



Universitat de València

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Doctorado: 3004

**Análisis de los factores que influyen en el
efecto de variantes genéticas en el riesgo
de obesidad y diabetes**

Tesis doctoral presentada por:

Eva M^a Asensio Márquez

Licenciada en Biología

Para la obtención del Grado de Doctora por la Universitat de València

Valencia, Mayo de 2017

Dirigida por los profesores:

Dolores Corella Piquer

Carolina Ortega Azorín



Universitat de València

Dolores Corella Piquer, Catedrática de universidad, del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València

Carolina Ortega Azorín, Técnico Superior de Investigación del centro de Investigación Biomédica en Red-Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn) y Profesora asociada del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral con el título: “**Análisis de los factores que influyen en el efecto de variantes genéticas en el riesgo de obesidad y diabetes**”, ha sido realizada por **Eva M^a Asensio Márquez**, bajo nuestra dirección, y reúne los méritos suficientes para que su autora obtenga el título de Doctora por la Universitat de València.

Y para que así conste, firman el presente certificado en

Valencia, a 25 Mayo de 2017

Dolores Corella Piquer

Carolina Ortega Azorín

Esta tesis doctoral se ha realizado durante el disfrute de las siguientes becas y contratos:

Beca para titulado superior pre-doctoral: CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. 01/01/2009-31/12/2010.

Beca de colaboración: adscrita a al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. RD 1493/2011. 16/01/2011-01/03/2011.

Contrato en prácticas: CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. 01/03/2011-28/02/2013.

Contrato Técnico Superior de Investigación: Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 08/03/2013-31/05/2014.

Contrato Técnico Medio de soporte a la Investigación: Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 01/07/2014 hasta la actualidad.

Dedicatoria

A mis padres, José y Antonia, y a mi hermana, Mercedes, por todo su apoyo,
comprensión y amor incondicional

A Carlos, por estar siempre a mi lado, por su paciencia, ayuda y preocupación tanto
en los buenos y como en los malos momentos. Sin ti, esto no hubiera sido posible

Agradecimientos

Deseo agradecer la realización de este trabajo:

A mis directoras de tesis por aceptarme para realizar esta tesis doctoral, por confiar en mi facilitándome todo lo necesario para la consecución de este trabajo.

A Caro, por enseñarme todo lo que sé en el laboratorio, por sus consejos, sinceridad y apoyo incondicional en los malos momentos. Has sido y serás una parte muy importante de mi vida. Estoy muy orgullosa de ser tu primera tesis dirigida.

A mis compis de café, Gema, Laura y Vicente, por todos los buenos momentos vividos y cuya amistad durará toda la vida.

A Rocío por vivir todo este proceso conmigo, siempre con una sonrisa y una palabra de ánimo. A mis compañeras Paula, Inma, Esther, Rebeca, Rosana, Raquel y Patricia por todo lo compartido estos años.

A Paco por su preocupación, paciencia y cariño, especialmente en momentos personales que reflejan la gran persona que es. A todos los compañeros del departamento, Olga, Marisa, Sorlí, Pepe y Carmen, siempre dispuestos a ayudarme.

A mis amigos (ellos saben quienes son) que, sin entender muy bien lo que estaba haciendo, han comprendido mis ausencias y me han animado y apoyado durante todos estos meses. Gracias de corazón.

A todos los participantes que han colaborado en el estudio PREDIMED y todas las personas que han facilitado su elaboración, sin su participación este trabajo no hubiera sido posible.

ÍNDICE

TERMINOLOGÍA.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1.- OBESIDAD	20
1.2.- DIABETES MELLITUS TIPO 2	31
1.3.- ETIOLOGÍA DE OBESIDAD Y DIABETES MELLITUS TIPO 2	40
1.4.- OBESIDAD, DIABETES Y OTROS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	71
1.5.- GENÉTICA DE LA OBESIDAD Y LA DIABETES	81
1.6.- EPIGENÉTICA DE LA OBESIDAD Y LA DIABETES.....	97
1.7.- INTERACCIONES DE LOS GENES	105
1.8.- PERSPECTIVA DE GÉNERO.....	114
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	117
2.1 HIPÓTESIS.....	117
2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	118
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	121
3.1.- INTRODUCCIÓN	121
3.2.- ESTUDIO PREDIMED.....	121
3.2.1 <i>Nodos participantes</i>	123
3.2.2.- <i>Selección de participantes</i>	123
3.2.3.- <i>Reclutamiento de participantes</i>	126
3.2.4.- <i>Recopilación de datos de los participantes</i>	127
3.3.- ESTUDIO PREDIMED PLUS	132
3.3.1.- <i>Selección de participantes</i>	133
3.3.2.- <i>Recopilación de datos de los participantes</i>	135
3.4.- DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	136

3.5.- ANÁLISIS GENÉTICO	140
3.6.- ANÁLISIS EPIGENÉTICO	147
3.7.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	153
4. RESULTADOS.....	161
4. 1.-GENERALIDADES.....	161
4. 2.- ESTUDIO PREDIMED.....	162
4.2.1.- Características generales de la población	162
4.2.2.- Características generales de la población en relación a la obesidad y la DMT2	165
4.2.3.- Estudio de las características relacionadas con el desarrollo de la obesidad y la DMT2	166
4.2.4.- Estudio genético de polimorfismos en genes candidatos y su asociación con obesidad, DMT2	181
4.2.5.- Estudio de posibles interacciones gen*ambiente sobre la obesidad, DMT2 y otros factores de riesgo cardiovascular	240
4.2.6.- Estudio de posibles interacciones gen*gen sobre la obesidad y la DMT2	259
4.2.7.- Estudio epigenético de genes relacionados con la obesidad y la DMT2	260
4.3.- ESTUDIO DE LA PUNTUACIÓN DE RIESGO GENÉTICO (GRS) EN POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA OBESIDAD Y LA DMT2	268
4.3.1.- Asociación de la puntuación del riesgo genético entre el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK y el polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 sobre la concentración de glucosa.	268
4.3.2.- Asociación de la puntuación del riesgo genético entre el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK y el polimorfismo rs822759 sobre la concentración de c-LDL.	270
4.4.- ESTUDIO PILOTO DE GWAS PARA LA SELECCIÓN DE NUEVOS POLIMORFISMOS CANDIDATOS RELACIONADOS CON OBESIDAD Y DMT2	271
4.4.1.- Estudios PREDIMED PLUS	271
4.4.2.- Replicación de los resultados en el estudio PREDIMED	284
5. DISCUSIÓN	291
5.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA Y EN RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD Y LA DMT2.....	292
5.2.- ASOCIACIÓN DE FACTORES AMBIENTALES CON OBESIDAD Y DMT2	296

5.3- ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ANALIZADOS CON LA OBESIDAD Y LA DMT2 Y DE LAS INTERACCIONES GEN*AMBIENTE	303
5.3.1- <i>Polimorfismos asociados con obesidad</i>	303
5.3.2.- <i>Polimorfismos asociados con DMT2</i>	317
5.3.3.- <i>Polimorfismos asociados con ancestro genético</i>	330
5.3.4- <i>Polimorfismos relacionados con la obesidad y la DMT2 analizados mediante genotipado de GWAs</i>	341
5.4.- ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES GEN*GEN	352
5.5.- ESTUDIO EPIGENÉTICO DE GENES RELACIONADOS CON OBESIDAD Y DMT2.....	354
5.5.- ESTUDIO DE LA PUNTUACIÓN DE RIESGO GENÉTICO (GRS) EN POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA OBESIDAD Y LA DMT2	364
5.6.- ESTUDIO PILOTO DE GWAs PARA LA SELECCIÓN DE NUEVOS POLIMORFISMOS CANDIDATOS RELACIONADOS CON OBESIDAD Y DMT2	365
6. CONCLUSIONES.....	369
7. BIBLIOGRAFÍA.....	373
8. ÍNDICE DE FIGURAS	469
9. ÍNDICE DE TABLAS	477

TERMINOLOGÍA

Las abreviaturas utilizadas en esta tesis son las siguientes:

5mC:	5-metilcitosina
ACV:	Accidente vascular cerebral
ADA:	American Diabetes Association
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AGM:	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP:	Ácidos grasos poliinsaturados
AgRP:	Péptido Agouti relacionado
AGS:	Ácidos grasos saturados
AHA:	American Heart Association
AIMs:	Ancestry Informative Markers
Ala:	Alanina
AOV	Aceite de oliva
ApoA5:	Apolipoprotein A5
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ASB3:	Ankyrin Repeat and SOCS box Containing
ATF6:	Activating transcription factor-6
AVC:	Accidente Vascular Cerebral
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAD:	Enfermedad coronaria arterial
CART:	Transcripto regulado por cocaína y anfetamina
CDKN2B:	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B
c-HDL:	Colesterol HDL
CI:	Cardiopatía isquémica
c-LDL:	Colesterol LDL
CLNK:	Citokine dependent hematopoietic cell linker
CLOCK:	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CNV:	Copy number variation
Cys:	Cisteína

DA:	Dopamina
DM:	Dieta Mediterránea
DMRTA1:	Doublesex-and Mab-3-related transcription factor A1
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2:	Diabetes Mellitus tipo 2
DNMT:	DNA metiltransferasas
EC:	Enfermedad coronaria
ECV:	Enfermedad cardiovascular
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU:	Estados Unidos
Epi:	Epinefrina
FAM5C:	Family with sequence similarity 5, member C
FS:	Frutos secos
FTO:	Fat mass and obesity associated
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
GLUT 4:	Transportador de la glucosa 4
GRS	Genetip Risk Score
GWAS:	Genome-wide association study
HbA1c:	Hemoglobina glicosilada
HOMA:	Homoeostasis model assessment
IAM:	Infarto Agudo de Miocardio
IDF:	International Diabetes Federation
IGT:	Impaired glucose tolerance
IL:	Interleucina
IMC:	Índice de Masa Corporal
INAFM2:	InaF-Motif-Containing Protein 2
INE:	Instituto Nacional de Estadística
IOTF:	International Obesity Task Force
IRE1:	Inositol-requiring protein-1
IRS1:	Insulin Receptor Substrate 1
KCNMA1:	Potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1
KLF14:	Krüppel like factor 14
LPL:	Lipoprotein Lipase
MAF:	Minor allelic frequency
MC4R:	Receptor de la melanocortina 4

miR:	microARN
MIST:	Mast cell immunoreceptor signal transducer
MODY:	Maturity-onset diabetes of the Young
MTNR1B:	Melatonin Receptor 1B
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NEpi:	Norepinefrina
NO:	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
nPKC:	Nueva proteína quinasa C
NPY:	Neuropéptido Y
NR1D1:	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1
OGG1:	8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PAD:	Presión arterial diastólica
PAI-1:	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAS:	Presión arterial sistólica
PB:	Par de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PCSK1:	Prohormona convertasa 1
PERK:	Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
PI 3-quinasa:	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PLCB1:	Phospholipase C beta 1
POMC:	Proopiomelanocortina
PPARGC1A:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1-alpha
PREDIMED:	Prevención con Dieta Mediterránea
PRMD16:	PR domain containing 16
Pro:	Prolina
QTL:	Quantitative trait locus
RAAS:	Sistema aldosterona-angiotensina-renina
RM:	Resonancia magnética
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
SCD1:	Stearoyl.CoA desaturase-1
SEEDO:	Sociedad Española para el estudio de la Obesidad
SENC:	Sociedad española de nutrición comunitaria
Ser:	Serina

SLC45A2:	Solute carrier family 45 member 2
SNP:	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNC:	<i>Sistema nervioso central</i>
SNS:	Sistema nervioso simpático
SOCS3:	Suppressor of cytokine signalling
TC:	Tomografía computerizada
TCF7L2:	Transcriptor Factor 7-Like 2
TG:	Triglicéridos
TLR:	Receptores Toll-like
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral
TRKB:	Tropomiosina relacionada con la quinasa B
UNESCO:	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
USDA:	Departamento de Agricultura de EEUU
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad
ZNF564:	Zinc finger protein 564

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles o enfermedades crónicas son actualmente la principal causa de defunción en todo el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas enfermedades causan la muerte a 38 millones de personas cada año a nivel mundial. Estas patologías afectan a todos los grupos de edad y a todas las regiones, aunque se suelen asociar a los grupos de población más avanzada excepto en países de ingresos bajos o medios donde se producen al año 16 millones de muertes en población menor de 70 años. Estas enfermedades se ven favorecidas por factores tales como el envejecimiento, una urbanización rápida y no planificada, y la mundialización de unos modos de vida poco saludables (OMS, 2014). Por tanto, estas enfermedades son reto muy importante dentro de la Salud Pública tanto por su mortalidad como por su morbilidad.

Dentro de las enfermedades crónicas se incluyen las enfermedades cardiovasculares (ECV), el cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes, siendo las enfermedades cardiovasculares a las que se asocian el mayor número de defunciones. En los últimos tiempos se ha visto una clara asociación entre la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), la obesidad y la enfermedad cardiovascular (Ortega FB et al, 2016). Individuos con DMT2 tienen un alto riesgo de sufrir una ECV. A su vez, se ha observado que, aproximadamente, el 80% de individuos con DMT2 son obesos y que la obesidad central y la grasa visceral conducen a la DMT2 y a la ECV a través de la resistencia a la insulina (Bhupathiraju SN and Hu FB, 2016). Por tanto, hay una relación muy estrecha entre estas tres patologías. Se estima que la DMT2 será la séptima causa de muerte a nivel mundial en 2030 y que la prevalencia de la obesidad se incrementará un 33% en las próximas dos décadas, sugiriendo que en 2030 el 51% de la población será obesa (Finkelstein EA et al, 2012). Estas estimaciones dan una visión global de la importancia de estas dos patologías como enfermedades en sí mismas y como factores de riesgo para el desarrollo de una posible enfermedad cardiovascular.

1.1.- Obesidad

La obesidad es considerada actualmente una enfermedad y, a su vez, un importante factor de riesgo de otras patologías como DMT2, hipertensión, dislipemia, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y depresión; y se asocia a un mayor riesgo de mortalidad (Volpe et al, 2016; Abdelaal M et al, 2017).

Sin embargo, el reconocimiento de la obesidad como enfermedad no se estableció hasta 1948 por la OMS en La Clasificación Internacional de Enfermedades, pero no se consideró un problema de salud pública. En 1975 se estableció en la categoría E65-67: “Obesidad y otra hiperalimentación”, pero durante estos años no se le dio importancia clínica ni tampoco se relacionó con un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. En los años 80, desde el punto de vista epidemiológico, la ganancia de peso se consideró como un factor de riesgo para la tensión arterial y para el aumento de los niveles de colesterol en sangre. No fue hasta 1995 cuando la OMS encontró grandes problemas de sobrepeso en muchos países desarrollados (James WPT, 2008).

Actualmente, la obesidad se considera un grave problema de salud pública a nivel mundial. La prevalencia de la obesidad ha aumentado alarmantemente tanto en países desarrollados como en países de economía de transición, adquiriendo proporciones epidémicas. Su prevalencia se ha doblado los últimos 30 años. Tanto es así, que se ha convertido en la segunda causa de mortalidad prematura y evitable, después del tabaco (Abdelaal M et al, 2017; Ackerman SE et al, 2017; Mejia de Grubb MC et al, 2017).

1.1.1.- Definición y clasificación

La OMS define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Esto conduce a una composición corporal cuyo contenido graso supera un estándar prefijado según la altura, edad y sexo de los individuos. Aunque la obesidad es considerada como equivalente al aumento de peso corporal, no siempre es así, ya que personas sin exceso de grasa pero con gran cantidad de tejido muscular podrían tener sobrepeso.

A nivel social, la obesidad está asociada a discapacidad, mortalidad y alto coste económico y de atención sanitaria. A nivel individual, la obesidad severa se asocia con múltiples problemas clínicos, como alteraciones en el sueño, dificultad respiratoria y problemas de movilidad, lo que afecta a la calidad de vida de la persona (Bischoff SC et al, 2016; Vats MG et al, 2016).

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial, fruto de la interacción entre el genotipo y el ambiente. Los factores que influyen en el cambio del peso corporal afectan el equilibrio entre el aporte de energía y el gasto energético. Tradicionalmente se asocia a una ingesta excesiva de comidas de alta densidad energética y un descenso de la actividad física. El aumento de la incidencia de la obesidad ocurre en países desarrollados, y está asociado a la urbanización, a un estilo de vida más sedentario debido a la reducción de actividad física en el trabajo así como en el tiempo de ocio, unido a un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes (Van der Klaauw AA and Farooqi IS, 2015).

También hay otros condicionantes ambientales como un nivel sociocultural y/o socioeconómico bajo o un entorno desfavorecido que actúan como determinantes para el desarrollo de la obesidad. A parte de estos factores ambientales, se ha comprobado que factores genéticos juegan un papel importante en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Actualmente se estima que hay más de 450 genes, marcadores y regiones cromosómicas relacionados con el fenotipo de la obesidad. Recientemente se ha observado que cambios epigenéticos también tienen relación con esta patología. La epigenética describe alteraciones estables del ADN y de las histonas que pueden alterar la expresión génica sin que se produzcan cambios en la secuencia del ADN. Dentro de los mecanismos epigenéticos se incluyen la metilación del ADN, remodelación de la cromatina, modificaciones de histonas entre otros (de Mello VD et al, 2014) (Figura 1.1).

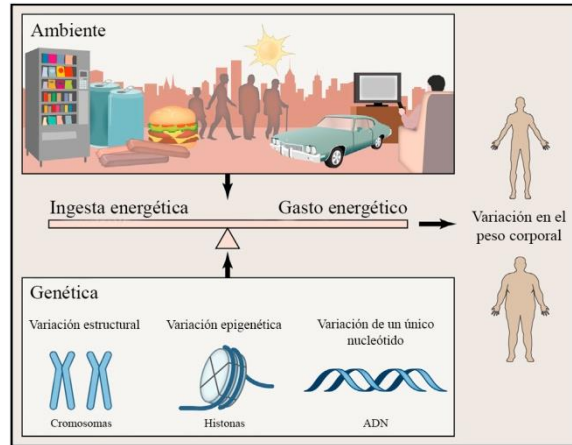


Figura 1.1.- Contribución de los factores genéticos y ambientales a la ganancia de peso. Figura modificada de (Van der Klaauw AA and Farooqi IS, 2015)

La obesidad es un exceso de grasa, es decir, de masa de tejido adiposo. Las células que conforman este tejido, los adipocitos, están adaptados para almacenar con eficacia el exceso de energía en forma de triglicéridos (TG) y, cuando sea necesario, liberar estos depósitos como ácidos grasos libres que pueden ser utilizados en otros lugares. Este sistema está regulado por vías endocrinas y nerviosas. Cuando los nutrientes son abundantes y la vida es sedentaria, este sistema incrementa los depósitos de energía del tejido adiposo con consecuencias adversas para la salud.

En función del porcentaje de grasa corporal, podríamos definir como sujetos obesos aquellos que presenten porcentajes de grasa por encima de los valores que se consideran normales, que son del 10% al 20% en varones y del 20 al 30% en mujeres adultas.

Aunque no es una medida directa de adiposidad, el método más utilizado para calibrar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC) que se define como el peso/talla² (kg/m²) (Dietz WH and Robinson TN, 1998; Keys A et al, 1972), pudiendo establecer un punto de corte para el sobrepeso y la obesidad. El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, puesto que es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. La OMS y el Grupo Internacional de Trabajo sobre la Obesidad (IOTF) recomiendan que se

utilice el IMC en estudios epidemiológicos que estimen la prevalencia del sobrepeso y la obesidad para que los resultados puedan ser comparables (OMS, 2000). La clasificación del sobrepeso y la obesidad según los criterios de la OMS (OMS 1997, OMS 1998) indican que un IMC = 30 kg/m² es el punto de corte para definir la obesidad y un IMC entre 25-29,9 kg/m² está definido como sobrepeso (Tabla 1.1).

Tabla 1.1.- Clasificación obesidad de la OMS adaptada de (OMS 1995, OMS 2000, OMS 2014)

Clasificación	IMC (kg/m ²)
	Puntos de corte
Bajo Peso	<18,50
Delgadez grave	<16,00
Delgadez moderada	16,00 - 16,99
Delgadez leve	17,00 - 18,49
Normopeso	18,50 - 24,99
Sobrepeso	≥25,00
Pre-Obeso	25,00 - 29,99
Obesidad	≥30,00
Clase I	30,00 - 34,99
Clase II	35,00 - 39,99
Clase III	≥40,00

La Sociedad Española para el estudio de la Obesidad (SEEDO), en un documento publicado en el año 1996 (SEEDO, 1996) introdujo unas modificaciones a la clasificación propuesta por la OMS, subdividiendo el sobrepeso en dos categorías y se introdujo un grado adicional de obesidad para pacientes con un IMC ≥ a 50 kg/m² que son tributarios de indicaciones especiales en la elección del procedimiento de cirugía bariátrica (Tabla 1.2).

Tabla 1.2.- Criterios de la SEEDO para definir la obesidad en grados según el IMC en adultos (SEEDO, 2007)

Categoría	Valores límite del IMC (kg/m²)
Peso insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5 - 24,9
Sobrepeso grado I	25,0 - 26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0 - 29,9
Obesidad de tipo I	30,0 - 34,9
Obesidad de tipo II	35,0 - 39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0 - 49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥ 50

Además del exceso de grasa, diversos estudios epidemiológicos han resaltado la noción introducida por el médico francés Dr. Jean Vague, la cual indicaba que las complicaciones halladas en los obesos estaban relacionadas con la distribución o localización del exceso de grasa más que el exceso en sí mismo (Vague J, 1947). Por tanto, la distribución del tejido adiposo en los distintos depósitos anatómicos también tiene un papel importante en relación con la morbilidad de la enfermedad. En especial, la grasa intraabdominal y subcutánea abdominal tienen mayor valor que la grasa subcutánea gluteofemoral que parece no representar una amenaza para la salud. Un aumento de la grasa intraabdominal, o grasa visceral, se relaciona mejor con la presencia de determinados factores de riesgo y de enfermedad cardiovascular (Rexrode KM et al, 1998; Yusuf S et al, 2005).

Aunque el IMC tiene una buena correlación con la masa grasa total, la medición de la distribución de la grasa se puede determinar con otros métodos diferentes, como pueden ser medidas antropométricas y otras técnicas como la densitometría, tomografía computerizada, la resonancia magnética y la impedancia eléctrica. Muchas de estas técnicas son caras y su uso está restringido, ya que su coste y su complejidad no permiten su uso generalizado. En cambio, las medidas antropométricas como son la talla, el peso, la medida de pliegues cutáneos y las circunferencias corporales, se han visto que son métodos sencillos y de bajo coste y que nos permiten evaluar el grado de obesidad y el porcentaje de grasa corporal.

Otros métodos antropométricos utilizados tanto en la práctica clínica como en investigación son la medición del diámetro sagital y la medida de las circunferencias. Es muy importante realizar las medidas correctamente, se deben tomar referencias óseas para hacerlo. Para la determinación de estos parámetros se necesita una cinta métrica flexible, milimetrada, siguiendo los criterios de referencia establecidos por la SEEDO en su consenso SEEDO 2000 (SEEDO, 2000):

- Diámetro sagital: Se mide con un calibrador abdominal tipo Holtein. Este indicador se valora estimando la distancia entre el ombligo y L4-L5 con el individuo en decúbito supino (Heymsfield SB et al, 1998). Cifras superiores a 25 cm para el diámetro sagital delimitan valores de riesgo (Pouliot MC et al, 1994). La medición del diámetro sagital presenta muy buena correlación con la acumulación adiposa perivisceral medida por tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RM)
- Perímetro de la cintura: Se determina con una cinta métrica con el sujeto en bipedestación, sin ropa y relajado. Se debe localizar el borde superior de las crestas ilíacas y por encima de ese punto rodear la cintura con la cinta métrica, de manera paralela al suelo, asegurando que la cinta esté ajustada pero sin comprimir la piel. La lectura se realiza al final de una espiración normal. Tiene una buena correlación con la acumulación de grasa perivisceral. En algunos trabajos se ha observado que el riesgo de complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad aumenta en los varones a partir de una circunferencia de la cintura ≥ 94 cm y en las mujeres ≥ 80 cm y este riesgo está muy aumentado para los varones a partir de valores ≥ 102 cm y en las mujeres ≥ 88 cm (Aranceta J et al, 1998). Los datos referidos a la circunferencia de la cintura de la población española permiten estimar parámetros de riesgo a partir de 95 cm en varones y 82 cm en mujeres, y riesgo muy elevado a partir de 102 cm en varones y 90 cm en mujeres. Pero el establecimiento de estos puntos de corte ha sido un tema controvertido, ya que se vieron que entre los grupos de población existe una variación de los niveles de obesidad en los cuales comienza a aumentar el riesgo de desarrollar otras afecciones sanitarias (Eckel RH et al, 2005). Por ello, la Federación internacional de diabetes creó un grupo de consenso incorporó umbrales de circunferencia de cintura específicos para cada etnia, estableciendo para la población europea ≥ 94 en varones y ≥ 80 en mujeres. (IDF, 2014 (b))

- Circunferencia de la cadera: Las medidas deberían realizarse con el sujeto desnudo o con ropa muy ligera, de pie con las piernas juntas, y los brazos relajados al costado del cuerpo. Para medir la cadera, localiza el trocánter mayor del fémur o hueso más prominente de la parte superior del muslo y realizar una marca. A este nivel debe hacerse la medición rodeando con la cinta métrica las caderas y sin comprimir la piel.
- Circunferencia del muslo: Se realiza midiendo el perímetro desde la raíz del muslo en sentido horizontal y paralelo al plano del suelo.

Tabla 1.3.- Valores de riesgo según la distribución de la grasa corporal (datos antropométricos) SEEDO 2000

Criterio	Valores límite	
	Varones	Mujeres
Índice cintura-cadera	> 1	> 0,90
	> 1	> 0,85
Circunferencia de la cintura SEEDO	> 95 cm	> 82 cm valores de riesgo
	> 102 cm	> 90 cm valores de riesgo elevado
National Institute of Health	> 102 cm	> 88 cm valores de riesgo
Diámetro sagital	> 25 cm	Valores de riesgo

1.1.2.- Epidemiología

La obesidad es un problema prioritario dentro del ámbito de la salud debido al gran número de personas afectadas, a sus graves consecuencias sobre la salud y a su gran trascendencia socio-sanitaria y económica. La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial que se ha relacionado con un incremento del riesgo de padecer alguna enfermedades, entre las que se encuentra la diabetes, hipertensión, dislipemias, ECV y ciertos tipos de cáncer (Heber D, 2010). Debido a que es la enfermedad metabólica más prevalente en los países desarrollados y en los países en vías de desarrollo, la OMS la ha catalogado como la “epidemia del siglo XXI”.

Actualmente, el aumento de la obesidad se ha dado tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo debido al abandono de sus tradiciones y costumbre y a la adopción de un estilo de vida más occidental. Sin embargo, estos cambios en el estilo de vida afectan de manera diferente a las personas lo que puede sugerir que los factores genéticos tienen un papel importante en la susceptibilidad de la obesidad (Van der Klaauw AA and Farooqi IS, 2015). Este fenómeno se podría explicar por la teoría del “gen ahorrador” propuesta por Neel (Neel V, 1962). Esta hipótesis sugiere que albergamos variantes genéticas que favorecen el eficiente mantenimiento de la reserva energética, como la grasa abdominal, para sobrevivir periodos de hambruna. En el periodo actual donde el acceso a los alimentos es más fácil, estas variantes genéticas son una desventaja, ya que estos “genes ahorradores” ahora hacen que tengan mayor susceptibilidad a desarrollar la obesidad.

A nivel mundial, según la OMS desde 1980 el número de personas obesas se ha doblado en todo el mundo. Acorde con sus datos, el 2014 más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. En porcentaje corresponde a un 39% de personas adultas tenían sobrepeso y el 13% eran obesas. En la figura 1.2 se muestra el incremento de la prevalencia a nivel mundial según la Federación Internacional de Obesidad. La prevalencia varía según los diferentes países y las diferentes etnias. Los valores van desde menos de un 5% en China, Japón y ciertos países de África y llegando superar el 75% en otros como Samoa (país que comprende un número de islas perteneciente al archipiélago de la Polinesia al sur del Pacífico) (Marie NG et al, 2014).

La proporción de hombres con sobrepeso ha aumentado del 28,8% en 1980 al 36,9% en 2013; la proporción de mujeres con sobrepeso ha aumentado del 29,8% al 38%. En países en vías de desarrollo, más hombres que mujeres tienen sobrepeso o son obesos; en los países desarrollados, sobrepeso y obesidad es más prevalente en mujeres que en hombres (Marie NG et al, 2014). Se ha comprobado un efecto negativo del sobrepeso y la obesidad en la salud. Se ha observado una asociación entre el IMC mayor de 23 kg/m² con ECV, cáncer, desarrollo de diabetes y enfermedades mentales (Wormser D et al, 2011; Flegal KM et al, 2013). La mayor parte de las muertes atribuibles al sobrepeso y la obesidad son muertes cardiovasculares (Lim SS et al, 2012).

Datos de revisiones sistemáticas sugieren que el 31% de riesgo de enfermedad coronaria y el 8% del riesgo de mortalidad por infarto de miocardio (IAM) asociados con la obesidad están mediados por una alta presión sanguínea y los niveles de CT (Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration, 2014).

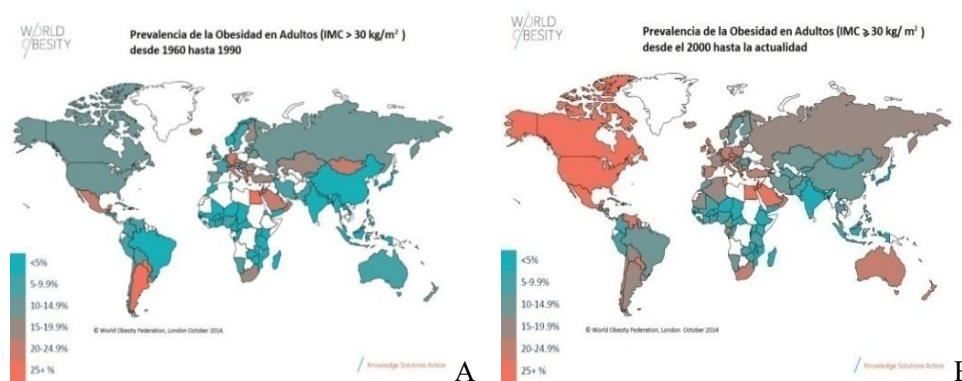


Figura 1.2.- Prevalencia de la obesidad en adultos desde 1960 a 1990 (A) y desde 2000 hasta la actualidad (B). Figura modificada de los mapas de la Federación Internacional de Obesidad

En Europa también ha habido un incremento en la prevalencia del sobrepeso y de la obesidad llegando a proporciones epidémicas pero no de una forma tan pronunciada. Existen unas grandes variaciones en la prevalencia de la obesidad en las distintas regiones de Europa. La prevalencia de la obesidad es mayor en los hombres que en las mujeres en 14 de los 36 países y la prevalencia de sobrepeso fue mayor entre los hombres en los 36 países (Branca F et al, 2007). Según estos estudios, la mayor prevalencia se encontró en Alemania (26,3%), Finlandia (25,7%), Estonia (23%) y Reino Unido (22,9%) (van Vliet-Ostapchouk JV et al, 2014). En la Figura 1.3 se muestra como en Europa, las regiones central, oriental y meridional las tasas de prevalencia son más altas. Las grandes variaciones en la prevalencia en las diferentes regiones europeas también pueden ser debidas en parte a su origen étnico. Se ha demostrado en diferentes estudios realizados con diversos grupos de inmigrantes (Gasevic D. et al, 2015) que el origen étnico es un factor importante y determinante de la obesidad con independencia de las condiciones socioeconómicas (Wahi G and Anand S, 2013; Chiu M. et al, 2015). En las últimas décadas, en distintos países europeos se ha dado una importante inmigración tanto de países del Este de Europa como de otros continentes.

Esta nueva población presenta sus propios hábitos alimentarios, carga genética y estilo de vida los cuales se encontraban adaptados a su realidad originaria pero, al emigrar, pueden caer en una inadaptación en su nuevo entorno social (Prentice AM, 2006).

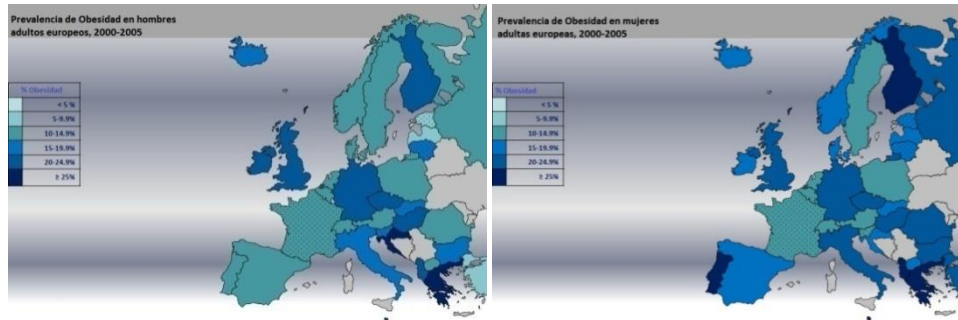


Figura 1.3.-Mapas de prevalencia de la obesidad en Europa entre 2000-2005 de hombres (izquierda) y mujeres (derecha). Figura modificada de los mapas de prevalencia de la Federación Internacional de Obesidad

En España también se ha visto un aumento de las patologías crónicas, incluida la obesidad. El valor de prevalencia de la obesidad en nuestro país se sitúa en un punto intermedio entre los valores más altos y más bajos de prevalencia en Europa. Como hemos comentado anteriormente, en España en los últimos años también han ocurrido cambios socio-demográficos que han influido en cambios en los hábitos alimentarios y de estilo de vida. Un exceso de aporte de energía por el consumo de alimentos de alta energía que contienen más grasas y azúcares añadidos junto con una disminución del gasto energético por una inactividad física tanto en el trabajo como en el hogar, en el transporte como en el tiempo libre o de ocio, ha conducido a un alejamiento de la dieta mediterránea (DM) tradicional y un aumento de la prevalencia de la obesidad. Según el Instituto Nacional de Estadística en la Encuesta Nacional de Salud realizada entre 2011 y 2012, de cada 100 adultos mayores de edad, 17 padecen obesidad y 37 presentes sobrepeso. La obesidad ha aumentado del 7,4% al 17% en los últimos 25 años. De cada 10 niños y adolescentes de 2 a 17 años, dos tienen sobrepeso y uno obesidad. Diferenciando por sexos, la obesidad afecta al 18% de hombre y al 16% de mujeres. Por tanto, en España un 53,7% de la población mayor de 18 años padece obesidad o sobrepeso. Otro dato extraídos de esta encuesta es la relación de la obesidad con la edad y la escala social en nuestro país. Respecto a la edad, la obesidad es más frecuente a mayor edad. Y con respecto al nivel social, la obesidad crece según se desciende en

la escala social, de 8,9% en la clase I a 23,7% en la clase VI. La prevalencia de la obesidad infantil (de 2 a 17 años), se mantiene relativamente estable desde 1987. Un 27,8% de esta población padece obesidad o sobrepeso. Otro de los datos importantes que se puede extraer de esta encuesta es el nivel de sedentarismo en el país. Cuatro de cada 10 personas (41,3%) se declara sedentaria (no realiza actividad física alguna en su tiempo libre), uno de cada tres hombres (35,9%) y casi una de cada dos mujeres (46,6%).

Se han realizado diversos estudios en España para conocer los valores de prevalencia. En ellos se observaron diferencias geográficas, tanto en hombre como en mujeres. La distribución geográfica de la obesidad por comunidades parece seguir un gradiente de norte a sur (Aranceta J et al, 2004; Gutiérrez-Fisac JL et al, 2012; Valdes S et al, 2014). Este patrón tradicionalmente se ha asociado al bajo nivel socioeconómico de las islas Canarias y el sur de España (Gutiérrez-Fisac JL et al, 1999). Por último, la disminución de la actividad física y el empeoramiento de los hábitos alimentarios los cuales han liderado la obesidad durante las últimas décadas, pueden ser más pronunciadas en el sur de España que en otras regiones debido a las diferentes circunstancias sociales y económicas (Serra-Majem L et al, 2000). En la Figura 1.4 se muestra la distribución de la prevalencia de la obesidad por Comunidades Autónomas según los datos obtenidos en el estudio ENRICA (2008-2010).

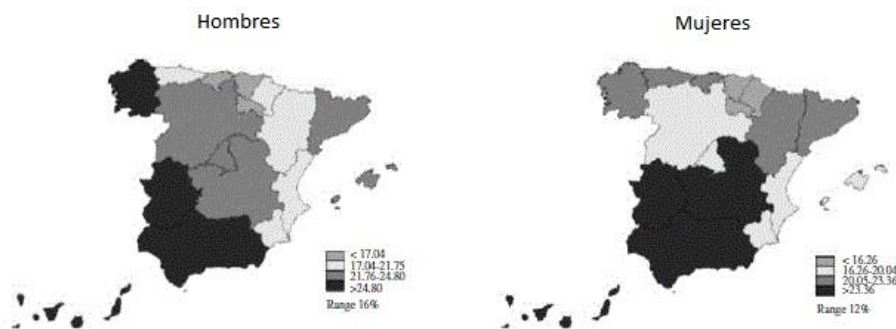


Figura 1.4.- Prevalencia de la obesidad por comunidades autónomas, Estudio ENRICA (Gutiérrez-Fisac JL et al, 2012)

En la Comunidad Valenciana el estudio de la obesidad se ha realizado a través de la Encuesta de Salud de la Comunidad Valenciana (Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat, 2010). En el año 2010 el 37,3% de la población adulta presenta sobrepeso, porcentaje algo superior al registrado en la anterior encuesta realizada en la Comunitat Valenciana, mientras que el porcentaje de población obesa, crece a lo largo de todo el periodo (14,5% de la población). También se observaron diferencias según el sexo en el porcentaje de población que presenta sobrepeso, el 45,4% de los hombres frente al 29% de las mujeres. En el caso de la obesidad, las diferencias entre sexos no son tan acusadas, 15% en hombre y 13,7% en mujeres.

1.2.- Diabetes Mellitus tipo 2

La prevalencia de la DMT2 ha aumentado alarmantemente en los últimos 20 años hasta considerarla como una epidemia a nivel mundial. Aunque existe una predisposición genética que establece una susceptibilidad, cambios ambientales como el estilo de vida han hecho que aumente la incidencia esta enfermedad. Dentro de la diabetes, la tipo 2 ha aumentado con mayor rapidez a nivel mundial debido a un aumento en la frecuencia de la obesidad así como una disminución en los niveles de actividad física.

1.2.1.- Definición y clasificación

Según la OMS, la diabetes es una condición que se define inicialmente por el nivel de hiperglucemia que dirige a un aumento en el riesgo de daño microvascular (retinopatía, nefropatía y neuropatía). Está asociada a un descenso de la esperanza de vida, una importante morbilidad debido a las complicaciones microvasculares indicadas, un aumento de riesgo de complicaciones macrovasculares (enfermedades isquémicas cardíacas, apoplejía y enfermedades vasculares periféricas), y una disminución de la calidad de vida (OMS, 2006; Trikkalinou et al, 2017)

La diabetes es un desorden metabólico caracterizado por un defecto en la secreción de la insulina, un defecto en su acción o ambas. Las células no pueden absorber la glucosa que está en el torrente sanguíneo para usarla como energía. Esto provoca un elevado nivel de azúcar en sangre o hiperglucemia. Esta hiperglucemia crónica se asocia con daños en nervios y en los vasos sanguíneos que conducirán a

complicaciones como enfermedades coronarias, ictus, enfermedades renales, ceguera, enfermedades dentales e, incluso, amputaciones. No se conoce como comienza el proceso que causa la diabetes pero se cree que tanto los genes como los factores ambientales contribuyen a su aparición. La DMT2 se caracteriza por una resistencia a la insulina y por las características del síndrome metabólico, que son hipertensión arterial, hiperglucemia, niveles elevados de TG, bajos niveles sanguíneos de c-HDL y obesidad abdominal (Bertoluci MC and Rocha VZ, 2017).

En el desarrollo de la diabetes están implicados diversos procesos patogénicos que conduce a una deficiencia de insulina y anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas que derivan en una deficiencia en la acción de la insulina en los tejidos diana. Como consecuencia, estas anormalidades llevan a una resistencia a la acción de la insulina.

El grado de hiperglucemia puede cambiar en el tiempo dependiendo de lo extendida que esté la enfermedad. En el inicio del proceso de la enfermedad puede causar lo que se denomina estado prediabético. En 1997 y 2003, El Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997; Genuth S et al, 2003) reconocieron un grupo de individuos los cuales tenían unos niveles elevados de glucosa pero que no cumplían los criterios para diagnosticarlos como diabéticos. Por eso acuñaron el término “Prediabetes” para individuos con una alteración de la glucosa en ayuno o intolerancia a la glucosa y que indicaba un aumento en el riesgo de un desarrollo futuro de la enfermedad. Estos dos síntomas están relacionados con la obesidad, especialmente la grasa visceral, la dislipemia con altos niveles de TG y/o bajo c-HDL e hipertensión.

En individuos con diabetes, un control adecuado de la glucemia puede conseguirse con una reducción de peso, ejercicio y/o antidiabéticos orales. Estos individuos no requieren insulina. Otros individuos con una secreción residual de insulina requieren un aporte de insulina exógena para un control de la glucemia adecuado pero pueden sobrevivir sin ella. Por último, individuos con una extensa destrucción de células β no tienen ninguna secreción residual de insulina por lo que necesitan un aporte exógeno para sobrevivir. La gravedad de la anormalidad metabólica puede progresar, retroceder o mantenerse igual (Deepa M et al, 2017).

La diabetes es una enfermedad mucho más heterogénea que la subdivisión clásica. Tradicionalmente esta enfermedad se ha subdividido en dos categorías que se designan como tipo 1 y tipo 2. Y ambos parecen ser el resultado de combinación entre genes y factores ambientales. Son antecedidos por una fase de metabolismo anormal de la glucosa. Pero esta subdivisión es una simplificación y no describe realmente la amplitud de la enfermedad. Según la Sociedad Americana de Diabetes (ADA), la clasificación del tipo de diabetes depende de las circunstancias en el momento del diagnóstico. Actualmente, a la subdivisión clásica de tipo 1 y 2 se pueden añadir nuevas subdivisiones como la diabetes gestacional y otros tipos específicos que pueden conducir al desarrollo de la DM2 como pueden ser defectos monogénicos de las células β , enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por químicos o drogas, infecciones, formas poco comunes de diabetes mediada por procesos inmunes y otros síndromes genéticos asociados con diabetes.

La DM2 es una enfermedad poligénica y multifactorial. Su patogénesis no está claro pero se sabe que, además de poseer un fuerte componente genético, factores ambientales como la obesidad, la nutrición y la actividad física modulan el fenotipo. La DM2 se caracteriza por una menor secreción de insulina, por la resistencia a esta hormona, por una producción excesiva de glucosa por el hígado y por el metabolismo anormal de la grasa (Chatterjee S et al, 2017). Esta forma de diabetes agrupa el 90-95% de los casos de la enfermedad. Anteriormente se definía como diabetes no dependiente de insulina o diabetes adulta (Lian JX et al, 2017). Muchos de estos pacientes sufren obesidad, la cual en sí misma produce resistencia a la insulina. En personas que no están obesas puede que hayan incrementado el porcentaje de grasa distribuido por la región abdominal. Normalmente, la enfermedad no es diagnosticada hasta años después de su aparición debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente e inicialmente los pacientes no sufren los síntomas clásicos de la diabetes. En estos individuos aumenta el riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares y macrovasculares (Dambha-Miller H et al, 2017).

El riesgo de desarrollar esta enfermedad aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física (Thibault V et al, 201). Ocurre más frecuentemente en mujeres con una diabetes gestacional previa y en individuos con hipertensión o dislipemia y hay variaciones dentro de los subgrupos étnicos. En las etapas iniciales de la enfermedad, la tolerancia a la glucosa sigue siendo casi normal, a pesar de la

resistencia a la insulina porque las células β del páncreas lo compensan al incrementar la producción de la hormona. Si la resistencia a la insulina sigue aumentando surge hiperinsulinemia compensatoria. Los islotes pancreáticos de algunas personas no pueden ya el estado hiperinsulinémico y aparece el trastorno de la tolerancia a la glucosa (IGT). El IGT se caracteriza por incremento en el nivel de glucemia posprandial. La disminución subsiguiente en la secreción de insulina y el incremento de la producción de glucosa por el hígado concluyen en la diabetes con hiperglucemia en ayunas. Y, por último, surge insuficiencia de las células β .

Como se ha acaba de comentar, la secreción de la insulina aumenta inicialmente en respuesta a la insulinoresistencia, con el fin de mantener una tolerancia normal de la glucosa. Al principio el defecto de la secreción de insulina es leve y afecta a la secreción de insulina estimulada por glucosa. Este defecto en la secreción avanza progresivamente hasta un estado inadecuado de secreción. Las razones de este trastorno no están claras, se piensa que lo causa un defecto genético. Se conocen varios factores que pueden influir en este trastorno. Se ha visto que la hiperglucemia crónica altera la función de los islotes y lleva a un empeoramiento de la hiperglucemia, lo que se denomina “toxicosis por glucosa”. Además, la elevación de los valores de ácidos grasos libres también empeora el funcionamiento de los islotes (“lipotoxicosis”). Finalmente, la masa de células β disminuye en personas con DMT2 de larga evolución.

La resistencia hepática a la insulina refleja la incapacidad de la hiperinsulinemia de suprimir la gluconeogénesis, lo que produce hiperglucemia en ayunas y disminución del almacenamiento de glucosa en el hígado en el periodo posprandial. Como resultado de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo y la obesidad, el flujo de ácidos grasos libres desde los adipocitos aumenta y hace que aumente la síntesis de VLDL y TG en los hepatocitos. Este almacenamiento de lípido o esteatosis del hígado puede provocar hepatopatía grasa no alcohólica y anomalías de la función hepática. Esta situación también ocasiona la dislipidemia que aparece en la DMT2 (incremento de TG, disminución c-HDL e incremento de c-LDL).

Actualmente se considera que la obesidad visceral forma parte del proceso patogénico de la diabetes. La presencia de mayor masa de adipocitos hace que aumente la producción de ácidos grasos libres y de algunas adipocinas. La producción de estos ácidos grasos disminuye la utilización de glucosa por parte de

este músculo de fibra estriada, estimula la producción de glucosa por el hígado y disminuyen la función de las células β . En la obesidad disminuye la producción de adiponectina por parte de los adipocitos (péptido insulinosensibilizante) y contribuye a la resistencia a la insulina por parte del hígado (Chatterjee S et al, 2017; Keane KN et al, 2017).

1.2.2.- Epidemiología

La DMT2 es una enfermedad metabólica muy común en todo el mundo cuya prevalencia aumenta en los últimos tiempos, tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo. El cambio en el estilo de vida de estas sociedades, tendiendo a llevar una vida más sedentaria junto con una dieta en alto contenido calórico, puede ser la razón de este alarmante aumento a nivel mundial (Chatterjee S et al, 2017).

Según la OMS (OMS, 2015), en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes. Se calcula que en el 2012 murieron más de 1,5 millones de personas en el mundo como consecuencia del exceso de glucosa en la sangre en ayunas. Según las proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad a nivel mundial en el 2030. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) ha estimado la prevalencia de la diabetes desde el año 2000. En un estudio hecho por IDF para estimar la prevalencia en 2013 (Guariguata L et al, 2014) se vio que alrededor de 381,8 millones de adultos en 219 países y territorios sufrían esta enfermedad y se cree que este número aumentará has 591,9 millones en 2035. Con estos datos obtenidos se calcula que una aumento de adultos con diabetes en el 2035 de un 55%. Hay diferencias regionales también en el valor de prevalencia.

Los países con un alto número de población adulta también presentan mayor número de personas con DMT2. Ocho de los diez países más poblados del mundo se encuentran entre los 10 países con mayor número de adultos con diabetes. China tiene 98,4 millones de personas que padecen diabetes seguida por la India. Si se ajustan los datos respecto a la población del país, calculando la prevalencia en porcentaje, la zona del mundo con mayor prevalencia es Tokelau, archipiélago situado en Oceanía, y Micronesia (Forouhi NG and Wareham NJ, 2014). Esta prevalencia también se ha visto que está relacionada con el grado de desarrollo económico del país. La gran mayoría de personas diabéticas provienen de países con recursos bajos o en vías de desarrollo. Además, se prevé una aumento de de

población adulta con diabetes mucho mayor en países de bajos recursos (109%) y en vías de desarrollo (60%) que en países desarrollados (28%) (Figura 1.5).

Se ha comprobado que la prevalencia de la diabetes aumenta con la edad en todas las regiones independientemente del grado de desarrollo del país. La mayor prevalencia se encuentra en personas con edades comprendidas entre los 60 y 79 años (18,6%), aunque parece que el patrón está empezando a cambiar. En países desarrollados, las personas que padecen diabetes están mayoritariamente por encima de los 50 años (74%) pero en países de bajos recursos y en vías de desarrollo el 59% de casos de diabetes se dan antes de los 50 años. Esto se puede deber diversos factores incluyendo que hay una mayor mortalidad por la enfermedad en esos países. Particularmente en países en vías de desarrollo, el cambio demográfico que se está dando, con un aumento en la esperanza de vida, el descenso de enfermedades infecciosas y altas tasas de urbanización, conduce a un aumento en la prevalencia de la diabetes.

En 2004, la OMS estimó que en el 2030 el número de personas con DMT2 superaría los 366 millones a nivel mundial. La IDF estimó desde 151 millones en el 2000 hasta los 382 millones en el 2013, por lo que se ha superado ampliamente las previsiones de la OMS muchos años antes de lo previsto. Una de las razones por las que ha habido este aumento de prevalencia puede ser debido a que la mortalidad debida a la DMT2 ha descendido y los sistemas sanitarios están intentando prevenir muertes por complicaciones derivadas de la enfermedad, aunque no hay una evidencia estudiada. Otro factor que puede contribuir al aumento de la prevalencia es el aumento de sus factores de riesgo como son la edad, obesidad, predisposición genética e inactividad física. Esto puede hacer que las previsiones para el 2035 aumenten ya que están calculadas solamente en base al aumento de población y urbanización.

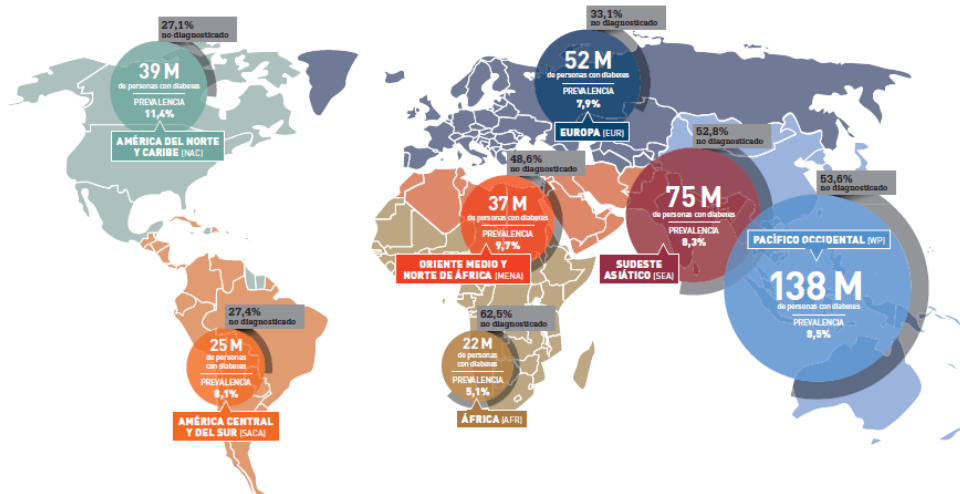


Figura 1.5.- Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes, actualización de 2014 ([IDF, 2014](#) (a))

En Europa en la estimación de la prevalencia para el 2013 se ha visto que los países con más alto porcentaje son Alemania, Portugal, Serbia y Turquía si el valor se ajusta a la población de cada país (Tabla 1.4). España sería el quinto país con mayor prevalencia de la DMT2 en Europa. Si se tienen en cuenta estos datos con los valores ajustados a la población mundial, el orden de países con mayor prevalencia cambia, siendo Turquía el que tiene mayor porcentaje, seguida de Serbia, Portugal, Alemania y Rusia. En todos los países se prevé un aumento de la prevalencia de la diabetes para el 2035.

Tabla 1.4.- Prevalencia de la diabetes (%) en Europa en 2013 y estimación para el 2035. Figura modificada de (Guariguata L et al, 2014)

País	Prevalencia ajustada a la población nacional (%)		Prevalencia ajustada a la población mundial (%)	
	2013	2035	2013	2035
Bielorrusia	6,3	7,4	5,1	5,1
Bélgica	6,4	7,3	4,8	4,8
República Checa	9,2	10,8	6,9	7,0
Francia	7,5	8,2	5,4	5,5
Alemania	11,9	14,1	8,3	8,3
Grecia	7,0	8,6	4,8	4,9
Hungría	7,6	8,5	6,0	6,1
Italia	7,9	9,8	5,1	5,2
Kazajistán	4,9	5,8	5,0	5,0
Holanda	7,5	9,0	5,2	5,3
Polonia	6,5	7,9	5,2	5,2
Portugal	13,0	15,8	9,6	9,8
Rumania	5,1	6,4	4,0	4,0
Rusia	10,0	11,6	8,3	8,3
Serbia	12,4	14,7	9,9	10,2
España	10,8	14,4	8,2	8,3
Suecia	6,4	6,6	4,7	4,7
Turquía	14,6	18,5	14,9	15,1
Ucrania	3,0	3,4	2,5	2,5
Reino Unido	6,6	7,4	4,9	5,0
Uzbequistán	5,0	7,1	6,4	6,5

En España, según la Encuesta Europea de Salud realizada en 2009, la prevalencia se calculó en un 5,9%, teniendo más presencia en hombre que en mujeres. Según La Encuesta Nacional de Salud realizada entre 2011-2012 (www.ine.es), las patologías crónicas donde se incluye la DMT2 siguen su tendencia ascendente en nuestro país. Desde 1993 la diabetes ha aumentado del 4,1% al 7% calculado en el 2012.

Entre 2009-2010 se realizó en España el primer estudio nacional para examinar la prevalencia de la DMT2 (Soriguer F et al, 2012). Se estimó que la prevalencia total de la diabetes ajustada por sexo y edad es de un 13,8% y se corroboró, como antes se ha mencionado, que aumentaba significativamente con la edad y que se presentaba más en hombres que en mujeres (Figura 1.6). Estos datos coinciden con los diferentes estudios europeos realizados, donde la prevalencia de la DMT2 es más baja en gente menor de 60 años (<10%) que en la población entre 60-80 años (10-20%). La diferencia de prevalencia entre países puede ser debido a diferencias en la prevalencia de la obesidad, la actividad física o los patrones de alimentación.

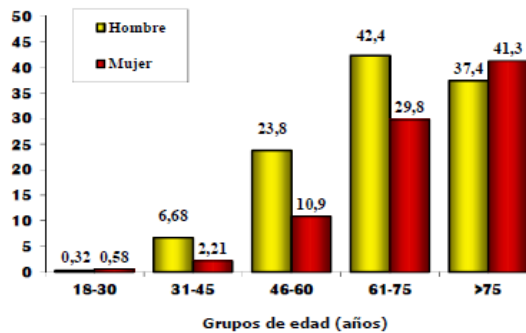


Figura 1.6.- Prevalencia de la diabetes en España: distribución por sexos y grupos de edad en % Gráfica Estudio Di@betes.es (CIBERdem, 2012)

La presencia de DMT2 se ha visto relacionada con la obesidad abdominal, hipertensión, bajo c-HDL, alto nivel de TG y antecedente familiares de diabetes. Otro de los factores que en España se ha visto relacionado significativamente con la DMT2 es el nivel de educación. Un bajo nivel educativo aumenta un 28% el riesgo de tener DMT2. Un nivel socioeconómico bajo se ha asociado con un pobre estado de salud, altas tasas de mortalidad y de ECV y un aumento de la prevalencia de la diabetes (Soriguer F et al, 2012).

1.3.- Etiología de Obesidad y Diabetes Mellitus tipo 2

Tanto la obesidad como la DMT2 son enfermedades crónicas, complejas y multifactoriales, producto de la interacción de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida, siendo estos últimos una parte muy importante para la aparición de estas patologías (Corella et al, 2009; Boles A et al, 2017; Jellinger PS et al, 2017; Wells JC, 2017). A continuación, se detallan los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de estas dos enfermedades.

1.3.1.-Factores Sociodemográficos

1.3.1.1.- Edad y Sexo

La incidencia de la obesidad sigue una línea ascendente en ambos sexos, pero con diferencias entre ellos. Estas diferencias se incrementan con la edad (Varela-Moreiras et al 2013). El aumento de la obesidad con la edad se asocia con el aumento de la grasa corporal la cual se distribuye de manera diferente a la población más joven. De la misma manera, la disminución de la masa muscular y la altura es algo asociado al envejecimiento (Hajek et al, 2015). Con la edad, la masa magra, incluyendo la masa muscular, va disminuyendo y aumenta la masa grasa, que se acumula sobre todo en el área central, tanto visceral como abdominal (Yoneshiro et al, 2011; Lee CG et al 2011; Lee M-J et al 2012) y se da tanto en hombres como en mujeres. Este exceso de masa grasa corporal se asocia a mayor riesgo de muerte, se estima que las personas obesas mueren 10 años antes que personas con un peso corporal estándar (Greenberg, 2013). Este mayor riesgo se debe a que el acúmulo de grasa produce un mayor riesgo de complicaciones metabólicas como la hipertensión, la DMT 2, ECV, enfermedades pulmonares y cáncer. La asociación entre el IMC y el riesgo de muerte se deben a procesos patológicos como la resistencia a la insulina, anormalidad en los niveles de lípidos, alteraciones hormonales e inflamación crónica (Adams et al, 2006; Abdelaal M et al, 2017; Ackerman SE et al, 2017).

Respecto al sexo, se ha visto que las mujeres tienden a tener más riesgo de obesidad. Esta mayor prevalencia de obesidad en mujeres aparece en todos los continentes (Mauvais-Jarvis F, 2015) Esto es debido a la diferente distribución del tejido adiposo en hombres y en mujeres. En hombre, la distribución de grasa es de tipo androide, con mayor proporción de grasa en la parte abdominal, mientras que

las mujeres el mayor acúmulo de grasas se presenta en la zona glúteo- femoral (Bouchard C, 1997). Además, las mujeres almacenan el tejido adiposo en áreas subcutáneas que son áreas con una función de almacenamiento a largo plazo. Mientras que en los hombres, se acumula en la grasa visceral que es más activa metabólicamente (Palme BF and Clegg DJ, 2015). Estas diferencias de distribución se deben a factores hormonales, con un predominio de testosterona en hombres y de estrógenos en mujeres (Bann D et al, 2015; Shea K et al, 2015). En mujeres durante la menopausia se producen cambios en la distribución de la grasa corporal, incrementándose en la zona intraabdominal (Zhang H and Sairam MR, 2014). Por último, también hay una correlación entre la ganancia de peso y la paridad. Si se tiene en cuenta el ratio cintura-cadera como medida de la adiposidad, se encuentra una correlación positiva entre este ratio y dar a luz, siendo mayor cuando se tienen hijos. Este incremento también se da con el aumento del número de hijos. Se calcula que la ganancia de peso asociado a tener uno o más hijos es de 3-6 kg, considerando una ganancia de 2-3 kg en el primer alumbramiento y de 1,7 kg en los siguientes (Shirazian T et al, 2016).

Con respecto a la DMT2, también se ha observado diferencias en la incidencia de la enfermedad con respecto a la edad y el sexo de la persona que la padece. En términos generales, a nivel mundial se observa mayor prevalencia de DMT2 en hombre que en mujeres (Wändell PE and CarlssonSC, 2014) y las personas con edad más avanzada tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Lopez JM et al, 2014). Si se estudia más detalladamente, esta diferencia de incidencia de la patología entre sexos ocurre a unos rangos de edades concretos. La DMT2 afecta más a hombres entre los 30-49 años de edad que a las mujeres. A partir de los 50 años de edad estas diferencias entre sexos se van reduciendo e, incluso, desaparecen (Bu S et al, 2015). Se ha comprobado que estas diferencias entre los sexos no se deben a factores genéticos sino a otro tipo de factores. Se asocia esta mayor prevalencia en hombres a una mayor obesidad abdominal y una mayor resistencia a la insulina, ya se ha observado estas dos características en hombre sin diabetes (Gale EA and Gillespie KM, 2001; Logue J et al, 2011). La deposición de la grasa en la zona abdominal provoca que haya una menor oxidación de la grasa, es decir, una menor utilización de la grasa corporal como energía en lugar de los carbohidratos. Esto provoca que los hombres sean más propensos a desarrollar la DMT2 en respuesta a un aumento de obesidad. Por tanto, los hombres son diagnosticados unos 3-4 años antes que las mujeres y con un menor IMC (1-3 kg/m² más en hombres) (Wändell PE and CarlssonSC, 2014).

Otros factores que se asocian a la diferencia entre sexos son los factores modificables o de estilo de vida. El consumo de tabaco, la hipertensión, la dislipemia, la carencia de actividad física, el mayor consumo de alcohol y un menor control en la dieta se dan más frecuentemente en hombres que en mujeres y contribuyen al desarrollo de la DMT2 (Bomberg E et al, 2017).

Como hemos indicado, el riesgo de desarrollar la DMT2 es mayor en adultos mayores, sobre todo a partir de los 65 años. A partir de esa edad, el riesgo de complicaciones debidas a esta enfermedad, como pueden ser IAM, problemas de visión o problemas renales aumenta. Una vez superados los 75 años, el riesgo de muerte por hiperglucemia es significativamente más alto que entre 65-74 años. (Kirkman MS et al, 2012). Los adultos mayores tienen más riesgo a desarrollar esta patología debido a los efectos combinados de un aumento de resistencia a la insulina junto con una deficiente función de los islotes pancreáticos debido al envejecimiento. Los factores que contribuyen a una resistencia a la insulina asociada al envejecimiento pueden ser la adiposidad visceral, inflamación, estrés oxidativo y una pérdida intrínseca de la sensibilidad a la insulina en las fibras musculares. El descenso en la función pancreática se debe a un descenso en la masa de los islotes pancreáticos y en la capacidad proliferativa de las células β . Todo ello provocará un descenso en la secreción de insulina. (Halter JB et al, 2014).

1.3.1.2.- Nivel socioeconómico y cultural

En numerosos estudios se ha observado una relación entre la prevalencia del sobrepeso y la obesidad y el nivel socioeconómico y cultural. La relación de estos factores depende del grado de desarrollo del país, ya que en países un alto nivel socioeconómico y cultural se asocia a una baja prevalencia de obesidad. En países en vía de desarrollo hay una asociación positiva entre las clases altas socioeconómicamente y un mayor índice de obesidad (Cohen AK et al, 2013). Esta asociación se observa especialmente en mujeres ya que en hombres los resultados son más inconsistente (Sulander TT and Uutela AK, 2007; Roskan AJ et al, 2010).

El desarrollo económico de un país conduce a un aumento de accesibilidad a la comida barata y de alto contenido energético a los grupos socioeconómicos bajos. En la población de alto nivel socioeconómico tienden a tener una alimentación con menos grasa y hay mayor prevalencia de dietas. En la población con menos recursos económicos consumen dietas altas en calorías y menos fruta y verdura (Marin AR et al 2008; McLeod DL et al, 2016).

Se ha observado que un nivel educativo menor, un menor salario y un menor estado ocupacional se relaciona con una mayor prevalencia de obesidad en mujeres, mientras que en hombres es el menor nivel educativo y el menor estado ocupacional lo que afecta a la prevalencia de la obesidad (Kuntz B and Lampert T, 2010). Un mayor nivel de educación disminuye el riesgo de obesidad (Sulander TT and Uutela AK, 2007). El estudio MONICA realizado en 26 países a nivel mundial por la OMS observó esta relación inversa entre el nivel educacional y el IMC en todas las mujeres y en la mitad de la población masculina (Molarius A et al, 2000).

En relación con la DMT2, se ha observado una relación entre un nivel socioeconómico bajo y la incidencia de la enfermedad. Se ha visto un incremento del riesgo de DMT2 en los grupos de nivel socioeconómico bajo comparados con los grupos de alto poder adquisitivo, medido por el nivel educativo, la ocupación o los ingresos o salario. El bajo nivel socioeconómico lleva a una mayor prevalencia de la DMT2 y, por tanto, a una mayor mortalidad por esta patología (Espelt A et al, 2008; Dalsgaard EM et al, 2015). Esta relación se ha visto en estudios con poblaciones jóvenes (entre 30-64 años) así como estudios con una población de edad más avanzada (a partir de 50 años) (Smith BT et al, 2011; Espelt A et al, 2013)

Otro factor que contribuye es el acceso a los servicios sanitarios, que puede ser menor en los grupos más desfavorecidos. (Agardh E et al, 2011; Dalsgaard EM et al, 2015). Si se estudia el nivel socioeconómico a lo largo de la vida, se observa que mujeres con un bajo nivel socioeconómico en la infancia y adolescencia basado en el nivel económico de los padres, también se reflejarán en el trabajo, los ingresos y el prestigio social a la edad adulta, tienden a sufrir un mayor riesgo de DMT2, aunque esta asociación no es tan consistente en hombres (Smith BT et al, 2011; Sacerdote C et al, 2012).

Dentro de los tres factores que anteriormente se han indicado que se utilizan para medir el nivel socioeconómico, es el nivel educativo el más sencillo y universal. La asociación entre el nivel de estudios y el riesgo de DMT2 y sus complicaciones es consistente en diferentes países (Blomster JI et al, 2017; Funakoshi M et al, 2017; Heltberg A et al, 2017). Menor nivel educativo aumenta el riesgo de la enfermedad. En contraste, un alto nivel educativo se asocia con salud de diferentes maneras. Estas personas pueden ser más receptivas a los mensajes de prevención, pueden tener mayor capacidad o aptitud para cambiar su comportamiento en su salud y tender a usar de manera más correcta los servicios del sistema de salud (Sacerdote C et al, 2012). Dentro de los diferentes niveles educativos se han observado diferencias muy elevadas entre la educación terciaria con respecto a la educación elemental o secundaria (Espelt A et al, 2008; Chatterjee S et al, 2017).

1.3.1.3.- Distribución geográfica y etnia

La prevalencia de la obesidad varía en función de la distribución geográfica (Budnik A and Henneberg M, 2017; Hassapidou M et al, 2017). En los países desarrollados encontramos más frecuentemente ratios de obesidad mayores en áreas rurales, todo lo contrario en lo que ocurren en los países en vías de desarrollo donde se observa mayor prevalencia en las zonas urbanas que en las rurales (Popkin BM et al, 2012). Nuevas evidencias sugieren que estos patrones están cambiando lo que demuestra que la prevalencia de la obesidad está muy relacionada con la distribución de las desigualdades en salud.

En España se ha observado también diferencias geográficas en la distribución de la obesidad, mostrando un gradiente norte-sur. Las comunidades del sureste del país y las Islas Canarias, así como las localidades del noroeste, son las regiones con más prevalencia de esta patología (Serra-Majem LI and Bautista-Castaño I, 2013; Gutiérrez-Fisac JL et al, 2012) que históricamente se ha asociado a sus circunstancias económicas y sociales (Serra-Majem L et al, 2000). Los resultados del estudio ENRICA, realizado entre 2008 y 2010 en España mostró que la comunidad autónoma con la prevalencia de obesidad más alta era el doble que la comunidad con menor prevalencia. Las regiones del Principado de Asturias y Extremadura presentaban las máximas prevalencias en ambos sexos, mientras que en Murcia e Islas Baleares era mayor en hombre y en Andalucía y las Islas Canarias en las mujeres (Guallar-Castillón P et al, 2014).

Este gradiente también se ha observado en estudios de prevalencia de la obesidad en otros países como EEUU, donde también se ha visto que existe una mayor prevalencia en el sureste del país (Le A et al, 2014) mientras que en otros países como Inglaterra es justo al contrario, ya que se encuentran mayores prevalencias de la patología en las regiones del norte del país (Scarborough P and Allender S, 2008). La prevalencia de la obesidad también cambia según la etnia. Se han comprobado diferencias étnicas en estudios en diferentes países (Sarkar et al, 2010; Seamans MJ et al, 2015; Hill SE et al, 2015). En España, un estudio sobre la obesidad en inmigrantes en Madrid mostró que la prevalencia era mayor en esta población que en la española, a excepción del grupo de occidentales. Los inmigrantes varones de Europa del Este y Latinoamérica y las mujeres de África, Asia y Europa del Este presentaban más casos de obesidad (Marin-Guerrero AC et al, 2010).

Como ocurre con la obesidad, la prevalencia de la DMT2 varía según la situación geográfica (Chatterjee S et al, 2017). En general se ha visto que hay diferencias según la región y si el entorno, ya que varía según si es urbano o rural, debido a que existen diferencias en el control de la enfermedad, la adherencia a la medicación y la mortalidad por esta patología (Lynch CP et al, 2015). En relación a la etnia de la población, se ha observado que personas de ciertas razas y grupos étnicos tienen mayor probabilidad de tener diabetes. En concreto la población afroamericana, la población hispana y personas de ascendencia del sur de Asia (Mather R et al, 2010; Egede LE et al, 2011; Menke A et al, 2014). Está muy bien documentado que las minorías étnicas tienen mayor prevalencia de diabetes debido a múltiples factores, como pueden ser factores biológicos o clínicos así como factores sociales y del sistema de salud.

1.3.2.- Factores Ambientales

1.3.2.1.- Consumo y abandono del tabaco

Es ampliamente conocido que existe una relación entre el consumo de tabaco y la regulación del peso corporal. Una creencia de la cultura popular es que el fumar ayuda a controlar el peso corporal. En varios estudios se ha observado que las personas fumadoras pesan una media de entre 4-5 kg menos que los no fumadores y que dejar de fumar produce un aumento en el peso, lo que a su vez puede

dificultar el éxito del cese del hábito tabáquico (Williamson et al, 1991; Chiolero A et al, 2008; Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011; Bush T et al, 2016).

Esta ganancia de peso puede mitigar los beneficios en la salud que se consiguen al dejar de fumar. Por ejemplo, el incremento de peso puede contribuir al aumento de riesgo de DMT2 y de hipertensión (Janzon E et al, 2004) y reducir la mejora en la función pulmonar que se confiere el cese del consumo del tabaco (Chinn S et al, 2005). El peso corporal está determinado por el balance entre la ingesta calórica y el gasto energético. Hay diversos motivos por los que el tabaco puede disminuir el peso corporal. Desde el punto de vista psicológico, los cigarrillos pueden servir como un comportamiento alternativo a comer, por lo que disminuye la ingesta de alimentos (Bush T et al, 2016). Por otro lado, se ha visto que la nicotina media el descenso del peso mediante un descenso del apetito y un incremento del metabolismo (Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011). Concretamente, la nicotina interactúa con el sistema de melanocortina en el cerebro a través de la activación de los receptores nicotínicos de la acetilcolina en las neuronas proopiomelanocortina del núcleo del hipotálamo. Estas neuronas se proyectan a neuronas secundarias que influyen en el apetito, y la nicotina conduce a la activación de la liberación de antagonistas de la melanocortina 4, produciendo una supresión del apetito (Thorgeirsson TE et al. 2013).

La nicotina también aumenta el efecto de la leptina, hormona liberada por el tejido adiposo y que actúa centralmente suprimiendo la ingesta calórica y aumentando el metabolismo. La liberación de hormonas como la norepinefrina, la dopamina, la serotonina y el ácido γ -aminobutírico por el sistema SNC que se ha comentado anteriormente, también influyen en el descenso del apetito y un aumento de metabolismo corporal (Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011; Morton GJ et al, 2014). Este mecanismo de pérdida de peso a través del consumo del tabaco está resumido en la Figura 1.7.

El consumo de tabaco es un factor de riesgo muy importante no sólo en el caso de la obesidad. Fumar provoca un estado de inflamación crónica que causa disfunción endotelial, aumenta la trombogénesis, se asocia con un perfil lipídico aterogénico y puede causar resistencia a la insulina. Por tanto, también se considera un factor de riesgo para la DMT2 (Kar D et al, 2016). El cese del consumo del tabaco debería disminuir el riesgo de la enfermedad, pero varios estudios han mostrado que la ganancia de peso después del cese del consumo de tabaco puede aumentar,

paradójicamente, el riesgo de DMT2 (Stein JH et al, 2014). Diversos estudios han puesto de manifiesto que las personas muy fumadoras, con una evidencia de inflamación sistémica y con una ganancia sustancial de peso, son los que más riesgo a desarrollar DMT2 tienen. El descenso de niveles de adiponectina en plasma que provoca la nicotina puede ser uno de los mediadores en la asociación entre fumar y la DMT2. Esta hipoadiponectidemia causa la resistencia a la insulina y al desarrollo de la DMT2 (Hilawe EH et al, 2015). Varios estudios que han investigado esta relación entre el abandono del consumo de tabaco y el riesgo de DMT2, muestran que el riesgo de DMT2 disminuye conforme aumentan los años del cese del consumo, aunque los años que se requieren para que el riesgo vuelva a ser el mismo que para individuos no fumadores no se ha podido concretar de forma consistente todavía (Luo J et al, 2013; Maddatu J et al, 2017).

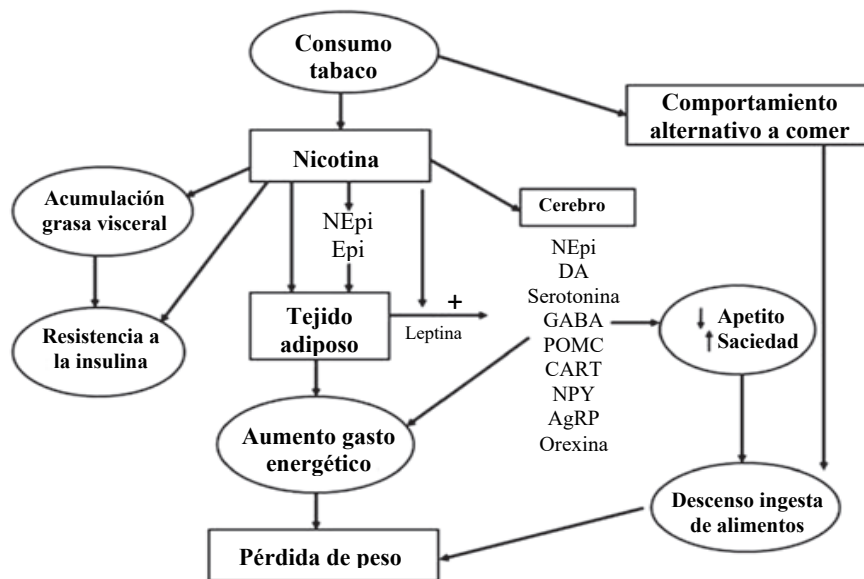


Figura 1.7.- Mecanismo por el cual el consumo de tabaco reduce el peso corporal. Fumar reduce el peso aumentando el gasto energético e inhibiendo el aumento compensatorio de ingesta calórica. La nicotina aumenta el gasto energético por efecto directo en los tejidos periféricos mediado por catecolaminas, y por efecto en los circuitos neuroendocrinos del SNC. Esto conducen a la supresión del apetito y fumar puede servir como comportamiento alternativo a comer. AgRP, péptido relacionado con Agouti; CART, transcripción regulada de cocaína y anfetamina; DA, dopamina; Epi, epinefrina; GABA, ácido γ -aminobutírico; NEpi, norepinefrina; NPY, neuropéptido Y; POMC, proopiomelanocortina. Figura modificada de Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011

1.3.2.2.- Actividad física

Se define la actividad física como “cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos del que resulta un incremento sustancial del gasto energético en reposo”. Dentro de este concepto se incluye el ejercicio físico, definido como “actividad física planeada, estructurada y hecha con el objetivo de mejorar o mantener la condición física”. Un tercer concepto importante es el sedentarismo o “cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos del que no resulta un incremento sustancial del gasto energético en reposo” (OMS, 2011).

El balance energético se ha considerado fundamental para evitar el sobrepeso y la obesidad. Un desequilibrio entre la ingesta energética y el gasto energético puede dar lugar a la ganancia o la pérdida de grasa corporal (Hall KD et al, 2011). Un desequilibrio en el balance energético puede ser debido a una falta de control en la ingesta o un descenso del gasto energético (Palou A et al, 2000).

El gasto energético se produce por la pérdida de energía en forma de calor por la termogénesis, que en humanos se activa al aumentar la tasa metabólica basal, inducida por la acción de nutrientes y hormonas y la demanda energética propia de la actividad física (SEEDO, 2007). El gasto energético es proporcional al grado de actividad física y ejercicio, definiendo la actividad física como movimiento corporal producido por la contracción del músculo esquelético, lo que aumenta el gasto energético; y el término ejercicio como una actividad física planificada hecha con la intención de mejorar la salud física, es decir, mejorar la función respiratoria y cardiovascular, la fuerza o la flexibilidad (Colberg SR et al, 2010).

Hay una fuerte evidencia epidemiológica que apoya que comportamientos sedentarios están asociados adversamente con riesgos en la salud y el papel del ejercicio en la prevención de la obesidad y la DMT2 (Curtis GL et al, 2017; Füzéki E et al, 2017; Wewege M et al, 2017). La intensidad y la duración de la actividad física también afecta ya que a mayor intensidad más gasto de energía por unidad de tiempo y, a mayor duración, mayor gasto de energía total (Curtis GL et al, 2017). Adicionalmente, la práctica de ejercicio aumenta la masa muscular, el metabolismo basal, se consume más oxígeno y, por tanto, el gasto energético aumenta (López-Mojares LM, 2006).

Los músculos consumen energía derivada de la grasas y del glucógeno (Zhang Y et al, 2014). La práctica de ejercicio también mejora el perfil lipídico, aumentando el c-HDL, y el metabolismo de la glucosa (Hu FB, 2003).

La práctica de ejercicio físico es muy efectiva tanto en la prevención como en la pérdida de peso y como en el mantenimiento del mismo a lo largo del tiempo (Pate RR et al, 2015; Street SJ et al, 2015). Las recomendaciones de actividad física para la salud según la OMS se dividen según grupos de edad. Conforme envejecemos, el máximo volumen de oxígeno en la sangre que nuestro organismo puede transportar y metabolizar disminuye, así como la fuerza. Por ello, para personas mayores de 65 años, se recomiendan 150 minutos a la semana de actividad física moderada o 75 minutos a la semana de actividad vigorosa (OMS, 2010).

Se debe tener en cuenta que muchas personas con obesidad que tienen una vida sedentaria tienen poco interés en comenzar a realizar una actividad física, definiendo el sedentarismo como cualquier comportamiento caracterizado por un gasto energético menor o igual al equivalente metabólico a estar sentado o reclinado (Sedentary Behaviour Research Network, 2012).

Por ello, hay que fomentar un estilo de vida menos sedentaria, fomentando el incremento de actividades cotidianas que generan un gasto calórico e ir incrementando la intensidad poco a poco (SEEDO, 2007) (Figura 1.8). El ejercicio reduce la ingesta calórica, aumentando la eficiencia saciante de la comida (Fock KM and Khoo J, 2013).



Figura 1.8.- Pirámide de actividad física en adultos (SEEDO, 2007)

Se ha observado también que individuos que aumentan sus niveles de actividad física tienen un riesgo 36% menor de desarrollar DMT2 (Aune D et al, 2015; Arena R et al, 2017). En este caso también se observa una relación de la intensidad de la actividad y la enfermedad, ya que una actividad vigorosa está asociada más consistentemente con la reducción del riesgo de DMT2 que andar. Una actividad física alta también se relaciona con otros factores de riesgo para la DMT2, como son menor prevalencia de obesidad, menor prevalencia de consumo de tabaco y mayor consumo de dietas altas en fibra y cereales integrales y menor consumo de carnes rojas y procesadas (Aune D et al, 2015; Melo LC et al, 2017).

La contracción muscular al realizar el ejercicio mejora la homeostasis de la glucosa incrementando el consumo de glucosa por el músculo esquelético por la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 a las membranas celulares del músculo esquelético y aumentando la actividad de la glucosa sintasa (Colberg SR et al, 2010). Una actividad física regular mejora la sensibilidad a la insulina (Mayer-Davis EJ et al, 1998), el control glucémico (Avery L et al 2012) y el perfil metabólico de personas mejorando el metabolismo lipídico y disminuyendo la presión arterial (Siegel et al, 2009).

Desplazar el tiempo que se está sentado por un ejercicio ligero regular tiene un gran efecto positivo en los niveles de insulina y lípidos plasmáticos que una única hora de actividad física más intensa. Interrumpir tiempos sedentarios prolongados con frecuentes periodos de actividad física ligera es suficiente para conseguir beneficios metabólicos (Falconer CL et al, 2015).

1.3.2.3.- Dieta

La dieta es un factor determinante para la salud. La composición de la dieta es un factor muy importante para la prevención del desarrollo tanto de la obesidad como de la DMT2 (Jung CH and Choi KM, 2017; Sun Y et al, 2017).

Inicialmente en 1980, el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) y el Departamento de Salud y Servicios Humanos publicaron conjuntamente las Guías Alimentarias para los americanos. En 1992, el USDA diseñó una guía dietética, en forma de pirámide, con el fin de trasladar los objetivos nutricionales a un lenguaje que la población estadounidense pudiera entender y llevar a la práctica (USDA, 1995; Krauss MR et al, 2000). En ella se recomendaba el tipo y la frecuencia de

consumo de cada alimento para llevar a cabo una dieta saludable. Se basaba en una dieta baja en grasas donde se recomendaba una reducción del consumo total de grasas $\leq 30\%$. Esta pirámide oficial del gobierno de EEUU tuvo gran influencia sobre otros gobiernos, incluso en España. Sin embargo, diversas premisas en las que se basa esta pirámide han sido ampliamente discutidas, de hecho, no se distingue entre los diferentes tipos de grasa y además se recomienda un consumo mínimo de éstas. Se considera, también todos los carbohidratos iguales y se indica que se consuman en grandes cantidades, el origen de las proteínas es indiferente y no contiene una guía para la ingesta de alcohol y la realización de ejercicio físico. Todo ello, junto con las crecientes tasas de obesidad hicieron que el USDA introdujera en Abril de 2005 una nueva versión llamada “Mi pirámide” (Figura 1.10). En esta ocasión, las bandas, en vez de ser horizontales, descienden verticalmente desde la cúspide de la pirámide hasta la base, insistiendo en la necesidad de moderación, tiene en cuenta el tipo de grasa, incentiva el consumo de carnes magras frente a carnes rojas, recomienda el consumo de cereales integrales, además incorpora el concepto de que la dieta debe adecuarse a la necesidades individuales, de modo, que invita a los consumidores a seleccionar alimentos ajustados a sus necesidades calóricas y agrega una nueva categoría; el ejercicio regular (USDA, 2005). Actualmente, se han sustituido las pirámides por My plate (Harvard, 2016)

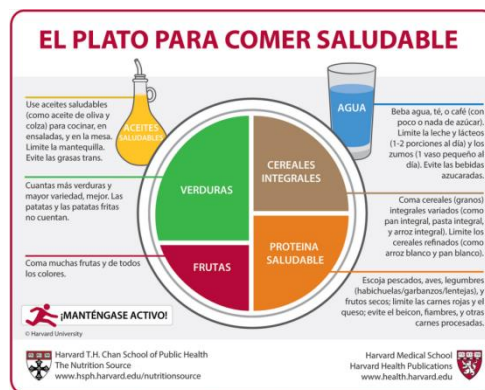


Figura 1.9.- El plato para comer saludable (Harvard, 2016)

Esta pirámide se extendió a otros países usada como referencia de la alimentación saludable, e incluso se ha adaptado para algunos tipos de dieta. En España, la Sociedad Española de Nutrición comunitaria (SENC) elaboró una Guía de Alimentación Saludable (SENC, 2004) que incluyó una Pirámide de la Alimentación (Figura 1.11 .A). Esta pirámide fue actualizada en 2016 (SENC, 2016). La dieta, según la concepción de la SENC no sólo comprende los alimentos que ingerimos, sino que dieta implica “estilo de vida” por lo que se debe complementar con la práctica diaria de ejercicio físico moderado y ajustar la ingesta de alimentos de acuerdo al nivel de actividad habitual para mantener el peso corporal en los niveles deseables. En el 2015 se ha presentado la nueva pirámide nutricional donde, además de los objetivos nutricionales o recomendaciones, también se incorporan conceptos novedosos como la importancia de los alimentos de temporada, la sostenibilidad, la cocina doméstica, la importancia del etiquetado nutricional o disfrutar de la alimentación en compañía (Figura 1.11.B) (SENC, 2015).

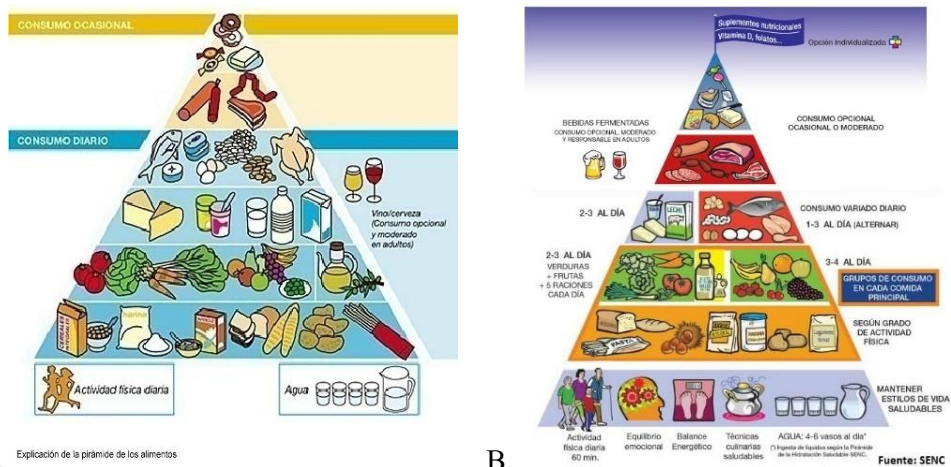


Figura 1.10.- Pirámide de la Alimentación Saludable SENC del 2004(A) y del 2015 (B)

El alarmante incremento de la obesidad y la DMT2 en todo el mundo pone de manifiesto la necesidad de estudiar la efectividad de las diferentes dietas para perder peso (Nordmann AJ et al, 2011; Sackner-Bernstein et al, 2015), entre las que podemos destacar las dietas bajas en carbohidratos, las dietas bajas en grasas y la DM.

Las dietas bajas en carbohidratos a corto plazo pueden dar resultados beneficiosos con lo que respecta a la pérdida de peso. Se ha observado además, que pueden disminuir los niveles de glucosa, insulina y TG, incrementar los niveles de c-HDL e, incluso, disminuir la resistencia a la insulina lo que protegería frente a un posible desarrollo de DMT2. Esto se traduce en una rápida pérdida de peso y un aumento de la saciedad (Khazrai YM et al, 2014). Pero no se ha podido observar estos beneficios a largo plazo (Dyson P, 2015). Con lo que respecta a las dietas bajas en grasas con alto contenido en carbohidratos, pueden producir un descenso del peso pero se ha visto un efecto adverso de las mismas ya que pueden aumentar los niveles de TG y disminuir los niveles de c-HDL. Otro aspecto a considerar es que, debido a la baja palatabilidad de esta dieta, es más proclive al abandono (Hession M et al, 2009).

1.3.2.3.1.- Dieta mediterránea

El término de DM agrupa las diferentes culturas alimentarias presentes en los países de la cuenca del mar Mediterráneo que se encuentra en continua evolución. No existe una única DM sino unas variaciones adaptadas a las diferentes culturas de los países. El concepto de DM se puede definir, más que como una dieta, como unos patrones característicos de alimentación de los países mediterráneos con variaciones culturales y de estilo de vida entre ellos. (Dernini S and Berry EM, 2015; Dernini S et al, 2017). Estos patrones de alimentación se caracterizan por un alto consumo de AOV, frutas, verduras, cereales (en su mayoría integrales), FS y legumbres; un consumo moderado de pescado, marisco, aves, productos lácteos (principalmente queso y yogurt) y huevos; y un bajo consumo de carne roja, carne procesada y dulces; junto con consumo regular pero moderado de vino durante las comidas (Trichopoulou A and Lagiou P, 1997).

En la última década, la DM ha sido objeto de estudio, además de por su efecto favorable en la salud, por su sostenibilidad medioambiental, debido a que sus patrones alimentarios se basan principalmente en plantas y tienen menor emisión de gases de efecto invernadero y menor impacto ecológico en el agua que otros patrones alimentarios (Almendros SS et al, 2013; Donini LM et al, 2016; Dernini S et al, 2017). Por tanto, la DM no es sólo un patrón nutricional saludable, si no que es un estilo de vida que recoge formas de cocinar, costumbre y productos típicos del lugar.

La consideración de la DM como dieta saludable surgió a partir de estudios nutricionales realizados en Grecia, donde se detectó una incidencia de arteriosclerosis, ECV y enfermedades degenerativas inferiores a la media y una mayor esperanza de vida. Basándose en estos antecedentes, de 1958 a 1964, Ancel Keys, realizó un extenso estudio epidemiológico denominado "Estudio de los siete países", para investigar los hábitos dietéticos de siete países entre los que figuraban cinco países no mediterráneos: EEUU, Japón, Finlandia y Holanda, y tres mediterráneos: Yugoslavia, Italia y Grecia (Keys A et al, 1986). Tras 15 años de seguimiento, se observó que la esperanza de vida en los países del Mediterráneo era mayor y presentaban una menor incidencia de mortalidad coronaria, aspectos que ponían de manifiesto las características saludables del tipo de dieta que seguían estos participantes. Además, se observó que la principal característica diferencial de la DM era la relación entre ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos saturados (AGM/AGS) ya que a mayor consumo de AGM y menor consumo de AGS, menor mortalidad cardiovascular. A través de este estudio, A. Keys definió por primera vez el concepto de DM como: *“La DM se caracteriza por un elevado consumo de pan, de legumbres, de arroz, de frutas y verduras. Es fundamental la utilización de AOV, así como típico un consumo moderado de vino en las comidas. Abundante en FS y pescado, la DM es escasa en carnes rojas y grasas de la leche”*. Además, Keys reconoce la importancia del *“estilo de vida mediterráneo”* que se caracteriza por: personalidad más tranquila libre de estrés, uso frecuente de la siesta, alto grado de comunicación entre los habitantes de los pueblos y elevado apoyo social, tradiciones culinarias como comidas en casa y consumo habitual de alimentos poco procesados, frescos y de temporada, alto grado de ejercicio físico, y clima suave que favorece los paseos todo el año.

En enero de 1993, en la “International Conference on the Diets of the Mediterranean” que tuvo lugar en Cambridge se inició la elaboración de una serie de guías alimentarias que reflejaban la variedad de las tendencias tradicionales que históricamente se habían relacionado con una mejor calidad de vida. De esta manera, se definió en la literatura científica el concepto de *DM tradicional óptima* (Willett WC et al, 1995(a)). Los rasgos característicos de la dieta que seguían las poblaciones de la región mediterránea fueron plasmados en forma de pirámide, como alternativa a la pirámide de USDA. La Pirámide Mediterránea que se presentó en 1994 en San Francisco en la “Oldways International Conference on the Diets of the Mediterranean”.

A final del año 2010, la UNESCO inscribió a la DM como uno de los elementos de la Representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad, describiéndola de la siguiente forma; “*La DM (derivada de la palabra griega *dáita*, forma de vida) es un conjunto de conocimientos, competencias prácticas, rituales, tradiciones y símbolos relacionados con los cultivos y cosechas agrícolas, la pesca y la cría de animales, y también con la forma de conservar, transformar, cocinar, compartir y consumir los alimentos de la cuenca del Mediterráneo. Este elemento del patrimonio cultural inmaterial pone de relieve los valores de hospitalidad, buena vecindad, diálogo intercultural y creatividad, así como un modo de vida que se guía por el respeto de la diversidad*” (UNESCO, 2010).

Ese mismo año, la Fundación Dieta Mediterránea junto con diversas entidades internacionales y expertos de diversas disciplinas, actualizaron la pirámide nutricional, donde se seguía las mismas pautas que la anterior pero se incluyeron indicaciones culturales y sociales siguiendo el estilo de vida mediterráneo (Figura 1.12).

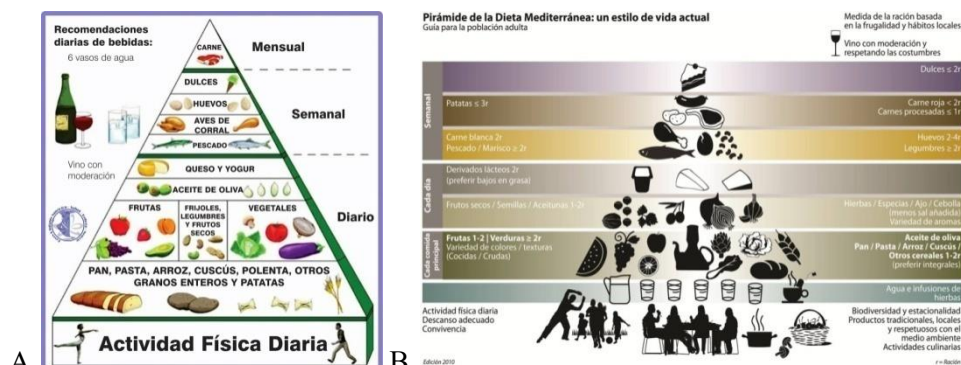


Figura 1.11.- Pirámide de DM Tradicional Óptima (A) (Willett W et al, 1995) y Pirámide de la DM (B) (Bach-Faig A et al, 2011)

En la base de la pirámide están los alimentos de consumo diario y conforme se estrecha la pirámide se va reduciendo la frecuencia de consumo de los respectivos alimentos. Según esta nueva actualización, para seguir los patrones de DM se deben cumplir diez puntos: 1) Se debe utilizar el AOV como principal grasa, ya que es rico en vitamina E, β -carotenos y AGM que le confieren propiedades cardioprotectoras. 2) Se deben consumir alimentos de origen vegetal

abundantemente (verduras, frutas y hortalizas) que son una fuente principal de vitaminas, minerales y fibras. Se deben consumir al menos 3 piezas de fruta y dos raciones de verduras de manera diaria. 3) El pan y los alimentos procedentes de cereales (arroz y pasta) se deben consumir preferentemente integrales y de manera diaria. 4) Se deben consumir alimentos poco procesados y de temporada. 5) Se deben consumir productos lácteos, principalmente queso y yogurt de manera diaria ya que son fuente de proteínas de alto valor biológico, minerales y vitaminas. 6) Las carnes rojas o procesadas hay que consumirlas con moderación. 7) Consumir pescado azul 1-2 veces por semana debido a que su grasa se considera que tiene efecto cardioprotector y consumir huevos con moderación (2-4 por semana). 8) La fruta fresca debe ser el postre habitual y los dulces o pasteles consumirlos muy ocasionalmente. 9) El agua es fundamental en nuestra dieta y el vino se debe tomar con moderación y en las comidas. 10) Es muy recomendable hacer ejercicio físico todos los días ya que es tan importante como comer bien.

Gran parte de los efectos beneficiosos asociados a la DM se atribuyen a su alto contenido en AGM y sus alimentos con propiedades antioxidantes que mejoran la presión arterial, la sensibilidad a la insulina, el perfil lipídico y las moléculas inflamatorias circulantes (Ros E et al, 2014; Widmer RJ et al, 2015; Dinu M et al, 2017).

Entre los alimentos característicos que destacan de la DM se encuentran el consumo de AOV, el consumo moderado de vino y los FS. El AOV virgen es la principal fuente de grasa vegetal compuesta por AGM, en su mayor parte ácido oleico. Contiene componentes bioactivos y antioxidantes como polifenoles, fitoesteroles y vitamina E que tienen efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos y tienen un papel fundamental en la reducción del estrés oxidativo y mejorar la función endotelial (Guasch-Ferré M et al, 2014; Scoditti E et al, 2014; Covas MI et al, 2015). El consumo moderado de vino de manera diaria se ha asociado a un menor de riesgo de ECV (Chiva-Blanch G et al, 2013; Tresserra-Rimbau A et al, 2015; Gémes K et al, 2015; Parkinson L, Cicerale S, 2016; Hernáez Á et al, 2017). Esto puede ser debido a su composición ya que, entre otros componentes, el vino es rico en diferentes polifenoles, que se dividen en flavonoides como la quercetina, con elevada actividad antioxidante; y no flavonoides como el resveratrol, con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Giacosa A et al, 2014; Artero A et al, 2015). Los FS presentan una composición de ácidos grasos

beneficiosa debido a que tienen un bajo contenido de AGS y cerca de la mitad de su contenido de ácidos grasos insaturados, la mayor parte de AGM, aunque contienen un parte de ácidos grasos poliinsaturados (AGP), predominantemente ácido linoleico (Ros E and Mataix J, 2006). Además, las nueces poseen una alta proporción de ácido α -linoleico (AGP de la serie 3), ácido graso al que se le atribuye un importante efecto antiaterogénico (Harper CR and Jacobson, 2003; TARusso GL, 2009, Damasceno NR et al, 2013). Los FS poseen otros nutrientes con efectos potencialmente beneficiosos debido a que son una fuente de fibra, arginina (precursor del ácido nítrico), ácido fólico, vitaminas y polifenoles antioxidantes (Ros E, 2015; Di Daniele N et al, 2017). Otro de los componentes básicos de la DM son los cereales. Contribuyen en gran medida al aporte calórico total y son fuente de carbohidratos, fibra dietética y proteína, ricos en vitaminas del grupo B, vitamina E y un gran número de minerales principalmente hierro, zinc, magnesio y fósforo (Márquez-Sandoval F et al, 2008).

Los cereales se deben consumir integrales preferentemente, ya que tienen una gran cantidad de fitoestrógenos y diferentes antioxidantes que se van perdiendo en el caso de los cereales refinados por los procesos a los que están sometidos. El consumo de cereales integrales está relacionado inversamente con el desarrollo de aterosclerosis y, por tanto, con un menor riesgo de ECV (Zhang G and Hamaker BR, 2016). Es debido al alto contenido en fibra, vitaminas, minerales, antioxidantes y otros componentes vegetales como los fitoesteroles, que se encuentran en el salvado y el germen que se desprende al procesar el cereal (Mellen PB et al, 2008). Las legumbres que incluyen lentejas, garbanzos, judías, guisantes y habas, aportan a la dieta un alto contenido en carbohidratos y proteínas de origen vegetal, además de fibra, niacina y ácido fólico. Su alto contenido en fitosteroles e isoflavonas pueden ayudar a reducir los niveles de colesterol contribuyendo a reducir el riesgo de ciertas enfermedades crónicas. Otros alimentos propios de la DM como por ejemplo el pescado, las frutas y verduras, también son fuente de diversas sustancias capaces de mejorar diferentes factores de riesgo cardiovascular a través de múltiples mecanismos, contribuyendo muy posiblemente a explicar también el menor riesgo de enfermedad arteriosclerótica y de ciertos tipos de cáncer que presenta la población de países mediterráneos (Márquez-Sandoval F et al, 2008; Dinu M et al, 2017). Existen otros componentes no nutrientes que son muy característicos de la DM, como son las especias para cocinar. Su utilización incrementa el sabor y la patabilidad de los alimentos, reduciendo la adición de sal o

grasa al cocinar. Estas especies contienen altos niveles de antioxidantes y polifenoles (Bower A et al, 2016).

Dentro del patrón de DM, hay ciertos alimentos que hay consumir de manera más esporádica y prudente. Entre ellas está la carne que no contiene fibra ni componentes antioxidantes pero son ricas en proteínas de alto valor biológico, por lo que deben formar parte de la dieta pero con un consumo prudente porque tienen un alto contenido en AGS. Dependiendo de la composición de la grasa y de su contenido en hierro, la carne se puede clasificar en dos tipos. La carne blanca o magra, es decir, el pollo, pavo y conejo, tiene menor aporte graso (entre un 13-15%) por lo que es la más recomendada para consumir. La carne roja que proviene del cordero o la ternera, contiene mayor cantidad de grasa (22-26%). Debido a su alto contenido en AGS y colesterol, el consumo de este tipo de carne está asociado a un mayor riesgo de DMT2, síndrome metabólico y ECV (Amiano P et al, 2015; Micha R et al, 2012).

El consumo de la carne roja procesada se ha asociado también a riesgo de hipertensión, síndrome metabólico DMT2, ECV e insuficiencia cardiaca. Esto se debe a sus altos niveles de sodio, nitrito y nitros que se usan como conservantes. Alto contenido de nitritos en sangre está asociado con disfunción endotelial y con resistencia a la insulina en adultos (Shen J et al, 2015). Otros alimentos que se recomienda consumir muy ocasionalmente son todo tipo de repostería y bollería comercial, así como alimentos precocinados, productos fritos tipo aperitivo y margarinas duras, donde se han encontrado cantidades considerables de grasas trans, producidas a partir de la hidrogenación parcial de los ácidos grasos (Carbajal et al, 2000). Las grasas trans están relacionadas directamente con las ECV y con una alteración del perfil lipídico, ya que su consumo aumenta el c-LDL plasmático y disminuye el c-HDL (Mensink R et al, 2003). Las bebidas carbonatadas y/o azucaradas están asociadas a una mayor incidencia de DMT2 y un incremento del peso corporal (Schillinger D et al, 2016; Narain A et al, 2017). Esto se debe al efecto del consumo en la adiposidad, ya que la ingesta de energía en forma líquida no es completamente compensada, promoviendo la ganancia de peso por vía del efecto glucémico al consumir de grandes cantidades de azúcares rápidamente absorbibles. Este aumento de peso aumenta el riesgo de DMT2 (O'Connor L et al, 2015).

A lo largo de los años, diversos estudios han aumentado la evidencia científica que otorga a la DM efectos beneficiosos para preservar una buena salud y prevenir la enfermedad cardiovascular, así como otras enfermedades (Bloomfield HE et al, 2016). El Lyon Heart Study fue el primer estudio clínico que demostró efectos beneficiosos de la DM al reducir la enfermedad cardíaca (de Lorgeril M et al, 1994; de Lorgeril M et al, 2006). Desde entonces ha habido diversos estudios que muestran como la DM puede disminuir el riesgo de mortalidad y proteger de forma significativa de la incidencia de las principales enfermedades crónicas (Trichopoulou et al, 2003; Mitrou et al, 2007; Sofi F et al, 2010) y las enfermedades cardiovasculares en concreto (Estruch R et al, 2013; Chiva-Blanch G et al, 2014; Tong TY et al, 2016; Limongi F et al, 2017). Sin embargo, la alimentación actual se está desviando de forma marcada del seguimiento del patrón de la DM a causa de la globalización y el crecimiento económico (da Silva R et al, 2009; Varela-Moreiras G et al, 2010; León-Muñoz LM et al, 2012).

Dado el incremento a nivel mundial de la prevalencia tanto de la obesidad como de la DM2, es importante determinar si la DM puede servir para prevenir o tratar estas patologías. Con respecto a la obesidad, la DM generaba dudas, ya que preocupaba que su alto contenido en grasa pudiera provocar un incremento en el peso (Ferro-Luzzi A et al, 2002). Sin embargo, numerosos estudios a nivel internacional como nacional muestran una asociación inversa entre la DM y la obesidad en adultos (Schröder H et al, 2004; Panagiotakos DB et al, 2006; Romaguera D et al, 2009). Una revisión sistemática realizada por Buckland et al evaluando la relación entre DM y peso corporal, concluyó que los datos encontrados eran inconsistentes pero que estos resultados apuntaban a un papel de este tipo de dieta en la prevención del sobrepeso y la obesidad (Buckland et al, 2008). En 2006, Méndez y colaboradores publicaron un estudio con datos provenientes de la cohorte española del estudio EPIC donde se observó que los individuos con alta adherencia a la DM tenían un 27% en mujeres, y un 29% en hombres menos probabilidad de convertirse en obesos (Méndez et al, 2006). En cambio, analizando la cohorte de EPIC en Grecia, no se encontró asociación entre la adherencia a la dieta y el peso (Trichopoulos A et al, 2005).

En 2007, Tortosa y colaboradores publicaron un estudio después del seguimiento de la cohorte SUN donde se asoció un menor perímetro abdominal en los voluntarios con mayor adherencia a la dieta (Tortosa et al, 2007). Dos estudios realizados en 2009 dieron resultados contradictorios. En el estudio ATTICA realizado en Grecia

no se halló asociación significativa entre la DM y la incidencia de sobrepeso y obesidad (Yannakouli M et al, 2009). En el segundo estudio, donde se analizó la cohorte Framingham Heart Study Offspring, se encontró un menor perímetro abdominal en los individuos con mayor adherencia (Rumawas ME et al, 2009). En 2010 se publicaron los resultados de la cohorte EPIC-PANACEA donde se observó, tras 5 años de seguimiento, que individuos con mayor adherencia a la DM presentaron cambio de peso de -0,16 kg y fueron un 10% menos proclives a desarrollar sobrepeso u obesidad que individuos con menor adherencia a la DM (Romaguera D et al, 2010). En estudios más recientes, se ha encontrado una asociación entre una mayor adherencia a la DM y un menor riesgo de obesidad abdominal (Funtikova AN et al, 2014). Resultados recientes del estudio PREDIMED tras más unos 5 años de seguimiento han puesto de manifiesto que la dieta mediterránea no aumenta el peso ni el perímetro de la cintura de los participantes en el estudio en comparación con la dieta control (Estruch R et al, 2016).

Los efectos beneficiosos de la DM sobre el peso pueden estar asociados al alto consumo de fibra procedente de alimentos de origen vegetal y una baja densidad energética de la dieta. Este consumo aumenta la saciedad y disminuye el consumo de calorías (Schröder H et al, 2007), se produce una reducción del ratio colesterol:c-HDL (Estruch R et al, 2006), reducción de los niveles de lípidos y de la oxidación del c-LDL (Fitó M et al, 2007) y aumenta la producción de ácidos grasos de cadena corta (Hu GX et al, 2010). El consumo de AOV virgen como principal grasa tiene numerosos efectos beneficiosos frente a otras fuentes de grasa debido a que está compuesto por grasas monoinsaturadas. El consumo del aceite aumenta el c-HDL, reduce el daño oxidativo a los lípidos, disminuye la inflamación, mejora la función endotelial y disminuye la presión arterial sistólica (Covas MI et al, 2015). El consumo de FS mejora la inflamación, el estrés oxidativo y la función endotelial, además de tener un impacto beneficioso en la glicemia postprandial. Aunque los FS son un alimento de alta densidad energética y de alto contenido en grasa, no hay una evidencia que indique que su consumo moderado provoque un aumento de peso o de obesidad abdominal (Salas-Salvadó J et al, 2014a).

Respecto a la DMT2 y de acuerdo con datos epidemiológicos, una mayor adherencia a este patrón dietético está inversamente asociado al riesgo de DMT2 en población general, individuos con alto riesgo cardiovascular y en pacientes con una ECV establecida (Georgoulis M et al, 2014). Esta afirmación se basa en los datos obtenidos en diversos estudios diseñados para analizar la relación entre el patrón de la DM y la prevención de la enfermedad. El estudio ATTICA realizado en Grecia en 2005, encontró que la adherencia a la DM estaba inversamente asociada al riesgo de DMT2 (Panagiotakos DB et al, 2005). En 2008, un estudio realizado entre universitarios graduados no diabéticos, observó que los participantes con una mayor adherencia a la DM presentaban un riesgo menor de desarrollar DMT2 que los individuos con menor adherencia. Un aumento de dos puntos en la puntuación de adherencia a la DM se asocia con una reducción del 35% del riesgo de la enfermedad (Martínez-González MA et al, 2008).

En el estudio EPIC también se observó que una alta adherencia a la DM estaba asociada con la disminución de un 12% del riesgo de DMT2 (InterAct Consortium et al, 2011). Dentro del estudio EPIC, en los resultados obtenidos de la cohorte griega, se vio también una relación inversa entre la DM y el riesgo de DMT2. Una mayor adherencia aporta un 20% de protección frente al desarrollo de la DMT2 (Rossi M et al, 2013). Dentro del estudio PREDIMED, en la cohorte de Reus se obtuvieron resultados similares. Después de cuatro años de seguimiento, los grupos a los que se asignó DM reducían la incidencia de DMT2 un 52% frente a una dieta baja en grasas tradicional (Salas-Salvadó J et al, 2011) Otro estudios realizados en diferentes poblaciones también determinaron que una adherencia mayor al patrón de DM disminuía el riesgo de DMT2 o menor incidencia de una futura DMT2 (de Koning L et al, 2011; Tobias DK et al, 2012). Recientemente, en el estudio PREDIMED incluyendo todos los nodos, también se encontró una menor incidencia de DMT2 en el grupo de intervención con DM en comparación con el grupo control (Martínez-González MA et al, 2014). En el estudio PREDIMED, también se observó tras un año de seguimiento, se observó un aumento en el ratio adiponectina/leptina y en el ratio adiponectina/HOMA-Resistencia insulina, y un descenso acusado de los valores de perímetro de la cadera (Lasa et al, 2014).

La potencial protección frente a la DMT2 a través de la dieta puede ser debida a las propiedades antiinflamatorias y antioxidativas de su patrón de alimentos característico (Esposito K and Giugliano D, 2014; Sleiman D et al, 2015). Esto es debido al aumento del consumo de fibra, vitaminas y minerales, así como antioxidantes y polifenoles y la disminución del consumo de alimentos

proinflamatorios y nutrientes como pueden ser los AGS y trans, azúcar refinado y almidón así como alimentos con un exceso de energía (Calder PC et al, 2011). La DM afecta favorablemente a numerosos factores de riesgo cardiovascular como la obesidad y la diabetes (Shen J et al, 2015).

1.3.2.4.- La obesidad como factor de riesgo de la DMT2

Existe una relación demostrada entre ambas patologías. La obesidad se puede considerar como una patología en sí misma y a su vez, un factor de riesgo para la DMT2. Uno de los mecanismos propuestos como el nexo de unión entre la obesidad y la diabetes es la presencia de inflamación crónica que produce una alteración de los componentes del sistema inmune que, a su vez, conduce a desarrollar una mayor resistencia a la insulina, uno de los factores característicos del desarrollo de DMT2 (Donath MY and Shoelson SE, 2011; de Simone G et al, 2017; Sorisky A, 2017; Xu E et al, 2017). Podemos definir la resistencia a la insulina como un estado en el cual un mayor nivel de insulina es necesaria para producir una respuesta biológica normal (Riobó P, 2013). Un exceso del tejido adiposo visceral aumenta la liberación de citoquinas inflamatorias como el TNF- α , IL-6 y produce un descenso de IL-10, citoquina antiinflamatoria por macrófagos y linfocitos. Altos niveles de otros factores inflamatorios como la proteína C reactiva, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y activación de monocitos también están asociados a un aumento de la resistencia a la insulina (King GL, 2008). Por ejemplo, la liberación de TNF- α , incrementa la concentración de ceramidas, que actúan como mediadores lipotóxicos interrumpiendo la cascada de señalización de la insulina y se deteriora la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético (Muo DM, 2009; Xu E et al, 2017).

La obesidad puede producir un aumento de la resistencia a la insulina por aumento de ácidos grasos en el plasma sanguíneo. El tejido adiposo se caracteriza por la habilidad de expandirse pasivamente para acomodar cualquier exceso de nutrientes. Si se alcanza el límite de esta expansión, este tejido adiposo no puede almacenar de forma efectiva los lípidos y se transfieren a otros tejidos periféricos como el músculo esquelético, el hígado y páncreas (Tan CY and Vidal-Puig A, 2008; Yao F et al, 2017). El exceso de ácidos grasos plasmáticos inhibe la activación del receptor de la insulina (IRS-1) inhibiendo, a su vez, el transporte de la glucosa a la célula estimulado por la insulina (Dresner A et al, 1999). Un mecanismo similar ocurre en el hígado, donde la acumulación de metabolitos lipídicos intracelulares,

activan una serie de cascadas de señalización donde disminuye la fosforilación del receptor IRS-2, un mediador clave para la acción de la insulina en el hígado (Previs SF et al, 2000). Ambos procesos están resumidos en la Figura 1.12.

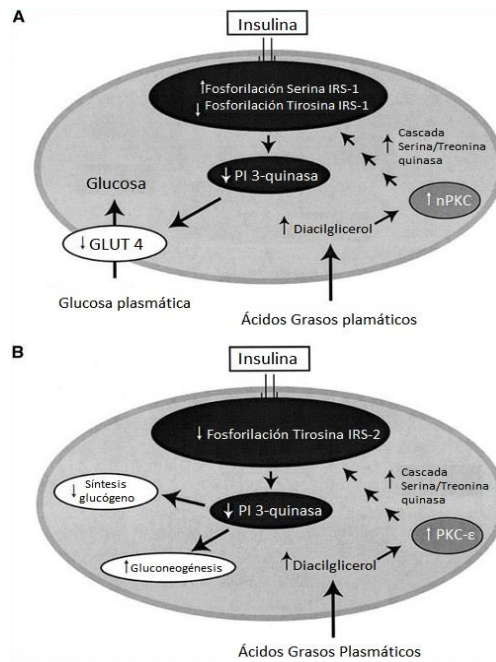


Figura 1.12.- Mecanismo de la resistencia a la insulina inducida por los ácidos grasos en el músculo (A) y en el hígado (B). GLUT 4: transportador de la glucosa 4; IRS: receptor de la insulina; PI 3-quinasa: fosfatidilinositol 3 quinasa; nPKC: nueva proteína quinasa C. Figura modificada de Petersen KF and Shulman GI, 2006

1.3.3.- Factores genéticos

La variación en el peso corporal y la masa grasa de un individuo es debida a complejas interacciones entre influencias genéticas, conductuales y ambientales (Van der Klaauw AA and Farooqi IS, 2015; Ben-Shlomo A and Fleseriu M, 2017; Garasia S et al, 2017). Parte del aumento del IMC llegando a niveles clínicos se ha indicado que puede estar determinado genéticamente. Basándose en estudios de agregación familiar y de gemelos, se estima una heredabilidad dentro de un rango entre el 40% y el 70% (Maes HH et al, 1997). Se observó que la concordancia de masas grasa en gemelos monocigóticos (idénticos genéticamente) era de un 70-90% mientras que en gemelos dicigóticos (comparten el 50% de material genético)

era de 35-45% (Bell CG et al, 2005; Farooqi IS and O'Rahilly S, 2005a). Avances en las técnicas de análisis genético han conseguido una mayor comprensión de los mecanismos que intervienen en la genética de la obesidad. Estos avances van desde la aproximación a través de la estrategia denominada “genes candidatos”, donde una vez descubierto un gen relacionado se investigaba su secuencia y los polimorfismos más frecuentes en la población, hasta los estudios denominados Genome-Wide Association Study (GWAS), donde se determinan millones de polimorfismos y se analizan conjuntamente para ver su relación sin hipótesis previa de gen candidato (Hazelett DJ et al, 2016). Todo ello ha permitido identificar cientos de variantes genéticas que pueden causar distintos tipos de obesidad (Andersen MK and Sandholt CH, 2015; Sandholt CH et al, 2015; Singh RK et al, 2017).

Existen causas de obesidad monogénica, es decir, que una mutación en un único gen puede ser la causa de la obesidad en el individuo (Macho T et al, 2000). Este tipo de mutaciones podría ser la causa de un 2-4% de los casos de obesidad humana (Martí A et al, 2003). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la etiología de la obesidad es de origen poligénico o multifactorial (Macho T et al, 2000). Este tipo de obesidad suele aparecer en la niñez, con un fenotipo extremo y, generalmente, suele venir acompañada de trastornos neuroendocrinos, de desarrollo y de conducta (MacNeil DJ et al, 2002; Farooqi IS and O'Rahilly S, 2005b). La mayoría de los genes implicados en la obesidad monogénica se relacionan con la regulación de la ingesta de alimentos a través del sistema de la leptina-melanocortina en el hipotálamo y el gasto energético (Beckers S et al 2009; González-Jiménez E et al, 2012). Esta vía se activa cuando la leptina es secretada por el tejido adiposo, se une a su receptor, localizado en las neuronas superficiales del núcleo arqueado del hipotálamo (Dubern B and Clément K, 2012).

Se han descrito mutaciones relacionadas en la leptina y su receptor, la proopiomelanocortina (POMC), la prohormonaconvertasa 1 (PCSK1) y en el receptor de la melanocortina 4 (MC4R), el gen SIM1, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y su receptor TRKB relacionados con los casos de obesidad monogénica (Montague CT et al, 1997; Clement K et al, 1998; Krude H et al, 1998; Jackson RS et al, 1997; Yeo GS et al, 1998; Holder JL et al, 2000; Gray J et al, 2006).

Asimismo, existen numerosos síndromes producidos por formas monogénicas o anomalías cromosómicas que cursan con un fenotipo obeso (Rankinen T et al, 2006). Las bases genéticas de estos desórdenes es muy heterogénea, siendo las formas mejor caracterizadas los síndromes de Prader-Willi, Bardet-Biedl, síndrome de Cohen, síndrome de Alström, osteodistrofia hereditaria de Albright, síndrome de Börjeson-Forssman-Lehmann, entre otros.

Sin embargo, los casos de obesidad monogénica sólo constituyen un pequeño porcentaje de los casos de obesidad, mostrando que las formas más comunes de obesidad no se deben a los casos de obesidad monogénica (Kaur Y et al, 2017). Estudios de ligamiento mediante barridos del genoma completo así como estudios de marcadores que flanquean genes candidatos en familias con obesidad no monogénicas (Rankinen et al, 2002), permitieron ver que los mecanismos moleculares y genéticos involucrados en la regulación del peso corporal son complejos, pudiendo intervenir varios genes (Rankinen et al, 2006; Hinney et al, 2010). Por tanto, en la mayoría de los casos, la obesidad es una enfermedad poligénica en la que diferentes variaciones genéticas, junto con la interacción con factores ambientales, dan lugar al aumento del peso. Su estudio se basa en el análisis de variaciones genéticas en el genoma situadas dentro o cerca de los genes candidatos. Cada polimorfismo conduce a una variante que confiere susceptibilidad, requiriendo adicionalmente la presencia de otras variantes y un medio ambiente obesogénico que determina el fenotipo obeso (Razquin et al, 2011; Apalasy YD and Mohamed Z, 2015).

La cantidad de genes implicados en la regulación del peso corporal se ha ido incrementando en los últimos años (Singh RK et al, 2017; Ng MCY et al, 2017). Estos genes actúan a través de diferentes mecanismo moleculares. Entre ellos podemos destacar los genes que codifican para proteínas implicadas en la regulación del apetito, proteínas que regulan el consumo de energía, para los péptidos que intervienen en el metabolismo de los nutrientes y los relacionados con procesos de diferenciación de adipocitos (Martínez JA et al, 1996; Palou A et al, 2000; Laber S and Cox RD, 2017; ;Cheng G et al, 2017).

Con los recientes avances en los instrumentos de secuenciación automática de ADN que permiten la secuenciación de todo el genoma o exoma o de varios genes al mismo tiempo se ha producido un vertiginoso avance en el conocimiento de

variaciones genéticas relacionadas con los mecanismos moleculares que conducen a la obesidad (Marian AJ, 2012; Moon S et al, 2017).

Estas técnicas permiten la secuenciación directa en lugar del análisis de SNPs y así tener un completo escaneo de numerosos polimorfismos a lo largo de todo el genoma usando poderosos métodos estadísticos para identificar loci asociados a determinados fenotipos aunque sean muy poco frecuentes (Das Bhowmik A et al, 2017). Casi en cada cromosoma humano se ha encontrado un loci unido a la predisposición de un fenotipo obeso (Figura 1.13).

Además, la regulación epigenética de la expresión genética ha emergido en los últimos años como un factor que contribuye a la herencia de la obesidad. Este mecanismo modula la expresión genética sin modificar su secuencia y cuyos marcadores incluyen metilación genómica del ADN, cambios en la organización de la cromatina por modificaciones en las histonas y los microARN (miR) no codificantes (Kim JK et al, 2009; Desiderio A et al, 2016; Xu W et al, 2016; Cruz KJ et al, 2017). Actualmente existe un gran auge en las investigaciones de estos tres principales mecanismos y su relación con el aumento de riesgo de obesidad (Godfrey M et al, 2011; Rönn et al, 2013).

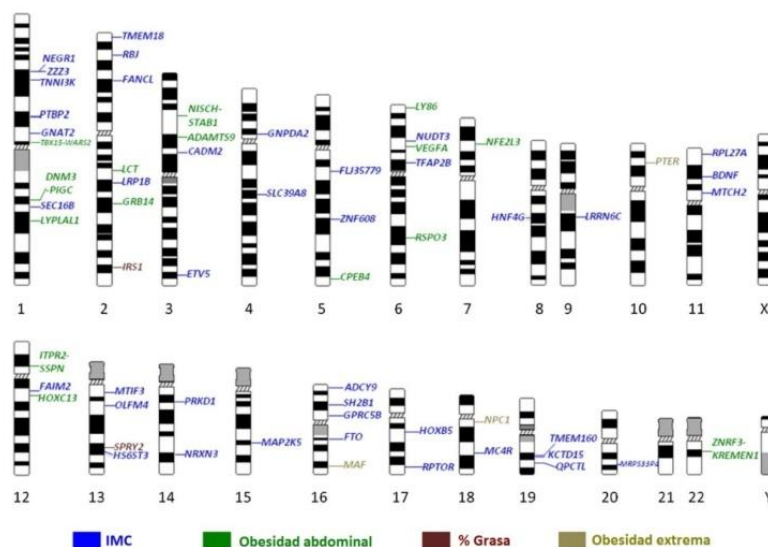


Figura 1.13.- Loci asociados con fenotipos relacionados con obesidad. Figura modificada de Albuquerque D et al, 2015

La DMT2 es una enfermedad heterogénea con un fuerte componente genético y herencia familiar donde la interacción de estos factores genéticos con factores ambientales induce la resistencia a la insulina y la deficiencia de insulina (Brunetti A et al, 2014). La alta concordancia en estudios con gemelos idénticos, así como estudios en familias, apoyan la existencia de determinantes genéticos implicados en el desarrollo de la patología. En estudios con gemelos monocigóticos se ha visto que el riesgo de DMT2 es de un 70% mientras que en gemelos dicigóticos se estima que se encuentra entre el 20-30%; y el número de gemelos monocigóticos afectados que tienen un hermano gemelo diabético varía entre un 34% y un 100% (Medici F et al, 1999; Poulsen P et al, 1999). En estudios familiares, se ha estimado que el riesgo de desarrollar DMT2 es de un 40% en individuos con un padre que padece la enfermedad, y alcanza alrededor del 70% cuando ambos padres están afectados (Köbberling J and Tillil H, 1982). El riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta aproximadamente de 2 a 4 veces cuando uno o ambos padres la padecen (Meigs JB et al, 2000). Dentro de la diabetes mellitus, se han encontrado formas monogénicas de la enfermedad (MODY), que se caracterizan por una herencia autosómica dominante y presentan una heterogeneidad alélica extrema. La aparición de la enfermedad es a edades tempranas, alrededor de los 25 años, y varía el grado de disfunción de las células β (Tattersall RB, 1974; Murphy R et al, 2008). Los avances en la tecnología genómica han permitido identificar numerosas variaciones genéticas asociadas a la DMT2 que confieren un aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad. Estudios de ligamiento, de genes candidatos y de GWAS han caracterizado cientos de loci relacionados con el metabolismo de la glucosa y la secreción y resistencia a la insulina (Qi Q and Hu FB, 2012; Groop L and Pociot F, 2013; Hara K et al, 2014; Hara K et al 2015). En total, estudios de GWAs han aportado alrededor de 153 variantes para unos 120 loci relacionados con la DMT2 directamente, así como numerosos loci relacionados con el metabolismo de la glucosa o la insulina (Prasad RB and Groop L, 2015) (Figura 1.15).

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de las variantes genéticas relacionadas con la DMT2, los loci identificados sólo explican menos del 15% de la herencia de la enfermedad (Groop L and Pociot F, 2013). Se han propuesto diferentes hipótesis para definir la estructura genética de la DMT2.

La primera de ellas sugiere que la herencia consiste en un amplio número de variantes comunes con bajo efecto aditivo y que la enfermedad representa los extremos de una distribución normal (Plomin R et al, 2009). Otras hipótesis proponen que variantes genéticas poco prevalentes pueden ser responsables de los efectos observados en las variantes comunes (Lupski J et al, 2011). En la DMT2, la penetrancia del efecto genético depende fuertemente de las interacciones con el ambiente, especialmente desde que el ambiente ha cambiado en los últimos años y las variantes genéticas de riesgo podrían haber sido neutralizadas e, incluso, beneficiosas antes de la introducción del estilo de vida occidental. También se ha observado que las interacciones gen-gen donde variantes menos prevalentes con alta penetrancia pueden actuar conjuntamente con alelos comunes incrementando el riesgo de la enfermedad (Prasad RB and Groop L, 2015).

Como ocurre en el caso de la obesidad, recientemente se ha observado que las regulaciones epigenéticas pueden tener un papel importante en la progresión de la enfermedad a través de la inducción de glucotoxicidad en los islotes pancreáticos y predisponiendo a complicaciones diabéticas (Kato M and Natarajan R, 2014). Los tres principales mecanismos epigenéticos se han relacionado con el riesgo de enfermedad, tanto la metilación del ADN (Kong et al, 2009) como las modificaciones en las histonas (Brasacchio et al, 2009) y los miR (Fernandez-Valverde SL et al, 2011). Serían necesarios estudios sistemáticos integrando información genética y epigenética para conocer cómo estas regulaciones epigenéticas causan cambios en la expresión genética y cómo contribuyen estos cambios al aumento del riesgo de desarrollar DMT2. La introducción de la nueva generación de secuenciadores permite el estudio de transcriptoma, el análisis de pequeños ARNs y/o análisis epigenético. Toda esta información permitirá conocer la arquitectura genética de la DMT2 (Imamura M and Maeda S, 2011).

obesidad. Esta patología se caracteriza por episodios frecuentes de colapso en las vías aéreas superiores durante el sueño lo que puede derivar en graves complicaciones. Se han descrito diferentes mecanismos implicados en la asociación entre la obesidad y esta enfermedad, como son la acumulación de tejido adiposo en el cuello, defectos en la función muscular respiratoria y regulación neuroendocrina de la ingesta. Estas alteraciones metabólicas conducen a un aumento de la adiposidad (Ceccato F et al, 2015).

Por último, cabe destacar la relación que se ha encontrado recientemente en la composición de la microbiota intestinal y diferentes enfermedades, como son la obesidad (Everard A and Cani PD, 2013; Wegielska I and Suliburska J, 2016; Tang WH et al, 2017). Varios estudios han observado que la microbiota ejerce un papel importante en el almacenamiento de la masa grasa y puede alterar la homeostasis energética. Esto puede ser debido a que mejora la extracción de energía de la dieta por la conversión de la fibra de los alimentos ingeridos en ácidos grasos de corta cadena. Alteraciones en la composición de esta microbiota pueden favorecer el desarrollo de la obesidad. Además, también puede contribuir en menor grado a la inflamación, rasgo característico del sobrepeso y la obesidad (Bäckhed F et al, 2004; Blaut M and Klaus S, 2012; Blaut M, 2015; Fändriks L, 2016).

Respecto a la DMT2, hay diversos factores relacionados con la obesidad, como pueden ser consumo de alcohol, la apnea del sueño y la microbiota intestinal (Wu Y et al, 2014). A lo largo de los años, numerosos estudios han asociado un consumo moderado de alcohol (<20g/día en mujeres; <40 g/día en hombres) con un menor riesgo de diabetes, a excepción de la cerveza. Aunque el mecanismo por el que el consumo de alcohol induce un descenso del riesgo de DMT2 no se conoce, una posible explicación es el efecto inhibitorio que tiene el alcohol en la gluconeogénesis y la producción de glucosa hepática, lo que lleva a una reducción de los niveles de glucosa en sangre (Schulze MB and Hu FB, 2005; Li XH et al, 2016). Aunque este descenso del riesgo por consumo de alcohol es modificado con el consumo de tabaco. En el caso de la cerveza, la reducción del riesgo se compensa por el alto contenido en carbohidratos (Heidemann C et al, 2005).

Diversos estudios han comprobado que la apnea del sueño es más prevalente en personas con DMT2 (30-40%) que en la población general, lo que indica una relación entre las dos patologías (Schober et al, 2011). La hipoxia intermitente que

ocurre durante los episodios de colapso de las vías respiratorias contribuye a la muerte de las células β debido al estrés oxidativo que se produce. Esta enfermedad se asocia a un peor control de la glucosa y a resistencia a la insulina, así como con complicaciones diabéticas como puede ser la retinopatía (Pamidi S and Tasali E, 2012; Ceccato F et al, 2015).

La microbiota intestinal es factor que contribuye al desarrollo de la DMT2. Una alteración en su composición y diversidad puede favorecer alteraciones en el almacenamiento y utilización de los hidratos de carbono, con el aumento del estrés oxidativo e inflamación. Dentro de los diferentes grupos de bacterias que componen la microbiota, en pacientes diabéticos se ha observado una reducción del nivel de *Firmicutes* mientras que el nivel de Bacteroidetes y Proteobacterias es algo mayor comparadas con la composición de la microbiota de individuos no diabéticos. El ratio entre estos dos grupos de bacterias (*Bacteroidetes/Firmicutes*) está relacionado con los niveles de glucosa en sangre e influyen sobre la resistencia a la insulina. Todavía no se conocen muy bien los mecanismos por los que se produce (Larsen N et al, 2010; Musso G et al, 2011; Everard A and Cani PD, 2013; Wu Y et al, 2014).

1.4.- Obesidad, diabetes y otros factores de riesgo cardiovascular

La ECV es una enfermedad progresiva y crónica que constituye la principal causa de muerte en los países desarrollados. Debido a la alta morbimortalidad de las ECV, la detección y control de los factores de riesgo cardiovascular es clave para la prevención cardiovascular (Galve E et al, 2016). En 1948 el National Heart Institute comenzó el estudio Framingham cuyo objetivo era el estudio de la epidemiología y la investigación de las características que contribuían al desarrollo de una ECV. Hasta entonces se consideraba que la aparición de una ECV era cosa del azar. En cambio, el estudio Framingham contribuyó a la definición de factor de riesgo, es decir, elemento o característica medible que se asocia con un aumento en el riesgo de desarrollar una enfermedad y que es un predictor independiente y significativo de riesgo de presentar la enfermedad (O'Donnell CJ and Elosua R, 2008). Cuatro años después de comenzar el estudio, los investigadores definieron tener el colesterol alto y presión arterial elevada como factores importantes para el desarrollo de ECV, así como el tabaquismo, la obesidad y la diabetes (Kagan A et

al, 1963; Keys A et al, 1966). Posteriormente, factores inflamatorios, como la proteína C reactiva, se han unieron a estos factores predictores de la ECV (Ridker PM et al, 1997).

Los investigadores del estudio Framingham fueron los primeros en identificar la obesidad como un factor de riesgo para la ECV (Kannel WB et al, 1967); aunque fue la American Heart Association la que reconoció en 1998 a la obesidad como factor de riesgo independiente de ECV por primera vez (Eckel RH et al, 1998), corroborado posteriormente en diferentes trabajos (Poirier P and Eckel RH, 2002; Engeland A et al, 2003; Jee SH et al, 2006). Varios estudios han mostrado la relación entre un alto IMC con manifestaciones de ECV como son angina, IAM, insuficiencia cardiaca y muerte súbita (Hubert HB et al, 1983; Manson JE et al, 1990; Field AE et al, 2001). También se ha observado que, aparte de contribuir como factor independiente, la obesidad promueve alteraciones en otros factores de riesgo intermedio de la ECV, como son la dislipemia, hipertensión y la DMT2 (Stamler R et al, 1978; Eckel RH et al, 2006; Wormser D et al, 2011) e induce cambios en la función y estructura cardiaca por el exceso de tejido adiposo acumulado (Messerli FH et al, 1987; Poirier P et al, 2004; Kim SH et al, 2015). A todos estos factores se suma la condición inflamatoria crónica que se produce en personas obesas que puede provocar disfunción endotelial, aterosclerosis e hipertrofia vascular (Lundgren CH et al, 1996; Rocha VZ and Libby P, 2009; Bastien M et al, 2014).

En el estudio Framingham también se reconoció la DMT2 como un factor de riesgo cardiovascular (Fox CS, 2010). Esta enfermedad se asocia con un mayor riesgo de sufrir un IAM, insuficiencia cardiaca, enfermedad arterial periférica, ictus y aumento de la mortalidad; y el riesgo es mayor en mujeres que en hombres (Kannel WB et al, 1974; Kannel WB and McGee DL, 1979; Brand FN et al, 1989). Como ocurre en el caso de la obesidad, la DMT2 se asocia con otros factores de riesgo cardiovascular. Las personas diabéticas tienen entre una prevalencia entre 77-87% de hipertensión, entre 74-81% de tener el colesterol c-LDL elevado y un 62-67% de obesidad (Preis SR et al, 2009). Se ha sugerido la resistencia a la insulina como el mecanismo común para estos factores de riesgo (Reaven GM, 1988) y la asociación de estos factores se denomina como síndrome metabólico. Este síndrome es una constelación de factores de riesgo metabólico el cual incluye al menos tres criterios, incluyendo un elevado perímetro de cintura, glucosa elevada,

TG elevados, hipertensión o bajo colesterol c-HDL (Grundy SM et al, 2005). La presencia del síndrome metabólico es un factor de riesgo muy importante para el desarrollo de la DMT2, riesgo 7 veces mayor comparado con personas sin síndrome metabólico (Wilson PW et al, 2007).

1.4.1.- Dislipemia

Se define como dislipemia el conjunto de patologías producidas por la alteración del metabolismo de los lípidos y con la consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en sangre. Se ha identificado la dislipemia como un factor de riesgo cardiovascular. Concretamente se ha observado que está muy relacionado con la aparición de la cardiopatía isquémica, cuya mortalidad se asocia directamente con los valores séricos de colesterol unido a c-LDL, la principal lipoproteína transportadora de colesterol en sangre (Yusuf S et al, 2004). También se reconoce la hipertrigliceridemia y el c-HDL como factores de riesgo independiente (Cordero A et al, 2012). Las guías actuales para la prevención recomiendan el control de los niveles de c-LDL como principal tratamiento contra la dislipemia. En 2011, la Sociedad Europea de Cardiología y la Sociedad Europea de Aterosclerosis consideró el valor recomendado de c-LDL en función del riesgo cardiovascular total. En individuos con muy alto riesgo cardiovascular (ECV documentada, DMT1 y DMT2) se recomiendan unos niveles de c-LDL < 70 mg/dl; mientras que en individuos con alto riesgo cardiovascular (dislipemia familiar y grave hipertensión) el nivel recomendado es < 100 mg/dl (Reiner Z et al, 2011).

A mayor reducción de c-LDL mayor será la reducción del riesgo cardiovascular (Rahilly-Tierney CR et al, 2009); por ejemplo, el descenso de 1 mmol de c-LDL se asocia con una reducción del riesgo de ictus del 17% (Amarencu P et al, 2007). En el caso del c-HDL, está fuertemente asociado con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, especialmente con la enfermedad arterial coronaria (Hafiane A nad Genest J, 2015). Numerosos estudios apoyan la idea que la correlación entre el c-HDL y el riesgo cardiovascular es inversa (Boekholdt SM et al, 2013), ya que individuos con altos niveles de c-HDL presentaban menor incidencia de ECV que individuos con bajos niveles de c-HDL (O'Donnell CJ et al, 2008). Se recomiendan que sus valores estén por encima de 40 mg/dl en hombres y 50 mg/dl en mujeres (Cordero A et al, 2012). Respecto a los TG, el papel como un factor de riesgo de ECV independiente siempre ha sido controvertido. Aunque hay evidencias que

apuntan a esta relación, no hay ensayos publicados que confirme que el descenso de su nivel plasmático produzca la reducción del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Sarwar N et al, 2007; Rahilly-Tierney CR et al, 2009). Aún así, se recomienda mantener sus niveles por debajo de 150 mg/dl.

La incidencia de la dislipemia ha ido en aumento en muchos países en desarrollo asociado, como en el caso de otros factores de riesgo cardiovascular, a la industrialización y al estilo de vida actual (tabaco, hábitos alimentarios, inactividad física y estrés psicosocial). Diversos estudios epidemiológicos muestran que los valores poblacionales de colesterol en España son similares, o ligeramente inferiores al resto de países europeos (Reiner Z et al, 2013). La prevalencia de dislipemia en población general española se encuentra en torno al 30-51%, lo que hace que sea uno de los factores de riesgo cardiovascular más importante (Cordero A and Fácila L, 2015), con variaciones en la distribución geográfica (Gabriel R et al, 2008). Aunque actualmente existen tratamientos eficaces, seguros y baratos para controlar los niveles de colesterol elevados, hay una falta de control importante especialmente en personas con alto riesgo cardiovascular.

La obesidad es un factor importante en la dislipemia, el cual actúa a través de diversos mecanismos metabólicos, como pueden ser la sensibilidad a la insulina y cambios en el metabolismo de los ácidos grasos (Bays H et al, 2005). Una acumulación de tejido adiposo visceral se ha relacionado la aparición de una variedad de cambios metabólicos como pueden ser la aparición de resistencia a la insulina, un aumento de TG, descenso de c-HDL, y aumento de c-LDL (Bastien M et al, 2014). Pacientes diabéticos presentan un mayor riesgo de desarrollar dislipemia. El perfil lipídico alterado, caracterizado con alta concentración de TG, de c-LDL y una baja concentración de c-HDL, se atribuye a la resistencia a la insulina (Lorber D, 2014) debido a la incapacidad del lipocito de almacenar ácidos grasos provocando una alteración en los niveles de los diferentes tipos de colesterol. La sobrecarga lipídica en el músculo esquelético disminuye la sensibilidad a la insulina (Sánchez-Recalde A and Kaski JC, 2001). Además, la hiperglucemia afecta a las lipoproteínas a través del aumento de la glicosilación y oxidación, lo que puede facilitar el desarrollo de aterosclerosis (Leon BM and Maddox TM, 2015). Varios estudios han mostrado que el descenso de c-LDL reduce el riesgo de de eventos cardiovasculares en pacientes con DMT2 (Pyorala K

et al, 1997; Kearny PM et al, 2008). Aunque el descenso de c-HDL se considera un importante predictor del riesgo de ECV, diversos estudios farmacológicos de intervención para aumentar el c-HDL no han encontrado evidencias de un efecto beneficioso sobre el riesgo cardiovascular (Briel M et al, 2009).

En el caso de los TG, existen pocas evidencias clínicas que muestren que la reducción de los niveles de TG disminuye el riesgo cardiovascular (Miller M et al, 2011). Aunque se ha determinado el descenso de c-LDL como meta a conseguir para la prevención de la ECV, el 45% de la población diabética sigue teniendo sus niveles descontrolados (Wong ND et al, 2013).

1.4.2.- Hipertensión arterial

La tensión arterial se registra con dos valores medidos en milímetros de mercurio (mmHg). El primer valor corresponde a la tensión arterial sistólica (PAS) que se produce cuando el corazón se contrae y el segundo valor corresponde a la tensión arterial diastólica (PAD) que se produce cuando la musculatura cardíaca se relaja entre un latido y el otro. Según la OMS, la hipertensión se define con valores de PAS igual o mayores de 140 mmHg y valores de PAD de igual o superiores a 90 mmHg (OMS, 1999). Si no se controla, la hipertensión puede provocar IAM, hipertrofia ventricular y, finalmente, insuficiencia cardíaca (Karmali KN et al, 2017). En los vasos sanguíneos, la hipertensión puede provocar dilataciones (aneurismas) y zonas de debilidad de la pared vascular, aumentando las probabilidades de obstrucción y rotura de los vasos sanguíneos. Todas estas circunstancias pueden causar accidente vascular cerebral (ACV) (Lewington S et al, 2002; OMS, 2013; Weiss J et al, 2016).

La prevalencia de la hipertensión se estima entre un 30-45% de la población general (Mancia G et al, 2013), siendo un 70% población de edad avanzada frente a 32% de población adulta entre 40-59 años (Mozaffarian D et al, 2015). Existe el problema de ser una enfermedad ignorada o desconocida por la población en general y que, en ocasiones presenta un tratamiento inadecuado a pesar de ser una enfermedad de fácil diagnóstico y de tener un tratamiento no muy costoso (Buford TW, 2016). Existe una relación demostrada entre la obesidad y la hipertensión. Según el resultado del estudio Framingham, la obesidad explica el 78% de hipertensión en hombres y el 65% en mujeres (Kannel WB et al, 1993) y un exceso de peso puede contribuir entre el 65-75% del riesgo de padecer hipertensión

(Wilson PW et al, 2002). Cada 5% de peso ganado se asocia con incremento del 20-30% del riesgo de hipertensión (Droyvold WB et al, 2005). La relación entre obesidad e hipertensión varía con la edad, el sexo y la raza (González-Albarrán O et al, 1999).

Además, la circunferencia de cintura y el ratio cintura-cadera, ambas medidas de obesidad abdominal, están más fuertemente relacionadas con hipertensión que el IMC (Lee CM et al, 2008; Samson R et al, 2017; Schütten MT et al, 2017).

Varios mecanismos pueden estar implicados en el desarrollo de la hipertensión en individuos obesos (Schütten MT et al, 2017). El descenso de la producción de adiponectina por el tejido adiposo disfuncional en individuos con sobrepeso u obesidad produce un descenso de óxido nítrico (NO), debido a que la adiponectina estimula la actividad NO sintasa endotelial. El NO se considera un mediador para la vasoconstricción y la vasodilatación y controla el crecimiento celular en tejido muscular liso. Un descenso en los niveles plasmáticos de adiponectina se relaciona con una menor respuesta de vasodilatación endotelial (Wang ZV and Scherer PE, 2008). El incremento del tejido adiposo visceral está asociado con inflamación y estrés oxidativo. Ambos procesos están implicados en la rigidez arterial y la hipertensión a través de la disfunción endotelial y la hipertrofia vascular (Dorresteijn JA et al, 2012). La obesidad predispone al riñón a reabsorber sodio a través de mecanismos neurales (activando el SNS), hormonales (activando el sistema aldosterona-angiotensina-renina (RAAS)) y vasculares (angiotensina II). Esto provoca la necesidad de una mayor presión arterial para excretar la ingesta de sal diaria y mantener el balance de sodio y el volumen de homeostasis (Landsberg L et al, 2013). Además, la activación del SNS produce la elevación de la presión sanguínea por una vasoconstricción periférica y la activación del sistema aldosterona-angiotensina-renina induce estrés oxidativo e inflamación (Dorresteijn JA et al, 2012). Por tanto, la disfunción del tejido adiposo en casos de obesidad conduce a una disfunción endotelial, hipertrofia vascular, una natriuresis defectuosa y una desregulación metabólica con un desequilibrio de adipoquinas y una aumento de citoquinas inflamatorias, mecanismos que conducen a la hipertensión (Kang YS, 2013).

La hipertensión es más común en individuos con DMT2 que en población general. Se estima que la prevalencia de hipertensión en población diabética se encuentra entre un 40-80% (Almgren T et al, 2007). En el estudio Framingham se observó que más de la mitad de los pacientes con DMT2 tenían hipertensión y esto aumentaba el riesgo para cualquier ECV un 25% y un 30% para la mortalidad. También se observó que la bajada de presión sanguínea en diabéticos confería unos importantes beneficios clínicos (Chen G et al, 2011; Seo DC et al, 2017). Estas vías en células del endotelio vascular están basadas en un balance entre la vasoconstricción y la vasodilatación (de Boer MP et al, 2012), donde la insulina causa un ligero aumento del flujo sanguíneo por un aumento de la liberación de NO y por una importante vasodilatación. En individuos con resistencia a la insulina la vasodilatación en respuesta a la concentración de insulina está reducida conduciendo a la vasoconstricción por hipertensión (Sowers JR, 2004; Cheung BM and Li C, 2012; Ferrannini E and Cushman WC, 2012). La resistencia a la insulina se asocia típicamente con hiperinsulinemia debido a la sobreproducción pancreática de insulina. La hiperinsulinemia ejerce una presión antinatriurética crónica lo que provoca una retención de líquidos en personas diabéticas aumentando, a su vez, la presión sanguínea. También puede activar la cascada de crecimiento celular en las paredes vasculares que provoca una remodelación aumentando su rigidez y provocando la pérdida de autoregulación de la presión sanguínea (Reaven GM, 2011; Ferrannini E and Cushman WC, 2012; Kang YS, 2013).

Por último, la hiperglucemia característica de la DMT2 puede producir cambios estructurales en las células renales. Esto produce cambios en la presión de filtración del glomérulo, provocando una activación crónica del RAAS para compensar esta situación. Esta activación a menudo progresa al desarrollo de hipertensión (Leon BM et al, 2015).

1.4.3.- Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos antioxidantes de defensa que se encargan de neutralizarlos (Sies H, 1997). Los radicales libres forman parte de las especies reactivas del oxígeno (ROS), son un grupo de moléculas de peso molecular bajo y corto tiempo de vida que derivan del oxígeno inhalado por la respiración aeróbica y de la variedad de reacciones aeróbicas que se producen in vivo en las células (Kayama Y et al, 2015; Tangvarasittichai S, 2015). ROS incluye el óxido nítrico

(NO), el superóxido (O_2), el radical hidroxilo (OH), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Zuo L et al, 2000). Las fuentes de producción de ROS en los tejidos incluye el sistema de transporte de electrones mitocondrial, NADPH oxidasas, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS) y el metabolismo del ácido araquidónico (Kayama Y et al, 2015). La producción excesiva de ROS juega un papel esencial en el desarrollo de ECV. Este incremento de producción derivada de una disfunción endotelial y vascular que contribuye a una serie de reestructuraciones vasculares que conducen a una estenosis de los vasos sanguíneos y aterosclerosis. Un elevado número de ROS provoca daños en macromoléculas celulares como son lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (He F and Zuo L, 2015). Se ha demostrado que el estrés oxidativo está asociado con la patogénesis de diversas enfermedades, conduciendo a un aumento de la resistencia a la insulina, dislipemia, presión sanguínea elevada, síndrome metabólico y disfunción endotelial, factores todos ellos de riesgo de desarrollo de una ECV (Tangvarasittichai S, 2015).

Diversos estudios han relacionado el sobrepeso y la obesidad con un aumento de estrés oxidativo (Keaney JF et al, 2003; Stefanovic A et al, 2008; Fernández-Sánchez A et al, 2011; Marseglia L et al, 2015). Esta relación se da por diversos mecanismos. En individuos obesos, la actividad antioxidante es menor y son más susceptibles al daño oxidativo (Amirkhizi F et al, 2010). Por otro lado, el exceso de grasa conduce a un aumento de la concentración de ácidos grasos libres que provoca una mayor oxidación mitocondrial. Este estado se traduce en una mayor síntesis de radicales libres, estrés oxidativo, daño en el ADN mitocondrial y, por último, lipotoxicidad que conlleva efectos negativos en las estructuras celulares de los ácidos grasos. Este daño produce una mayor síntesis de citoquinas como TNF- α el cual genera aún más ROS en los tejidos (Marseglia L et al, 2015).

Un incremento de leptina también está asociado con un mayor estrés oxidativo ya que incrementa la actividad fagocítica de los macrófagos, induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias y aumenta los marcadores de disfunción endotelial (Knudson JD et al, 2005). La deficiencia de adiponectina está inversamente correlacionada con el estrés oxidativo sistémico ya que moléculas como TNF- α o la IL-6 son potentes inhibidores de la síntesis de adiponectina. La exposición a altos niveles de ROS suprimirán su expresión y secreción (Furukawa S et al, 2004).

Varios estudios han demostrado que la nutrición se asocia con un aumento o descenso del estrés oxidativo. Dietas con una elevada cantidad de ácidos grasos y azúcares conduce a un aumento del estrés oxidativo, debido a que aumenta la activación de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y esto conduce a la sobreproducción de ROS (Inoguchi T et al, 2000; Rani V et al, 2016). En cambio, una dieta baja en grasa y baja en carbohidratos con un alto contenido de antioxidantes, rica en AGM, AGP ω -3, vitamina C y vitamina E, puede ayudar a restablecer el equilibrio de producción de radicales libres (Sofi F et al, 2010). La actividad física también mejora el sistema antioxidante lo que ayuda a controlar la situación de estrés oxidativo (Scheele C et al, 2009).

LA DMT2 está altamente relacionada con el estrés oxidativo debido a que contribuye al desarrollo y progresión de complicaciones diabéticas, las cuales están asociadas con la resistencia a la insulina y a la secreción defectuosa de la misma (Kayama Y et al, 2015). La hiperglucemia induce el exceso de producción de ROS mitocondrial. Las altas concentraciones de glucosa son metabolizadas a través del ciclo del ácido tricarbónico que aumenta el flujo de NADH en la cadena transportadora electrónica mitocondrial generando superóxido y aumentando el estrés oxidativo (Brownlee M, 2005; Domingueti CP et al, 2015; Marseglia L et al, 2015). ROS también tienen un papel importante en la desregulación de la proliferación de las células pancreáticas β debido a que alteran los reguladores del ciclo celular y esto contribuye a la progresión de la diabetes (Rane SG et al, 1999). Las células pancreáticas β son más vulnerables al estrés oxidativo debido a que tienen niveles bajos de expresión de enzimas detoxificantes de ROS como la catalasa y la glutatión peroxidasa, siendo así más susceptibles al daño que pueda causar (Verdile G et al, 2015).

Recientes avances han mostrado que el estrés oxidativo contribuye a alterar la sensibilidad a la insulina en el endotelio vascular (Paneni F et al, 2015). Esta situación puede causar una inhibición de la actividad de la insulina y una aceleración del desarrollo de DMT2 (Tangvarasittichai S, 2015; Rani V et al, 2016). El estado de hiperglucemia en la DMT2 también produce un aumento de la producción de superóxido como se ha comentado anteriormente, lo que también se asocia a un desarrollo de la resistencia a la insulina (Patel TP et al, 2016).

1.4.4.- Inflamación

La inflamación es una respuesta fisiológica del organismo a un estímulo dañino, ya sea físico, químico o biológico, que induce el restablecimiento de la homeostasis metabólica sistémica. Sin embargo, la inflamación es una de las principales causantes de enfermedad, incluyendo ECV, cuando la respuesta inflamatoria es demasiado débil, demasiado fuerte o demasiado larga provocando un estado de inflamación crónica (Lawrence T and Gilroy DW, 2007; Gregersen I et al, 2015). La inflamación crónica está caracterizada por una producción anormal de citoquinas, aumento de los reactivos de fase aguda y una activación de una serie de vías de señalización inflamatorias (Hotamisligil GS, 2006). Existe actualmente evidencia que indica que la inflamación puede estar relacionada con diversas enfermedades, como puede ser obesidad, DMT2, resistencia a la insulina, la hipertensión arterial, las dislipemias y las ECV. Diversos estudios han mostrado la relación entre la inflamación y las ECV, ya que personas con enfermedades que causan inflamación sistémica crónica, como son la artritis reumatoide y las enfermedades infecciosas, tienen un mayor riesgo de desarrollar una ECV que los individuos sanos (Tufano A et al, 2012; Nurmohamed MT et al, 2015).

La obesidad se caracteriza por la activación del proceso inflamatorio en sitios metabólicamente activos como el tejido adiposo, el hígado y las células inmunitarias (Karalis KP et al, 2009). La disfunción del tejido adiposo provocará una alteración de la producción de adipocinas, aumentando la síntesis de mediadores inflamatorios como son TNF- α , IL-1 o IL-6 entre otros, produciendo un estado de inflamación crónica en la obesidad (Bondia-Pons I et al, 2012). La hipoxia es una causa potencial de inflamación en el tejido adiposo en obesidad resultado de la hipertrofia de los adipocitos. Una de las características de la inflamación es la infiltración del tejido inflamado por células del sistema inmune como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Se ha sugerido que la expansión de los adipocitos puede empezar a producir señales que conducen al reclutamiento de macrófagos necrosando los adipocitos. (Hotamisligil GS, 2006; Bondia-Pons I et al, 2012). Las señales inflamatorias también pueden estar moduladas por lípidos. El exceso de ácidos grasos libres está unido a receptores del sistema inmune, como los receptores Toll-like (TLR) 4 y 2 que se expresan en el tejido adiposo y su expresión se induce en sujetos obesos, lo que conlleva la activación de factores de transcripción proinflamatorios (Vitseva OI et al, 2008).

1.5.- Genética de la obesidad y la diabetes

En la mitad de los años 80, surgió una nueva disciplina resultado de la interacción entre la epidemiología y la genética, la epidemiología genética. Se basa en el estudio del papel que pueden tener los factores genéticos en las enfermedades, tanto en familias como en poblaciones, y la interacción de estos factores genéticos con factores ambientales. Las áreas de estudio incluyen las causas de las enfermedades, su distribución y control (Khoury MJ et al, 1993; Kaprio J, 2000). La epidemiología genética utiliza conjuntamente técnicas desarrolladas en matemáticas aplicadas a genética y estadística, genética cuantitativa y epidemiología (Burton PR et al, 2005; Teare MD and Koref MF, 2011). Un cambio en el código genético, por pequeño que sea, puede tener importancia ya que puede predisponer al desarrollo de una enfermedad (Collins FS, 1999). Los avances conseguidos en el campo de la biología molecular y los avances estadísticos han hecho posible identificar y caracterizar parte de estas variaciones en el código genético asociadas con pequeños efectos a nivel individual, junto con el posterior estudio de la posible modulación de estos efectos por factores ambientales. El avance en esta disciplina ha dado lugar a lo que ahora llamamos nueva era de la medicina de precisión o también salud de precisión (Feero WG, 2017; Stratakis CA, 2017).

1.5.1.- Generalidades

Se denomina mutación a cambios heredables que alteran la secuencia del ADN. Esta mutación puede afectar a un solo nucleótido (SNP o *single nucleotide polymorphism*) o pueden producirse por repetición (CNV o *copy number variation*), inversión, delección o traslocación de segmentos genómicos. Estas variaciones pueden darse en regiones codificantes, los exomas, o no codificantes del genoma, como son los intrones o las regiones promotoras. Estas mutaciones además tienen dos alelos debido a que presentan dos variedades del mismo gen, el alelo natural o silvestre (*wild type*) y el alelo mutante. El término mutación se refiere a cambios que afectan gravemente a la proteína o enzima codificada. En algunos casos, la alteración de un solo gen puede provocar la enfermedad (enfermedad monogénica o mendeliana). Tienen una baja prevalencia y se transmiten de generación en generación por herencia mendeliana, dominante o recesiva. En cambio, se denominan polimorfismos cuando las variaciones son comunes, es decir, aparecen

en al menos el 1% de la población (Altshuler DM et al, 2010). Algunos pueden afectar modestamente a la función o, incluso, no tener ningún efecto; pero varios polimorfismos desfavorables pueden conducir a la aparición de una enfermedad. Se calcula que el 90% de las variantes en la secuencia del ADN son SNPs (Collins FS et al, 1998).

Los métodos utilizados para el estudio de genes causantes de enfermedades han evolucionado rápidamente en las últimas décadas. Dos loci están ligados si se transmiten de manera conjunta a la descendencia más a menudo de lo esperado bajo una herencia independiente (Groop L and Pociot F, 2013). El desequilibrio de ligamiento es una propiedad de los SNPs presentes en un tramo contiguo de la secuencia genómica que describe el grado por el que un alelo de un SNP es heredado o correlacionado con un alelo de otro SNP dentro de una población (Bush WS and Moore JH, 2012). Al conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente se denomina haplotipo (International HapMap Consortium, 2005). Dos loci están ligados si, durante la meiosis, la recombinación ocurre entre ellos con una probabilidad menor del 50%. Por el contrario, cada vez que ocurre la recombinación entre loci en la población, el desequilibrio de ligamiento es débil y sólo se mantendrá si los loci están muy cerca (Teare MD and Barrett JH, 2005). El análisis de ligamiento es a menudo el primer paso dentro de la investigación genética para identificar regiones que pueden contener genes relacionados con una enfermedad, incluso si no hay una evidencia previa.

Uno de los mayores avances en el análisis genético fue la finalización del Proyecto del Genoma Humano en el año 2000. Sus resultados fueron publicados el año 2003 (Collins FS et al, 2003). En el proyecto se determinó la secuencia de más del 90% de los 3.200 millones de pares de bases que forman los aproximadamente 38.000 genes del genoma humano, repartidos entre los 23 pares de cromosomas. También se observó que cada persona comparte alrededor del 99,9% del mismo código genético con el resto de seres humanos. Sólo el 0,1% de los genes presentan una variabilidad individual, por lo que sólo 1.250 nucleótidos separan a una persona de otra. Se han encontrado entre 1,4 - 2,1 millones de SNPs, la mayoría de los cuales no tienen un efecto clínico concreto. Aunque también hay que considerar el medio ambiente y el estilo de vida debido a que su interacción con las variantes genéticas puede provocar el desencadenamiento de la enfermedad. Una de las aplicaciones más directas de conocer la secuencia de genes que componen el genoma humano es

que se puede conocer la base molecular de muchas enfermedades genéticas y se pueden realizar un diagnóstico adecuado (Alburquerque D et al, 2015).

En la epidemiología genética, hay diferentes aproximaciones para identificar genes relacionados con la aparición de enfermedades. Por un lado está el estudio de genes candidatos que se basan en la búsqueda de un marcador alélico que está relacionado con la presencia de una enfermedad (Zhu M and Zhao S, 2007). Con esta aproximación se observa que una variación del fenotipo bajo estudio, ya sea una característica cuantitativa o un pequeño atributo o enfermedad, está causada por una mutación funcional de un gen. Los genes candidatos son generalmente genes con una función biológica conocida regulando directa o indirectamente los procesos que se quieren investigar, la cual se puede confirmar evaluando los efectos que causan la variante genética con un estudio de asociación (Cordell HJ and Clayton DG, 2005). Por otro lado, los estudios de ligamiento se basan en comparar patrones de variación entre genotipos y el fenotipo de estudio mediante el estudio de marcadores genéticos espaciados a lo largo de la totalidad del genoma. Al encontrar una zona relacionada con la presencia del fenotipo de estudio se le denomina loci de rasgos cuantitativos (QTL). Este concepto fue definido por Sax en 1923 y sigue siendo relevante en la actualidad (Sax K, 1923). El primordial interés en los QTL en el estudio de enfermedades es el número de loci que contribuyen a la variación del rasgo a estudiar y la distribución de la magnitud de sus efectos (Stranger BE et al, 2011). Los estudios de ligamiento han tenido mucho éxito en identificar variantes genéticas con gran efecto y penetrancia, permitiendo la comprensión de un gran número de enfermedades mendelianas. Pero, en contraste con las enfermedades monogénicas, las enfermedades complejas son más difíciles de estudiar de esta forma, debido a que los estudios de ligamiento tienen menor poder para detectar variantes con un efecto pequeño (Risch N and Merikangas K, 1996). Los análisis de asociación, en cambio, permiten estudiar la relación entre fenotipos y genotipos de individuos no relacionados y son más potentes en la detección de estas variantes genéticas comunes (frecuencia del alelo menor (MAF) >0.05) cuyo efecto contribuye en menor medida al riesgo de la enfermedad (Cordell HJ and Clayton DG, 2005).

En los últimos años, y gracias al desarrollo de las técnicas en biología molecular y genética y de la biotecnología, ha surgido los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) que suponen una poderosa arma para el estudio genético de las enfermedades humanas (Manolio TA, 2010). Esta técnica se basa en el escaneo de

numerosos polimorfismos (entre 0,1 – 5 millones) a través del genoma completo usando poderosos métodos estadísticos para identificar loci asociados con un fenotipo concreto (Stranger BE et al, 2011; Manolio TA, 2013; Welter D et al, 2014; Kalmbach DA et al, 2017).

La metodología utilizada para estos estudios se basa en chip de microarrays para realizar ensayos en las que se analiza un número muy elevado de SNPs. Estos estudios de GWAs se basan en la comparación de dos grupos, uno compuesto con personas sanas y que se denomina control y otro grupo compuesto por personas que presentan la enfermedad, el grupo caso. Para cada SNP analizado, que habitualmente oscila alrededor del millón, se analiza si su frecuencia alélica varía de forma significativa entre ambos grupos. Si esta diferencia existe, se determina que ese SNP está relacionado con la enfermedad (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Todo el análisis estadístico se realiza con la ayuda de un software bioinformático. Esta nueva tecnología ha facilitado el desarrollo de proyectos como el International HapMap Project (International HaopMap Consortium, 2005). En el proyecto inicialmente se genotipó 3,9 millones de SNPs en 270 muestras de DNA de cuatro grupos étnicos diferentes y definió los patrones de herencia de la variación genética así como la cuantificación por desequilibrio de ligamiento. Dos SNPs con un fuerte desequilibrio de ligamiento pueden heredarse más frecuentemente que los SNPs con un débil desequilibrio. Toda la información obtenida se depositó en una base de datos pública. El proyecto 1000 Genome Project ha incrementado la información de los SNPs en más de 2 millones (1000 Genomes Project Consortium, 2010). Actualmente los Consorcios de estudios que se han formado para realizar GWAs de diferentes fenotipos suele superar los 100.000 individuos analizados, con lo cual se aumenta mucho el poder estadístico (Chen GB et al, 2016; Liu CT et al, 2016

Una de las ventajas de la aproximación por GWAs es que no es necesario un conocimiento previo de la estructura genómica y de los rasgos etiológicos de la enfermedad, en contraste de los estudios de genes candidatos, donde es necesario el conocimiento previo de la etiología de la enfermedad para poder identificar esos genes candidatos. Otra de sus ventajas es la posibilidad de la aparición de genes causales que previamente no se sospechaba que estuvieran relacionados con la enfermedad, así como la posibilidad de estimar los efectos genéticos completos (aditivos y no aditivos) y los efectos pleiotrópicos de una manera imparcial.

Por el contrario, aunque los estudios de GWAs son muy útiles para identificar regiones del genoma que albergan variantes que contribuyen a fenotipos complejos y enfermedades, la información obtenida sólo explica una pequeña proporción de la transmisión de predisposición a la enfermedad estimada (“missing heritability”). Se han indicado diferentes explicaciones para este hecho, descritas de manera más desarrollada por los autores Manolio TA y colaboradores (2009) y por Eichler EE y colaboradores (2010). Una de las posibles razones podría deberse a que los polimorfismo con una baja frecuencia alélica (MAF 0,005-0,05) o las variantes raras (MAF<0,005) que no son capturadas por estas plataformas de genotipado podrían contribuir a esta heredabilidad. Otra de las posibles explicaciones se relaciona con el efecto de las variantes asociadas, ya que podría estar infravalorado debido a un desequilibrio de ligamiento incompleto entre las variantes causales y los SNPs marcadores. Por último, también se cree que la epistasia, epigenética y las interacciones genotipo-ambiente pueden también contribuir a la heredabilidad (Biernacka JM et al, 2016; Polimanti R et al, 2017).

Desde el primer éxito que se consiguió con las tecnología de GWAs en el 2005 (Haines JL et al, 2005; Edwards AO et al, 2005; Klein RJ et al, 2005), se han descubierto una gran número de loci relacionados con la obesidad y la DMT2. Con respecto a la obesidad, el primer locus asociado con ella por un estudio de GWAs fue el gen FTO, concretamente el polimorfismo rs9939609 situado en el primer intrón del gen (Frayling et al, 2007). Posteriormente se han publicado diferentes estudios de GWAs (Loos RJ et al, 2008; Willer CJ et al, 2009; Speliotes EK et al, 2010; Sandholt CH et al, 2012; Berndt SI et al, 2013) que han identificado hasta ahora más de 50 loci genéticos asociados con algún rasgo relacionado con obesidad. También en el campo de la DMT2 ha habido importantes estudios basados en GWAs. El primero identificó dos nuevos loci relacionados con esta patología, los genes HHEX y SLC30A8 (Sladek R et al 2007). Ese mismo año se publicaron tres estudios de GWAs asociados con diabetes cuyos resultados eran similares (Saxena R et al, 2007; Scott LJ et al, 2007; Zeggini E et al, 2007). Posteriormente, han surgido diferentes estudios con los que se han podido determinar un gran número de loci asociados a esta patología (Voight BF et al, 2010; Kooner JS et al, 2011; Morris AP et al, 2012; Cho YS et al, 2012; Tabassum R et al, 2013; Mahajan A et al, 2014). Los GWAs identificaron unas 153 variantes para la DMT2 en más de 120 loci en 2015 (Prasad RB and Groop L, 2015). Posteriormente, ha seguido en aumento el número de GWAs realizados, así como el número de personas incluidas en los GWAs, por lo que el número de variantes

genéticas relacionadas con la obesidad y con la diabetes a través de GWAs no deja de incrementarse paulatinamente (Piaggi P et al, 2017; Ng MCY et al, 2017; Wood AR et al, 2017)

Las mejoras en las técnicas genéticas han permitido analizar una gran cantidad de marcadores de distintos aspectos que pueden ampliar la información de la estructura de una población. Uno de estos aspectos es el estudio de marcadores de ancestro genético, denominados AIMs (Ancestry Informative Markers) (Drineas P et al, 2010). De acuerdo con la teoría del gen ahorrador, una combinación de variantes genéticas que en una época fueron beneficiosas para la supervivencia, en época de abundancia pueden resultar perjudiciales. El ancestro genético puede reflejar este sustrato y asociarse con fenotipos de una determinada enfermedad, como puede ser las enfermedades cardiovasculares o sus factores de riesgo, como son la obesidad y la DMT2. Se define los marcadores AIMs como SNPs que presentan unas grandes diferencias en sus frecuencias alélicas en diferentes grupos étnicos o continentales, mientras otros SNPs no (Tian C et al, 2008).

Actualmente, el análisis de estos AIMs está cobrando más relevancia por diferentes motivos. Uno de ellos es la mejora de la caracterización de la arquitectura de la población (Pino-Yanes M et al, 2011). Otros motivos es la mejora de los estudios epidemiológicos por esta estructura de la población permitiendo la reducción de los falsos positivos o resultados negativos en los estudios caso-control para la asociación de variantes genéticas a la enfermedad debido a que se podría conocer si las diferencias entre las frecuencias alélicas son debidas a pertenecer a un determinado grupos étnicos (Enoch MA et al, 2006).

Por tanto, el número de genes relacionados con la obesidad y la DMT2 conocidos es cada vez mayor debido al avance de las nuevas tecnologías. Por ello, en el presente trabajo se hizo una rigurosa selección de las variables a analizar. En el estudio de los polimorfismos analizados individualmente, la selección se basó en la literatura previa, seleccionando genes relacionados con la obesidad, la DMT2 y factores de riesgo relacionados de gran relevancia. Por ello, se eligieron variantes concretas asociadas a la hipertrigliceridemia, adiposidad, resistencia a la insulina, metabolismo lipídico y, por último, la relación de estas patologías con genes asociados al ancestro genético. Así se propone el estudio de los polimorfismos de los genes ApoA5 promotor, ApoA5 S19W, CLOCK C, FTO, IRS1, KLF14, LPL,

NR1D1, OGG1, SCD1. Y relacionados con el ancestro genético, polimorfismos de los genes CLNK, FAM5C, KCNMA1, PLCB1, PRDM16, SLC45A2, ZNF564, rs293553, rs822759 y rs10509954. Para completar este análisis genético, se analizó con un array de genotipado denso nuevos genes como ASB3, CDKN2B, DMRTA1, INAFM2 y MTNR1B. A continuación se realiza una descripción de los genes seleccionados y de las variantes genéticas a analizar.

1.5.2.- Genes seleccionados

1.5.2.1.- Genes asociados con Obesidad

- **Gen APOA5 (Apolipoprotein A5).** Es un gen localizado en el cromosoma 11q23.3 que consta de 4 exones y 3 intrones que codifican para una proteína de 369 aminoácidos, la ApoA5. La proteína se expresa fundamentalmente en el hígado donde se secreta a la circulación ligada al c-HDL, VLDL y quilomicrones (Pennacchio LA et al, 2001). Diversos estudios han mostrado la implicación del gen en la regulación de los niveles de lípidos, concretamente de los TG, reduciendo su cantidad estimulando la lipoproteínlipasa (LPL) e inhibiendo la producción de VLDL-TG en el hígado. Esto sugería que la ApoA5 tiene un papel importante en la hidrólisis de los componentes lipídicos de las lipoproteínas (Austin MA et al, 2004; Schaap FG et al, 2004; Merkel M et al, 2005; Smith CE et al, 2010; Garelnabi M et al, 2013). En el presente estudio se analizaron dos variantes del gen, el polimorfismo rs3135506 y rs662799. El polimorfismo rs3135506 también denominado S19W ó 56 C>G está situado en una región codificante del gen que resulta un cambio de aminoácido de serina por triptófano y los portadores del alelo 19W se asocian con elevadas cifras de TG en diversos estudios (Pennacchio LA et al, 2001; Lai CQ et al 2003; Qi L et al, 2007b). El polimorfismo rs662799 está situado en el promotor del gen, también denominado -1131T>C, es el polimorfismo más estudiado. También se ha asociado con la concentración de TG, donde los portadores del alelo C tenían mayor riesgo de hipertrigliceridemia (Endo K et al, 2002). Estos resultados se han replicados en diferentes poblaciones (Endo K et al, 2002; Martin M et al, 2003; Lai CQ et al, 2003). Además, se han descrito interacciones entre ambos polimorfismos y factores ambientales (Corella D et al, 2007; Sotos-Prieto M et al, 2010; Sánchez-Moreno C et al, 2011; Yin RX et al, 2011; Wu Y et al, 2016).

- **Gen FTO (Fat mass and obesity associated).** El gen se localiza en cromosoma 16q12.2 y codifica para la 2-oxoglutarato demetilasa dependiente de ácido nucléico, que se expresa en el hipotálamo y en el tejido adiposo y cuyas funciones in vivo todavía no son bien conocidas (Gerken T et al, 2007). También actúa como coactivador transcripcional (Wu Q et al, 2010) y un posible regulador de la longitud del telómero (Dlouha D et al, 2012). Diversos estudios de GWAs han mostrado una fuerte asociación entre polimorfismos de este gen y la obesidad o parámetros relacionados con ella como son la grasa corporal, IMC, perímetro de cintura y cadera (Dina C et al, 2007; Frayling TM et al, 2007, Scuteri A et al, 2007). El polimorfismo rs9939609, situado en el primer intrón del gen FTO es el que muestra una mayor asociación con estos parámetros (Frayling TM et al, 2007), siendo el alelo menor de este polimorfismo el que se asocia con mayor riesgo de obesidad y ha mostrado una fuerte influencia sobre el IMC (Hinney A et al, 2007; Li H et al, 2012; Marcadenti A et al, 2013)
- **Gen KLF14 (Krüppel like factor 14).** El gen KLF14 se localiza en el cromosoma 7p32.2. La familia de genes KLF codifican para proteínas reguladoras de diversos procesos biológicos que incluyen proliferación, diferenciación, crecimiento, desarrollo, supervivencia y respuesta a estrés externo (McConnell BB and Yang VW, 2010). Ocho miembros de esta familia de genes tienen un papel importante en la red de transcripción que controla la formación de preadipocitos, adipogénesis, lipogénesis y obesidad. Diversos estudios han mostrado que el gen KLF14 es una pieza fundamental en la regulación de la expresión, en el tejido adiposo, de genes asociados con aspectos metabólicos, relacionados con los lípidos y el IMC (Chasman DI et al, 2009; Teslovich TM et al, 2010; Small KS et al, 2011). También se ha asociado el gen KLF14 a la susceptibilidad a la DMT2, parece ser que a través de la reducción de la acción de la insulina (Voight BF et al, 2010). El polimorfismo rs4731702 es una variante intergénica situada a 14 kb del gen KLF14 y que actúa en la regulación del gen influyendo en el metabolismo lipídico. Este polimorfismo se ha asociado con niveles plasmáticos de c-HDL y riesgo de DMT2, así como enfermedades cardiovasculares (Chen X et al, 2012; Huang P et al, 2013).

- **Gen LPL (Lipoprotein Lipase).** El gen LPL es un gen de alrededor de 35 kb de longitud, localizado en el cromosoma 8p21.3 y con 10 exones. El gen se expresa en corazón, músculo y tejido adiposo. El gen codifica una enzima multifuncional que tiene dos funciones. La primera es catalizar la liberación de los TG desde los quilomicrones y VLDL en ácidos grasos libres y glicerol, los cuales son degradados por el hígado o convertidos a partículas de c-LDL por la lipasa hepática. La segunda es actuar como ligando del c-LDL para su captación y eliminación por los receptores hepáticos. Durante este proceso, el colesterol libre y fosfolípidos son transferidos a las partículas de c-HDL, aumentando su concentración (Corella D et al, 2002; López-Miranda J et al, 2004; Wood AC et al, 2011). Una elevada actividad LPL se asocia con una alta actividad lipolítica disminuyendo los niveles de TG y aumentando los niveles de c-HDL (Pirim D et al, 2015). Variantes genéticas del gen LPL se asocian con alteraciones en el perfil lipídico y un aumento del riesgo de ECV (Elber CC et al, 2012; Kusunuru K et al, 2012). En el presente estudio se analizó el polimorfismo rs13702 localizado en la región 3'UTR del gen. Esta variante se ha asociado previamente con la concentración de TG y c-HDL (Tang W et al, 2010; Richardson K et al, 2013).
- **Gen NR1D1 (Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1).** También denominado gen REV-ERB Alpha. Este gen se encuentra situado en el cromosoma 17q21.1. Este gen se expresa altamente en el tejido adiposo, músculo esquelético, cerebro e hígado y su expresión se induce durante la diferenciación de adipocitos (Laitinen S et al, 2005). Tiene un papel muy importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, el metabolismo de la glucosa, la capacidad oxidativa del músculo esquelético y la adipogénesis (Kumar N et al, 2010; Ruano EG et al, 2014). El gen NR1D1 se ha identificado como un componente integral del ciclo circadiano (Ueda HR et al, 2002). El sistema circadiano controla los estados de sueño y vigilia, los ciclos de ayuno y alimentación, organizando las funciones biológicas o procesos fisiológicos en 24 horas que sincronizan la ingesta de energía y el gasto con cambios en el ambiente externo impuesto por la salida y puesta del sol (Turek FW et al, 2005). Este gen está considerado un receptor nuclear que regula la transcripción de uno de los genes centrales del ciclo circadiano, el gen BMAL1 (Gimble JM and Floyd ZE, 2009). Variantes genéticas del gen se han asociado con parámetros relacionados con obesidad, como el IMC, circunferencia de cintura, niveles de TG, c-HDL y CT así como elevada

adiposidad central (Solt LA et al, 2012; Ruano EG et al, 2014; Dashti HS et al, 2015). El polimorfismo rs2314339 se ha asociado con riesgo de obesidad y con el metabolismo lipídico en diferentes poblaciones (Garaulet M et al, 2013).

- **Gen SCD1 (Stearoyl.CoA desaturase-1).** El gen se localiza en el cromosoma 10q24.31 tiene 6 exones y se expresa de manera importante en el tejido adiposo y el hígado. La enzima que codifica se encarga de catalizar la síntesis endógena de AGM *de novo* o partir de AGS provenientes de la dieta. Principalmente cataliza la síntesis de oleico y palmitoleico a partir de palmítico y esteárico de la dieta (Merino DM et al, 2010). Los AGM son importante para el mantenimiento de estructuras lipídicas (fosfolípidos, ésteres de colesterol) y como mediadores de señales de transducción, diferenciación celular y apoptosis (Warensjö E et al, 2007). Estudios en modelos animales han mostrado que la actividad de SCD1 está fuertemente asociada con fenotipo obeso, donde un aumento de la actividad favorece en desarrollo de complicaciones cardiovasculares (Merino DM et al, 2010). Variaciones en el gen SCD1 en humanos puede relacionarse con susceptibilidad a enfermedades como la obesidad, la DMT2 u otras condiciones relacionadas (Martín-Núñez et al, 2013; Moreno-Indias I and Tinahones FJ, 2015). El polimorfismo rs10883463 se ha asociado con parámetros relacionados con ambas patologías (Warensjö E et al, 2007; Arregui M et al, 2012 (b)).

1.5.2.2.- Genes asociados con DMT2

- **Gen CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput).** Este gen se localiza en el cromosoma 4q12. Codifica para un factor de transcripción el cual se considera un componente central en la regulación del reloj circadiano. La regulación de estos ritmos se ha visto que influye en un amplio rango de procesos incluyendo el metabolismo de la glucosa, el metabolismo lipídico, la temperatura corporal, la secreción de hormonas endocrinas y en la actividad cardiovascular (Marcheva B et al, 2013; Takeda N and Maemura K, 2015; Valenzuela FJ et al, 2016). Alteraciones en los ritmos circadianos contribuyen a la patología de enfermedades cardiovasculares, cáncer, síndrome metabólico

y envejecimiento (Van Cauter E et al, 1997; Takahashi JS et al, 2008; Brum MC et al, 2015). La proteína que codifica el gen CLOCK es un factor de transcripción con un motivo hélice-bucle-hélice que le permite dimerizar en el citosol con la proteína BMAL1, otro de los componentes del sistema circadiano. Este dímero se transloca al núcleo donde se une a las regiones promotoras de otros genes circadianos (PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2, NR1D1, ROR α), estimulando su expresión (Micó V et al, 2016). Este dímero actúa en células de órganos clave como son el hígado, el músculo esquelético, los islotes pancreáticos o el tejido adiposo. Variantes genéticas de este gen se han asociado con diversas alteraciones metabólicas (Yoshino J and Klein S, 2013). En el presente trabajo analizaremos el polimorfismo rs4580704, situado en intrón 9 del gen CLOCK. Diversos estudios han relacionado este polimorfismo con parámetros antropométricos, variaciones en la concentración de glucosa y de tensión arterial (Sookian S et al, 2008, Zhang L et al, 2014). Se observó que los portadores del alelo menor G presentaban menor peso, menor concentración de insulina plasmática y menor riesgo de hiperglucemia (Garaulet M et al, 2009).

- **Gen IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1).** Este gen está situado en el cromosoma 2q36.3. Codifica para una proteína que juega un papel clave en la transmisión de señales desde el receptor de la insulina hacia vías de señalización intracelulares. Varios estudios han mostrado que variaciones genéticas cerca del gen IRS1 pueden predisponer a un mayor riesgo de DMT2 y de fenotipos relacionados con la enfermedad (Voight BF et al, 2010). El polimorfismo rs2943641 está situado en una región no codificante a 500 kb del gen. Su alelo de riesgo C se ha asociado con un aumento de resistencia a la insulina y una mayor hiperglucemia así como a anormalidades lipídicas, como un descenso de c-HDL y un aumento de TG (Rung J et al, 2009; Kilpeläinen TO et al, 2011a; Sharma R et al, 2011; Yiannakouris N et al, 2011; Zheng JS et al, 2013). Otro polimorfismo, el rs2943634 está situado en una región no codificante del cromosoma 2 cerca del gen IRS1. Su alelo de riesgo C puede predisponer a una enfermedad coronaria arterial (CAD) a través de un aumento de la susceptibilidad a la DMT2 y el polimorfismo se asocia con mayores niveles de c-HDL (Samani NJ et al, 2007; Arregui M et al, 2012 (a); Vakalis K et al, 2014).

- **Gen OGG1 (8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1).** Es un gen codificante de proteína localizado en el cromosoma 3p26.2. El producto de este gen se ha indicado que está implicado en el sistema de reparación de ADN. Las especies reactivas del oxígeno se producen durante el metabolismo aeróbico, principalmente por la cadena respiratoria mitocondrial. Cuando su producción excede la capacidad del sistema antioxidante de defensa se produce una situación de estrés oxidativo (Pácal L et al, 2011; Soares JP et al, 2015) que puede producir modificaciones en el ADN. El aumento de daño oxidativo en el ADN está involucrado en el envejecimiento así como en enfermedades crónicas degenerativas incluyendo cáncer y enfermedades neurodegenerativas (D'Errico M et al, 2008). Una de las bases mutagénicas producidas por este estrés oxidativo es la 7,8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) que produce una alteración al utilizar residuos de adenina en lugar de los residuos usuales de citosina produciendo una transversión aumentando la de G:C a T:A (Thameem F et al, 2010). El gen OGG1 codifica una enzima responsable de la eliminación de 8-OHdG (Jensen A et al, 2012). El polimorfismo rs1052133 es el más común del gen OGG1. Es una sustitución de citosina a guanina en el nucleótido 1245, la cual conduce a una sustitución serina a cisteína localizada en el dominio C terminal de la proteína, concretamente en el codón 326 (Simonelli V et al, 2013). El alelo menor G codifica la cisteína. El polimorfismo también se denomina Ser326Cys. Este polimorfismo se ha asociado con diferentes tipos de cáncer (Weiss JM et al, 2005) y con otras patologías influidas por la aparición de un mayor número de radicales libres debido al estrés oxidativo, como puede ser la DMT2 (Daimon M et al, 2009; Thameem F et al, 2010; Sun C et al, 2010; Pácal L et al, 2011; Hara M et al, 2014).

1.5.2.3.- Genes asociados con Ancestro genético

En el presente estudio se analizaron 10 marcadores AIMS elegidos por su relevancia en población española, siete de ellos se seleccionaron del estudio de Pino-Yanes et al (2011). Estos marcadores fueron: rs2419063, intrónico en el gen FAM5C (cromosoma 1); rs11807062, intrónico del gen PRDM16 (cromosoma 1); rs16891982 con cambio de aminoácido en el gen SLC45A2 (cromosoma 5); rs822759, intergénico (cromosoma 3); rs2014303, intrónico en el gen CLNK (cromosoma 4); rs10509954, intergénico (cromosoma 10); y rs2116830, intrónico

en el gen *KCNMA1* (cromosoma 10). Además de estos marcadores, se seleccionaron otros 3 AIMs más: rs6086473, intrónico en el gen *PLCB1* (cromosoma 20); rs293553, intergénico (cromosoma 20) y rs17638989, intrónico en el gen *ZNF564* (cromosoma 19). Además de ser marcadores AIMs, algunos de estos polimorfismos se han relacionado previamente con factores de riesgo de la obesidad y la DMT2, así como con aspectos característicos de las diversas poblaciones.

El polimorfismo rs2419063 es una variante intrónica ubicada en el gen *FAM5C* el cual pertenece a la familia con la secuencia similar 5, miembro C (Family with sequence similarity 5, member C). El gen está localizado en el cromosoma 1. Algunos miembros de esta familia se han asociado a un mayor riesgo de IAM y se ha observado que pueden estar implicados en el proceso de inflamación vascular (Sato J et al, 2014). El gen *PRDM16* (PR domain containing 16) está situado también en el cromosoma 1. El polimorfismo rs11807062 de dicho gen se considera una variante intrónica dentro de la región que codifica para la proteína. Se ha comprobado que el gen *PRDM16* puede estar relacionado con la función del tejido adiposo blanco, ya que se ha visto que se expresa en él y puede estar relacionado con genes adipogénicos (*PPARG*, *ADIPOQ*, *PLIN1*), genes relacionados con la señalización de la insulina (*IRS1*, *GLUT4*) y genes lipogénicos (*FASN*, *ACACA*). Por tanto, polimorfismos en este gen pueden estar relacionados con la obesidad y la acción de la insulina (Moreno-Navarrete JM et al, 2015). El gen *KCNMA1* (potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1) está situado en el cromosoma 10q22.3. El alelo G de rs2116830, localizado en el intrón 28 del gen, muestra una consistente asociación alélica con la obesidad. Estudios de GWAs en diferentes cohortes europeas han confirmado esta asociación, llegando a indicarse que este polimorfismo podría actuar en el tejido adiposo aumentando el número de adipocitos promoviendo la obesidad (Jiao et al, 2011).

Por otro lado, diversos estudios han analizado la relación entre el gen *SLC45A2* (solute carrier family 45 member 2) y la pigmentación. El gen está localizado en el cromosoma 5p13.2. El gen codifica para una proteína transportadora que media en la síntesis de melanina. Variantes en este gen están asociadas con variaciones en el color de piel y de ojos. Se ha visto que sus frecuencias alélicas difieren según el grupo étnico. En un estudio de ancestro europeo, el polimorfismo rs16891982 se encontró significativamente asociado con el color de pelo (Branicki et al, 2008).

Además, otros estudios han encontrado la relación de este polimorfismo con la producción de eumelanina, pigmento que determina el color del ojo humano (Andersen JD et al, 2013).

El polimorfismo rs822759 es una variante intergénica localizada en el cromosoma 3. Ha sido estudiado en relación a la herencia de la duración de los intervalos QT del electrocardiograma (medida para el diagnóstico de arritmias) así como la variabilidad de la frecuencia cardíaca para intentar prevenir eventos cardiovasculares dentro del estudio Framingham (Newton-Cheh C et al, 2008). Por otro lado, el gen CLNK (citokine dependent hematopoietic cell linker) se sitúa en el cromosoma 4p16.1, también se denomina MIST (mast cell immunoreceptor signal transducer) se ha mostrado como un potente AIM en población europea, manifestando una estratificación en su frecuencia en esta población con un eje norte-sur (Bauchet M et al, 2007). El polimorfismo rs2014303 de este gen es una variante intrónica que parece tener un papel en la regulación de la señalización de los inmunoreceptores. Es el mismo caso para el gen PLCB1 (phospholipase C β 1), rs295335 y el gen ZNF654 (zinc finger protein 564). Son AIMs de población europea y se analizan también en estudios entre poblaciones para intentar comprobar si el componente genético de los ancestros europeos puede influir en la población actual y analizar su posible asociación con enfermedades complejas (Tian C et al, 2007). Se ha observado que el gen PLCB1 situado en el cromosoma 20p12.3 codifica para una proteína que cataliza la formación de inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato. Esta reacción utiliza calcio como cofactor y juega un papel importante en la transducción intracelular de muchas señales extracelulares.

El gen se sitúa en el cromosoma 19p13.2 y codifica para una proteína de 55 aminoácidos involucrada en la regulación transcripcional, datos disponibles en Genecards: Human Gene Database (<http://www.genecards.org/>) y Ensembl genome browser 87 (www.ensembl.org/).

1.5.2.4.- Estudio de polimorfismos de genes relacionados con obesidad y DMT2 determinados con el array de genotipado denso de GWAs

En este apartado se estudian los polimorfismos cuyo genotipo se obtuvo con el array de genotipado denso GWAs. Los polimorfismos se escogieron en base a la bibliografía reciente de estudios de genoma completo relacionados con la obesidad y DMT2 (Gaulton KJ et al, 2015; Imamura M et al, 2016).

- **Gen ASB3 (Ankyrin Repeat and SOCS box Containing).** El gen ASB3 se encuentra situado en el cromosoma 2p16.2, contiene 11 exones y codifica para una proteína de 518 amino ácidos altamente conservada denominada SOCS3 (suppressor of cytokine signalling). Se caracterizan por tener un dominio N-terminal de longitud variable, un dominio central –SH2 muy conservado y un dominio C-terminal de alrededor de 40 amino ácidos, conocido como “caja SOCS”. (Kile BT et al, 2000). Estas proteínas actúan como inhibidores de la señal de transducción de las citoquinas (Kile BT et al, 2002). Se ha observado que las proteínas SOCS también tienen un papel en la regulación de la señalización de la insulina y, por tanto, podrían presentar relación con la DMT2 (Howard JK and Flier JS, 2006; Li JY et al, 2011). En el presente estudio se escogieron dos polimorfismos, rs 4671327 y rs11892385, ambas variantes intergénicas próximas al gen ASB3. Se analizó su posible relación la obesidad y DMT2 y parámetros relacionados.
- **Gen CDKN2B (Cyclin dependent kinase inhibitor 2B).** El gen está localizado en el cromosoma 9p21.3, tienen una longitud de 6,4 kb y contiene dos exones. Junto con CDKN2A, gen que se encuentra adyacente a una distancia de 30 kb, los productos de ambos actúan como reguladores del ciclo celular. Este gen se expresa mayoritariamente en el páncreas, la pituitaria y las células adiposas. Considerados como genes supresores de tumores, CDKN2A/B están relacionados con el envejecimiento y muchas enfermedades crónicas (Bao XY et al, 2012). Diversos estudios han mostrado que este *locus* está relacionado con riesgo de cardiovascular ya que se ha observado su implicación en diversas enfermedades como la enfermedad arterial coronaria, IAM, arterioesclerosis, ACV, en diversas poblaciones, así como con glaucoma así como también se ha asociado con Alzheimer, enfermedades relacionadas con el envejecimiento y numerosos cáncer (Hu WL et al, 2009; Hannou SA et al, 2015; Dehghan A et al, 2016). Variantes genéticas del gen CDKN2B se

han asociado también a enfermedades metabólicas como la DMT2 (Nemr R et al, 2011; Bao XY et al, 2012; Peng F et al, 2013; Horswekk SD et al, 2013; Wei F et al, 2015; Kong Y et al, 2016). En el presente estudio se analizarán los polimorfismos rs1063192 y rs3217986, ambos situados en la región 3' UTR del gen. No existen estudios previos que relacionen estos polimorfismos con la obesidad o DMT2.

- **Gen DMRTA1 (Doublesex-and Mab-3-related transcription factor A1).** El gen está situado en el cromosoma 9p21.3. Este gen codifica para un factor de transcripción que recientemente se ha descrito implicado en el desarrollo neuronal (Kikkawa T et al, 2013). Estudios recientes de GWAs han relacionado variantes genéticas del gen con la DMT2 (Imamura M et al, 2016). No se conoce el mecanismo por el que el gen DMRTA1 puede ser relevante en la DMT2 pero se ha sugerido que el gen podría estar implicado en el desarrollo de las células β , debido a que el gen regula diversos factores de transcripción que, a su vez, regulan la diferenciación de las células endocrinas pancreáticas (Wilson ME et al, 2003). También se ha visto que el gen está situado cerca de otros genes relacionados con la DMT2 como son CDKN2A/B (Imamura M et al, 2016). Se seleccionaron los polimorfismos rs655497 y rs693370, sólo separados por algo más de 500 pares de bases. Se encuentran situados en la región 5' del gen a unas 20 kb del mismo. No existe en la literatura científica información de las funciones de estos polimorfismos.
- **Gen INAFM2 (InaF-Motif-Containing Protein 2).** El gen se encuentra situado en el cromosoma 15q15.1., conocido previamente como OGU1 (Osteogenesis up-regulate transcript 1). Aunque la expresión de OGU1 se vio que se alteraba durante la osteogénesis (Kikuchi K et al, 2009), la función de INAFM2 sigue siendo desconocida. Variantes del gen han mostrado ser loci susceptibles para la DMT2 en diferentes poblaciones, aunque la significación de la asociación difiere dependiendo del grupo étnico (Imamura M et al, 2016). El polimorfismo rs961090 está situado en la región 3'UTR del gen INAFM2. No se hallaron referencias en la literatura científica que examinaran esta misma variante.

- **Gen MTNR1B (Melatonin Receptor 1B).** El gen está localizado en el cromosoma 11q14.3, compuesto por un intrón y dos exones. El gen codifica para una proteína transmembrana que forma parte del receptor de la melatonina. Concretamente, MTNR1B es una de las siete proteínas receptoras de melatonina acopladas a proteína G transmembrana (Lyssenko V et al, 2009; Grotenfelt NE et al, 2016). La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal que actúa en los mecanismos de homeostasis del cuerpo. Su secreción se encuentra regulada circadianamente y su función es la regulación del sueño y la homeostasis de la glucosa (Marcheva B et al, 2013). El gen se expresa en el SNC y en tejidos periféricos, como pueden ser las células β pancreáticas (Grotenfelt NE et al, 2016; Lane JM et al, 2016). Diversas variantes genéticas del gen se han asociado con DMT2 (Bouatia-Naji N et al, 2009; Chambers JC ET AL, 2009). En el presente trabajo analizaremos el polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B. Diversos estudios han indicado que la variante G de este polimorfismo se asocia con mayores niveles de glucosa, así como con una disminución de la sensibilidad a la insulina (Mulder H et al, 2009; Bouatia-Naji N et al, 2009; Liu C et al, 2010; Tare A et al, 2014; Grotenfelt NE et al, 2016; Ollila HM et al, 2016). Aunque se sabe el efecto, se desconoce el mecanismo por el que se produce esta alteración (Lane JM et al, 2016).

1.6.- Epigenética de la obesidad y la diabetes

Los estudios de asociación han permitido conocer la influencia del componente genético en las enfermedades complejas pero también han puesto de manifiesto algo sorprendente. Muchos de los nuevos SNPs identificados no se encuentran en zonas codificantes y, muchas veces, no guardan una relación funcional evidente con la enfermedad explicando, en muchos casos, una pequeña parte de la heredabilidad de la enfermedad. Por tanto, quedan por identificar muchas de las causas de la transmisión de predisposición de estas patologías. En los últimos años, la epigenética ha emergido como una de las áreas más prometedoras para ampliar el conocimiento sobre herencia de los rasgos más comunes, es decir, de la predisposición individual a la enfermedad.

1.6.1.- Generalidades

La definición de epigenética ha variado a lo largo de los años. Fue Conrad Waddington quien definió por primera vez esta disciplina como “las interacciones causales entre genes y sus productos conducen al fenotipo”, introduciendo la palabra epigenotipo (Waddington CH, 1940; Waddington CH, 1957). El término abarca el estudio de cómo la actividad de los genes durante el desarrollo causa el fenotipo emergente, aunque en la actualidad se considera obsoleta. Posteriormente, Arthur Riggs y colaboradores actualizaron el término de epigenética como “el estudio de los cambios, heredables mitótica o meióticamente, en la función génica que no pueden ser explicados por un cambio en la secuencia del ADN” (Russo VEA et al, 1996). Actualmente se puede definir la epigenética como una disciplina que estudia los procesos o modificaciones reversibles y heredables implicados en la regulación de la transcripción génica y que no dependen de cambios en la secuencia del ADN (Guardiola M et al, 2015).

Una alteración en la regulación epigenética se ha visto que puede estar relacionada con la etiología y progresión de la patología. Perfiles epigenéticos anormales pueden servir como biomarcadores de una enfermedad o como predictores de la evolución de la misma (Brookes E and Shi Y, 2014). Concretamente, en el campo de la obesidad y la DMT2, las investigaciones en epigenética tienen tres objetivos concretos. En primer lugar, la búsqueda de estos biomarcadores epigenéticos para predecir futuros problemas de salud o detectar individuos de alto riesgo. Consideramos un biomarcador a aquella molécula que tenga la habilidad de predecir un estado de enfermedad o respuesta a un tratamiento por su cuantificación, debido a que está involucrado en la enfermedad. En segundo lugar, entender la relación entre la obesidad y los factores ambientales que pueden modular la expresión génica por mecanismos epigenéticos. Y, por último, prever nuevas estrategias terapéuticas basadas en agentes farmacológicos o nutricionales que puedan modificar esas marcas epigenéticas (Martínez JA et al, 2014). Se han descrito diversas modificaciones epigenéticas que sufren el ADN y la cromatina y que pueden ser utilizadas como biomarcadores. Dentro de estas variaciones epigenéticas se han descrito las que se detallan a continuación:

- 1) Modificación de histonas. Se describió en los años 90 (Turner BM, 1998). Las histonas son proteínas básicas, de bajo peso molecular y muy conservadas evolutivamente. Participan en el empaquetamiento del ADN formando un

octámero de histonas (un tetrámero de las histonas H3 y H4 y dos dímeros de H2A y H2B) sobre el que se envuelven 146 pares de bases formando los nucleosomas. Además, la histona H1 mantiene los nucleosomas unidos sellando los giros completos del ADN. Las histonas juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, en la reparación del ADN dañado, en la replicación y recombinación del ADN y en la regulación epigenética (Lennartsson A and Ekwall K, 2009). Las histonas pueden ser modificadas covalentemente por diferentes procesos como son metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación (Strahl BD and Allis CD, 2000). Las histonas tienen un dominio carboxilo terminal globular y una cola amino terminal que es la que sufre las modificaciones. Concretamente, las modificaciones incluyen la metilación de residuos de lisina y arginina, acetilación de residuos de lisina, ubiquitinación de lisinas y fosforilación de serinas y treoninas. Todas las modificaciones postraduccionales de las histonas tendrán efectos sobre la estructura de la cromatina y, por tanto, sobre la regulación de la expresión génica (Guardiola M et al, 2015). Se ha sugerido que la combinación de modificaciones específicas de histonas constituye un código que dicta el reclutamiento de factores transcripcionales concretos para regular diversos mecanismos fisiológicos (Lennartsson A and Ekwall K, 2009; Brookes E and Shi Y, 2014). Una alteración en este código puede conllevar el desarrollo de enfermedad. Este tipo de modificaciones epigenéticas están muy estudiadas y caracterizadas en relación con el cáncer (Fahner JA et al 2002; Fraga MF et al, 2005; Park YS et al, 2008; Yen CY et al, 2016).

- 2) microRNA. El Proyecto Genoma Humano permitió conocer que menos del 2% del genoma codifica proteínas. La mayoría del genoma se transcribe en ARN no codificante, es decir, moléculas de ARN funcional que no se traducen en proteína si no que están implicados en la regulación de la expresión génica de manera postranscripcional, uniéndose a los ARN mensajeros diana (ARNm). Dentro de estos ARN no codificantes, los mejor estudiados son los miR, que se encargan de regular la traducción de al menos un 60% de los genes codificantes en humanos (Friedman RC et al, 2009). Estos miR pueden clasificarse como el tercer marcador epigenético ya que regulan la expresión génica sin producir cambios en la molécula de ADN. Los miR son pequeños ARNs de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que reprimen la expresión del ARNm que es completa o parcialmente complementario. Los miR se transcriben inicialmente como miR primario para ser procesados

posteriormente en el núcleo formando estructuras de 70 nucleótidos denominadas miR precursores. Estas estructuras se transportan al citoplasma donde vuelven a ser procesadas formándose los miR maduros de doble cadena de 22 nucleótidos. De las dos cadenas, una se selecciona como miR maduro que se encarga del silenciamiento génico y la otra cadena normalmente se degrada. Si esta degradación no ocurre y las dos cadenas son activas, los dos miR maduros se denominan 3p y 5p en función de la cadena a partir de la cual se ha generado. El miR maduro se une a su ARNm diana promoviendo su degradación, cuando la complementariedad es perfecta, o su represión, cuando la unión es parcial (Graves P and Zeng Y, 2012; Guardiola M et al, 2015). En la región 5' de los miR maduros existe una región “semilla” compuesta de 2 a 7 nucleótidos, región complementaria obligatoriamente a su diana, el resto de secuencia puede tener complementariedad parcial (Park JH and Shin C, 2014). Este hecho produce que un mismo miR pueda inhibir múltiples dianas, así como un ARNm puede contener diferentes dianas de unión para distintos miR formando una compleja red de regulación (Kim VN and Nam JW, 2006; Price NL et al, 2014). En los últimos años se han descrito numerosos miR como potenciales biomarcadores de diversas enfermedades, incluidas la obesidad y la DMT2 (Pescador N et al, 2013; Peng Y et al, 2014; Higuchi C et al, 2015; Kilic ID et al, 2015; Seyhan AA, 2015; Wu L et al, 2015; Wang G et al, 2016).

- 3) Metilación del ADN. Fue el primer mecanismo que se describió como epigenético, identificado por Holliday y Pugh en 1975 (Holliday R and Pugh JE, 1975). La metilación se basa en la transmisión de un grupo metilo principalmente en las citosinas localizadas en los dinucleótidos CpG. Este mecanismo se explicará más detalladamente en el siguiente apartado.

Los mecanismos epigenéticos regulan la actividad génica y la expresión durante el desarrollo y diferenciación o en respuesta a un estímulo nutricional o ambiental, incluyendo el comportamiento materno y el ejercicio físico (Petronis A, 2010; Martínez JA et al, 2014). Exposiciones tempranas a condiciones adversas pueden inducir cambios epigenéticos persistentes que derivan en fenotipos adversos expresados posteriormente. Diversos estudios han puesto de manifiesto la influencia de la dieta materna durante el embarazo en el patrón epigenético de diversos genes (Ordovas JM and Smith CE, 2010; Vickers MH, 2014). Uno de estos estudios fue el realizado por Heijmans y colaboradores donde estudiaron los

individuos expuestos a la Hambruna Holandesa ocurrida entre 1944 y 1945 (Heijmans BT et al, 2008). Individuos expuestos a esta hambruna durante el embarazo presentaban patrones de metilación distintos en genes involucrados en el crecimiento y enfermedades metabólicas respecto a los controles, es decir, la exposición prenatal a ese factor ambiental provocó cambios persistentes en el patrón de metilación del ADN. Sin embargo, los cambios epigenéticos no están restringidos al periodo prenatal (Figura 1.20). Fraga y colaboradores realizaron un estudio con gemelos monocigóticos, donde demostraron la diferencias epigenéticas entre ambos con una edad avanzada, diferencias acentuadas por disminución del tiempo que compartían juntos así como diferencias en el comportamiento, como podría ser el consumo del tabaco (Fraga MF and Esteller M, 2007). Estilos de vida diferentes pueden ser el desencadenante para las diferencias en la aparición de enfermedades. Estudios epidemiológicos basados en gemelos monocigóticos que presentan enfermedades distintas han identificado los factores ambientales o de estilo de vida como los factores que aumentan o disminuyen el riesgo de desarrollar la enfermedad a través de los mecanismos epigenéticos (Alegría-Torres JA et al, 2011; Castillo-Fernandez et al, 2014). Por ejemplo, se ha comprobado que el consumo del tabaco puede aumentar el riesgo de padecer un carcinoma basocelular de piel y, a su vez, fumar está fuertemente relacionado con cambios en la metilación del ADN en múltiples genes (Milán T et al, 2003).

Se ha observado una relación entre los cambios epigenéticos y diversas enfermedades complejas, como pueden ser la obesidad, la DMT2 y las enfermedades cardiovasculares (Petronis A, 2010; Ordovas JM and Smith CE, 2010; Drong AW et al, 2012; Schwenk RW et al, 2013; Smith CJ and Ryckman KK, 2015). Dentro de los mecanismos epigenéticos, la metilación del ADN es uno de los más estudiados. El presente estudio se centrará en este aspecto para ver su relación con las patologías antes mencionadas.

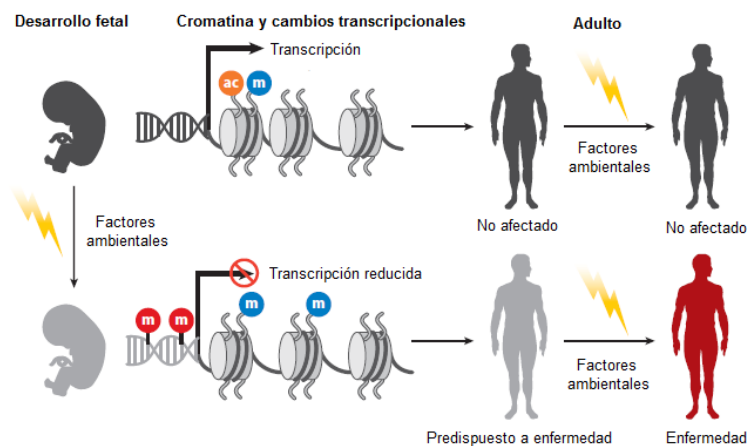


Figura 1.15.- La programación epigenética durante el desarrollo puede inducir predisposición a la enfermedad. Figura modificada de Brookes E and Shi Y, 2014

1.6.2.- Metilación

Fue el primer mecanismo que se describió como epigenético, identificado por Holliday y Pugh en 1975 (Holliday R and Pugh JE, 1975). La metilación se basa en la transmisión de un grupo metilo principalmente en las citosinas localizadas en los dinucleótidos CpG. Existen aproximadamente 28 millones de CpGs en el genoma humano y entre 60-80% de ellos pueden ser metilados. Cuando los dinucleótidos CpG están agrupados y forman una secuencia repetida muy densa en el genoma forman las llamadas islas CpG. Estas regiones están localizadas principalmente en las regiones promotoras aunque también se han encontrado en regiones intragénicas (Maunakea AK et al, 2010; Tammén SA et al, 2013). La mayoría de las islas CpG en el promotor no están metiladas, excepto en genes específicos de la línea germinal o tejidos concretos. Como norma general, la hipermetilación se asocia a represión transcripcional y la hipometilación a activación transcripcional (de Mello VD et al, 2013). Existen dos mecanismos generales por los cuales la metilación puede inhibir la expresión génica. La modificación de las citosinas puede inhibir la asociación de factores de unión al ADN relacionados con el reconocimiento de secuencias de ADN. Por otro lado, las proteínas que reconocen las CpG metiladas pueden actuar como moléculas corepresoras para silenciar la

transcripción directamente. Estas proteínas tienen un dominio responsable de la unión a los dinucleótidos metilados (Klose RJ and Bird AP, 2006).

Diferentes estudios han relacionado los cambios en el patrón de metilación con diferentes enfermedades. Este hecho ha sido particularmente estudiado en la enfermedad cardiovascular así como en sus factores de riesgo, incluyendo la obesidad y la DMT2. Diferencias entre individuos concernientes a enfermedades crónicas, como la obesidad y la DMT2 dependen no sólo de el patrón dietético o los antecedentes genéticos, sino también de el epigenoma heredado y las diferentes influencias nutricionales (durante el embarazo o en la edad adulta) que modifica los marcadores epigenéticos y pueden afectar la expresión de los genes (Martínez JA et al, 2014).

Con respecto a la obesidad, se ha observado que cambios de metilación durante el desarrollo embrionario que pueden derivar en enfermedad en la edad adulta, también factores ambientales pueden asociarse con cambios en la metilación del ADN. Concretamente, factores ambientales como la dieta pueden alterar la síntesis de la S-adenosilmetionina, que genera los grupos metilos necesarios para la metilación, alterando los patrones de metilación de las islas CpG en la edad adulta en regiones críticas del genoma (Feil R, 2006). Se ha observado que la exposición a dietas de alto contenido en grasa influyen en la metilación del gen *PPARGC1A* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1-alpha) en el músculo esquelético. Este gen codifica una proteína relacionada con el control de la presión sanguínea, regulación la homeostasis del colesterol celular y con el desarrollo de la obesidad (Brons C et al, 2010). Otros estudios han revelado que el incremento de la edad también puede modificar la metilación (Fraga MF et al, 2005; Ronn T et al, 2008). Por último, otras investigaciones sugieren que los niveles de metilación pueden estar asociados con genotipos específicos, sugiriendo que variaciones genéticas pueden ser ejercidas a través de cambios en la metilación (Heijmans BT et al, 2007). Dentro de los genes relacionados con el desarrollo de la obesidad, el gen *FTO* es el gen más ampliamente relacionado con el fenotipo de obesidad. Variaciones en el gen *FTO* se han relacionado con variaciones en la metilación. Concretamente, se ha asociado el alelo de riesgo del gen *FTO* rs9939609 con una mayor metilación de islas CpG dentro del intrón 1 del gen, pudiendo reducir la eficiencia de la expresión del gen (Bell CG et al, 2010; Almén MS et al, 2012).

En el caso de la DMT2, la metilación del ADN se ha visto que es relevante en los tejidos metabólicos como el tejido adiposo, el músculo esquelético y las células pancreáticas que pueden tener un papel en la patogénesis de esta patología, tanto en su desarrollo como en sus complicaciones (Martínez JA et al, 2014). Uno de sus factores más característicos como es la resistencia a la insulina se ha asociado con una metilación del ADN inusual (Zhao J et al, 2012). Diversos estudios de caso-control han permitido describir variaciones en los patrones de metilación en diversos genes relacionados con la DMT2. En los estudios realizados por Yang y colaboradores en 2011 y 2012 demostró que pacientes con DMT2 aumentaban la metilación de cuatro sitios CpG del promotor del gen INS (human insulin gene) y en 10 sitios CpG del promotor del gen PDX1 (transcriptional activator pancreatic and duodenal homeobox 1). Esta metilación se relaciona negativamente con la expresión de sus respectivos ARNm y se correlaciona positivamente con los niveles de HbA1c. El resultado será la reducción de la secreción de insulina (Yang et al 2011; Yang et al, 2012).

Estudios con arrays de metilación han encontrado una prevalente hipometilación de promotores en los islotes de DMT2 lo cual puede indicar procesos biológicos activos involucrados en la adaptación de un medioambiente diabético (estrés metabólico) y está asociado con disfunción de las células β pancreáticas y apoptosis. Estos cambios en la metilación de los promotores de diversos genes se relacionan inversamente con los niveles de expresión de los ARNm (Volkmar M et al, 2012). Con respecto al gen TCF7L2 (Transcriptor Factor 7-Like 2), los portadores del alelo menor T del polimorfismo rs7903146 (C>T) está ampliamente asociado con mayor riesgo de DMT2. Se ha sugerido que cambios epigenéticos pueden tener un efecto importante en el gen ya que ha visto que existe un patrón de metilación diferente en individuos diabéticos y no diabéticos (Canivell S et al, 2014). Un estudio reciente observó que, mientras en promotor del gen TCF7L2 está hipermetilado, la expresión del ARNm aumentaba y, sorprendentemente, la expresión de la proteína disminuía en las células β (Hu Y et al, 2014).

En el presente estudio nos centraremos en analizar los niveles de metilación las islas CpG seleccionadas del intrón 1 del polimorfismo rs9939609 G>A del gen FTO y los niveles de metilación en islas CpG alrededor del polimorfismo rs7903146 del TCF7L2.

1.7.- Interacciones de los genes

1.7.1.-Interacción gen*gen

Debido a la naturaleza multifactorial de las enfermedades complejas relacionadas con un origen poligénico, como son la obesidad y la DMT2, se ha observado que genes que *a priori* tienen un efecto pequeño en la patología pueden interactuar entre ellos contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. Es decir, el efecto combinado de distintas variantes genéticas en dos o más loci puede afectar conjuntamente al fenotipo. Es lo que conocemos como interacciones gen*gen las cuales se ha indicado que pueden tener un papel crucial en la etiología de estas enfermedades (Culverhouse et al, 2002; Moore JH and Williams SM, 2009; Cordell HJ, 2010).

Las interacciones gen*gen pueden producirse entre genes que se segreguen de manera independiente así como entre locus que estén ligados, y su efecto depende de genotipos específicos presentes en distintos genes o regiones génicas. Las interacciones pueden llegar a ser complejas debido a que los diferentes genotipos tener un efecto sinérgico en la susceptibilidad de un efecto concreto o su efecto puede ser amortiguado por genotipos en otros loci. Este tipo de interacciones suelen estar pobremente descritas en estudios epidemiológicos aunque este fenómeno tenga el potencial de mejorar nuestro conocimiento de las variaciones genéticas de las enfermedades (Murk W et al, 2015). También se observa una carencia en la replicación de estas interacciones debido a diversos factores. Uno de ellos puede ser por la heterogeneidad genética que puede influenciar la habilidad de detectar una interacción dada, debido a diferencias en las frecuencias alélicas y el desequilibrio de ligamiento entre SNPs marcadores y las variantes causales (Ma L et al, 2012).

En la actualidad, diversos estudios han observado la existencia de interacciones gen*gen en obesidad (De R et al, 2015). Un estudio reciente ha mostrado la relación entre variantes de la FTO y los niveles de expresión de un gen cercano, el gen IRX3. Las regiones del gen FTO asociadas con la obesidad interactúan directamente con los promotores de este gen. Concretamente, para el SNP rs9930506, el alelo asociado con un incremento de IMC está asociado también a un aumento de la expresión de IRX3 (Smemo S et al, 2014). Otro ejemplo de esta relación es la interacción que se ha estudiado entre dos SNPs de los genes FTO y

ApoA5 en individuos obesos. El alelo de riesgo de FTO está asociado con la ingesta o la saciedad mientras que el gen de la ApoA5 está implicado en el metabolismo de los TG. Se ha visto una interacción gen*gen entre estos dos genes a través del factor de transcripción USF1, factor que regula numerosos genes en el metabolismo de lípidos y de glucosa (Wang MH et al, 2014). Los genes PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) α y δ codifican para factores de transcripción que actúan como reguladores en el metabolismo de la glucosa, ácidos grasos y lipoproteínas, en el balance energético, la proliferación celular y diferenciación, la inflamación y arterioesclerosis. En diferentes estudios se ha visto que, interacciones entre diferentes polimorfismos de estos genes, tienen efecto en el IMC y el peso corporal, debido a que la relación entre los polimorfismos +294T/C del gen PPAR δ con el polimorfismo L162V del gen PPAR α influye en los niveles de expresión y su efecto actuará sobre c-HDL, los TG y c-LDL (Aberle J et al, 2006; Ding Y et al, 2012).

También en el campo de la DMT2 se han realizado estudios para evaluar estas interacciones gen*gen y su papel en el desarrollo de la enfermedad (Cauchi S et al, 2008b; Uma Jyothi K and Reddy BM, 2015; Xiao S et al, 2016). Estudios recientes han indicado que el gen HNF4A (hepatocyte nuclear factor 4 α) puede estar relacionado con el gen KCNJ11, gen que codifica para una subunidad del canal K + ATP de las células β . Ambos genes se habían descrito previamente asociados modestamente con riesgo de DMT2. El gen HNF4A codifica un factor de transcripción crucial para la función de los hepatocitos y las células β pancreáticas e influye en la secreción de la insulina y la homeostasis de la glucosa. KCNJ11 es una diana transcripcional de HNF4A y puede mediar el efecto regulador sobre la secreción de insulina, ya que un descenso de HNF4A causa disfunción en la actividad de los canales K + APT de las células β pancreáticas. Variantes de KCNJ11 también se han asociado modestamente a riesgo de DMT2. Se ha visto una interacción entre polimorfismos de estos dos genes aunque los mecanismos no se conocen. Se ha visto que la acción de ambos genes está relacionada con la secreción de la insulina y que HNF4A puede ser un activador transcripcional de KCNJ11 (Qi L et al, 2007a; Neuman RJ et al, 2010). La DMT2 se puede describir como un desorden metabólico pro-inflamatorio ya que se caracteriza por una hiperglucemia crónica y por un aumento de los niveles de las citoquinas causantes de la inflamación. Se vio que polimorfismos de los genes de citoquinas como la IL-6, TNF- α y la IL-10 si se estudiaban individualmente no se encontraba

asociación con la DMT2. En cambio, analizando por parejas, se veía que el genotipo 597 GA del gen IL-6 y el genotipo 308 GG del gen TNF- α aumentaban 21 veces el riesgo de DMT2. Y si se analizaban estos dos genotipos junto con 592 CA del gen IL-10, el riesgo de DMT2 aumentaba hasta 314 veces. Por tanto, los resultados de este estudio indicaban que los individuos que tenían la combinación AA, GG y CA para polimorfismos de los genes IL-6, TNF- α y la IL-10 tenían una mayor susceptibilidad y mayor riesgo de desarrollar DMT2 (Saxena M et al, 2013).

Con todas estas evidencias, se ha mostrado que descubrir y caracterizar las interacciones gen*gen que modulan un fenotipo concreto proporcionará nuevo conocimiento sobre la patogenia de estas enfermedades tan complejas. Así mismo, hay que tener en cuenta que, además de este tipo de interacción, se establecen otras interacciones con conductas y patrones ambientales que influirán a su vez en la acción de los genes, creando una compleja red de interacciones que se deben estudiar en su conjunto.

1.7.2.- Interacción gen*ambiente

Las enfermedades complejas son el resultado de la combinación de los efectos genéticos y ambientales así como de la interacción entre ellos. Los factores ambientales son factores no genéticos que pueden considerarse de estilo de vida, incluyendo la actividad física, la dieta, el consumo de alcohol y tabaco entre otros. Las interacciones gen*ambiente se producen cuando un alelo se asocia con un fenotipo determinado sólo cuando un factor ambiental sobrepasa un límite determinado, es decir, el fenotipo de un individuo estará influenciado por el entorno ambiental (van Vliet-Ostaptchouk JV et al, 2012). Este hecho conlleva dos implicaciones. La primera, que la variante alélica puede no ser de riesgo para algunos individuos y, la segunda, un análisis genético sin tener en cuenta estos factores ambientales será incompleto (Lee YC et al, 2011). E

El incremento de la prevalencia de la obesidad y la DMT2 en las últimas décadas se debe a la adquisición de un estilo de vida occidental, caracterizado por un exceso de ingesta de calorías y un estilo de vida sedentario. Debido a esta exposición a un ambiente obesogénico, algunos individuos con predisposición genética desarrollarán estas patologías (Temelkova-Kurktschiev T and Stefanov T, 2012). La identificación de estas interacciones entre genes y el entorno son muy importantes para la prevención y tratamiento, con el objetivo de disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad en individuos predispuestos genéticamente.

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de las interacciones gen*ambiente es la aproximación por genes candidatos donde se identifican loci que pueden tener un papel en la etiología de la enfermedad y se analiza si pueden estar regulados por exposiciones a diferentes factores ambientales, como pueden ser la dieta, el ejercicio físico, el alcohol o el estrés (Franks PW, 2011). Sin embargo, aunque hay cientos de publicaciones que utilizan esta aproximación, han sido pocos los trabajos independientes que han intentado replicar o refutar la hipótesis inicial debido a la dificultad de capturar de manera fiable los datos relativos a los factores ambientales y la complejidad del entorno (Ordovas JM, 2009). Otra aproximación utilizada actualmente es el estudio de los loci descubiertos a través de meta-análisis de GWAS y sus posibles modificaciones por efecto de factores de riesgo ambientales (Murcray CE et al, 2009).

Tanto en la obesidad y la DMT2, uno de los factores ambientales más estudiados ha sido la actividad física. La obesidad es el resultado de una interacción compleja entre factores genéticos, sociales y ambientales que afectan al balance energético y a la regulación del peso corporal (Speakman JR, 2004). Y uno de los factores ambientales importantes en su desarrollo es la actividad física, debido al gasto que se produce en la contracción muscular. Diversos estudio han analizado las variantes genéticas de riesgo asociadas a obesidad y su posible modulación por la actividad física. Estos trabajos se basan en análisis individuales de variantes de genes candidatos como en análisis de un conjunto de variantes que predispongan a la enfermedad.

Un ejemplo de genes candidatos es la variante rs9939609 del gen de la FTO. Se ha demostrado que el alelo menor del gen FTO aumenta el riesgo de obesidad en adultos. Sin embargo, diferentes estudios han observado que ese efecto adverso puede estar modulado con la actividad física (Demerath EW et al, 2011; Corella D et al, 2012). Un metaanálisis realizado en 2011 por Kilpelainen y colaboradores incluyendo a más de 200.000 adultos, mostró que el riesgo conferido al ser portador del alelo menor A del gen FTO descendía un 27% al aumentar la actividad física (Kilpeläinen TO et al, 2011b). Otro ejemplo de esta interacción es el trabajo elaborado por Li y colaboradores en 2010. Este estudio no se centró en un gen candidato únicamente, sino que analizó 12 variantes genéticas que conferían riesgo de obesidad (genetic risk score) y su posible modulación por la actividad física.

Estos investigadores encontraron que el riesgo de obesidad se atenúa el 40% en individuos activos comparándolos con individuos inactivos o sedentarios (Li S et al, 2010).

Respecto a la DMT2, como ocurre en la obesidad, estudios epidemiológicos han mostrado que el efecto adverso de diferentes loci asociados a esta enfermedad, puede ser anulado o, al menos, atenuado en individuos con altos niveles de actividad física mientras que niveles bajos aumentan su efecto (Cornelis MC and Hu FB, 2012). La actividad física ayuda a la disminución de la hemoglobina glicosilada, a un mejor control de la glucemia, reduce las complicaciones derivadas de la DMT2 y tiene efectos beneficiosos en los eventos cardiovasculares, la mortalidad y la calidad de vida de los diabéticos (Armstrong MJ and Sigal RJ, 2015; Henson J et al, 2016). Ejemplos de esta interacción gen*actividad física son las investigaciones realizadas en los genes SLC2A2, ABCC8 y PPAR γ , todos ellos relacionados con el riesgo de desarrollar la DMT2. El gen SLC2A2 y el gen ABCC8 afectan a la secreción de insulina debido a que regulan la entrada de glucosa en las células pancreáticas. Variantes genéticas de estos genes se han asociado a un mayor riesgo de DMT2. Una intervención con actividad física modificó el efecto de estas variantes de riesgo, mejorando la sensibilidad a la insulina y preservando la función celular (Kilpeläinen TO et al, 2007). El gen PPAR γ es un factor de transcripción que regula la diferenciación de los adipocitos y la sensibilidad de la insulina. El alelo menor (Ala12) del polimorfismo Pro12Ala de este gen está asociado con riesgo de DMT2. En personas con un bajo nivel de actividad física, este alelo está relacionado con un empeoramiento en la regulación de la glucosa mientras que en personas con un alto nivel de actividad física ocurría lo contrario. El ejercicio físico aumenta la actividad del gen por lo que mejora la sensibilidad a la insulina (Nelson TL et al, 2007; Brito EC et al, 2009).

Otra de las interacciones gen*ambiente estudiadas relacionada con estas patologías es el tabaco. Su consumo está establecido como un factor de riesgo tanto para la obesidad como la DMT2 ya que incrementa la acumulación de grasa visceral, favoreciendo la aparición de resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa; y está relacionado con estrés oxidativo, disfunción endotelial e inflamación, factores que predisponen a la aparición de la obesidad (Noma K et al, 2005; Hu FB, 2011). Diversos estudios han mostrado la existencia de una modulación genética a través del consumo de tabaco, tanto en obesidad (Jang Y et al,

2007; Edwards TL et al, 2012) como en DMT2 (Stephens JW et al, 2008; Manfredi S et al, 2009).

1.7.3.- Interacción gen*dieta

De todos los factores ambientales que pueden influirnos, es la dieta el único factor al cual estamos expuestos de manera continua desde la concepción hasta la muerte. Además, se ha visto que se producen respuestas diferentes a la dieta dependiendo de las características particulares de cada individuo. Por tanto, la ingesta de alimentos es el factor más importante en la modulación de la expresión génica durante la vida de una persona. Se puede definir el concepto de interacción gen*dieta como la modulación del efecto de un componente dietético sobre un fenotipo específico por un polimorfismo genético (Ordovás JM et al, 2004). Estas interacciones gen*dieta son importantes en diferentes etapas a lo largo de la vida. En primer lugar, en el desarrollo del feto y las condiciones en el útero son esenciales para las primeras interacciones entre los genes y los nutrientes. En segundo lugar, la nutrición en los primeros años de vida es determinante para el estado de salud o enfermedad. Por último, en el caso de enfermedades multifactoriales, es necesario un largo período de exposición a las pautas dietéticas para desarrollar el fenotipo de la enfermedad.

Para el estudio de estas interacciones surgió una nueva disciplina, la genómica nutricional, que aborda el estudio de la interacción de los alimentos y sus componentes con el genoma a nivel molecular, celular y sistémico. Dentro de ella, se definieron dos conceptos, la nutrigenética (Brenan RO, 1975) y la nutrigenómica (DellaPenna D, 1999), ambos relacionados para intentar entender las relaciones entre los genes y la dieta. Ambas aproximaciones tienen como objetivo descubrir cómo funcionan estas interacciones gen*dieta pero hay que tener precaución en los resultados, debido a que muchos estudios no están validados. La cuantificación de la ingesta alimentaria es difícil y es un reto realizar réplicas de las observaciones obtenidas. Por tanto, para que los resultados se consideren válidos y puedan aplicarse, estas investigaciones requieren un tamaño muestral amplio, una correcta evaluación de la dieta y un análisis bien diseñado con muestras válidas para replicar (Qi L and Liang J, 2010).

La Nutrigenética estudia el efecto de la variación genética en la interacción entre la dieta y la enfermedad, es decir, analiza las diferentes respuestas fenotípicas a la

dieta dependiendo del genotipo de cada individuo (Corella D and Ordovás JM, 2009). Se basa en la integración del análisis del genoma en los estudios tradicionales de epidemiología nutricional para descubrir cómo las variantes genéticas en genes candidatos pueden modular el efecto de ciertas dietas en fenotipos de la enfermedad (Bouchard C and Ordovás JM, 2012). El objetivo de la nutrigenética es realizar recomendaciones respecto a los riesgos y beneficios de dietas concretas o de componentes específicos según el genotipo, lo que se denomina nutrición personalizada.

La Nutrigenómica estudia los mecanismos moleculares que producen las diferentes respuestas fenotípicas a la dieta dependiendo del genotipo, analizando cómo los nutrientes regulan la expresión génica, cómo afectan los polimorfismos en esta regulación y cómo esos cambios están interrelacionados con la proteómica y la metabolómica (Corella D and Ordovás JM, 2009). Por tanto, la nutrigenómica es más general e incluye la metabolómica, la biología de sistemas, la proteómica, la genómica comparada y la transcriptómica (van Ommen B and Stierum R, 2002).

Numerosos estudios han indicado que una dieta rica en energía es el mayor contribuyente al desarrollo de la obesidad. Esta ingesta altamente energética se asocia con el consumo de una mayor cantidad de proteínas, carbohidratos y grasas. También se conoce que el riesgo de un incremento excesivo de peso puede ser prevenido mediante una intervención dietética temprana y se ha observado, curiosamente, una diferente respuesta al efecto de la composición o el tipo de dieta según las personas, confirmando la participación de un componente genético en el desarrollo de la obesidad. Todo ello evidencia la necesidad de conocer cómo influyen los nutrientes en la obesidad considerando las variaciones genéticas individuales (Doo M and Kim Y, 2015).

Varios estudios han mostrado la existencia de las interacciones gen*dieta. Sonestedt y colaboradores mostraron la interacción entre la ingesta de grasa y carbohidratos y las variantes del gen FTO rs9939609 en el IMC (Sonestedt E et al, 2009). El gen FTO se ha identificado como el mayor predictor genético de la obesidad que se conoce y está relacionado con la regulación del apetito. Los portadores del genotipo de riesgo AA muestran una alteración de la respuesta a la saciedad y un incremento de la ingesta de grasa, lo que implica un mayor IMC que los portadores del genotipo TT. El estudio muestra que el incremento del IMC está restringido a los individuos que consumían una dieta rica en grasas, siendo el incremento mayor en los genotipos AA. En cambio, estas variantes genéticas no se

asocian con un mayor IMC en individuos con una ingesta dietética baja en carbohidratos. Los resultados mostraban que dietas altas en componente graso acentuaban la susceptibilidad a la obesidad por las variantes del gen FTO.

El gen ADIPOQ codifica para la hormona adiponectina, relacionada con la obesidad ya que sus niveles circulantes son inversamente proporcionales al IMC y al porcentaje de grasa corporal. El polimorfismo del promotor rs17300539 (-11391G>A) es el más asociado a rasgos relacionados con la obesidad, como la resistencia a la insulina, IMC, peso y circunferencias de cintura y cadera. El alelo A de este polimorfismo se relaciona con un incremento significativo de la actividad transcripcional y la concentración plasmática de la adiponectina comparado con el alelo G. Los portadores del alelo A tienen menor peso, IMC, circunferencia de cintura y cadera comparado con los homocigotos GG. Pero esta relación puede ser modificada con la ingesta de AGM. Una ingesta de estos ácidos grasos $\geq 13\%$ de ingesta de energía total produce que los portadores del alelo A tengan menor IMC y se produzca un descenso del 48% del riesgo de obesidad comparado con los homocigotos GG. Por otro lado, no se observa una asociación significativa con el IMC o el riesgo de obesidad cuando la ingesta de AGM es $<13\%$ (Warodomwicht D et al, 2009).

Otro ejemplo de interacción gen*dieta se da en el polimorfismo rs512535 (A>G) del gen APO B (apolipoproteína B), gen asociado con los lípidos plasmáticos y las concentraciones de lipoproteínas. Los portadores del alelo menor G se han asociado con fenotipos relacionados con obesidad, como el IMC y la circunferencia de la cintura. En individuos con un consumo alto de grasa ($>35\%$ de la energía), los homocigotos GG de este polimorfismo tienen mayor IMC que los portadores del alelo A, pero estas diferencias no se mostraron en individuos con un consumo de grasa $<35\%$ de la energía (Phillips CM et al, 2011). Como en el caso de la obesidad, se ha demostrado que los factores genéticos pueden interaccionar con factores dietéticos afectando al riesgo de desarrollar DMT2. Durante los últimos años varios trabajos han estudiado estas interacciones y la validez de los mismos (Harrington JM and Phillips CM, 2014). Luan y colaboradores demostraron una interacción gen*nutriente relevante en la DMT2 con el polimorfismo Pro12Ala del PPAR γ , gen relacionado con la regulación de la resistencia a la insulina (Luan J et al, 2001). El alelo Ala se asocia con un menor riesgo de DMT2.

Este estudio mostró una relación inversa entre el ratio AGP/AGS con la concentración de insulina en los portadores del alelo Ala. Cuando el ratio es bajo, la concentración de insulina de los portadores Ala es mayor que los homocigotos Pro, pero si el ratio es mayor se ve el efecto contrario. Esto sugiere que el posible efecto protector de este alelo se pierde en presencia de una dieta rica en AGS.

El gen TCF7L2 es el locus más fuertemente asociado y replicado con la DMT2. El polimorfismo rs7903146 (C>T) es una de las variantes genéticas más importantes relacionados con el riesgo de DMT2, donde el alelo T se asocia con mayor riesgo. En el estudio de Corella y colaboradores analizó la interacción entre la DM y este polimorfismo (Corella D et al, 2013). Cuando la adherencia a la dieta DM era baja, el genotipo TT presentaba concentraciones más elevadas de glucosa que los portadores del alelo C. En cambio, si la adherencia era alta, este aumento no se mostraba. Además, esta modulación también se mostró en los niveles de colesterol total, c-LDL y TG, así como la incidencia de riesgo de ECV en los portadores TT. Por tanto, la DM reducía el aumento de glucosa y lípidos en los individuos TT, así como factores de riesgo cardiovascular (Figura 1.16).

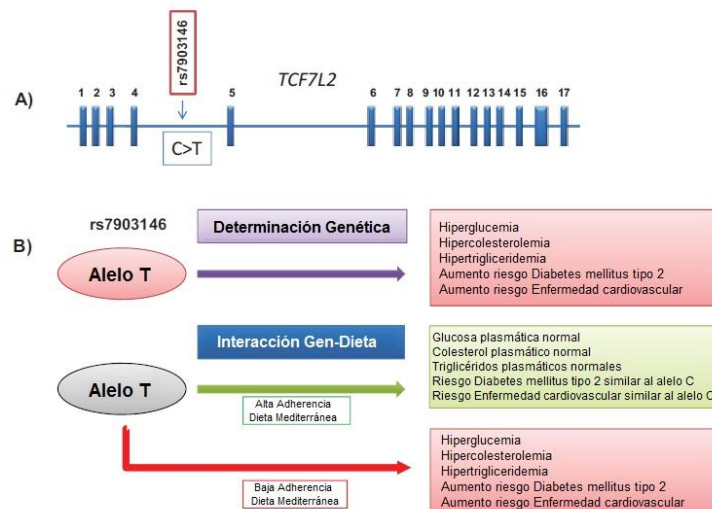


Figura 1.16.- Estructura genética del gen TCF7L2 e interacción gen-dieta. A) Localización del polimorfismo rs7903146 (C>T) en el intrón 4 del gen TCF7L2. B) Asociación entre el alelo de riesgo (T) y fenotipos cardiovasculares dependiendo de la determinación genética o de la interacción gen-dieta. Figura modificada de Corella D and Ordovás JM, 2014(a)

Otro ejemplo de estas relación gen*dieta en relación de DMT2 se da en genes que también están relacionados con la obesidad, como son el gen FTO y el gen MC4R, aunque su asociación con DMT2 no está muy clara. Analizando su interacción con la DM, para los polimorfismos rs9939609 de FTO y rs17782313 de MC4R, una baja adherencia a la dieta en los portadores de las variantes alélicas presentaban mayor riesgo de DMT2 mientras que si la adherencia era alta la asociación no se producía. Por tanto, la adherencia a la dieta interactúa con la predisposición genética en la asociación de estos polimorfismos con la DMT2 (Ortega-Azorín C et al, 2012).

Los estudios de estas interacciones inicialmente se basaron en el estudio de SNP. Posteriormente, se ha visto que otro tipo de variaciones, como puede ser CNV, también producen resultados interesantes (Zhang D et al, 2015). Además, el desarrollo de las ciencias ómicas ha extendido el estudio de estas interacciones al estudio del epigenoma, aumentando su relevancia en los últimos años (Zaina S and Lund G, 2011; Milagro FI et al, 2013; Remely M et al, 2015).

Las investigaciones de las interacciones gen-dieta son muy importantes para obtener información que permita emprender medidas preventivas para evitar el desarrollo de estas patologías. Si una variante de riesgo se asocia con un fenotipo intermedio de enfermedad cardiovascular y se conoce que una dieta concreta puede revertir este riesgo, se podrán prevenir estos fenotipos con dietas personalizadas (Corella D and Ordovás JM, 2014 (b)). Por tanto, el conocimiento de estas interacciones nos permitirá establecer recomendaciones más personalizadas y exitosas.

1.8.- Perspectiva de género

Como se ha indicado previamente, factores de riesgo modificables como la dieta, la actividad física y el consumo de tabaco influyen en el desarrollo de enfermedades no transmisibles como la obesidad, la DMT2 y la ECV. Recientemente, el análisis de género y sexo ha cobrado una relevancia significativa en la comprensión de los riesgos para el desarrollo estas patologías. La Unión Europea incluyó en el artículo 15 del Reglamento de los programas marco de investigación Horizonte 2020, una disposición relativa a la perspectiva de género, para lo cual se establece la

integración de la perspectiva de género en investigación (Sánchez de Madariaga I and Ruiz Cantero MT, 2014).

Los factores biológicos específicos del sexo y los comportamientos relacionados con el género producen diferencias en el riesgo de sobrepeso y obesidad, hiperglucemia, tensión arterial e hiperlipemia (OMS, 2014). Estos factores determinarán la capacidad funcional del individuo cuando envejece debido a que interactúan desde los primeros años de vida y en las diversas etapas en el curso de la vida (Figura 1.17). Por ello, el análisis de los mecanismos biológicos específicos del sexo y de los factores sociales de género (educación, acceso a alimentos saludables o ejercicio físico, etc.,) son necesarios para conocer los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades como la obesidad y la DMT2 (Brands A and Yach D, 2002).

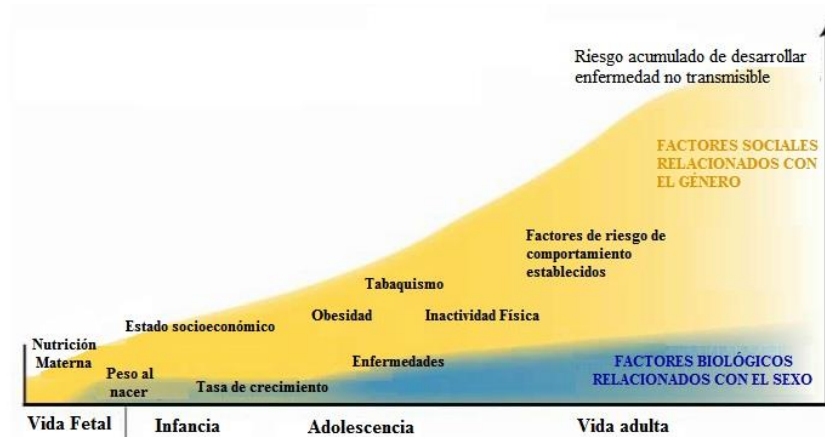
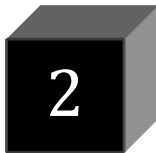


Figura 1.17.- Factores de riesgo acumulados en el curso de la vida para el desarrollo de enfermedades no transmisibles en relación al género y sexo. Figura modificada Gendered innovations Project, 2009

Diversos estudios han mostrado la necesidad de diferenciar por sexo en el diseño metodológico y la interpretación de los resultados (Isensee J and Ruiz Noppinger P, 2007). Estudios de nutrigenómica muestran que los hombres y mujeres responden de forma distinta a dietas específicas a nivel celular, molecular y genético. Se ha observado la necesidad de determinar las especificidades por sexo

del metabolismo, la dieta y la respuesta a los nutrientes para mejorar la comprensión de cómo las dietas afectan a mujeres y hombres (Gendered innovations Project, 2009).

Por todo ello, en el presente estudio se analizaron los distintos parámetros estudiados en función del sexo. No fue posible analizar el género a nivel global, como sería deseable al carecer de las determinaciones de muchas variables necesarias. Por tanto, en el presente estudio se siguieron las recomendaciones de la Unión Europea al realizar los análisis en función del sexo. Todos los resultados obtenidos aportarán información adicional importante para la caracterización de los factores de riesgo en el desarrollo de la obesidad y la DMT2.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La hipótesis conceptual general es la siguiente:

La obesidad y la DMT2 son patologías en sí y, a su vez, factores de riesgo para otras, cuya prevalencia se ha incrementado de manera alarmante en las últimas décadas. En la etología de ambas, el estilo de vida, como la dieta, la realización de la actividad física y el consumo de tabaco, entre otros factores influyen en su desarrollo. Además, existe una predisposición genética a dichas patologías que puede atribuirse tanto a variantes genéticas localizadas en genes candidatos clásicos como a otras variantes localizadas en loci cuya función es desconocida y que se descubren a en los estudios de GWAs. En el desarrollo de estas patologías los factores genéticos y ambientales interaccionan para modular los fenotipos, de manera que un mayor riesgo genético se puede minimizar por un factor ambiental más saludable, entre los que destacamos la dieta mediterránea y la actividad física. Además de las variaciones en la secuencia de ADN, las modificaciones epigenéticas, que no implican cambios de base pero sí otras modificaciones como por ejemplo las metilaciones de citosinas, pueden tener una influencia en la etiología de la obesidad y diabetes, siendo también modulables por los factores ambientales mencionados. Además, en estas asociaciones e interacciones, podemos encontrar algunas diferencias entre hombres y mujeres que es necesario investigar. Por todo ello, el análisis integrado de todos estos factores en una población de alto riesgo de estas patologías nos permitirá obtener nueva información para una futura aplicación en prevención, tratamiento o en el diseño de nuevos estudios.

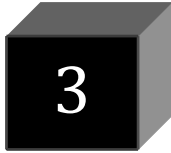
Esta hipótesis general se aborda a través de los siguientes objetivos específicos:

2.2.- Objetivos específicos:

1. Conocer la relación de las variables sociodemográficas (sexo, edad, nivel de estudios, etc.), y de las variables del estilo de vida (adherencia a dieta mediterránea, actividad física, consumo de tabaco, etc) con la obesidad, y las diabetes, así como con los parámetros antropométricos y bioquímicos relacionados con estas variables en una población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular del estudio PREDIMED-Valencia.
2. Analizar la asociación entre variantes genéticas en genes candidatos clásicos relacionados con la obesidad y la diabetes a nivel basal, así como entre nuevas variantes genéticas descubiertas mediante GWAs, tanto con los fenotipos de obesidad y diabetes como con variables antropométricas y bioquímicas relacionadas. Entre estos factores genéticos candidatos y por GWAs, hemos seleccionado los siguientes: el polimorfismo rs3135506 del gen ApoA5 S19W, el polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor, el polimorfismo rs9939609 del gen FTO, el polimorfismo rs4731702 del gen KLF14, el polimorfismo rs13702 del gen LPL, el polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1, el polimorfismo rs10883463 del gen SCD1, el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C, los polimorfismos rs2943641 y rs2943634 cerca del gen IRS1, el polimorfismo rs1052133 del gen OGG1. Además de estas variantes, hemos incluido otras más recientemente descubiertas mediante GWAS como son: los polimorfismos rs4671327 y rs11892385 cerca del gen ASB3, los polimorfismos rs1063192 y rs3217986 de gen CDNK2B, los polimorfismos rs655497 y rs693370 del gen DMRTA1, el polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 y el polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B así como analizar su asociación con parámetros antropométricos y bioquímicos relacionados con ambas patologías en individuos de población mediterránea con alto riesgo cardiovascular. Además del estudio del desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos ubicados en el mismo gen o regiones adyacentes y los posibles haplotipos. Finalmente, dentro de este objetivo planteamos analizar el efecto conjunto de varias de estas variantes genéticas en distintos genes, a partir de la estimación de las puntuaciones de riesgo genético.

3. Investigar la asociación entre variantes genéticas utilizadas como marcadores de ancestro genético con la obesidad, diabetes y parámetros relacionados a nivel basal. Las variantes seleccionadas son: el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK, el polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C, el polimorfismo rs2116830 del gen KCNMA1, el polimorfismo rs6086473 del gen PLCB1, el polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16, el polimorfismo rs16891982 del gen SLC45A2, el polimorfismo rs17638989 del gen ZNF564 y los polimorfismos rs10509954, rs293553 y rs822759.
4. Analizar las principales interacciones gen*ambiente entre los polimorfismos relevantes seleccionados y los factores ambientales (dieta, ejercicio, consumo de tabaco, etc) determinando y modulando la obesidad, diabetes y los fenotipos antropométricos y lipídicos seleccionados. Del mismo modo también se analizarán las interacciones gen*sexo y las interacciones gen*gen entre los polimorfismos en genes relacionados a nivel basal.
5. Extender los objetivos anteriores basados en el estudio PREDIMED-Valencia al total de los participantes del estudio PREDIMED, seleccionando un polimorfismo relevante, en este caso el rs4580704 del gen CLOCK, para el estudio de su asociación con obesidad, y diabetes (prevalencia e incidencia) y su modulación por la intervención con dieta mediterránea.
6. Investigar la influencia epigenética a través del análisis de las metilaciones en islas CpG seleccionadas en los principales genes que se han descrito asociados con obesidad (gen FTO) y con diabetes (TCF7L2), analizando las variables que influyen en dicha metilación así como su asociación con los principales fenotipos relacionados con la obesidad y diabetes. Entre estas variables, analizar específicamente la influencia de los polimorfismos rs9939609-FTO y rs7903146-TCF7L2 en los niveles de metilación integrando genética y epigenética. Adicionalmente, estudiar de manera dinámica los cambios en los niveles de metilación y sus factores asociados, en una submuestra de los participantes PREDIMED-Valencia tras un año de intervención con dieta mediterránea.

7. Identificar nuevas variantes genéticas asociadas los fenotipos de obesidad y de diabetes mediante la realización de GWAs piloto en los participantes en el estudio PREDIMED PLUS Valencia y valorar su replicación en los participantes en el estudio PREDIMED-Valencia.



MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Introducción

El estudio realizado en esta tesis es fruto de un trabajo multidisciplinar para la obtención de las conclusiones generales. Para llevar a cabo esta tesis, la doctoranda ha tenido la oportunidad de participar en todas y cada una de las tareas que forman parte del protocolo de la investigación genómica. A lo largo de seis años se realizó el reclutamiento de participantes en los estudios incluidos en diversos centros de salud de la Comunidad Valenciana, se recopiló la información y se realizaron las mediciones necesarias para poder llevar a cabo este estudio. Además, la doctoranda ha realizado las técnicas de laboratorio incluyendo, desde la extracción de ADN, hasta el análisis de los polimorfismos estudiados mediante distintas técnicas y análisis epigenético. Además, ha realizado el análisis estadístico de datos.

3.2.- Estudio PREDIMED

El estudio PREDIMED es un ensayo prospectivo, aleatorizado, multicéntrico, simple ciego y controlado de intervención para proporcionar el máximo nivel de evidencia científica sobre los efectos beneficiosos de una dieta tipo mediterránea en la prevención primaria de enfermedad cardiovascular llevado a cabo en varias comunidades autónomas (Estruch R., et al., 2006). Esta red recibió financiación por el Instituto de Salud Carlos III en el año 2003 (referencia G03/140). El grupo EPIGEM, de la Facultad de Medicina de Valencia, participa en dicha red desde el denominado nodo de Valencia (EPIGEM-Valencia).

En este estudio se reclutaron pacientes con un alto riesgo cardiovascular pero sin ningún evento cardiovascular al inicio del estudio en diferentes comunidades autónomas repartidas por todo el territorio. Todos ellos se repartieron aleatoriamente en tres grupos de intervención nutricional: dos de ellos con intervención con Dieta Mediterránea, uno suplementado con AOV y otro suplementado con FS y un tercer grupo con una intervención nutricional basada en

una dieta baja en grasa según las recomendaciones tradicionales de la *American Heart Association* (AHA) (Krauss RM et al, 2000). El reclutamiento se hizo a través de centros de atención primaria y cada nodo tenía asignado el reclutamiento de 1000 participantes que cumplieran unos criterios de inclusión determinados que se explicarán más adelante. El seguimiento de estos participantes debía durar un periodo de entre 3 a 5 años para detectar la aparición de cualquier complicación cardiovascular, ya fueran mayores o menores. De todos los participantes se recogieron variables demográficas, de dieta y de estilo de vida mediante diferentes cuestionarios estandarizados. Previamente se obtuvo la firma del consentimiento informado. Además de la obtención de estos datos, se realizaba una exploración física con la medición de la presión arterial y la determinación de datos antropométricos como altura, peso, cintura y cadera. Por último, se recogía muestras biológicas, tanto en la visita inicial o basal como en las diferentes visitas de seguimiento. En el estudio PREDIMED-Valencia se reclutaron 1094 participantes, mientras que en el total del estudio PREDIMED se alcanzó la cifra de 7447.

El estudio PREDIMED comenzó en Junio de 2003, realizando en primer lugar un estudio piloto (Estruch R et al, 2006) y tras comprobar la viabilidad del mismo se prosiguió el reclutamiento hasta Diciembre del 2008.

En el nodo de Valencia se reclutaron 1094 participantes. Este trabajo se ha realizado fundamentalmente con los participantes PREDIMED-Valencia, analizando los datos obtenidos a nivel basal utilizando un diseño transversal. Dado que el estudio PREDIMED es un ensayo randomizado y aleatorizado con seguimiento prospectivo, se ha trabajado también con todos los pacientes PREDIMED para unos análisis específicos en los que se ha podido testar de manera prospectiva la incidencia de diabetes al disponer de un mayor tamaño de muestra, así como testar los efectos de la intervención con dieta mediterránea en la modulación de los efectos genéticos. Este diseño sólo se ha utilizado para un polimorfismo, ya que para la elaboración de Tesis Doctorales la política de uso de datos del PREDIMED aconseja preferentemente trabajar con los datos de un solo nodo en los que se haya involucrado más el doctorando/a.

Para el análisis de GWAs, se han incluido también los primeros 300 participantes reclutados en el nodo de Valencia en el estudio PREDIMED PLUS (predimedplus.com), utilizando un diseño transversal con mediciones basales.

3.2.1 Nodos participantes

En el estudio PREDIMED participan 11 nodos reclutadores (Tabla 3.1). Además existen nodos específicos de laboratorio.

Tabla 3.1.- Centros de campo (CC) participantes en el estudio PREDIMED

NODOS PARTICIPANTES
Universidad Barcelona Hospital Clínic IDIBAPS
Barcelona Institut Municipal de Investigació Mèdica (IMIM)
Universidad Navarra Pamplona
Universidad Valencia EPIGEN
Universidad Málaga NUTR_ANDAL
Sevilla Centro de Atención Primaria
Mallorca Universidad Baleares
Tarragona NURETA Universidad Rovira y Virgili
Vitoria Hospital Txagorritxu
Las Palmas Universidad Gran Canaria
Barcelona Hospital Bellvitge
Universidad de Barcelona Facultad Farmacia An_UB
Universidad de País Vasco Facultad Farmacia
Universidad de Barcelona Facultad de Ciencias

3.2.2.- Selección de participantes

3.2.2.1.- Criterios de inclusión

Se incluyeron en este estudio todos los hombres entre 55 y 80 años de edad y mujeres entre 60y 80 años, sin enfermedad cardiovascular previa documentada (cardiopatía isquémica (CI), angina de pecho o IAM, ACV o vasculopatía periférica) y que presentan además:

- **Diabetes Mellitus tipo 2:** Paciente tratado con insulina o hipoglucemiantes orales; glicemia basal > 126 mg/dl, o glicemia casual > 200 mg/dl con síntomas de DMT2 o un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa con glicemias > 200 mg/dl en dos determinaciones.
o reúnan tres o más de los siguientes factores:
- **Tabaquismo:** Fumadores de más de 1 cigarrillo al día. A efectos de criterio de inclusión en este estudio se consideran como fumadores aquellas personas que hayan dejado de fumar en el último año.
- **Hipertensión arterial:** sujetos con presiones arteriales superiores o iguales a 140/90 mm Hg sin tratamiento o aquéllos que siguen tratamiento hipotensor independientemente de sus cifras tensionales.
- **Hipercolesterolemia:** sujetos con cifras de LDL-colesterol superior a 160 mg/dl sin tratamiento o aquellos que siguen un tratamiento hipolipemiente independientemente de sus cifras de LDL-colesterol.
- **Cifras de c-HDL** superiores a 40 mg/dl, con o sin tratamiento hipolipemiente. En caso de c-HDL superior a 60 mg/dl, se resta uno al número total de factor de riesgo vascular.
- **Sobrepeso u Obesidad:** IMC superior a 25 kg/m².
- **Historia familiar de cardiopatía isquémica precoz:** familiares de primer orden varones menores de 55 años o mujeres menores de 65 años.

Asimismo, el participante debe firmar voluntariamente el impreso de consentimiento informado después de que se le haya explicado la naturaleza del estudio, antes del inicio de cualquier procedimiento relacionado con el mismo.

3.2.2.2.- Criterios de exclusión

Se excluyen todos aquellos sujetos que no cumplan con los requisitos del protocolo o que presenten alguno de los siguientes criterios:

- Dificultad para cambiar los hábitos alimentarios
- Baja probabilidad de realizar cambios dietéticos, según el modelo de estados de cambio de Prochaska et al (1983).
- Imposibilidad de seguir una DM controlada (incluidos los motivos religiosos) o de poder masticar o tragar los alimentos (por ejemplo, dificultad para consumir FS)
- Pacientes institucionalizados, que no realicen una vida autónoma o no puedan mantenerse en pie.
- Pacientes sin residencia fija en los últimos años o con imposibilidad de poder atender a los controles semestrales.
- Antecedentes de hipersensibilidad o reacciones alérgicas a algún componente del AOV o de las nueces.
- Enfermedad médica grave que limite su capacidad de participación en un estudio de intervención dietética (por ejemplo, enfermedades gastrointestinales con intolerancia a las grasas, neurológicas, psiquiátricas, endocrinas descompensadas, tumorales) o que se suponga una esperanza de vida inferior a 1 año. Los pacientes con patología inflamatoria aguda (por ejemplo, neumonía) pueden participar en el estudio transcurrido 3 meses a la curación de su enfermedad.
- Pacientes con un IMC superior a 35 kg/m².
- Enfermos inmunodeprimidos o con infección por el VIH.
- Enfermos alcohólicos crónicos o adictos a drogas.
- Pacientes que han recibido fármacos en fase de investigación durante el último año.

- Analfabetismo

Este estudio ha sido aprobado por los Comités de Ética de los Centros participantes y se ha redactado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. En el caso del nodo de Valencia, se ha obtenido la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

3.2.2.3.- Retirada del estudio

Todos los participantes tienen derecho a retirarse del estudio en cualquier momento sin que ello les suponga perjuicio alguno. Los investigadores pueden retirar a un sujeto del estudio si considera que es necesario por cualquier motivo, como reacciones adversas o incumplimiento del protocolo.

3.2.3.- Reclutamiento de participantes

El reclutamiento se realizó en Centros de Atención Primaria distribuidos por las tres provincias de la Comunidad Valenciana. Los facultativos de dichos centros, durante la realización de la consulta médica presentan el estudio PREDIMED a los posibles participantes que cumplan los criterios de inclusión establecidos en el protocolo del estudio. Tras el consentimiento de los participantes, facilitan los teléfonos de contacto de los participantes reclutados a los investigadores del proyecto. Éstos contactan con ellos para citarlos en su propio centro de atención primaria para realizar la visita inicial.

los participantes que aceptaron y firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio se les asignó un código que constaba de 10 dígitos. Los dos primeros dígitos hacían referencia al nodo reclutador, los dos siguientes al centro de salud en el que se reclutó el participante, los dos siguientes dígitos correspondían al médico de cabecera del participante y los dos últimos a la visita correspondiente

3.2.4.- Recopilación de datos de los participantes

La obtención de variables demográficas socio-económicas, de estilo de vida, antropométricas, clínicas, bioquímicas, así como la obtención de muestras biológicas se realiza en el centro de atención primaria.

Las variables se recogieron de todos los participantes al inicio (basal) y un seguimiento anual durante un periodo de 3 a 5 años prorrogable. En la visita inicial se asignó, de manera aleatoria, cada participante a uno de los tres grupos de intervención nutricional (dos con Dieta Mediterránea y uno con dieta baja en grasa). A los dos grupos de Dieta Mediterránea, además de la educación nutricional adecuada para realizar esta dieta, se les proporcionó aceite de oliva virgen extra o frutos secos según el grupo correspondiente, para facilitar el cumplimiento de estas recomendaciones. El grupo de Dieta Mediterránea con AOV se les proporcionó 1 litro a la semana para su utilización tanto en el cocinado de alimentos como en su aliño y el grupo de Dieta Mediterránea con FS recibió la cantidad correspondiente a la ingesta de 30 g al día de una mezcla de nueces y almendras. Durante el periodo de seguimiento, se reúnen a los participantes cada 3 meses para recordar y reforzar las recomendaciones dietéticas que deben seguir y para realizar, en el caso correspondiente, el reparto del aceite de oliva o de los frutos secos. En el presente trabajo incluiremos los datos obtenidos a nivel basal previo a la intervención dietética.

El proceso comienza con la citación del paciente en el centro de salud para la primera intervención. Se realiza la extracción de sangre y obtención de las medidas antropométricas por la enfermera y, a continuación, se procede a la entrevista con la dietista la cual se encarga de la administración de los cuestionarios correspondientes. El primer seguimiento se realizó hasta diciembre de 2010 y el segundo seguimiento, denominado extended follow-up, se realizó hasta junio de 2012, incluyendo un tiempo de seguimiento en el que sólo se recogen eventos, pero no se realiza ya intervención, ya que en ensayo clínico hubo que pararlo anticipadamente un año antes de lo previsto debido a las diferencias significativas en el número de eventos entre los grupos (Estruch et al, 2013).

3.2.4.1.- Recopilación de datos mediante cuestionarios

La obtención de los datos ambientales se realizó a través de cuestionarios para recoger variables de interés. En la visita basal o inicial los cuestionarios realizados eran: cuestionario de inclusión, cuestionario general, cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA), cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos y cuestionario de actividad física.

3.2.4.1.1.- Cuestionario de inclusión

Mediante este cuestionario se comprueba si el participante cumple los criterios de inclusión y además, no presenta ningún motivo de exclusión. Así pues, incluye preguntas a partir de las cuales se puede valorar especialmente la capacidad del participante para poder seguir un determinado tipo de dieta como la mediterránea, interés de participación en el estudio, su grado de compromiso y disponibilidad para acudir a las visitas de seguimiento y sesiones de intervención que se le indiquen, así como, si el participante ha sufrido, en el pasado, algún evento cardiovascular. Por otro lado, incluye preguntas relacionadas con todos los factores de inclusión, edad, sexo, DMT2, niveles de colesterol, presión arterial, historia familiar de CI precoz, tabaquismo y sobrepeso u obesidad.

3.2.4.1.2.- Cuestionario general

Este cuestionario recoge datos demográficos y socio-económicos de los participantes, como son lugar de nacimiento, estado civil, grado de escolarización y situación laboral. También incluye antecedentes familiares de enfermedades tales como CI, hipercolesterolemia, hipertensión arterial y cáncer. También hace referencia al consumo de alcohol, a enfermedades sufridas y medicaciones recibidas, especialmente aspirina, antiinflamatorios, tranquilizantes, vitaminas o minerales, medicamentos para el corazón, antihipertensivos, fármacos hipolipemiantes, insulina, antidiabéticos orales y tratamiento hormonal. Por otro lado, introduce dos ítems relacionados con la última ingesta de AOV y la última ingesta de bebida alcohólica o vino.

3.2.4.1.3.- Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario

Con este cuestionario se busca el cálculo de la frecuencia de consumo de alimentos en un año. Está compuesto por 139 preguntas. La frecuencia de consumo va de “nunca o casi nunca” hasta “más de 6 veces al día”. Incluye la frecuencia diaria, semanal o mensual durante el último año de consumo de un listado de alimentos comunes, como productos lácteos, cereales o féculas, verduras y hortalizas, legumbres, huevos, carnes, embutidos, pescados y mariscos, aceites y grasas, *fast food*, alimentos enlatados, frutas, frutos secos, dulces, pastelería y bollería industrial y bebidas no alcohólicas y alcohólicas. Además, añade la toma de vitaminas y/o minerales (incluyendo calcio) o productos dietéticos especiales (salvado, aceite de onagra, leche con ácidos omega-3, flavonoides) en el último año. Este cuestionario ha sido validado específicamente para el estudio PREDIMED (Fernández-Ballart J et al, 2010).

3.2.4.1.4.- Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos

A través de este cuestionario se evalúa el grado de cumplimiento de la Dieta Mediterránea. Está formado por 14 ítems de manera que si el participante consigue 14 puntos significa que consume una dieta tipo mediterráneo calificada como óptima. Los diferentes ítems hacen referencia al consumo de AOV, verduras, hortalizas, frutas, carnes rojas, blancas y embutidos, grasas, bebidas carbonatadas y/o azucaradas, vino, legumbres, pescados y mariscos, repostería comercial, FS, cereales y de condimentos con tomate, ajo, cebolla y hierbas aromáticas. A partir de este cuestionario se clasificaron los participantes en aquellos que consumen una dieta con alta adherencia a la DM e individuos con una dieta con baja adherencia a la DM. El punto de corte para realizar esta clasificación fue la media del total de puntos hallada en el total de la población. Dicha media fue de 9 ± 2 puntos, de modo que aquellos que obtuvieron 9 o más puntos en el cuestionario se incluyeron en el grupo de alta adherencia a la DM. Los individuos que presentaron puntuaciones por debajo de 9 se incluyeron en el grupo de baja adherencia a la DM. El cuestionario utilizado es un cuestionario validado en población española (Schröder H et al, 2011).

3.2.4.1.5.- Cuestionario de actividad física

Para la evaluación de nivel de actividad física realizada por el participante, se utiliza la adaptación española del Cuestionario de Actividad Física durante el Tiempo Libre de Minnesota (CAFTLM), el cual ha sido validado (Elosua R et al, 1994). Incluye las actividades físicas realizadas en el último mes y en el último año, y el tiempo de práctica de cada una de ellas. Las actividades que componen este cuestionario se dividen en diferentes grupos: andar, ejercicios de mantenimiento general, actividades acuáticas, actividades de invierno como esquí, deportes, actividades de jardín, reparaciones caseras (bricolaje) y caza y pesca. Cada actividad está perfectamente definida para asegurar una correcta evaluación del ejercicio físico que realiza el paciente. Además, para asegurar la uniformidad de la información recogida se considera que un mes tiene 4 semanas, un año tiene 48 semanas, cada año tiene 240 días laborables, un mes tiene 22 días laborables, un año tiene 100 días de fin de semana. Por otro lado, se ha establecido un tiempo estandarizado para las siguientes actividades: subir escaleras, cada piso = 1/2 minuto, una partida de billar = 10 minutos, un set de tenis individual = 20 minutos, un set de tenis dobles = 15 minutos, golf 9 hoyos = 90 minutos.

A partir de este cuestionario se clasificaron los participantes en sedentarios y no sedentarios. El criterio de clasificación se basó en las recomendaciones realizadas por la *American College of Sport Medicine* y la AHA para mayores de 65 años o para adultos entre 50 y 64 años con condiciones crónicas clínicamente relevantes (Nelson ME et al, 2007). Estas recomendaciones consideran que se mejora o mantiene la salud cuando se realiza actividad aeróbica de moderada intensidad al menos 30 minutos 5 días a la semana o actividad de intensidad alta 20 minutos, 3 días a la semana, sin incluir las tareas domésticas cotidianas. Puesto que se trata de individuos de avanzada edad en las actividades de moderada intensidad se incluyen actividades como pasear o caminar deprisa, ejercicio en casa y, son consideradas actividades de alta intensidad ejercicios como nadar, trotar, aeróbic, aquagym, andar campo a través, cavar en el huerto, ir en bicicleta (Nelson ME et al, 2007).

3.2.4.2.-Recopilación datos antropométricos

En el cuestionario general hay un apartado destinado a la exploración física en la que se recogen los datos antropométricos como son la talla, el peso, el perímetro de cintura y cadera. Además se realiza la medición de la presión arterial sistólica,

diastólica y la frecuencia cardíaca. El protocolo utilizado para tales medidas se explica a continuación.

3.2.4.2.1.- Medición de la talla

La medición de la talla se realiza con un tallímetro estándar, preferiblemente de brazo móvil. Se descalza previamente al participante, y debe quitarse su chaqueta. Los participantes deben estar en una superficie firme y lisa. Se coloca de espaldas al tallímetro, apoyando los talones, nalgas y brazos. La cabeza debe estar en el plano horizontal y con los pies/tobillos juntos. Se desplaza el brazo móvil del tallímetro hasta que se apoye sobre la superficie de la cabeza, formando un ángulo recto con el brazo móvil del tallímetro. Los valores se expresarán en centímetros, redondeando a 1 cm.

3.2.4.2.2.- Medición del peso

Se utiliza una báscula calibrada previamente, que debe estar colocada en una superficie firme y lisa. El participante se sitúa en el centro de la misma y debe vestir ropa ligera sin peso superfluo, sin zapatos, chaquetas o abrigos. El peso se expresa en Kg con un decimal, redondeando al valor de 100 gramos.

3.2.4.2.3.- Medición del perímetro de la cintura

Se utiliza una cinta métrica. El participante se coloca en bipedestación y mantiene la cabeza recta, con los brazos a ambos lados del cuerpo. Se mide el perímetro abdominal en espiración en el punto intermedio de la línea trazada entre la última costilla y la cresta ilíaca. Se asegura que la cinta está al mismo nivel por delante y por detrás. Se anota en escala de 0.1 cm.

3.2.4.2.4.- Obtención del Índice de Masa Corporal

El Índice de Masa Corporal (IMC) se ha calculado mediante la fórmula:

$$\text{IMC (Kg/m}^2\text{)} = \text{peso (Kg)} / (\text{talla(m)})^2$$

Se considera un individuo con sobrepeso con $\text{IMC} \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ y obeso con $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$.

3.2.4.2.5.- Medición de la presión arterial

Los participantes permanecen en una silla con la espalda y brazos apoyados en una situación que permita que el brazal se halle a la altura del corazón. Se les pide que eviten fumar o tomar cafeína durante los 30 minutos previos a la determinación de la presión arterial. Se inicia tras al menos 5 minutos de reposo. La cámara del manguito debe rodear como mínimo al 80% del brazo. Las determinaciones de la presión arterial se toman con un esfigmomanómetro automático (Omron 705 IT Intelli sense, Susaka Co. LTD, Japón). Se promedian 2 o más lecturas separadas por 2 minutos. Si las dos primeras difieren más de 5 mmHg se obtienen y promedian lecturas adicionales. Se considera HTA presiones arteriales superiores o iguales a 140/90 mm Hg.

3.3.- Estudio PREDIMED PLUS

El estudio PREDIMED PLUS es un ensayo de campo aleatorizado y multicéntrico dirigido a la prevención primaria de enfermedad cardiovascular en adultos con sobrepeso y obesidad mediante una intervención intensiva basada en una dieta mediterránea hipocalórica, promoción de actividad física y terapia conductual comparada frente a un grupo control que recibirá consejo de baja intensidad también sobre dieta mediterránea para la prevención de morbimortalidad cardiovascular (CV) y síndrome metabólico de acuerdo al estudio PREDIMED. Por ello, tomando el estudio mencionado como precedente a este nuevo ensayo se le denominará ensayo PREDIMED-PLUS.

Para este nuevo ensayo multicéntrico, con participación de un total de 22 nodos, se han reclutado 6800 participantes, la mitad asignados al grupo de intervención intensiva, y la otra mitad al grupo control. El reclutamiento ha tenido lugar entre 2013-2016. La intervención se mantendrá al menos 6 años. El seguimiento medio previsto para los eventos clínicos será de 8 años. El presente trabajo se seleccionaron 308 participantes reclutados en el nodo de Valencia, con las variables antropométricas y bioquímicas de interés, así como su correspondiente extracción de muestra biológica para el aislamiento de ADN. Estas muestras se utilizarán para la realización de un GWAs piloto con la finalidad de detectar nuevos SNPs candidatos relacionados con obesidad y DMT2.

3.3.1.- Selección de participantes

3.3.1.1.- Criterios de inclusión

Se propone realizar un ensayo de grupos paralelos, multicéntrico, aleatorizado y de prevención primaria en hombres de 55-75 años y mujeres de entre 60-75 años, con un IMC ≥ 27 y < 40 kg/m², que presenten al menos 3 criterios de síndrome metabólico (Alberti KG et al, 2009), los cuales son:

- Obesidad central. Valorada por el perímetro de cintura, debiendo ser > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres
- Niveles de triglicéridos ≥ 150 mg/dl o tratamiento para hipertrigliceridemia
- Valores de c-HDL inferiores a 40 mg/dl en hombres y 50 mg/dl en mujeres, o tratamiento farmacológico específico
- Presión arterial elevada, considerada como PAS ≥ 135 mmHg y PAD ≥ 85 mmHg, o tratamiento para la hipertensión diagnosticada previamente
- Incremento de niveles de glucemia: Cuando glucemia en ayunas es ≥ 100 mg/dl ($\geq 5,6$ mmol/l) o bien tratamiento para diabetes tipo 2 ya diagnosticada

Se exige la presencia de estos criterios, teniendo en cuenta evidencias recientes del papel beneficioso de la dieta mediterránea sobre el síndrome metabólico (Kastorini CM et al, 2011; Salas-Salvadó J et al, 2008), la resistencia a la insulina y la diabetes (Salas-Salvadó J et al, 2014b), especialmente cuando se acompaña de promoción de actividad física de resistencia (Fernández JM et al, 2012). Un el 50% de la población de estudio son mujeres. Los individuos que participaron en el primer estudio PREDIMED no son candidatos al nuevo estudio PREDIMED-PLUS, ya que se considera que ya han sido participes de una intervención.

3.3.1.2.- Criterios de exclusión

- Incapacidad o falta de voluntad para dar consentimiento informado por escrito o comunicarse con el personal del estudio o analfabetismo
- Institucionalización del participante (que habite en residencias o centros de larga estancia)
- Historia documentada de ECV previa, incluyendo la angina de pecho, infarto de miocardio, procedimientos de revascularización coronaria,

- accidente cerebrovascular (ya sea isquémico o hemorrágico, incluidos los ataques isquémicos transitorios), enfermedad arterial periférica sintomática que haya requerido cirugía o que fuera diagnosticada con técnicas de imagen vascular, las arritmias ventriculares; fibrilación auricular no controlada, insuficiencia cardíaca congestiva (Clase III o IV de la New York Heart Association), miocardiopatía hipertrófica, e historia de aneurisma aórtico $\geq 5,5$ cm de diámetro o cirugía de aneurisma de aorta
- Cáncer activo o antecedentes de tumores malignos en los últimos 5 años (con excepción del cáncer de piel no melanoma)
 - Imposibilidad de seguir la dieta recomendada (por razones religiosas, problemas de deglución, etc.) o incapacidad para realizar actividad física
 - Baja probabilidad predicha de cambiar los hábitos alimentarios de acuerdo a los estadios de Prochaska y DiClemente del modelo de estadios de cambio (Nigg CR et al, 1999)
 - La incapacidad para seguir las visitas programadas en la intervención (individuos institucionalizados, falta de autonomía, incapacidad para caminar, falta de un domicilio estable, planes de viaje, etc.)
 - Haber sido incluido en otro programa de consejos para pérdida de peso (> 5 kg) durante los 6 meses previos a la visita de selección
 - Historia de haber seguido una dieta de muy bajo valor calórico durante los 6 meses antes del inicio del estudio
 - Antecedentes de procedimientos quirúrgicos para bajar de peso o intención de someterse a cirugía bariátrica en los próximos 12 meses
 - Historia de resección del intestino delgado o grueso
 - Historia de enfermedad inflamatoria intestinal
 - Obesidad de origen endocrino conocido (con la excepción de hipotiroidismo tratado)
 - Alergia a alimentos o componentes de la dieta mediterránea
 - Inmunodeficiencia o estado VIH positivo
 - Cirrosis o insuficiencia hepática
 - Trastornos psiquiátricos graves: esquizofrenia, trastorno bipolar, trastornos de la conducta alimentaria, depresión con hospitalización en los últimos 6 meses
 - Toda condición severa de comorbilidad con menos de 24 meses de esperanza de vida

- Consumo problemático de alcohol o síndrome de dependencia alcohólica (o ingesta total diaria de alcohol > 50 g) o abuso de drogas en los últimos 6 meses
- Historia del trasplante de órgano vital
- Tratamiento concomitante con fármacos inmunosupresores o agentes citotóxicos
- Tratamiento actual con corticoesteroides sistémicos
- Uso actual de medicación para la pérdida de peso
- Participación simultánea en otro ensayo clínico aleatorizado
- Los pacientes con una infección aguda o inflamación (por ejemplo, neumonía) se les permitirá participar en el estudio 3 meses después de su recuperación
- Cualquier otra condición que pueda interferir con la realización del protocolo del estudio

3.3.2.- Recopilación de datos de los participantes

Para el reclutamiento de participantes se requirió la participación de los facultativos de centros de salud quienes seleccionaron posibles candidatos que cumplieran los criterios de inclusión para la realización del estudio. Si el candidato estaba interesado en participar, comenzaba un periodo de rodaje de 4 semanas, en el cual se administraron una serie de cuestionarios para confirmar su voluntad de participar en el estudio.

Tras completar esta fase, cada participante se aleatorizó para asignarle el grupo de intervención. A continuación se realizó una visita basal donde, mediante un cuestionario de información general, se recopiló información sobre el historial médico, antecedentes familiares y uso de medicamentos. La última parte del cuestionario estaba dedicada a la exploración física donde se recogieron datos antropométricos como el peso, perímetro de cintura y cadera, además de la presión arterial sistólica y diastólica. En la misma visita se recogió muestra biológica para la realización de una analítica bioquímica así como la extracción de ADN.

3.4.- Determinaciones bioquímicas a partir de muestras biológicas

Junto con la recopilación de todos estos datos antropométricos y ambientales, durante la visita se procede a la obtención de muestras biológicas para la posterior determinación de parámetros bioquímicos generales así como la extracción del ADN y su posterior análisis genético.

Para poder realizar todos estos procesos se necesitan una serie de aparatos, equipos y reactivos proporcionados por casas comerciales dedicadas al campo de la biología molecular. A continuación se describe más detalladamente los utilizados para el desarrollo experimental del presente trabajo.

3.4.1.- Casas comerciales

- Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos.
- Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos.
- Eppendorf, Hamburgo, Alemania
- Gibco BRL - Life Technologies, Paisley, Escocia.
- Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania.
- Illumina Inc, San Diego, CA, Estados Unidos
- Merck, Darmstadt, Alemania.
- Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos.
- Mitsubishi Electric Corporation, Tokyo, Japon.
- MoBio Laboratorios, Inc
- Nirco SA, Móstoles, Madrid, España
- Panreac, Barcelona, España.
- Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania.
- Sequenom, Inc. San Diego, CA, Estados Unidos.
- Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos.
- Soria Genlab SA, Valdemoro, Madrid, España.
- Zymo Research Corporation, Irvine, CA, Estados Unidos.

3.4.2.- Aparatos y equipos

El análisis de parámetros bioquímicos como el colesterol, c-HDL, triglicéridos y glucosa se realizaron en un analizador Beckman CX-7. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de bioquímica de la Clínica Quirón de Valencia. Se han realizado pruebas con muestras duplicadas para testar los resultados obtenidos en el laboratorio.

Para la extracción de ADN mediante técnica automatizada se utilizó el robot MagNa Pure Compact Instrument de Roche.

Para el análisis mediante fluorescencia con sondas TaqMan se utilizó el sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR.

Para el estudio de GWAs se realizó en la Unidad de genotipado y diagnóstico genético de la Fundación Investigación Clínico de Valencia (INCLIVA) mediante la Infinium genotyping platform de Illumina.

El estudio epigenético de la metilación del ADN se realizó en la Unidad de análisis multigénico por espectromía de masas la Fundación Investigación Clínico de Valencia (INCLIVA) con una plataforma SEQUENOM de Sequenom Inc.

El resto de aparatos (centrífugas de mesas, estufas, baños, pipetas monocanales y multicanales) fueron lo normales en un laboratorio.

3.4.3.- Material para la obtención de muestras y su almacenamiento

El material necesario para la obtención de las muestras y su almacenamiento es el siguiente:

- Tubos de extracción sangre (BD Vacutainer Systems): a) Tubo cristal 4,5 mL con EDTA como aditivo (tapa violeta) (REF 367654), destinado a conseguir plasma-EDTA y interfase celular (buffy coat); b) Tubo cristal 4,5 mL con citrato como aditivo (tapa azul) (REF 367704), destinado a conseguir plasma-citrato y interfase celular (buffy coat); c) Tubo cristal 4 mL con gel (tapa amarilla) (REF 367783), destinado a conseguir suero; d) Equipos y agujas (BD Vacutainer Systems).

- Contenedor orina 100 mL (Soria Genlab SA), para recolección de orina reciente.
- Viales de 650 μ L (NIRCO SA, REF 915530).
- Tapones de colores para los criotubos (NIRCO SA), según los códigos: a) “rojo” para el plasma-EDTA (NIRCO SA, ref 915410); b) “azul” para el plasma-citrato (NIRCO SA, ref 915470); c) “amarillo” para el suero (NIRCO SA, ref 915400); d) “blanco” para buffy-coat (NIRCO SA, ref 915480); e) “verde” para plasma-EDTA refrigerado (NIRCO SA, ref 915460); f) “transparente” para orina (NIRCO SA, ref 915490).
- Criocajas contenedores de criotubos GLW 2mL para 81 tubos, ref B50
- Pipetas Gilson 1000 μ L, Pasteur, puntas pipetas, y demás fungibles.

3.4.4.- Obtención de muestras biológicas

Al contactar con el participante se le informa de que debe asistir en ayunas al su centro de salud, con una muestra de la primera orina de la mañana y una muestra de uña del pie, en recipientes adecuados y esterilizados. Allí se procede a la extracción de sangre venosa periférica por el personal cualificado. El volumen de sangre extraído es distribuido en 4 tubos K3E con EDTA de 4,5, 1 tubo 9NC con citrato de 4,5 ml y 3 tubos SST de 4 ml con gel separador. Una vez extraídos los tubos se guardan en una nevera portátil para su transporte al laboratorio de la Facultad de Medicina para su procesado. Uno de los tubos K3E con EDTA se reserva para la extracción de ADN y posteriores análisis genéticos y un tubo SST con gel separados para la realización del análisis bioquímico. El resto de tubos se utilizan para el fraccionamiento de alícuotas siguiendo el protocolo estándar. Uno de los tubos K3E permanece en frío constantemente y uno de de los tubos SST está protegido de la luz. Posteriormente se almacenan a -80°C , constituyendo un banco de plasma, suero, orina y leucocitos para futuros análisis.

3.4.4.1.- Protocolo de fraccionamiento en alícuotas

Previo a la extracción de la sangre se realizan etiquetas con el código asignado al participante y se colocan en los crioviales para la identificación de las diferentes muestras.

Los tubos se centrifugan a 1500g durante 20 minutos. A continuación se realizan las siguientes alícuotas. A cada tipo de alícuota se le asigna un tapón con un color determinado para la correcta identificación de la muestra.

- Plasma EDTA (tapón rojo): 5 alícuotas de 200 μ L y 10 alícuotas de 500 μ L.
- Buffy-coat (tapón blanco): 5 alícuotas de 500 μ L a partir de tubos de EDTA y citrato.
- Plasma EDTA refrigerado (tapón verde): 1 alícuotas de 200 μ L y otra de 500 μ L.
- Plasma citrato (tapón azul): 3 alícuotas de 200 μ L y 2 alícuotas de 500 μ L.
- Suero (tapón amarillo): 4 alícuotas de 200 μ L y 6 alícuotas de 500 μ L.
- Suero protegido de la luz (tapón amarillo): 2 alícuotas de 500 μ L.
- Orina (tapón transparente): 14 alícuotas de 650 μ L.
- Muestras de uñas: se colocan en criotubos con tapón transparente.

Las alícuotas se introducen en criocajas y son almacenadas a -80°C hasta que son enviadas, a los nodos correspondientes encargados de realizar determinaciones específicas a partir de las muestras. Las alícuotas de un participante se distribuyen en criocajas separadas según deban ser enviadas a uno u otro nodo.

3.4.5.- Análisis bioquímico

A partir del análisis bioquímico se obtienen las concentraciones plasmáticas de glucosa, CT, c-HDL, c-LDL y TG. Las determinaciones se realizan en el laboratorio bioquímico de la Clínica Quirón de Valencia en el nodo de Valencia. La determinación del CT, c-HDL y TG se realizó por métodos enzimáticos en un analizador Beckman CX-7. La glucemia se determinó por método enzimático de adaptación de deshidrogenasa de la hexoquinasa-glucosa 6 fosfato. El c-LDL se obtuvo mediante la aplicación de la fórmula de Friedwald WT et al, (1972) válida siempre que la trigliceridemia no exceda los 300 mg/dl. Para calcularlo en mg/dl la fórmula es:

$$LDL\ coles\ terol = \text{Colesterol total} - (\text{HDL coles\ terol} + \underline{\text{Triglicéridos}})$$

5

Para poder calcularlo en mmol/L la cifra de TG debe dividirse entre 2,2.

3.5.- Análisis genético

En el presente trabajo se estudió el efecto de diferentes polimorfismos relacionados con la obesidad y la DMT2 en la población de alto riesgo cardiovascular del estudio PREDIMED.

El proceso de extracción del ADN así como el análisis de polimorfismos por técnicas de fluorescencia se realizaron en el laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de Valencia. Ambos procesos se realizaron bajo las condiciones óptimas y en salas distintas para impedir la contaminación de las muestras. El genotipado denso con los arrays de alta densidad para llevar a cabo GWAs se realizó en la Unidad de genotipado y diagnóstico genético de la Fundación Investigación Clínico de Valencia (INCLIVA) y el estudio epigenético de la metilación del ADN se realizó en la Unidad de análisis multigénico por espectromía de masas la Fundación Investigación Clínico de Valencia (INCLIVA), ambas situadas en la Facultad de Medicina de Valencia.

3.5.1.- Reactivo para el análisis genético

Extracción de ADN: Para la extracción por método automático se utilizó el kit MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation kit (Roche diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) para la extracción con MagNa Pure Compact de Roche (Figura 3.1).

Técnica de fluorescencia con sondas Taqman: Se utilizó la plataforma 7900HT Fast Real-Time PCR. Para amplificar el ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó una máster mix estándar, la *Taqman Genotyping Master Mix*. Junto con esta mix se utiliza la solución *TaqMan SNP Genotyping Assay*, que contiene la pareja de cebadores de la reacción de amplificación y las sondas TaqMan específicas para cada uno de los alelos del polimorfismo a estudiar. Ambos reactivos son diseñados por Applied Biosystems

Estudio Genome-wide Association (GWAs): Se utilizaron los chips *HumanOmniExpress-24 Beads Chips* de Illumina 24 muestras cada uno. Se utilizó el Infinium HD Assay en la plataforma *Infinium genotyping platform* de Illumina.

Estudio de metilación de ADN: Se utilizó para medir el grado de metilación de las regiones de los genes de interés la plataforma de análisis SEQUENOM, con un tratamiento previo de las muestras por bisulfito usando el kit *EZ-96 DNA methylation* de Zymo Research.



Figura 3.1.- MagNa Pure Compact de Roche

3.5.2.- Análisis de polimorfismos

Tras la extracción de ADN, posteriormente se seleccionaron polimorfismos de estudios anteriores que se consideraron que tenían interés en nuestro estudio. Además, gracias a los estudios de GWAs se buscaron nuevos genes relacionados tanto con la obesidad como con la DMT2.

Los polimorfismos analizados en la población del estudio PREDIMED del nodo de Valencia fueron: ApoA5 promotor, ApoA5 S19W, CLOCK C, FTO, IRS1, KLF14, LPL, NR1D1, OGG1, SCD1, ASB3, CDKN2B, DMRTA1, INAFM2 y MTNR1B. También se analizaron otros polimorfismos que se han relacionado con el ancestro genético como: CLNK, FAM5C, KCNMA1, PLCB1, PRDM16, SLC45A2, ZNF564, rs293553, rs822759 y rs10509954.

3.5.2.1.- Extracción de ADN

La extracción se realizó con un método automatizado utilizando el robot MagNA Pure Compact Instrument de Roche. Este robot integra la tecnología necesaria para la purificación de ácidos nucleicos de manera automatizada. Está preparado para procesar de 1 a 8 muestras en paralelo al mismo tiempo. Las muestras pueden proceder de sangre fresca, congelada o buffy-coat. Funciona en combinación con kits que contienen todos los componentes ya optimizados necesarios para llevar a cabo el aislamiento de ADN suministrados también por Roche.

3.5.2.2.- Análisis de polimorfismos en genes candidatos por sondas Taqman

La sonda Taqman es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa. Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó *reporter* (FAM_{TM}, o VIC_{TM}) y otro unido en el extremo 3' ó *quencher* (NFQ). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* mediante un proceso conocido como FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente), que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Didenko VV et al, 2001). Si la secuencia de DNA complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador degrada la sonda gracias a su actividad 5' exonucleasa. Esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es recogido y almacenado por el secuenciador. La separación de la sonda del ADN posibilita que el proceso de extensión del primer continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado.

Así, se diseña una sonda Taqman con la secuencia que correspondería al alelo Y unido a un fluorocromo (FAM_{TM} o VIC_{TM}), y otra sonda con la secuencia que correspondería al alelo X (FAM_{TM} o VIC_{TM}). Cada sonda se unirá de manera específica a su secuencia complementaria, y al unirse será cuando la polimerasa separe el *reporter* del *quencher* y la fluorescencia que se emite será específica de la secuencia a la que era complementaria (Figura 3.2).

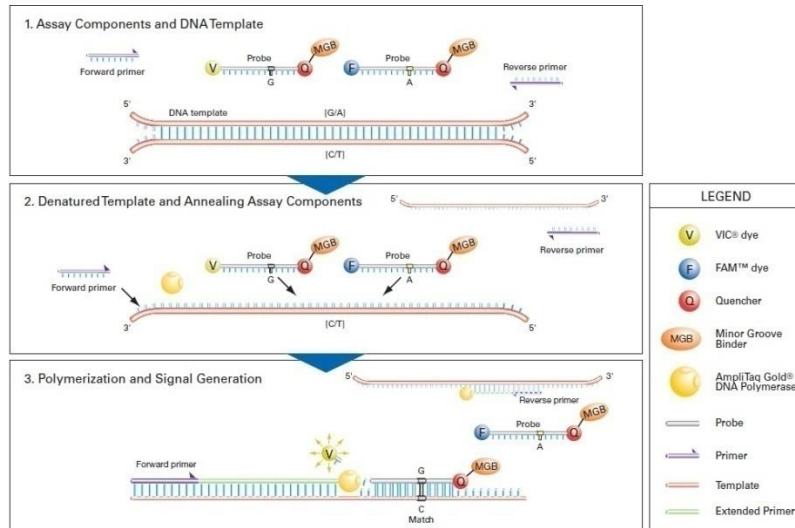


Figura 3.2.- En la figura se muestra el funcionamiento de las sondas Taqman. La sonda con la secuencia complementaria se une al DNA molde y durante la elongación, hay una actividad exonucleasa por parte de la polimerasa. Reporter y quencher se separan y hay un incremento de la fluorescencia. Modificado de Taqman SNP Genotyping Assay Protocol

Para determinar el genotipo a través del análisis de fluorescencia se realizó mediante la plataforma 7900HT Fast Real-Time PCR de Applied Biosystems. Esta plataforma permite la detección cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos usando una lectura de fluorescencia a tiempo final, permitiendo la determinación del genotipo por discriminación alélica (Figura 3.3).

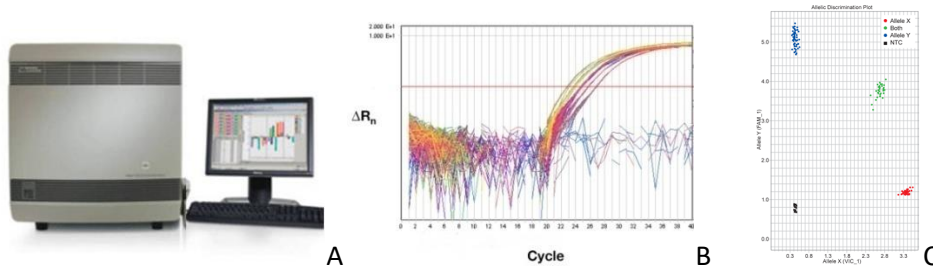


Figura 3.3.-Plataforma de 7900HT Fast Real-Time PCR (A). Gráfico proporcionado por el programa SDS 2.3 para la detección cuantitativa en la PCR (B) y para la detección cuantitativa de la discriminación alélica (C)

Mediante esta técnica se analizaron los polimorfismos de los genes: ApoA5 promotor, ApoA5 S19W, CLOCK C, FTO, IRS1, KLF14, LPL, NR1D1, OGG1, SCD1. También se analizaron otros polimorfismos que se han relacionado con el ancestro genético como: CLNK, FAM5C, KCNMA1, PLCB1, PRDM16, SLC45A2, ZNF564, rs293553, rs822759 y rs10509954. Para cada polimorfismo se utilizaron las soluciones prediseñadas de *Applied Biosystem*, las *TaqMan SNP Genotyping Assay*, que contienen la pareja de cebadores para cada reacción de amplificación y las sondas TaqMan específicas para cada polimorfismo. A continuación se indican las *TaqMan SNP Genotyping Assay* para cada uno (Tabla 3.2).

Tabla 3.2.- Referencias de los ensayos de Applied Biosystems para cada polimorfismo genotipado

Gen/Polimorfismo	SNP Genotyping Assay Mix
ApoA5 promotor rs662799	C 2310403 10
ApoA5 S19W rs3135506	C 25638153 10
CLNK rs2014303	C 2297287 10
CLOCK C rs4580704	C 28028791 10
FAM5C rs2419063	C 16239790 20
FTO rs9939609	C 30090620 10
IRS1 rs2943641	C 3055406 10
IRS1 rs2943634	C 15949769 10
KCNMA1 rs2116830	C 15818349 10
KLF14 rs4731702	C 11422078 10
LPL rs13702	C 9639448 10
NR1D1 rs2314339	C 26004644 10
OGG1 rs1052133	C 3095552 1
PLCB1 rs6086473	C 338475 10
PRDM16 rs11807062	C 27103162 10
SCD1 rs10883463	C 31980225 10
SLC45A2 rs16891982	C 2842665 10
ZNF564 rs17638989	C 2937465 10
rs293553	C 2993762 10
rs822759	C 7499487 10
rs10509954	C 1653598 10

La mezcla para la realización de la PCR a tiempo real se prepara para el desarrollo del protocolo estándar propuesto por la casa comercial. El volumen final de la reacción es 5 μL para cada muestra compuestos por: 2,5 μL de *TaqMan Genotyping Master Mix (2x)*, 0,125 μL *TaqMan SNP Genotyping Assay* y 1,875 μL de agua bidestilada. Las reacciones se llevan a cabo en una placa de 384 pocillos (Microamp® Optical 384-well Reaction Plate, Applied Biosystems). Una vez cargada toda la placa se cubre con un adhesivo y se coloca en el bloque térmico del sistema de detección Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR. Las condiciones para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa para todos los polimorfismos están descritas en la siguiente tabla (Tabla 3.3).

Tabla 3.3.- Condiciones para la amplificación estándar en la plataforma Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR

Nº Ciclos	Condiciones
1x	10 minutos a 95 °C
40x	15 segundos a 92 °C 1 minuto a 60 °C

Tras la amplificación se realiza la discriminación alélica mediante el software SDS 2.3 de la plataforma. Con esta herramienta se clasifican las muestras según la fluorescencia que detecta de la siguiente manera: a) Homocigoto alelo X: sólo existe fluorescencia VIC, b) Homocigoto alelo Y: sólo existe fluorescencia FAM, c) Heterocigoto: existen ambas fluorescencias VIC y FAM.

3.5.2.3.- Arrays de Genoma completo (GWAs)

Para la búsqueda de nuevos genes relacionados con las enfermedades estudiadas se realizaron estudios basados en Arrays de genoma completo (GWAs). La lectura de los arrays se realizó en Unidad de genotipado y diagnóstico genético de la Fundación Investigación Clínico de Valencia (INCLIVA) mediante la Infinium genotyping platform de Illumina (Figura 3.4A). Con esta técnica se analizaron polimorfismos de los genes ASB3, CDKN2B, DMRTA1, INAFM2 y MTNR1B.

Para ello se utilizaron los chips *HumanOmniExpress-24 Beads Chips* de Illumina (Figura 3.4B). Cada array permite cargar 24 muestras y tiene más de 715000 marcadores o polimorfismos para analizar para cada muestra.

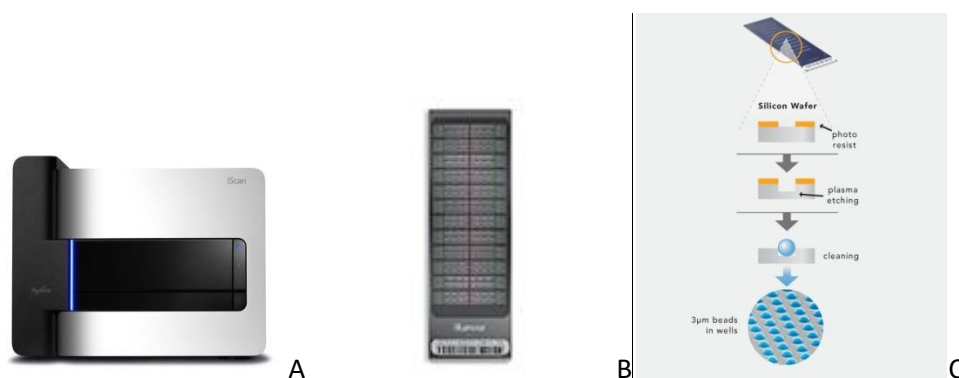


Figura 3.4.- iScan Microarray Scanner perteneciente a la plataforma de Infinium para la lectura de los arrays (A). *HumanOmniExpress-24 Beads Chips* de Illumina (B) y el esquema del formato del Illumina multi-sample array (C)

El proceso comienza por una desnaturalización y neutralización para preparar el ADN para su amplificación. Una vez realizado este proceso, las muestras se amplifican isotermalmente. A continuación, el producto amplificado se fragmenta enzimáticamente sin necesidad de utilizar geles de electroforesis. El resultado se precipita con etanol y se recolecta el ADN amplificado y fragmentado por centrifugación a 4°C. El ADN precipitado se resuspende en un tampón de hibridación.

Después de preparar toda las muestras de ADN se cargan en los Beadchip y se continúa el proceso (Figura 3.5). Los chips se incuban toda la noche para que las muestras de ADN se hibriden a las “beads”. Después de un lavado para eliminar todo el ADN que no se ha unido, se produce una extensión con oligos marcados usando el ADN como patrón, así se podrá determinar el genotipo.

Una vez ya está preparado el chip se lee con el escáner (iScan). El aparato utiliza un láser para activar los fluoróforos con los que están marcados los productos de la extensión. Dentro de la plataforma Infinium se utiliza el *GenomeStudio Genotyping Module*, una aplicación que permite extraer todos los datos de la lectura del chip.



Figura 3.5.- Imágenes del proceso de carga y preparación de los chips *HumanOmniExpress-24 Beads*

Dentro de los resultados se mide el call rate, que es el índice que se utiliza para comprobar que la calidad de las muestras era la adecuada y que se han genotipado la mayoría de sus polimorfismos. En nuestro caso, el call rate fue mayor de 0,9, por lo que el resultado y el genotipado es correcto.

3.6.- Análisis epigenético

El estudio epigenético se realizó en la Unidad de análisis multigénico por espectromía de masas la Fundación Investigación Clínico de Valencia (INCLIVA) con una plataforma SEQUENOM de Sequenom Inc. (Figura 3.8). Dentro de los diferentes mecanismos de regulación epigenética, el presente estudio se centró en la metilación del ADN. Concretamente, se cuantificó el grado de metilación en regiones de genes seleccionados para este estudio mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Las regiones seleccionadas se detallarán más adelante (Figura 3.6).



Figura 3.6.- Plataforma de análisis SEQUENOM

3.6.1- Protocolo de cuantificación del porcentaje de metilación

La metilación del ADN es una modificación epigenética donde un grupo metilo se une covalentemente a la posición 5 del anillo pirimidínico de la citosina (5-MeC), dentro del contexto del dinucleótido 5'-CpG-3'. Estos sitios CpG están concentrados en distintas áreas del genoma y se denominan islas CpG. Para realizar el análisis de la metilación de nuestras muestras, se realizó al ADN un tratamiento previo con bisulfito. Este método se basa en la habilidad del bisulfito sódico de transformar eficientemente los residuos de citosina a uracilo de los grupos CG no metilados. En los grupos metilados (5-MeC) no se producirá la reacción.

La conversión del ADN genómico con bisulfito sódico se realizó usando el kit EZ-96 DNA Methylation kit de Zymo Research. Siguiendo el protocolo del fabricante, se diluye el ADN con agua y se añade un buffer de dilución perteneciente al kit. Se incuban las muestras durante 15 minutos a 37°C. A continuación se añade el reactivo CT Conversion y se le da un vórtex para mezclarlo todo bien. Siguiendo el protocolo, las muestras tratadas, en oscuridad, se someten al “*Alternative Cycling Protocol*” que consiste en 20 ciclos de activación a 95°C durante 30 segundos y 50°C durante 15 minutos. Una vez terminado el protocolo, las muestras se mantienen en hielo durante 10 minutos.

La plataforma para realizar el análisis utiliza la espectrometría de masas MALDI-TOF en combinación con una escisión específica del RNA (MassCLEAVE). Por tanto, después de esta conversión del ADN, se realiza una transcripción in vitro así como un corte específico a la altura de cada citosina. Para ello es necesaria la selección de unos primers específicos para las regiones de los genes seleccionados para la amplificación, utilizando *Epidesigner* (Sequenom), para cada primer reverso se añade un promotor para la transcripción. Para realizar la PCR al ADN tratado se le añade Taq polimerasas, un tampón y los primers correspondientes. La amplificación por PCR siguió el protocolo descrito en la Tabla 3.4. A continuación se eliminan los dNTPs no incorporados. Los productos de la PCR se incuban a 37°C durante 3 horas junto con la T7 R&DNA polimerasa necesaria para la transcripción a ARN y con la ARNasa A que escindiré el ARN de manera específica (3' para cada rUTP o rCTP).

Tabla 3.4.- Condiciones para la amplificación en la plataforma Sequenom Mass ARRAY

N° ciclos	Condiciones	Etapas
x1	10 minutos a 95°C	Preactivación
x45	30 segundos a 95°C	Desnaturalización
	30 segundos a 56°C	Hibridación
	30 segundos a 72°C	Extensión
x1	4 minutos a 72°C	

El producto resultante de todos estos procesos se llevará al MALDI-TOF para analizar el espectro de cada muestra. Para cada posición CG existente se generarán dos señales, una corresponde al fragmento con la posición CG metilada y otro corresponde con el fragmento con la posición CG no metilada. Diferencias en perfil de metilación del ADN son resultado de los cambios en la secuencia de nucleótidos después del tratamiento con bisulfito, que a su vez dará lugar a fragmentos de diferentes masas en el ensayo. Comparando la intensidad de señal entre los fragmentos se puede cuantificar el porcentaje de metilación para cada una de las posiciones CG.

3.6.2- Selección de regiones a analizar

Para el presente estudio se seleccionaron regiones en los genes FTO y TCF7L2 fuertemente asociados con obesidad y DMT2 respectivamente. Las regiones a analizar se seleccionaron para que cubrieran al polimorfismo rs9939609 en el caso del gen FTO, y al polimorfismo rs7903146 para el gen TCF7L2. Dentro de cada región se seleccionaron dos amplicones (A y B) en función del número de islas CpG que presentaban que, o bien incluía el polimorfismo de interés, o bien estaba próximos a cada uno respectivamente, utilizando como genoma de referencia el GRCh.37. Las características de cada amplicón, su tamaño y la posición de los mismos se muestra en la tabla 3.5. Una vez seleccionadas las zonas a analizar, se diseñaron los cebadores específicos para cada amplicón de cada polimorfismo (Tabla 3.6).

Tabla 3.5.- Características y localización de las regiones seleccionadas para el análisis epigenético

Gen	Cr.	Polimorfismo	Amplicón	Tamaño amplicón	Bloque del amplicón	N° de islas CpGs
FTO	16	rs9939609 (53820527)	A	447 pb	53819571 - 53820018	13
			B	433 pb	53820764 - 53821197	8
TCF7L2	10	rs7903146 (114758349)	A	467 pb	114758002 - 114758469	4
			B	499 pb	114759036 - 114759535	8

Cr: cromosoma. Islas CpG: zonas de metilación. Pb: pares de bases

Tabla 3.6.- Cebadores utilizados para cada amplicón de los polimorfismos seleccionados

Gen	Amplicón	Cebador	Secuencia cebador
FTO	A	Izquierda	aggaagagagATTTTAGTATTTTGGGAGGATGAGG
		Derecha	cagtaatacgactcactataggagaaggctTCCTCCTAATCTCTCTATTATCCCCTA
	B	Izquierda	aggaagagagGTTTGTGTTTTTAGGATTTTGGGAG
		Derecha	cagtaatacgactcactataggagaaggctTCACTAAACTTTTCCCTTAAACCC
TCF7L2	A	Izquierda	aggaagagagGGTTTTGTTTTTTGTTTAGTTATTTTTTG
		Derecha	cagtaatacgactcactataggagaaggctAAAACCCCTCTAACCTTTCCCTAAT
	B	Izquierda	aggaagagagTGGTTAAGTTTTATGATTTGGTGG
		Derecha	cagtaatacgactcactataggagaaggctTATTTAAAATCTCCAAAAATCCCC

En el caso del polimorfismo del gen FTO, el amplicón A presentaba 13 islas CpG, mientras el amplicón B poseía 8 islas. La situación del gen en el cromosoma como la posición de las islas CpG en los dos amplicones seleccionados están representadas en la figura 3.7A. En el polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2, el amplicón A poseía 4 islas CpG mientras que en el amplicón B se observaban 8 islas CpG (Figura 3.7B).

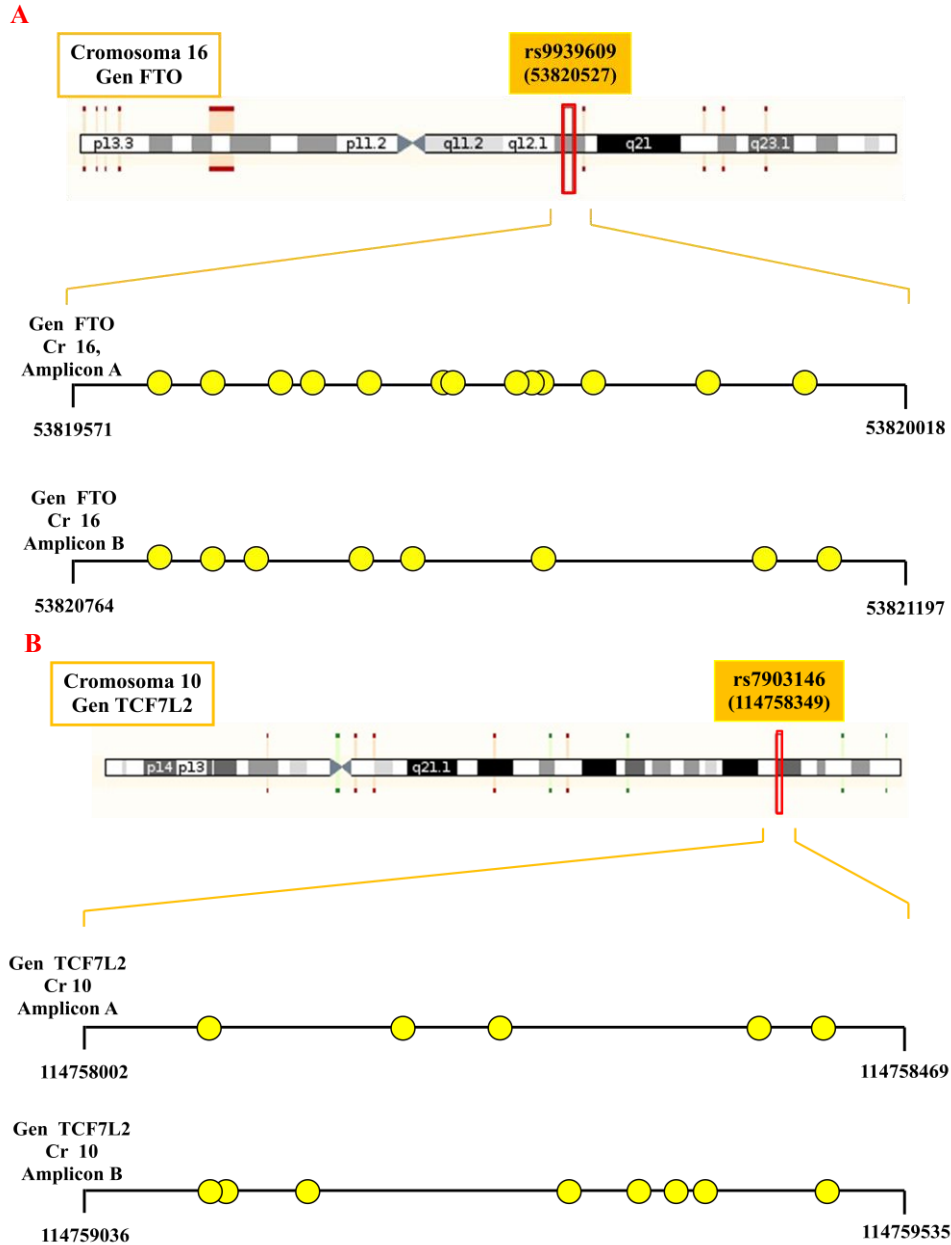


Figura 3.7.- Localización del gen FTO en el cromosoma 16 y posición de las islas CpG de los amplicones seleccionados del polimorfismo rs9939609 del mismo gen (A) y localización del gen TCF7L2 en el cromosoma 10 y posición de las islas CpG de los amplicones seleccionados del polimorfismo rs7903146 del mismo gen (B)

3.6.3- Selección de muestras

Las muestras se escogieron de manera estratificada en base a diferentes criterios, siendo el total de muestras analizadas de 195 en el estado basal. El primer criterio de selección fue el sexo, escogiendo 98 hombres y 97 mujeres. Dentro de cada sexo, los participantes se seleccionaron en función de la presencia o no de DMT2. El tercer criterio para seleccionar los participantes fue el resultado del genotipo del polimorfismo rs9939609 del gen FTO. Por último, dentro de cada genotipo se seleccionaron participantes asignados al grupo de consumo de aceite de oliva y participantes que estuvieron en el grupo control. Posteriormente, se seleccionaron 28 muestras de mujeres, dentro de las analizadas a nivel basal, para medir la metilación tras un año de intervención, estratificadas nuevamente según la DMT2, el genotipo del polimorfismo rs9939609 y el grupo de intervención (Figura 3.8).

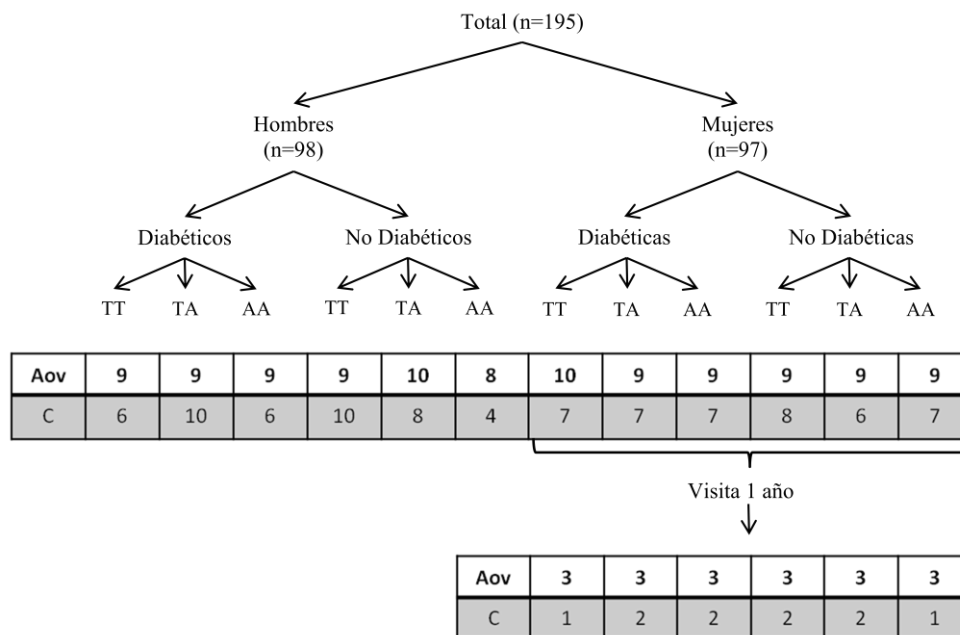


Figura 3.8.- Criterios de selección de las muestras para el análisis epigenético

3.7.- Métodos estadísticos

Los datos se informatizaron y se sometieron a control de calidad. Los análisis estadísticos se realizaron para la mayoría de los tests con el paquete estadístico SPSS, versión 22.0 para Windows (SPSS Chicago, IL), integrándolos datos recopilados a partir de los cuestionarios, así como las variables obtenidas mediante analítica y los resultados del genotipado de las muestras y los resultados del estudio epigenético. Antes de comenzar con el análisis estadístico, se efectuó una depuración de los datos, con el objetivo de corregir errores de transcripción. En primer lugar, se analizaron los estadísticos descriptivos de la población estudiada para poder caracterizarla. Además se analizaron las diferencias entre hombres y mujeres, obesos y no obesos y entre diabéticos y no diabéticos de variables categóricas y continuas. En el caso de las variables continuas o cuantitativas se calcularon la media y la desviación típica, comprobándose la normalidad de las variables mediante gráficos de distribución de frecuencias. Cuando la variable no mostró normalidad, se aplicó una transformación logarítmica, que fue el caso de los niveles plasmáticos de triglicéridos. Se empleó una prueba t-Student para comparar medias de dos grupos independientes, previa determinación de la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene, y el test ANOVA para la comparación de medias de más de dos grupos. Las variables categóricas se expresaron en porcentaje. En la comparación de porcentajes se utilizó el test Chi-Cuadrado (χ^2). Se consideró que las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas cuando el p-valor obtenido mediante estos test era menor de 0,05.

Para el estudio de factores sociodemográficos se analizó la media y la desviación típica de la edad de la población y se hizo una t-Student para comparar las diferencias en función del sexo, la obesidad y la DMT2. Se analizó mediante el test Chi-Cuadrado (χ^2), la prevalencia de la obesidad y la DMT2 en la población estudiada. Paralelamente, utilizando el mismo test, se analizaron las diferencias según el nivel de estudios, agrupando en 4 categorías (sin estudios, estudios primarios, estudios secundarios y estudios universitarios) entre hombres y mujeres, obesos y no obesos y entre diabéticos y no diabéticos.

A continuación se analizaron los factores ambientales. Para ello se crearon variables categóricas con respecto a los estilos de vida: fumador/exfumador/no fumador, sedentario/no sedentario y baja adherencia a la dieta mediterránea/alta

adherencia a la dieta mediterránea. Primero se analizaron las diferencias según el sexo, la obesidad y la DMT2 según estas variables ambientales mediante un test Chi-Cuadrado (χ^2). A continuación se analizó la media y desviación típica de variables cuantitativas de interés según las variables dicotómicas de estos factores ambientales (fumador/no fumador, sedentario/no sedentario, baja/alta adherencia a la dieta mediterránea) mediante un test t-Student para muestras independientes, tanto en la población total como estratificado por sexo, obesidad y DMT2.

En relación al análisis genético, inicialmente se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas. Los polimorfismos analizados se localizan en *locus* correspondientes a cromosomas autosómicos. Por tanto, cada individuo es portador de dos alelos, uno en cada copia del cromosoma, que heredan del padre y de la madre de manera independiente. Así pues, para un hipotético locus con los alelos A y B, las tres posibilidades de parejas de alelos son AA, AB y BB, que corresponden a los tres genotipos. Los individuos idénticos, es decir AA y BB, son los genotipos homocigotos y los que tienen los dos alelos diferentes (AB) son los heterocigotos (Iniesta R et al, 2005). En el presente trabajo, las frecuencias genotípicas se expresaron en porcentaje $((AA/n)*100, (AB/n)*100, (BB/n)*100)$ siendo n el tamaño de muestra, y las frecuencias alélicas se calcularon a partir del recuento de cada genotipo en la población utilizando las siguientes fórmulas:

$$p = \frac{2AA + AB}{2n} \qquad q = \frac{2BB + AB}{2n}$$

siendo p y q las frecuencias alélicas para los alelos A y B respectivamente y n el número total de individuos.

Antes de realizar los análisis de asociación de los genotipos de cada polimorfismo con otros parámetros de interés, se comprobó si las frecuencias genotípicas calculadas en nuestra población estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, prueba necesaria para asegurarnos que no hubiera errores en la interpretación de los resultados del genotipado. En una población panmíctica, suficientemente grande y no sometida a migración, mutación, deriva génica o selección, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. Cuando se cumplen estas condiciones se dice que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este equilibrio se alcanza tras una sola generación.

Por tanto, a partir de las frecuencias observadas de los diferentes genotipos se procedió al cálculo del equilibrio mediante la realización de un test Chi-Cuadrado (χ^2), a través del programa LINKUTYL (Rockefeller University, 2004), disponible en la página web <http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkutil.htm>. Este programa compara las frecuencias observadas frente a las esperadas mediante el cálculo del Chi-Cuadrado que termina el p-valor. Para la determinación de las frecuencias genotípicas según el sexo se realizaron tablas de contingencia y se comprobaron las diferencias mediante un test Chi-Cuadrado (χ^2).

En el caso de polimorfismos situados en el mismo gen o regiones génicas próximas, se procedió al cálculo del desequilibrio de ligamiento. Existen varias medidas de desequilibrio de ligamiento entre un par de polimorfismos (Weiss KM et al, 2002, Zondervan Kt et al, 2004). La más simple es D (coeficiente de desequilibrio) que mide la diferencia entre las frecuencias de haplotipos observadas y las esperadas a partir de las frecuencias individuales de cada alelo. Así, considerando el SNP A con variantes A1 y A2 con frecuencias f(A1) y f(A2) y el SNP B con variantes B1 y B2 con frecuencias f(B1) y f(B2):

$$D = f(A1B1) - f(A1)f(B1)$$

siendo f(A1B1) la frecuencia del haplotipo constituido por los marcadores A1 y B1.

Sin embargo, D tiene el inconveniente de que depende de las frecuencias de los distintos alelos, por lo que no es útil para comparar el desequilibrio de ligamiento entre distintas regiones. Por este motivo se han diseñado nuevas medidas entre dos polimorfismos, siendo las más usadas D' y r^2 . D' se calcula ajustando el valor de D en función del máximo o mínimo valor que puede alcanzar las frecuencias alélicas concretas: $D' = D/D_{max}$ si $D > 0$, o $D' = D/D_{min}$ si $D < 0$; su valor oscila entre -1 y 1. r^2 es el coeficiente de correlación entre los dos loci y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$r^2 = D^2 / f(A1)f(B1) f(A2)f(B2)$$

Su valor está comprendido entre 0 y 1. r^2 es una medida más restrictiva que D' (Balding DJ, 2006). Así, si el alelo de menor frecuencia de un polimorfismo está siempre asociado a uno de los dos alelos del otro polimorfismo, el valor de D' será de 1. En cambio, r^2 sólo será 1 si cada uno de los alelos de un polimorfismo está

asociado a un único alelo del otro polimorfismo. Por tanto, las frecuencias del alelo menor son idénticas en los dos polimorfismos y además se encuentran siempre en el mismo haplotipo (están en fase de acoplamiento). Además, el incremento en tamaño muestral necesario para mantener la potencia estadística si se emplea un polimorfismo marcador en lugar del polimorfismo causal es inversamente proporcional a r^2 . Así, por ejemplo, si en lugar de genotipar el polimorfismo causal, se genotipara un polimorfismo marcador que presentase un valor de $r^2 = 0,5$ con el causal se precisaría el doble de muestras para mantener la potencia estadística (Zondervan Kt et al, 2004).

Otra medida también utilizada es LOD. Es una medida de la existencia o no de ligamiento entre dos loci. Concretamente, es el logaritmo en base 10 de la probabilidad (Odds) de ligamiento entre dos loci. Cuando el valor de $\text{LOD} \geq 3$ se considera ligamiento establecido (Balding DJ, 2006).

En este trabajo se utilizó el programa Haploview versión 4.2 para calcular el desequilibrio de ligamiento. Este programa permite el cálculo D' , r^2 y LOD así como la obtención de gráficos en los que se representa la $D' \times 100$ entre dos loci distinto color que indican el grado de desequilibrio de ligamiento. De manera que, la determinación del color viene determinado por los valores de LOD y D' , así para un $\text{LOD} < 2$ el esquema aparece en blanco para un valor de $D' < 1$ y azul para $D' > 1$, pero si $\text{LOD} > 2$ el esquema aparece en distintas tonalidades de rojo según el valor de D' , siendo más rosa para $D' < 1$ e incrementando a rojo más intenso con un valor de $D' > 1$ (Barrett JC et al, 2005).

Para proceder al análisis de los genotipos de los polimorfismos, inicialmente en aquellos polimorfismos en los que la prevalencia del genotipo minoritario era inferior al 13% se agruparon los homocigotos del alelo minoritario con los heterocigotos y se compararon con los homocigotos del alelo mayoritario, para aumentar el poder estadístico. Posteriormente, para realizar los análisis de asociación de cada polimorfismo con variables cuantitativas se calculó la media y la desviación típica de estas variables en cada genotipo y se aplicó una transformación logarítmica sobre la concentración de triglicéridos ya que no cumplían la normalidad. Para establecer si las diferencias en las medias de variables cuantitativas eran estadísticamente significativas se empleó, un test t-Student para comparar las medias de dos grupos independientes (2 genotipos), y el

test ANOVA para la comparación de medias de más de 2 grupos (3 genotipos). Al realizar el test ANOVA se seleccionó un contraste polinómico que permitió obtener una estimación de la tendencia lineal de la asociación. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor era inferior a 0,05.

Para ajustar el efecto de las asociaciones entre el genotipo de los polimorfismos con variables cuantitativas por variables de confusión se emplearon modelos multivariantes (ANCOVA). Las variables dependientes se ajustaron por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y actividad física.

A continuación se analizó la asociación de estos polimorfismos con las patologías estudiadas en el presente trabajo, que fueron la obesidad y la DMT2. Para su realización, se calculó la OR (*odds ratio*), que indica la probabilidad que los participantes con el problema de salud estudiado estén expuestos al factor analizado (polimorfismo), comparada con la probabilidad de que lo estén las personas sin el problema de salud. El cálculo de la OR clásicamente se reservaba para los estudios de casos y controles, siendo la razón de prevalencia de la medida de asociación típica de los estudios transversales, siendo este último tipo de estudio realizado en este trabajo. Sin embargo, actualmente el cálculo de la OR está aceptado en los estudios de prevalencia, indicando que el valor corresponde a una OR de prevalencia.

Las diferencias en la prevalencia de las frecuencias genotípicas, en función de la obesidad y la DMT2, se determinó mediante tablas de contingencia y test Chi-Cuadrado (χ^2). Se aplicó un análisis de regresión logística simple para calcular la OR y su intervalo de confianza (IC) al 95% de la enfermedad y el polimorfismo, agrupando los portadores del alelo minoritario frente a los homocigotos para el alelo mayoritario. El valor de p se calculó con dos colas y se consideró estadísticamente significativo cuando era menor de 0,05. Para ajustar por variables de confusión se utilizó un análisis de regresión multivariante, ajustando por edad y sexo debido a que es un estudio transversal.

Los análisis de asociación de los diferentes polimorfismos con variables cuantitativas se realizaron estratificados por sexo, obesidad y DMT2 para observar la posible heterogeneidad en los resultados según estos factores así como la posible interacción de los polimorfismos con variables de interés. También se estudiaron interacciones gen*ambiente y las interacciones gen*gen que influyeran en las

asociaciones entre los polimorfismos y las variables de interés. Para las interacciones gen*ambiente se utilizaron las variables dicotómicas ambientales (fumador/no fumador, sedentario/no sedentario y alta/baja adherencia a la dieta mediterránea). Estas interacciones se calcularon mediante la estimación de la significación empleando modelos multivariantes (ANCOVA). Se consideraron estadísticamente significativas estas interacciones cuando el p-valor estimado era inferior a 0,05.

El efecto de varios polimorfismos en genes separados se analizó mediante el cálculo de las denominadas “genetic risk scores” (GRS en inglés), traducidas como puntuaciones de riesgo genético. Estas GRS se calcularon sumando el número de alelos de riesgo de cada polimorfismo incluido en el score (0, 1, 2, 3 ó 4). Esta modalidad se denomina “no ponderada”. Tras comprobar la significación de las GRS, las más relevantes se utilizaron como variables genéticas en los modelos estadísticos de asociación. Este estudio se realiza de manera piloto, ya que es necesario tener un mayor tamaño de muestra para un análisis más exhaustivo.

En el estudio metacéntrico PREDIMED en el que se incluyeron todos los participantes de los distintos nodos que disponían de datos de genotipo para el polimorfismo CLOCK (n>7000). Se analizaron todos los participantes a nivel basal y sólo los no diabéticos en el seguimiento, analizando de manera prospectiva la asociación de dicho polimorfismo con la incidencia de DMT2, se utilizaron modelos de regresión de COX. Para ello se tuvo en cuenta el tiempo de seguimiento desde que el participante fue incluido en el estudio hasta la aparición o no de caso incidente de DMT2 en el seguimiento extendido hasta el 30 de junio de 2012. Los modelos de regresión de Cox se ajustaron inicialmente por nodo, edad, sexo y grupo de intervención y posteriormente por otras variables de confusión como se detallan en resultados. Se testó el efecto del polimorfismo en la incidencia de DMT2, así como la interacción del mismo con la intervención con dieta mediterránea, tanto en el modelo de Cox como en los análisis estratificados por grupo de intervención.

Para el análisis de GWAS, se requieren grandes recursos computacionales por lo que ha sido necesario contar con la ayuda del bioinformático de nuestro grupo para llevar a cabo los análisis y el control de calidad de los mismos. Se ha utilizado el programa PLINK (Purcell S et al, 2007) (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) en su

versión más actualizada 1.9. El programa se ha utilizado en el entorno R (<https://www.r-project.org/>). Se ha realizado un análisis de asociación de genoma con datos válidos de unos 690.000 polimorfismos en 300 participantes PREDIMED PLUS-Valencia tras partir de los arrays de Illumina más de 700.000 polimorfismos y eliminar los polimorfismos en los cromosomas X, e Y, las variantes no polimórficas ($MAF < 0,01$) y las variantes que no seguían el equilibrio de Hardy-Weinberg a nivel de GWAs. Se ha utilizado el módulo `assoc` y se han considerado los efectos alélicos como aditivos. Como variables dependientes se ha preferido utilizar variables continuas porque son más informativas que las categóricas. Así se ha utilizado el IMC, el perímetro de la cintura y la glucosa en ayunas. De manera adicional, se han incluido también los resultados del fenotipo dicotómico de diabetes. Tras la obtención de los coeficientes y de los valores de P para cada asociación, se han creado los Manhattan plots en los que se representa en el eje vertical se el valor del menos logaritmo en base 10 de la P de asociación entre cada SNP y el fenotipo de interés, mientras que en el eje horizontal se representa la posición que ocupa cada SNP en el cromosoma. Cada punto de la gráfica es un SNP, de manera que sólo se visualizan como puntos los SNPs que tienen valores muy bajos de P, mientras que los demás SNPs quedan como marcas compactas en la parte inferior de la gráfica. Cuando más alto queda un SNP, más asociado se encuentra al fenotipo estudiado (su valor de la P de asociación es más pequeño). Para considerar una asociación como estadísticamente significativa, no se utiliza el valor nominal de $P < 0,05$, sino que se corrige dicho valor por el número de comparaciones realizadas para minimizar los falsos positivos. El valor comúnmente aceptado como umbral para considerar una asociación como estadísticamente significativa a nivel de GWAs es $P < 5 \times 10^{-8}$, este valor de P tiene su equivalente en el $-\log$ con un valor de 7,25. Cuando se realiza un GWAs con fines exploratorios para confirmar posteriormente los resultados en otra población, por ejemplo, se establecen valores de P a partir de los cuales las asociaciones se consideran sugerentes de asociación. Este valor es $P < 10^{-5}$, de manera que el $-\log_{10}$ de P se establece en 5.

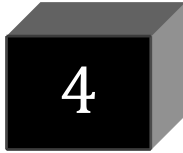
Además de los Manhattan plots indicando estos valores de P, se han identificado los SNPs y su efectos, bien, todos los que tengan $-\log_{10}$ de $P < 5$, o si no hay SNPs que cumplan este requisito, o son muy pocos, se tabulan los 25 primeros que sean más significativos.

Una vez identificados los SNPs más significativos para cada fenotipo en el estudio de GWAs del PREDIMED PLUS, se eligen los más significativos o relevantes por su novedad o funcionalidad para su extracción del genotipado masivo con el mismo array en PREDIMED-Valencia y para el estudio específico de su asociación con el fin de comprobar su posible replicación o no con el fenotipo principal.

Para el estudio epigenético se analizó el grado de metilación. Para ello se obtuvo una variable continua expresada en porcentaje. Para la comparación de porcentajes entre individuos obesos y no obesos y entre diabéticos y no diabéticos se utilizó el test t-Student de grupos independientes. Se consideró que las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas cuando el p-valor obtenido mediante estos test era menor de 0,05. Para el análisis de las asociaciones de los polimorfismos con el grado de metilación se calculó la media de metilación para cada genotipo. Para establecer si las diferencias en las medias de variables cuantitativas eran estadísticamente significativas se empleó el test ANOVA para la comparación de medias de los 3 genotipos.

Para analizar si existían cambios de metilación tras un año de intervención, se utilizó un test t-Student de muestras emparejadas entre el porcentaje de metilación al año de la intervención y a nivel basal. Además se calculó la diferencia del porcentaje de metilación tras la intervención y se aplicó un test t-Student de muestras independientes.

A continuación se analizó la relación entre los porcentajes de metilación y variables antropométricas y bioquímicas. Para ello se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para conocer la normalidad de los resultados. Una vez comprobada su distribución normal, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo cuando el p-valor obtenido de la prueba era menor de 0,05. Para conocer las interacciones entre la metilación y la adherencia a la dieta mediterránea, se calculó la diferencia entre el porcentaje de metilación de la visita de un año y el porcentaje de metilación de la visita basal. Para la interacción con la dieta se utilizó la variable dicotómica (alta adherencia a la dieta mediterránea/baja adherencia a la dieta mediterránea). Estas interacciones se calcularon mediante la estimación de la significación empleando modelos multivariantes (ANCOVA). Se consideraron estadísticamente significativas estas interacciones cuando el p-valor estimado era inferior a 0,05.



RESULTADOS

4. 1.-Generalidades

En este apartado se presentan los resultados de esta tesis fruto de un trabajo multidisciplinar que conlleva una labor en equipo para la obtención de conclusiones generales. En estos años de investigación se ha ido recopilando la información necesaria para poder realizar las actividades encaminadas para esta tesis. La doctoranda ha tenido la oportunidad de poder implicarse en todos y cada uno los trabajos que envuelven el protocolo de investigación en genómica cardiovascular. De esta manera, la doctoranda ha realizado diversas técnicas de laboratorio entre las que están incluidas; la extracción de ADN por varias técnicas hasta el análisis de polimorfismos con distintas tecnologías, la realización de estudios epigenéticos por diferentes métodos, para llevar a cabo la realización de bases de datos genómicas, con el objetivo del tratamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos. Además, también ha podido participar en la presentación de los resultados y redacción de manuscritos o comunicaciones a congresos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos del estudio transversal de la población del estudio PREDIMED del nodo de Valencia. Al inicio se reflejan las características generales de la muestra estudiada, las medidas antropométricas y bioquímicas estudiadas. También, se presentan las características bioquímicas de la muestra según la obesidad y DMT2, así como la influencia de características sociodemográficas y ambientales en el desarrollo de dichas patologías. Posteriormente se muestran los resultados de los genes estudiados, su prevalencia, la asociación con fenotipos relacionados y el análisis de interacciones gen*ambiente y gen*gen. A continuación se muestran los genotipos estudiados por la técnica de GWAs. Por último se presentan los resultados obtenidos en los estudios de epigenética.

4. 2.- Estudio PREDIMED

4.2.1.- Características generales de la población

En el estudio se incluyeron 1050 participantes reclutados en el nodo de Valencia dentro del estudio PREDIMED, siendo 390 de los participantes hombres (37,1%) y 660 restantes mujeres (62,9%). Todos ellos presentaban un elevado riesgo cardiovascular pero no habían sufrido ningún evento de este tipo previo al inicio del estudio. En la Tabla 4.1 se resumen las características antropométricas y bioquímicas recogidas en la visita inicial de los participantes, analizadas de manera global y en función del sexo.

Tabla 4.1.- Características antropométricas y bioquímicas de la población estudiada y comparación por sexos

	Población total (n=1050)	Hombres (n=390)	Mujeres (n=660)	
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	p ¹
Edad (años)	67 ± 6	66 ± 6	67 ± 5	0,016
Peso (kg)	76,3 ± 12,0	81,1 ± 11,8	73,5 ± 11,3	< 0,001
IMC (kg/m ²)	30,3 ± 4,4	29,4 ± 3,8	30,8 ± 4,6	< 0,001
Cintura (cm)	102,7 ± 11,9	104,6 ± 11,5	101,5 ± 12,0	< 0,001
CT (mg/dl)	205,9 ± 38,6	198,2 ± 37,1	210,4 ± 38,9	< 0,001
c-LDL (mg/dl)	127,9 ± 35,2	124,3 ± 35,0	130,1 ± 35,2	0,012
c-HDL (mg/dl)	52,7 ± 13,0	48,0 ± 10,9	55,4 ± 13,4	< 0,001
TG (mg/dl)	127,0 ± 65,0	134,0 ± 70,6	123,0 ± 61,2	0,009
Glucosa (mg/dl)	119,0 ± 38,5	125,8 ± 40,4	115,1 ± 10,0	< 0,001
PAS (mmHg)	146,31 ± 20,1	147,3 ± 19,7	145,7 ± 20,3	0,235
PAD (mmHg)	81,3 ± 10,5	82,0 ± 11,0	80,9 ± 10,3	0,101

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre sexos mediante una prueba t-Student.

En esta población, los hombres presentaban menor IMC ($29,4 \text{ kg/m}^2$) frente a las mujeres ($30,81 \text{ kg/m}^2$), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Sin embargo, las mujeres presentaban menor peso y perímetro de cintura que los hombres, siendo ambas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Respecto a los parámetros bioquímicos, las mujeres presentan mayor concentración de CT ($p < 0,001$) y de c-LDL ($p = 0,012$), así como de c-HDL ($p < 0,001$) y menor concentración de TG ($p = 0,009$). Las diferencias en los valores de la presión arterial no fueron estadísticamente significativas, siendo la media de la población $146,31 \text{ mmHg}$ de PAS y 81 mmHg de PAD.

Además, se determinaron las prevalencias de las características clínicas de los participantes del estudio (Tabla 4.2). Esta población de alto riesgo cardiovascular, presentó una alta prevalencia de hipertensión ($81,5\%$) e hipercolesterolemia ($74,6\%$), una prevalencia media de diabetes ($44,6\%$) y de obesidad ($49,8\%$). Analizando estas características por sexo, las mujeres presentaban mayor prevalencia de hipertensión e hipercolesterolemia, siendo esta diferencia significativa en ambos casos ($p < 0,001$ para hipertensión y $p = 0,023$ para hipercolesterolemia).

Respecto a la obesidad, su prevalencia en la población se estimó en un $49,8\%$, presentando las mujeres mayor porcentaje de obesidad que los hombres ($p < 0,001$). Basándonos en los criterios de clasificación de la OMS según el valor del IMC, la prevalencia de individuos con normopeso en el estudio fue del $9,2\%$, de individuos con sobrepeso fue 41% y el $49,8\%$ restante correspondía a individuos con obesidad. Si analizamos el perímetro de cintura según los puntos de corte establecidos por la Federación Internacional de diabetes para población europea para definir la obesidad abdominal, el $82,8\%$ de los hombres presentaban una cintura superior a 94 cm mientras que el $96,2\%$ de las mujeres tenían un perímetro de cintura superior a 80 cm .

Con respecto a la DMT2, su prevalencia se situó en un 44,6% de los participantes, siendo mayor su presencia en hombres que en mujeres ($p < 0,001$).

Tabla 4.2.- Características clínicas de la población estudiada y comparación por sexos

	Población total (n=1050)	Hombres (n=390)	Mujeres (n=660)	p¹
	%	%	%	
Diabéticos	44,6	52,3	40,1	< 0,001
Obesos	49,8	42,1	54,3	< 0,001
Hipertensos	81,5	75,4	85,0	< 0,001
Hipercolesterolémicos	74,6	70,6	76,9	0,023
Antecedentes de CI	21,7	15,4	25,3	0,001
Medicación:				
Hipolipemiante	49,6	49,2	49,8	0,972
Antihipertensivo	65,0	58,4	68,7	0,005
Insulina	7,4	6,7	7,8	0,556
Antidiabéticos orales	32,1	38,8	28,3	0,001

CI: cardiopatía isquémica; ¹: p valor obtenido al analizar la diferencia de porcentajes entre hombres y mujeres mediante un test Chi-Cuadrado.

Dada la estrecha relación entre la obesidad y la DMT2, se analizó la prevalencia de ambas patologías conjuntamente. Dentro de la población, el 28,8% de participantes no presentaba ninguna de ellas. Del 71,2% restante, el 26,5% de individuos presentaban obesidad, el 21,9% eran diabéticos y el 22,7% tenían ambas enfermedades. Analizándolo por sexos, las mujeres presentaban mayor número de casos en obesidad y obesidad/DMT2 mientras que era menor el número de mujeres con DMT2, siendo las diferencias estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0,001$).

4.2.2.- Características generales de la población en relación a la obesidad y la DMT2

Los valores medios de las características antropométricas y bioquímicas de los participantes en relación a la obesidad y la DMT2 se resumen en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Características antropométricas y bioquímicas de la población estudiada en relación a la obesidad y a la DMT2

	Obesos (n=523)	No obesos (n=527)	p¹	Diabéticos (n=465)	No diabéticos (n=577)	p²
	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	0,862	68 ± 6	66 ± 6	< 0,001
Peso (kg)	83,7 ± 10,3	69,0 ± 8,8	< 0,001	77,1 ± 12,1	75,6 ± 11,9	0,041
IMC (kg/m ²)	33,6 ± 3,1	26,9 ± 2,2	< 0,001	30,5 ± 4,5	30,1 ± 4,3	0,176
Cintura (cm)	108,9 ± 10,1	96,3 ± 10,1	< 0,001	104,2 ± 10,9	101,4 ± 12,6	< 0,001
CT (mg/dl)	207,4 ± 39,2	204,4 ± 38,1	0,215	200,7 ± 37,9	210,2 ± 38,8	< 0,001
c-LDL (mg/dl)	128,5 ± 35,3	127,3 ± 35,1	0,587	124,6 ± 34,4	130,8 ± 35,5	0,005
c-HDL (mg/dl)	51,4 ± 11,6	54,0 ± 14,2	0,001	50,1 ± 11,8	54,8 ± 13,5	< 0,001
TG (mg/dl)	134,8 ± 67,1	119,3 ± 61,9	< 0,001	133,9 ± 69,2	121,3 ± 60,6	0,002
Glucosa(mg/dl)	120,9 ± 35,5	117,1 ± 41,2	0,110	144,1 ± 41,3	98,6 ± 19,5	< 0,001
PAS (mmHg)	148,2 ± 19,9	144,5 ± 20,1	0,003	147,0 ± 19,7	145,7 ± 20,4	0,306
PAD (mmHg)	83,2 ± 10,8	79,5 ± 10,0	< 0,001	80,9 ± 10,4	81,7 ± 10,7	0,211

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre obesos y no obesos mediante una prueba t-Student; ²: p valor de comparación de medias entre diabéticos y no diabéticos mediante una prueba t-Student.

Con relación a la obesidad, los individuos obesos presentan mayor perímetro de cintura así como mayor nivel medio de triglicéridos, un menor nivel de c-HDL y una mayor presión arterial tanto sistólica como diastólica frente a los individuos no obesos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en todos estos casos. Al segmentar por sexos, las mujeres también presentaban diferencias

estadísticamente significativas en el nivel medio de glucosa, además de las anteriormente mencionadas. En el caso de los hombres, sólo se mantenían significativas las diferencias de cintura y presión arterial.

Analizando los casos de DMT2, los individuos diabéticos presentaban mayor edad, mayor peso y un perímetro de cintura más elevado. Respecto a las variables bioquímicas, las personas diabéticas tenían mayores niveles de triglicéridos y menor nivel de c-HDL. Todas las estas diferencias eran estadísticamente significativas. Al realizar la segmentación por sexo las mujeres, además de las características antes mencionadas, presentaban un diferencia significativa en el valor medio del IMC, siendo mayor en mujeres diabéticas que en mujeres no diabéticas. Con respecto a los hombres, las diferencias en los valores bioquímicos no llegaron a ser significativos.

4.2.3.- Estudio de las características relacionadas con el desarrollo de la obesidad y la DMT2

En este apartado se mostrarán las características sociodemográficas y ambientales en la población estudiada y en relación a las dos patologías. Dentro de las características sociodemográficas, se muestran factores como la edad, el sexo y el nivel cultural. Entre los factores ambientales, se analizan el consumo de tabaco, la conducta sedentaria y la adherencia a la Dieta Mediterránea.

4.2.3.1.- Estudio de factores sociodemográficos y su asociación con obesidad y DMT2

4.2.3.1.1.- Edad y sexo

La media de edad de la población de estudio fue de 67 ± 6 años. En el caso de la obesidad, no hubo diferencias significativas de la media de edad entre obesos y no obesos ($67,1 \pm 6,0$ vs $67,0 \pm 6,4$ años respectivamente, $p=0,862$). Entre la población obesa, los hombres presentaban una media de edad de $66,6 \pm 6$ años y las mujeres de 67 ± 5 años ($p=0,216$). Dentro de los no obesos, la media de edad de los hombres fue de $66,6 \pm 6$ años y las mujeres de 67 ± 6 años ($p=0,038$).

La media de edad en los diabéticos de la población total fue mayor que la de los no diabéticos (68 ± 6 vs 66 ± 6 años respectivamente, $p < 0,001$). Analizándolo por sexos, los hombres diabéticos presentaron una media de edad de 67 ± 6 años frente a los 68 ± 5 años de las mujeres diabéticas ($p = 0,081$). Dentro de la población no diabética, la media de edad de los hombre fue ligeramente menor (65 ± 6 años) que la de las mujeres (66 ± 6 años), llegando a ser una diferencia significativa ($p = 0,034$).

De los 1050 participantes, el 42,3% de los hombres presentaban obesidad frente al 54,2% de las mujeres. Esta mayor prevalencia de la obesidad en mujeres fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Por tanto, el 49,8% de los participantes eran obesos. En el caso de la diabetes, el 52,3% de hombres eran diabéticos frente al 40,1% de las mujeres ($p < 0,001$), representado el 44,6% de la población estudiada. Estas diferencias de prevalencia se ven representadas en la figura 4.1.

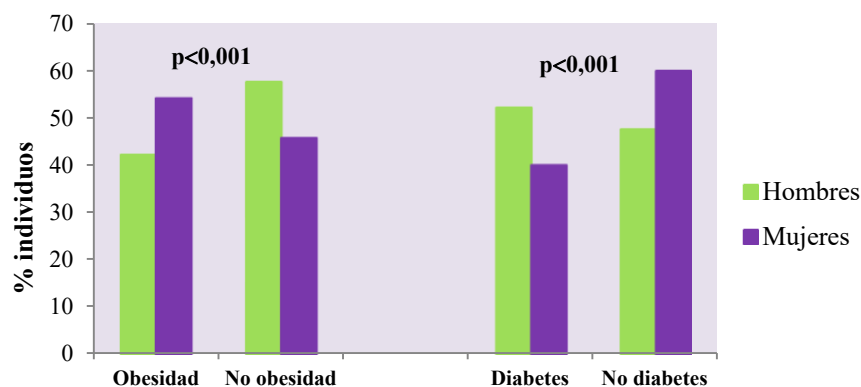


Figura 4.1.- Prevalencia de la obesidad y la DMT2 en función del sexo

4.2.3.1.2.- Nivel de estudios

En la tabla 4.4 se muestra la prevalencia de participantes según el nivel estudio, tanto en la población total como en función del sexo. En la población total, el 76,4% sólo realizaron estudios primarios y el 4,6% no poseían estudios. Según el sexo, se encontraron diferencias significativas debido a que el 9,5% de los hombres poseían estudios universitarios frente al 6,2% de mujeres. Además, sólo el 9,9% de mujeres poseían estudios secundarios frente al 14,5% de los hombres.

Tabla 4.4.- Porcentaje de individuos según el nivel de estudios en la población estudiada y en función del sexo

	Total (n=1050)	Hombres (n=390)	Mujeres (n=660)	p¹
	%	%	%	
Sin Estudios	4,6	1,4	6,4	<0,001
Estudios Primarios	76,4	74,6	77,5	
Estudios Secundarios	11,6	14,5	9,9	
Estudios Universitarios	7,4	9,5	6,2	

¹: p-valor obtenido mediante el test de Chi-cuadrado al comparar el porcentaje entre sexos.

Analizando la población en relación con la obesidad, el 71,3% de los individuos no obesos poseían estudios primarios frente al 81,7% de los individuos obesos. Además, el 10,3% de los individuos no obesos tenían estudios universitarios mientras que sólo el 4,6% de los individuos obesos los habían realizado. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Dentro de los casos de DMT2, nuevamente el 81% de los diabéticos poseían estudios primarios frente a un 72,8% de individuos no diabéticos. En cambio, en los individuos con estudios universitarios había mayor porcentaje de no diabéticos que de diabéticos (9,1% vs 5,2% respectivamente) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5.- Porcentaje de individuos según el nivel de estudios en función de la obesidad y la DMT2

	Obesos (n=523)	No obesos (n=527)	p¹	Diabéticos (n=465)	No diabéticos (n=577)	p¹
	%	%		%	%	
Sin Estudios	5	4,1	<0,001	6,1	3,4	<0,001
Estudios Primarios	81,7	71,3		81	72,8	
Estudios Secundarios	8,8	14,4		7,7	14,7	
Estudios Universitarios	4,6	10,3		5,2	9,1	

¹: p-valor obtenido mediante el test de Chi-cuadrado al comparar el porcentaje entre individuos obesos y no obesos y diabéticos y no diabéticos.

4.2.3.2.- Estudio de factores ambientales y su asociación con obesidad y DMT2

4.2.3.2.1.- Consumo de tabaco

Del total de la población estudiada, el 12,5 % eran fumadores mientras que el 22,3% del total eran exfumadores. Los hombres presentaban mayor porcentaje tanto de fumadores como de exfumadores respecto a las mujeres, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 4.6). Observando el consumo de tabaco en relación a la obesidad, el 14,2% de individuos no obesos eran fumadores frente al 10,8% de fumadores obesos, siendo también diferencias significativas ($p = 0,003$). Con respecto a la DMT2, no se observaron diferencias significativas entre diabéticos y no diabéticos ($p = 0,727$). Todos los datos de prevalencia de los participantes según el hábito tabáquico en relación a la obesidad y la DMT2 están indicados en la tabla 4.7.

Dentro del grupo de fumadores, la media del consumo de cigarrillos era de $15,1 \pm 9,8$ cigarrillos/día, con un mínimo de 1 y un máximo de 40 cigarrillos al día. No hubo diferencias significativas analizándolo por sexo ($15,6 \pm 10,0$ cig/día en hombres, $13,93 \pm 9,3$ cig/día; $p = 0,437$), por obesidad ($15,7 \pm 9,3$ cig/día en obesos y $14,77 \pm 10,1$ cig/día en no obesos; $p = 0,676$) ni por diabetes ($15,48 \pm 11,3$ cig/día diabéticos y $14,9 \pm 8,9$ cig/día en no diabéticos; $p = 0,784$).

Tabla 4.6.- Valores de porcentajes de individuos según su consumo de tabaco en la población estudiada y en función del sexo

	Total (n=1050)	Hombres (n=390)	Mujeres (n=660)	p ¹
	%	%	%	
Fumador	12,5	26,3	4,4	<0,001
Exfumador	22,3	46,6	8,1	
No fumador	65,2	27,1	87,5	

¹: p-valor obtenido aplicando un test Chi-cuadrado para comparar los porcentajes entre hombres y mujeres

Tabla 4.7.- Valores de porcentajes de individuos según su consumo de tabaco en la población estudiada en función de la obesidad y la DMT2

	Obesos (n=523)	No obesos (n=527)	P ¹	Diabéticos (n=465)	No diabéticos (n=577)	P ¹
	%	%		%	%	
Fumador	10,8	14,2	0,003	11,7	13,2	0,727
Exfumador	19,1	25,5		23,2	21,6	
No fumador	70,0	60,3		65,2	65,2	

¹: p-valor obtenido aplicando un test Chi-cuadrado para comparar los porcentajes entre obesos y no obesos y diabéticos y no diabéticos

También se analizaron las diferencias entre fumadores y no fumadores con respecto a variables antropométricas y bioquímicas (Tabla 4.8). Se observó que los fumadores tenían menor IMC, mayores niveles de triglicéridos y mayor PAD. En cambio presentaban menores niveles de c-HDL, de edad y de valor de IMC. Todas estas diferencias eran estadísticamente significativas.

Tabla 4.8.- Diferencias en las características antropométricas y bioquímicas entre fumadores y no fumadores en la población estudiada

	Fumadores (n=135)	No Fumadores (n=915)	P ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	64 ± 6	68 ± 6	< 0,001
Peso (kg)	79,7 ± 13,1	75,8 ± 11,8	0,001
IMC (kg/m ²)	29,4 ± 4,2	30,4 ± 4,4	0,010
Cintura (cm)	102,9 ± 12,2	102,7 ± 12,0	0,855
CT (mg/dl)	209,0 ± 44,8	205,5 ± 37,7	0,336
c-LDL (mg/dl)	129,5 ± 38,3	127,8 ± 34,6	0,623
c-HDL (mg/dl)	48,6 ± 13,9	53,3 ± 12,8	< 0,001
TG (mg/dl)	140,7 ± 73,0	124,8 ± 63,4	0,010
Glucosa (mg/dl)	119,9 ± 38,3	118,9 ± 38,6	0,775
PAS (mmHg)	147,6 ± 20,2	146,2 ± 20,1	0,453
PAD (mmHg)	83,5 ± 10,2	81,1 ± 10,6	0,017

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre fumadores y no fumadores mediante una prueba t-Student.

4.2.3.2.2.- Actividad física

Dentro de la población estudiada, el 27,2% presentaba un estilo de vida sedentario. Según el sexo, había mayor porcentaje de mujeres sedentarias que hombres (21,4% vs 30,6% respectivamente, $p=0,002$). Debido a que se trata de una población de edad avanzada y alto riesgo cardiovascular, la actividad física más realizada fue andar, con una media de práctica de $3,9\pm 2,8$ días a la semana y una duración media de $42\pm 37,8$ minutos al día, sin encontrar diferencias entre sexos.

En relación a la obesidad, se encontró un porcentaje mayor de población sedentaria dentro de los individuos obesos (31%) frente a los no obesos (23,5%), siendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,007$). Se detectó más riesgo de obesidad en la población sedentaria (OR=1,47 IC95% (1,11-1,94)), manteniéndose la significación estadística al ajustar por sexo y por edad (OR=1,39 IC95% (1,05-1,85) $p=0,020$). Con respecto a la DMT2, también se encontró mayor porcentaje de sedentarismo en individuos diabéticos frente a los no diabéticos (31% vs 24,1%) detectándose más riesgo de DMT2 en individuos sedentarios (OR:1,42 IC95% (1,07-1,87) $p=0,015$), manteniéndose la significación estadística al ajustar por sexo y por edad (OR=1,54 IC95% (1,15-2,04) $p<0,001$).

Además, se realizó el análisis de la relación entre sedentario y no sedentario con características antropométricas y bioquímicas de la población, resultados mostrados en la tabla 4.9. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso, IMC, perímetro de cintura, c-HDL, TG y glucosa. Lo individuos sedentarios presentan niveles medios mayores de todos estos parámetros excepto de c-HDL, cuyo valor medio es menor que en participantes no sedentarios. Analizando estos parámetros por sexo, se vio que el estilo de vida sedentario influye de la misma manera en hombres y mujeres.

Tabla 4.9.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre sedentarios y no sedentarios dentro de la población estudiada

	Sedentarios (n=294)	No Sedentarios (n=756)	P ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	0,748
Peso (kg)	77,5±13,0	75,7±11,5	0,033
IMC (kg/m ²)	31,1±4,7	29,9±4,1	<0,001
Cintura (cm)	105,2±12,2	101,6±11,8	<0,001
CT (mg/dl)	208,9±39,3	205,1±38,8	0,167
c-LDL (mg/dl)	129,1±36,0	127,8±35,3	0,609
c-HDL (mg/dl)	51,2±12,8	53,3±13,1	0,029
TG (mg/dl)	135,4±70,5	123,4±63,2	0,011
Glucosa (mg/dl)	126,3±43,0	115,7±36,1	<0,001
PAS (mmHg)	148,5±20,6	145,9±20,0	0,072
PAD (mmHg)	82,0±10,5	81,4±10,5	0,445

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre sedentarios y no sedentarios mediante una prueba t-Student.

Posteriormente se analizó si existía influencia del estilo de vida en relación a la obesidad (Tabla 4.10). Dentro de los individuos obesos, se observó que el grupo sedentario presentaban mayor perímetro de cintura, mayor peso, mayor IMC frente a los individuos no sedentarios, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Dentro de los participantes no obesos, también se encontraron diferencias significativas en el perímetro de la cintura y los niveles de glucosa, siendo mayores en los individuos sedentarios en ambos casos.

Tabla 4.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre sedentarios y no sedentarios dentro de la población estudiada comparando entre individuos obesos y no obesos

	Obesos (n=523)		P ¹	No obesos (n=527)		P ¹
	Sedentario (n=192)	No sedentario (n=361)		Sedentario (n=124)	No sedentario (n=403)	
	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	66±6	67±6	0,100	67±7	67±6	0,245
Peso (kg)	85,1±10,5	82,9±10,0	0,030	67,8±8,6	69,4±8,8	0,082
IMC (kg/m ²)	34,4±3,4	33,4±2,8	0,001	27,0±2,1	26,8±2,2	0,370
Cintura (cm)	110,6±10,5	108,2±10,0	0,018	98,1±10,7	95,7±9,9	0,027
CT (mg/dl)	207,7±39,5	207,5±39,8	0,956	210,6±39,1	202,9±37,9	0,061
c-LDL (mg/dl)	126,5±34,0	129,8±36,5	0,350	132,4±38,2	126,1±34,2	0,089
c-HDL (mg/dl)	49,7±11,6	51,7±11,4	0,087	53,1±14,0	54,6±14,2	0,309
TG (mg/dl)	143,6±70,3	131,2±66,5	0,064	125,0±69,7	116,7±59,4	0,203
Glucosa (mg/dl)	123,8±36,3	118,7±34,3	0,134	129,5±50,4	113,2±37,6	0,001
PAS (mmHg)	150,3±20,4	148,3±19,5	0,287	146,3±20,8	144,0±20,1	0,274
PAD (mmHg)	84,3±10,8	83,3±10,4	0,311	79,1±9,4	79,8±10,3	0,474

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre sedentarios y no sedentarios mediante una prueba t-Student.

Dentro de los casos de DMT2, se encontraron diferencias también en el IMC, la cintura y los niveles de glucosa (tabla 4.11). Los individuos diabéticos y sedentarios presentaban, de forma significativa, mayor IMC y mayor perímetro de cintura. También se encontró diferencias importantes en los niveles de glucosa donde los individuos diabéticos sedentarios presentaban niveles mayores que los diabéticos no sedentarios, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Dentro de los participantes no diabéticos, se encuentran las mismas tendencias que en la población general, donde los individuos sedentarios presentan mayor IMC, mayor perímetro de cintura y mayor peso, con una significación estadística.

Tabla 4.11.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre sedentarios y no sedentarios dentro de la población estudiada comparando entre individuos diabéticos y no diabéticos

	Diabéticos (n=465)		p¹	No diabéticos (n=577)		p¹
	Sedentario (n=144)	No sedentario (n=321)		Sedentario (n=139)	No sedentario (n=438)	
	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	68±6	0,314	66±6	66±6	0,949
Peso (kg)	77,6±12,9	76,7±11,6	0,460	77,5±13,1	74,9±11,4	0,044
IMC (kg/m ²)	31,2±4,7	30,1±4,3	0,019	31,2±4,7	29,7±4,0	0,001
Cintura (cm)	106,8±10,8	102,9±10,9	0,001	103,6±13,4	100,6±12,3	0,017
CT (mg/dl)	205,3±38,4	198,8±38,3	0,101	212,6±40,1	209,9±38,6	0,506
c-LDL (mg/dl)	126,8±33,7	123,9±35,3	0,431	131,3±38,2	131,1±34,8	0,955
c-HDL (mg/dl)	49,0±12,4	50,5±11,5	0,227	53,5±12,9	55,2±13,7	0,203
TG (mg/dl)	143,4±72,4	129,5±68,0	0,051	127,6±67,6	118,5±58,7	0,143
Glucosa (mg/dl)	151,6±45,6	139,7±38,7	0,009	99,6±15,0	97,9±20,7	0,405
PAS (mmHg)	148,2±20,8	147,1±19,2	0,599	148,9±20,6	145,1±20,3	0,058
PAD (mmHg)	81,6±10,3	80,9±10,3	0,509	82,3±10,8	81,8±10,6	0,604

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre sedentarios y no sedentarios mediante una prueba t-Student.

Debido a la influencia del estilo de vida en el desarrollo de la obesidad y la DMT2, se estudió el riesgo de estas dos patologías en función de la actividad física realizada por los participantes. En el caso de la obesidad, los individuos sedentarios presentaron mayor riesgo de obesidad que los no sedentarios siendo estos resultados estadísticamente significativos al ajustar por edad y sexo (OR: 1,39 IC95% (1,05-1,85) p=0,020). La misma tendencia se observó en función de la DMT2, ya que los individuos sedentarios también presentaban mayor riesgo de desarrollar esta patología que los no sedentarios, siendo también significativos tras ajustar por edad y sexo (OR: 1,54 IC95% (1,16-2,05) p=0,003).

4.2.3.2.3.- Dieta

Para valorar la posible relación de la obesidad y la DMT2 con el patrón alimentario característico de la DM se valoró la adherencia que tenía la población estudiada a esta dieta mediante un cuestionario de 14 puntos. Se comprobó que esta muestra presentaba adherencia a la DM ya que aproximadamente la mitad de los individuos obtenían una puntuación de 7 (15,1%), 8 (18,8%) y 9 (17,9%) puntos, siendo 3 la puntuación más baja obtenida y 14 la más alta. Al comparar los valores de la puntuación de hombres y mujeres, no se detectó diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,155$). En cambio, al analizar estos resultados en función de la obesidad, se observó que el mayor porcentaje de individuos obesos obtuvo 8 puntos (20,6%) mientras que en la población no obesa fue de 9 puntos (19,4%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,001$). Si realizamos el mismo análisis en relación a la DMT2 se obtuvieron los mismos resultados entre los diabéticos (8 puntos el 21,4%) y no diabéticos (9 puntos el 17,5).

Posteriormente se realizó un corte en la escala de los 14 puntos para determinar dos grupos con igual porcentaje de individuos en función de su adherencia a la DM. Así se asignó baja adherencia a la DM a todos los individuos que obtuvieron entre 3 y 8 puntos en el cuestionario (50,1%). El otro grupo se denominó de alta adherencia y comprendía los individuos con puntuaciones entre 9 y 14 puntos (49,9%).

Se estudió la posible relación entre la adherencia a la DM y la obesidad. Se observó que los individuos no obesos presentaban un mayor porcentaje de alta adherencia (56,8%) frente a los obesos (43%) ($p<0,001$). Se observa relación entre alta adherencia a la DM y una reducción del riesgo de obesidad (OR=0,57 IC95% (0,44-0,73)), significación estadística que se mantiene al ajustar por sexo y edad (OR=0,56 IC95% (0,44-0,72) $p<0,001$). Al segmentar por sexo, la significación estadística se mantiene en mujeres (OR=0,50 IC95% (0,37-0,69) $p<0,001$), incluso al ajustar por edad (OR=0,49 IC95% (0,36-0,68) $p<0,001$) (Figura 4.2)

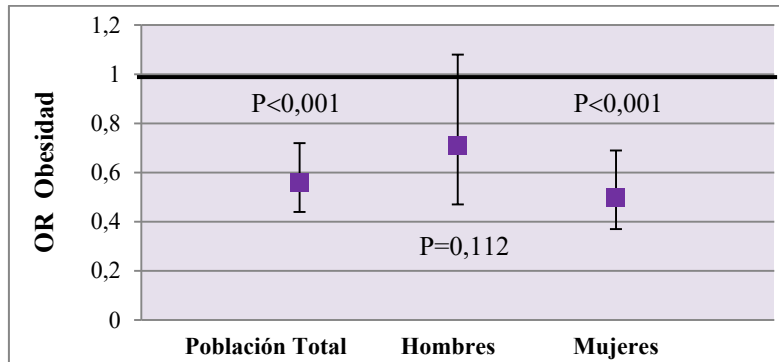


Figura 4.2.- Representación del riesgo de obesidad (OR) asociado a la adherencia a la DM en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad

En el caso de la DMT2, también se observa que individuos no diabéticos presentan mayor porcentaje de adherencia a la DM que los diabéticos (53,3% y 45,6%, respectivamente, $p=0,009$). Se observa que una alta adherencia está relacionada con un descenso en el riesgo de DMT2 ($OR=0,73$ IC95% (0,57-0,94) $p=0,016$), manteniéndose significativa al ajustar por sexo y edad ($OR=0,73$ IC95% (0,57-0,94) $p=0,015$). Al estratificar por sexo, la significación se mantiene en mujeres ($OR=0,66$ IC95% (0,48-0,90) $p=0,010$), incluso al ajustarlo por edad ($OR=0,67$ IC95% (0,48-0,92) $p=0,015$) (Figura 4.3)

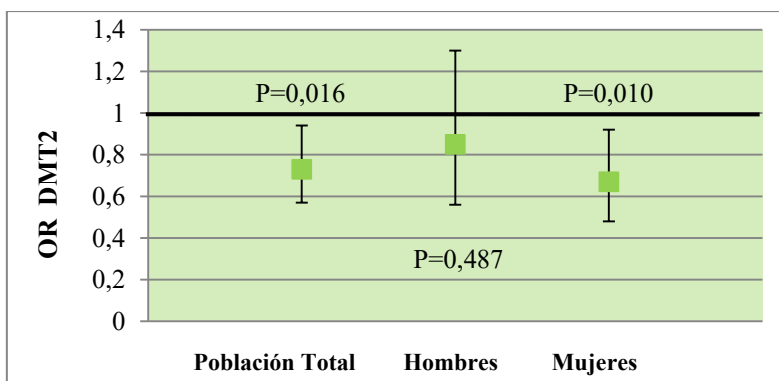


Figura 4.3.- Representación del riesgo de DMT2 (OR) asociado a la adherencia a la DM en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad

A continuación, se analizó la relación entre la adherencia a la DM y las características antropométricas y bioquímicas de la población estudiada, resultados mostrados en la tabla 4.12. Se observó que los individuos que presentaban alta adherencia al patrón de DM tenían menor IMC ($p < 0,001$), menor perímetro de cintura ($p = 0,001$) y un mayor nivel de c-HDL ($p = 0,008$). Al estratificar por sexo se observaron las mismas tendencias que en la población total. A continuación se realizaron los mismos análisis en función de la obesidad y la DMT2.

Con respecto a la obesidad, se encontraron diferencias significativas en los niveles de c-HDL dentro del grupo de no obesos donde los individuos con alta adherencia a la dieta presentaban mayores niveles ($p = 0,049$). Dentro del grupo de obesos se vieron las mismas tendencias que en la población total sin llegar a ser diferencias significativas.

En el análisis en base a la DMT2, se observó que los individuos con alta adherencia, tanto en el grupo de diabéticos como en el grupo de individuos no diabéticos, presentaban menor cintura ($p = 0,019$ diabéticos, $p = 0,028$ no diabéticos) y menor IMC ($p = 0,017$ diabéticos $p = 0,001$ no diabéticos) que los individuos con una baja adherencia, siendo diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.12.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre individuos con alta o baja adherencia a la DM dentro de la población estudiada

	Alta Adherencia DM (n=524)	Baja Adherencia DM (n=526)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±7	67±6	0,610
Peso (kg)	75,5±12,2	76,9±11,9	0,053
IMC (kg/m ²)	29,7±4,4	30,8±4,3	<0,001
Cintura (cm)	101,4±11,8	103,9±11,9	0,001
CT (mg/dl)	205,6±38,0	206,2±39,2	0,810
c-LDL (mg/dl)	127,4±34,7	128,6±35,3	0,576
c-HDL (mg/dl)	53,7±13,2	51,6±12,6	0,008
TG (mg/dl)	124,2±65,2	128,9±65,3	0,257
Glucosa (mg/dl)	117,3±37,0	120,9±40,2	0,137
PAS (mmHg)	145,7±20,5	146,9±19,6	0,358
PAD (mmHg)	81,9±10,5	80,8±10,6	0,082

DM: Dieta Mediterránea; IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre alta y baja adherencia a la DM mediante una prueba t-Student.

Posteriormente se analizó el cuestionario de Adherencia a la DM para conocer las diferencias del patrón de alimentación entre hombres y mujeres y en función de la obesidad y la DMT2. Se observaron diferencias al segmentar por sexo, donde se observó que los hombres consumían más carnes rojas, más vino, más legumbres, más FS y menos carnes blancas que las mujeres (Tabla 4.13). Respecto a la obesidad, los individuos obesos consumían menos verduras, más carne roja, menos vino, menos legumbres, menos pescado, más repostería comercial, menos FS y cocinaban menos sofritos. Al segmentar por DMt2 también encontramos diferencias significativas en el consumo de alimentos típicos de la DM. Los participantes diabéticos consumían menos fruta, más mantequillas, margarinas o natas, menos vino, menos legumbres, menos pescado y más repostería comercial (Tabla 4.14).

Tabla 4.13.- Diferencias en el cuestionario de 14 puntos de adherencia a la DM en población total y en función del sexo

Cuestionario Adherencia Dieta Mediterránea	Población total (n=1050)		Hombres (n=390)		Mujeres (n=660)		p ¹
	Si (%)	No (%)	Si (%)	No (%)	Si (%)	No (%)	
Aceite de oliva principal grasa para cocinar	83,3	16,7	81,6	18,4	84,3	15,7	0,149
Aceite de oliva (4 o más cucharadas/día)	75,5	24,5	76,6	23,4	74,8	25,2	0,284
Verduras/hortalizas (2 o más raciones/día)	60,5	39,5	59,9	40,1	61,0	39,0	0,386
Fruta (3 o más piezas/día)	46,6	53,4	46,5	53,5	47,0	53,0	0,455
Carnes rojas (menos de 1 ración/día)	83,1	16,9	77,2	22,8	86,3	13,7	<0,001
Mantequilla/margarina/nata (menos de 1 ración/día)	91,6	8,4	92,1	7,9	91,3	8,7	0,386
Bebidas azucaradas (menos de 1 ración/día)	87,8	12,2	87,3	12,7	88,3	11,7	0,341
Vino (7 o más vasos/semana)	20,9	79,1	39,9	60,1	10,9	89,1	<0,001
Legumbre (3 o más raciones/semana)	25,2	74,8	29,0	71,0	23,8	76,2	0,040
Pescado (3 o más raciones/semana)	51,7	48,3	51,1	48,9	52,5	47,5	0,358
Repostería comercial (menos de 2 veces/semana)	65,3	34,7	64,8	35,2	65,4	34,6	0,449
Frutos secos (3 o más veces /semana)	27,1	72,9	31,4	68,6	24,7	75,3	0,013
Consumo preferente de carnes blancas	72,4	27,6	66,7	33,3	75,8	24,2	0,001
Sofrito (3 o más veces/semana)	57,7	4,3	59,0	41,0	57,5	42,5	0,346

¹: p-valor obtenido aplicando un test Chi-cuadrado para comparar los porcentajes entre hombres y mujeres

Tabla 4.14.- Diferencias en el cuestionario de 14 puntos de adherencia a la DM en función de la obesidad y la DMT2

Cuestionario Adherencia Dieta Mediterránea	Obesos (n=523)		No obesos (n=527)		P ¹	Diabéticos (n=465)		No diabéticos (n=577)		P ¹
	Si (%)	No (%)	Si (%)	No (%)		Si (%)	No (%)	Si (%)	No (%)	
AOV principal grasa para cocinar	82,1	17,9	84,5	15,5	0,181	82,8	17,2	83,6	16,4	0,396
AOV (4 o más cucharadas/día)	77,2	22,8	73,8	26,2	0,117	77,5	22,5	73,8	26,2	0,099
Verduras/hortalizas (2 o más raciones/día)	57,7	42,3	63,5	36,5	0,036	59,2	40,8	61,6	38,4	0,233
Fruta (3 o más piezas/día)	44,8	55,2	48,8	51,2	0,114	43,4	56,6	49,5	50,5	0,029
Carnes rojas (menos de 1 ración/día)	79,4	20,6	86,6	13,4	0,001	81,2	18,8	84,5	15,5	0,099
Mantequilla/margarina/nata (menos de 1 ración/día)	91,1	8,9	92,1	7,9	0,308	89,2	10,8	93,5	6,5	0,010
Bebidas azucaradas (menos de 1 ración/día)	88,7	11,3	87,2	12,8	0,272	87,2	12,8	88,6	11,4	0,267
Vino (7 o más vasos/semana)	17,7	82,3	25,3	74,7	0,002	18,6	81,4	23,7	76,3	0,029
Legumbre (3 o más raciones/semana)	22,8	77,2	28,5	71,5	0,023	21,9	78,1	29,0	71,0	0,006
Pescado (3 o más raciones/semana)	46,6	53,4	57,3	42,7	<0,001	47,3	52,7	56,0	44,0	0,004
Repostería comercial (menos de 2 veces/semana)	62,3	37,7	68,0	32,0	0,034	69,5	30,5	61,3	38,7	0,004
Frutos secos (3 o más veces/semana)	23,3	76,7	31,0	69,0	0,003	24,8	75,2	29,2	70,8	0,067
Consumo preferente de carnes blancas	70,6	29,4	74,3	25,7	0,111	72,6	27,4	72,3	27,7	0,476
Sofrito (3 o más veces/semana)	54,5	45,5	61,5	38,5	0,013	55,5	44,5	60,2	39,8	0,076

¹: p-valor obtenido aplicando un test Chi-cuadrado para comparar los porcentajes entre obesos y no obesos y entre diabéticos y no diabéticos

4.2.4.- Estudio genético de polimorfismos en genes candidatos y su asociación con obesidad, DMT2

En el siguiente apartado se exponen los resultados de polimorfismos de genes relacionados con obesidad (ApoA5, FTO, KLF14, LPL, NR1D1 y SCD1), relacionados con la DMT2 (CLOCK C, IRS1 y OGG1), los relacionados con ancestro genético (CLNK, FAM5C, KCNMA1, PLCB1, PRDM16, SLC45A2, ZNF564, rs10509954, rs293553 y rs822759) y otros polimorfismos determinados con el array de genotipado denso de GWAs (ASB3, CDKNB, DMRTA1, INAFM2 y MTNR1B). En todos los casos, se presentan al inicio su asociación con datos antropométricos (peso, IMC y cintura), bioquímicos y de presión arterial y posteriormente se asociaron con obesidad, DMT2 y otros factores de riesgo cardiovascular.

4.2.4.1.- Estudio de polimorfismos de genes relacionados con la obesidad

En este apartado se estudian los polimorfismos de genes que inicialmente se relacionan con obesidad (ApoA5, FTO, KLF14, LPL, NR1D1 y SCD1). En la tabla 4.15 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de cada polimorfismo para la población total. No se observaron diferencias en las frecuencias genotípicas en según el sexo.

La distribución de los genotipos de estos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,508$; $p=0,058$; $p=0,765$; $p=0,570$; $p=0,813$; $p=0,742$; $p=0,369$; $p=0,508$ y $p=0,385$ respectivamente).

Tabla 4.15.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con la obesidad en la población estudiada y en función de sexo

Gen	Polimorfismos	Genotipo	Población total	Frec alélica	Hombres	Mujeres	P		
ApoA5 S19W	rs3135506	SS (%)	n=1040 87,9	S=0,936 W=0,064	n=385 89,4	n=655 87	0,486		
		SW (%)	11,3					10,1	12,1
		WW (%)	0,8					0,5	0,9
ApoA5 promotor	rs662799	TT (%)	n=1014 88,3	T=0,939 C=0,061	n=378 87,6	n=636 88,7	0,868		
		TC (%)	11,2					11,9	10,8
		CC (%)	0,5					0,5	0,5
FTO	rs9939609	TT (%)	n=1036 31,9	T=0,563 A=0,437	n=383 33,7	n=653 30,9	0,319		
		TA (%)	48,7					45,7	50,5
		AA (%)	19,3					20,6	18,5
KLF14	rs4731702	CC (%)	n=1006 32,8	C=0,577 T=0,423	n=374 34,0	n=632 32,1	0,241		
		CT (%)	49,7					46,5	51,6
		TT (%)	17,5					19,5	16,3
LPL	rs13702	CC (%)	n=1018 10,3	C=0,324 T=0,676	n=377 10,9	n=641 10	0,369		
		CT (%)	44,1					46,4	42,7
		TT (%)	45,6					42,7	47,3
NR1D1	rs2314339	CC (%)	n=1000 76,7	C=0,874 T=0,126	n=370 77,0	n=630 76,5	0,621		
		CT (%)	21,4					21,6	21,3
		TT (%)	1,9					1,4	2,2
SCD1	rs10883463	CC (%)	n=1020 0,6	C=0,068 T=0,932	n=379 0,5	n=641 0,6	0,918		
		TC (%)	12,4					11,9	12,6
		TT (%)	87,1					87,6	86,7

Frec alélica: frecuencia alélica. P: Valor de la P obtenido mediante un test Chi-cuadrado al comparar las frecuencias genotípicas según el sexo

4.2.4.1.1.- Polimorfismos del gen Apolipoproteína A5

A continuación se presentarán los resultados del análisis de los polimorfismos estudiados del gen ApoA5 y las variables antropométricas y bioquímicas. En este gen se analizaron dos polimorfismos, el rs662799 -1131T>C situado en el promotor del gen y el rs3135506 56C>G (S19W).

En el polimorfismo rs662799 debido a la escasa prevalencia del genotipo CC se agruparon los heterocigotos junto con los individuos de genotipo CC para obtener mayor potencia estadística en los análisis realizados. En el caso de este polimorfismo, no se observaron asociaciones con parámetros antropométricos ni bioquímicos en la población estudiada.

Posteriormente se realizaron los análisis en función del sexo, donde se encontraron diferencias entre hombres y mujeres. Se observó que las mujeres homocigotas TT presentaban mayor cintura que las mujeres portadoras del alelo C (TT: 101,9±12,0 cm; Port C: 98,9±12,3 cm; p=0,048) sin detectarse diferencias en los hombres, aunque no se observó interacción entre el polimorfismo y el sexo para la cintura (p interacción=0,347). Al ajustar por factores de confusión se perdió la significación estadística obtenida en el valor del perímetro de la cintura (p=0,085). También se observó que las mujeres homocigoto TT presentaban mayores niveles de c-LDL, aunque no alcanzó la significación estadística (TT: 131,6±35,4 mg/dL; Port C: 123,3±33,3 mg/dL; p=0,067). Al realizar los análisis en función de la obesidad no se mostraron diferencias entre individuos obesos y no obesos ni entre diabéticos y no diabéticos.

Como ocurre con el polimorfismo anterior, debido a la escasa prevalencia del genotipo WW en el polimorfismo rs3135506, se agruparon los heterocigotos SW junto con los individuos de genotipo WW para obtener mayor potencia estadística en los análisis realizados. Los resultados de los análisis del polimorfismo rs3135506 con parámetros antropométricos y bioquímicos se muestran en la Tabla 4.16. Al analizar los resultados, se observó una posible relación entre este polimorfismo y los valores de c-LDL. Los individuos homocigotos SS presentan mayor concentración media que los individuos portadores del alelo W (129,2 ± 35,2 mg/dl vs 119,3 ± 34,2 mg/dl, p=0,003). Esta diferencia se mantuvo al ajustar por las variables de confusión (p=0,002).

Tabla 4.16.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs3135506 del gen ApoA5 en la población estudiada

	SS (n=914)	SW + WW (n=126)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	0,667
Peso (kg)	76,5 ± 12	74,7 ± 11,9	0,125
IMC (kg/m ²)	30,3 ± 4,4	30,1 ± 4,3	0,505
Cintura (cm)	102,8 ± 12,0	102,0 ± 11,7	0,513
CT (mg/dl)	206,6 ± 38,4	201,4 ± 40,2	0,158
c-LDL (mg/dl)	129,2 ± 35,2	119,3 ± 34,2	0,002**
c-HDL (mg/dl)	52,7 ± 13,0	53,4 ± 13,4	0,551
TG (mg/dl)	126,0 ± 63,0	136,0 ± 78,1	0,288
Glucosa (mg/dl)	118,9 ± 37,8	121,2 ± 43,8	0,527
PAS (mmHg)	146,4 ± 19,7	146,0 ± 22,7	0,863
PAD (mmHg)	81,4 ± 10,6	81,3 ± 10,4	0,975

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student. *:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **:p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

Al realizar el mismo análisis segmentando la población por sexo, se encontraron diferencias entre hombres y mujeres. En el caso de los hombres se vio que los individuos homocigotos SS presentaban menor concentración de TG que los individuos portadores del alelo W (130,6±67,4 mg/dl vs 164,3±89,3 mg/dl) llegando esta diferencia a la significación estadística (p=0,011). No ocurre lo mismo en las mujeres, donde no se encuentran diferencias en la concentración de TG con respecto al genotipo (SS: 123,2±60,2 mg/dl Port W: 122,2±68,5 mg/dl p=0,598). Los resultados de esta interacción por sexo se muestran en la Figura 4.4.

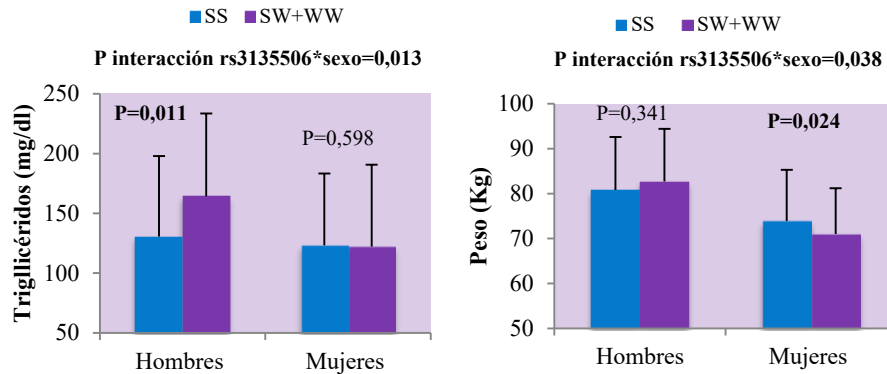


Figura 4.4.- Media de concentración de triglicéridos (izquierda) y del peso (derecha) en hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs3135506 en la población estudiada. P= p valor de comparación de medias según el genotipo entre sexo mediante la prueba de t-Student

En el caso de las mujeres, se encontraron diferencias en el peso medio que no se encontraron en hombres (Figura 4.4). Las mujeres SS presentaban mayor peso ($73,9 \pm 11,4$ kg) frente a las portadoras del alelo W ($71,0 \pm 10,2$ kg) siendo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,024$). No se encontraron esas diferencias en hombres (SS: $80,8 \pm 11,8$ kg; Port W: $82,7 \pm 11,7$ kg; $p=0,341$). Al realizar los análisis en función de la obesidad no se mostraron diferencias significativas entre individuos obesos y no obesos ni entre individuos diabéticos y no diabéticos.

Como ambos polimorfismos se han relacionado con la obesidad, se estudió el riesgo asociado a los portadores del alelo minoritario con respecto a los homocigotos mutados para ambos polimorfismos. En el caso de rs662799, no se detectaron diferencias según el genotipo en obesos y no obesos ($p=0,435$). Tampoco hubo diferencias en función de la obesidad en el caso de rs3135506 ($p=0,925$). Igualmente, en los dos casos los portadores del alelo minoritario no presentaron mayor riesgo de obesidad, sin alcanzar la significación estadística, ni tras ajustar por sexo y edad. También se analizó el riesgo de DMT2, sin encontrar riesgo asociado para el polimorfismo rs662799 (OR=0,89 IC95% (0,61-1,32) $P=0,568$) ni con el polimorfismo rs3135506 (OR=0,89 IC95% (0,61-1,31) $P=0,570$).

4.2.4.1.2.- Polimorfismo rs9939609 del gen FTO

En este apartado se analizará el polimorfismo rs9939609 localizado en el gen FTO. Se realizó un análisis de asociación entre este polimorfismo y las variables antropométricas y bioquímicas. El polimorfismo rs9939609 no se asoció con variables antropométricas relacionadas con la obesidad como el peso, cintura o IMC. Tampoco se encontraron diferencias según el genotipo con respecto a los parámetros bioquímicos realizados. No se observó heterogeneidad por sexo al realizar los análisis por sexos. Tampoco hubo diferencias entre obesos y no obesos, ni en diabéticos frente a los no diabéticos.

A continuación se estudió el riesgo de obesidad y DMT2 asociados al polimorfismo seleccionado del gen FTO. Para calcular estos riesgos se agruparon los portadores del alelo A del polimorfismo. Tras realizar el análisis, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas en obesos y no obesos ni en diabéticos y no diabéticos. Tampoco se observaron riesgo de obesidad (OR: 0,98 IC95% (0,76-1,27) $p=0,879$) ni de DMT2 (OR: 1,09 IC95% (0,84-1,42) $p=0,523$) estadísticamente significativo.

4.2.4.1.3.- Polimorfismo rs4731702 del gen KLF14

En el siguiente apartado se analizará el polimorfismo rs4731702 localizado en el gen KLF14. En la tabla 4.17 se muestran los resultados obtenidos al analizar las posibles asociaciones entre el polimorfismo y parámetros antropométricos y bioquímicos. Con respecto a los parámetros antropométricos, se observó que los individuos TT presentaban menor IMC que los individuos con genotipos CT y CC, quedándose esa diferencia al límite de la significación estadística ($p=0,058$) ni tras ajustar por factores de confusión. Comparando los parámetros bioquímicos, se observó una asociación entre la concentración media de c-HDL y el genotipo. Los individuos TT presentaban mayor concentración, los heterocigotos una concentración algo menor, siendo los individuos CC los que presentaban menor concentración. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,012$; p tendencia= $0,014$). Al ajustar por factores de confusión, la significación estadística se perdió ($p=0,090$). Al realizar estos análisis en función del sexo, no se encontró heterogeneidad entre hombres y mujeres según el genotipo. Tampoco se encontraron diferencias significativas al analizar su posible asociación con individuos obesos y no obesos.

Tabla 4.17.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4731702 del gen KLF14 en la población estudiada

	CC (n=344)	CT (n=521)	TT (n=186)	P1
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	67±6	0,740
Peso (kg)	76,1±12,3	76,8±11,9	75,5±11,2	0,425
IMC (kg/m ²)	30,1±4,4	30,6±4,4	29,8±3,9	0,058
Cintura (cm)	103,1±12,2	103,1±11,7	101,3±12,0	0,212
CT (mg/dl)	207,0±37,2	207,3±38,9	202,4±39,7	0,350
c-LDL (mg/dl)	129,8±34,8	128,6±35,5	123,0±35,2	0,119
c-HDL (mg/dl)	51,4±12,1	53,2±13,4	54,9±13,9	0,012*
TG (mg/dl)	128,6±66,6	126,1±64,2	128,4±66,3	0,847
Glucosa (mg/dl)	119,5±36,9	118,8±39,6	119,8±40,2	0,940
PAS (mmHg)	147,8±19,2	146,3±20,7	144,1±20,1	0,157
PAD (mmHg)	81,9±10,3	81,4±10,9	80,4±10,4	0,297

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

En cambio, al analizar estos parámetros en función de la DMT2, sí que se observaron diferencias entre diabéticos y no diabéticos (Figura 4.5). Respecto a los parámetros bioquímicos, se encontraron diferencias según el genotipo entre los individuos no diabéticos y la concentración de c-HDL. En este caso, los no diabéticos TT presentaban mayor concentración de c-HDL (59,2±14,7 mg/dl) frente a los CT (54,5±13,6 mg/dl) y CC (53,7±12,7 mg/dl), siendo una diferencia significativa (p=0,005; p tendencia=0,001), datos que concuerdan con los obtenidos en la población general. En cambio, los individuos diabéticos no seguían esa misma tendencia, CC y TT (CC: 48,7±10,8 mg/dL; CT: 51,3±12,9 mg/dl, TT: 49,8±10,9 mg/dl p=0,120) ni tras ajustar por la edad y sexo (Figura 4.5A).

También se observó una diferencia significativa en la concentración de TG dentro de los participantes diabéticos. Los diabéticos CC presentaban mayor nivel de TG ($144,3 \pm 76,3$ mg/dl) frente al resto de genotipos (CT= $125,4 \pm 62,5$ mg/dl y TT= $134,7 \pm 71,9$ mg/dl), alcanzando esta diferencia la significación estadística ($p=0,033$). En los individuos no diabéticos no se encontraron diferencias significativas (Figura 4.5B).

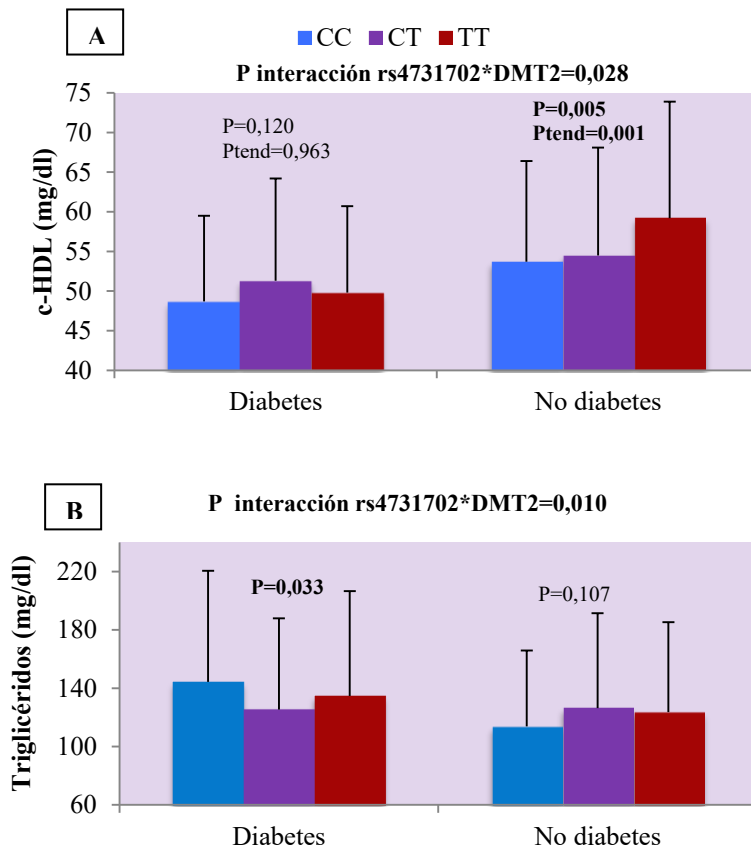


Figura 4.5.- Medida de la concentración de c-HDL (A) y TG (B) en diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4731702 del gen KLF14 (c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; P interac: p interacción; P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos)

Como en los casos anteriores, se calculó el riesgo de obesidad y DMT2 en función del genotipo, agrupando los portadores del alelo T para analizar el riesgo frente a los individuos CC, bajo un modelo de herencia dominante. No se encontraron diferencias en la prevalencia de obesos ni diabéticos según el genotipo. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el riesgo de obesidad (OR: 1,05 IC95% (0,81-1,36) $p=0,720$), ni en el riesgo de padecer DMT2 (OR: 0,828 IC95% (0,63-1,08) $p=0,163$) entre los portadores del alelo T frente a los homocigotos CC.

4.2.4.1.4.- Polimorfismo rs13702 de gen LPL

El siguiente polimorfismo relacionado con obesidad estudiado fue el polimorfismo rs13702 localizado en el gen LPL. Debido a la baja prevalencia del homocigoto CC, los análisis estadísticos se realizaron agrupando a los individuos heterocigotos con los homocigotos CC para compararlos frente a los que presentaban un genotipo TT. En la tabla 4.18 se muestran los resultados obtenidos de los análisis de asociación del polimorfismo con datos antropométricos y bioquímicos. Cuando se analizaron las variables antropométricas en función del genotipo no se encontraron diferencias significativas.

En el análisis de los datos bioquímicos se observó diferencias en los niveles tanto de CT como de TG. Los niveles de CT de los homocigotos TT eran mayores que en los portadores del alelo C ($208,6 \pm 39,0$ mg/dl vs $203,7 \pm 38,0$ mg/dl), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p=0,048$). Al ajustar por los factores de confusión, la diferencia dejó de ser significativa ($p=0,080$). También hubo diferencias en los niveles de TG, de forma similar al CT, ya que los homocigotos TT presentaban mayores niveles de TG que los portadores del alelo C ($132,1 \pm 66,6$ mg/dl vs $123,4 \pm 63,9$ mg/dl), alcanzando la significación estadística ($p=0,032$). Como en el caso anterior, al ajustar por factores de confusión se quedó en el límite de la significación ($p=0,074$).

Tabla 4.18.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs13702 del gen LPL en la población estudiada

	TT (n=464)	CT+CC (n=554)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	0,737
Peso (kg)	76,3±11,9	76,5±12,0	0,767
IMC (kg/m ²)	30,2±4,2	30,5±4,5	0,198
Cintura (cm)	102,2±12,5	103,4±11,2	0,101
CT (mg/dl)	208,6±38,0	203,7±39,0	0,048*
c-LDL (mg/dl)	126,9±34,7	129,2±35,9	0,309
c-HDL (mg/dl)	52,9±13,0	52,5±12,7	0,606
TG (mg/dl)	132,1±66,6	123,4±63,9	0,032*
Glucosa (mg/dl)	119,8±39,1	118,4±37,4	0,548
PAS (mmHg)	146,1±20,0	146,5±20,1	0,717
PAD (mmHg)	81,6±10,7	81,2±10,3	0,600

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

Paralelamente, se analizó las frecuencias genotípicas entre obesos y no obesos y entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo del gen LPL, pero no se observaron diferencias (p=0,521 y p=0,213 respectivamente). También se realizaron los mismos análisis según el sexo, la obesidad y la DMT2. No se encontraron diferencias en ninguno de los casos. Tampoco se observaron diferencias significativas ni en el riesgo de obesidad (OR: 1,00 IC95% (0,78-1,28) p=0,991) ni en el riesgo de DMT2 (OR: 1,12 IC95% (0,87-1,43) p=0,389) entre los portadores del alelo C frente a los homocigotos TT.

4.2.4.1.5.- Polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1

El siguiente polimorfismo estudiado fue rs2314339 situado en el gen NR1D1, cuyos resultados iniciales se resumen en la tabla 4.19. Debido a la baja prevalencia del genotipo TT, se agruparon los resultados de este genotipo junto con los de los individuos heterocigotos CT para obtener mayor poder estadístico. Al estudiar las asociaciones de los parámetros antropométricos según el genotipo no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, observando los datos bioquímicos se encontró una diferencia en el nivel de TG plasmáticos. Los individuos CC tenían mayor concentración media de TG respecto a los individuos portadores del alelo T ($129,9 \pm 65,9$ mg/dl vs $120,8 \pm 62,4$ mg/dl; $p=0,053$), siendo esta diferencia significativa al ajustar por factores de confusión ($p=0,045$).

Tabla 4.19.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 en la población estudiada

	CC (n=767)	CT+TT (n=233)	p ¹
	Media \pm DS	Media \pm DS	
Edad (años)	67 \pm 6	67 \pm 6	0,482
Peso (kg)	76,4 \pm 12,2	76,6 \pm 11,2	0,824
IMC (kg/m ²)	30,3 \pm 4,4	30,6 \pm 4,2	0,339
Cintura (cm)	102,9 \pm 12,3	102,6 \pm 11,1	0,802
CT (mg/dl)	206,1 \pm 39,9	203,7 \pm 35,2	0,406
c-LDL (mg/dl)	127,7 \pm 36,2	126,9 \pm 33,5	0,758
c-HDL (mg/dl)	52,7 \pm 13,1	52,6 \pm 12,7	0,935
TG (mg/dl)	129,9 \pm 65,9	120,8 \pm 62,4	0,053**
Glucosa (mg/dl)	119,9 \pm 37,6	117,6 \pm 40,8	0,438
PAS (mmHg)	146,3 \pm 20,1	145,9 \pm 20,2	0,786
PAD (mmHg)	81,4 \pm 10,6	81,6 \pm 10,3	0,829

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

A continuación se realizaron los mismos análisis según el sexo para observar si existían diferencias entre hombres y mujeres sin encontrar ninguna significativa. Similares resultados se obtuvieron al examinar los resultados en función de la DMT2. No se vieron diferencias entre diabéticos y no diabéticos.

En el caso de la obesidad, los resultados mostraron diferencias entre obesos y no obesos en un parámetro bioquímico (TG) y un parámetro antropométrico (cintura). En los participantes obesos, los individuos CC presentaban mayor concentración de TG plasmáticos ($140,1 \pm 69,2$ mg/dl) frente a los portadores del alelo T ($122,7 \pm 61,2$ mg/dl), siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p=0,006$). Esta diferencia no se encontró entre el genotipo CC y los genotipos CT+TT en los individuos no obesos ($120,2 \pm 61,1$ mg/dl vs $118,6 \pm 64,2$ mg/dl, $p=0,729$) (Figura 4.6), aunque la interacción no fue significativa ni tras ajustar por edad y sexo. En el caso del perímetro de la cintura, los individuos obesos CC también presentaban mayor valor de cintura ($109,7 \pm 10,6$ cm) que el resto de participantes obesos ($107,1 \pm 8,9$ cm), siendo estadísticamente significativa ($p=0,014$). No ocurría lo mismo en los individuos no obesos donde el perímetro de cintura era muy similar (CC: $96,2 \pm 10,0$ cm; CT+TT: $96,9 \pm 11,0$ cm; $p=0,565$). Esta interacción fue significativa incluso tras ajustar por edad y sexo ($p=0,037$) (Figura 4.6).

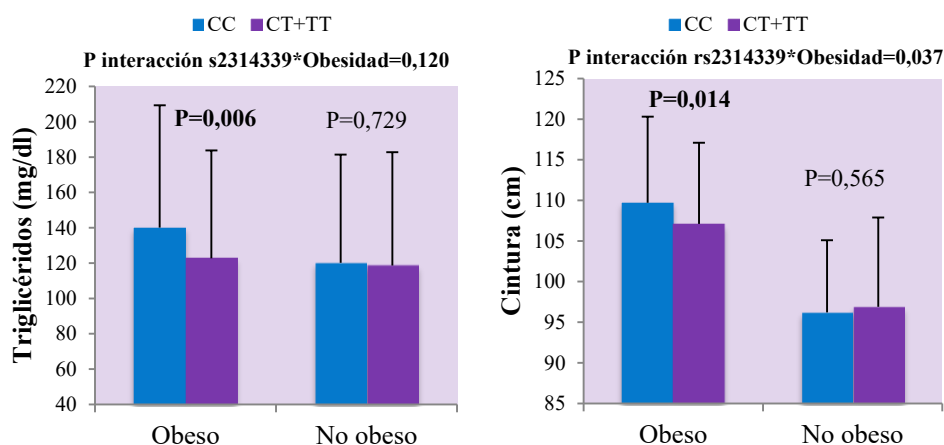


Figura 4.6.- Medida de la concentración de triglicéridos (izquierda) y del perímetro de cintura (derecha) en obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Al comparar las frecuencias genotípicas en función de la obesidad y la DMT2 se encontró que había diferencias en el caso de la obesidad con respecto al genotipo del polimorfismo rs2314339, quedándose en el límite de la significación ($p=0,054$), diferencias que no se encontraron en el caso de la DMT2.. Con respecto al cálculo del riesgo, se obtuvo una $OR=1,32$ tras ajustar por sexo y edad, quedándose cerca de la significación estadística ($p=0,065$), lo que indicaba que el genotipo CC podría presentar mayor riesgo de obesidad que los portadores del alelo T. Con respecto a la DMT2, el valor del riesgo estimado no fue significativo. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.20.

Tabla 4.20.- Análisis del riesgo de obesidad y de DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 en la población estudiada

Genotipo	Obeso %	No obeso %	P ¹	OR (IC 95%) CC vs CT + TT	P ²	OR (IC 95%) CC vs CT + TT	P ³
rs2314339							
CC	74,3	79,1	0,054	1,31 (0,98- 1,76)	0,072	1,32 (0,98 - 1,78)	0,065
CT	23,3	19,5					
TT	2,4	1,4					
Genotipo	DMT2 %	No DMT2 %	P ¹	OR (IC 95%) CC vs CT + TT	P ²	OR (IC 95%) CC vs CT + TT	P ³
rs2314339							
CC	74,9	78,0	0,234	1,18 (0,88 - 1,59)	0,261	1,16 (0,86 - 1,57)	0,321
CT	22,8	20,4					
TT	2,2	1,7					

P¹: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre obesos/no obesos y diabéticos/no diabéticos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple. P³: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

4.2.4.1.6.- Polimorfismo rs10883463 del gen SCD1

En este apartado se presentaran los resultados más relevantes obtenidos del estudio del polimorfismo rs10883463 localizado en el gen SCD1. Como ocurrió en los polimorfismos anteriores, en este caso se agruparon los homocigotos CC junto con los heterocigotos TC, debido a la baja prevalencia del genotipo CC, y se compararon con los homocigotos TT. No se observaron diferencias significativas en los valores antropométricos y bioquímicos obtenidos de la población estudiada

según el genotipo del polimorfismo. Tampoco se encontró ninguna diferencia al realizar los mismos análisis en función del sexo.

Debido a su posible asociación con la obesidad, se examinaron los resultados según la obesidad y la DMT2. En este último caso, no hubo diferencias en los parámetros estudiados según el genotipo entre diabéticos y no diabéticos. En el caso de la obesidad, se encontró una interacción entre el polimorfismo y la obesidad en el caso del perímetro de la cintura. Dentro de la población obesa, los homocigotos TT presentaban mayor cintura que los individuos portadores del alelo C, llegando esta diferencia a la significación estadística (109,3±9,9 cm y 106,6±9,9 cm, $p=0,044$). En el caso de los participantes no obesos, el perímetro de cintura que presentan es similar en los diferentes genotipos (TT: 96,3±13,1 cm; CC+TC: 96,5±13,1 cm; $p=0,880$) aunque la interacción no fue significativa ni tras ajustar por edad y sexo (Figura 4.7).

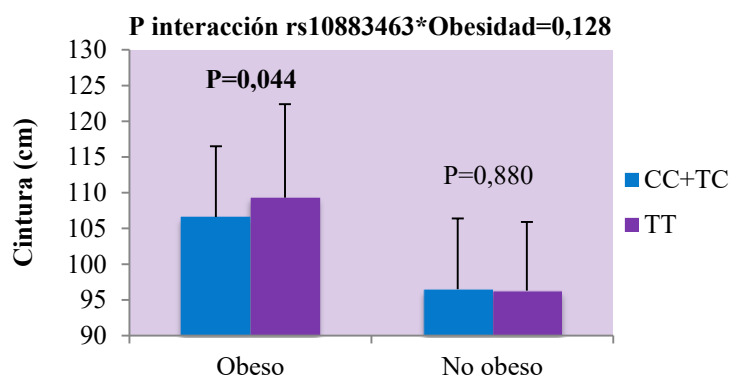


Figura 4.7.- Medida del perímetro de cintura en obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs10883463 del gen SCD1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Posteriormente se analizó el riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo. No se encontraron diferencias en las frecuencias genotípicas para ninguno de los dos casos. El cálculo del riesgo de obesidad no fue estadísticamente significativo (OR=0,98 IC95% (0,68-1,42) $P=0,923$). Los resultados para el riesgo de DMT2 fueron similares (OR=1,05 IC95%(0,72-1,53) $P=0,787$).

4.2.4.2.- Estudio de polimorfismos de genes relacionados con la DMT2

En este apartado se estudian los polimorfismos de genes que inicialmente se relacionan con la DMT2 (CLOCK C, IRS1 Y OGG1). En la tabla 4.21 se muestran las frecuencias genotípicas de estos polimorfismos en población total y en función del sexo. No se observaron diferencias en las frecuencias genotípicas según sexo. También se muestra en la tabla las frecuencias alélicas para cada polimorfismo.

La distribución de los genotipos de estos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,097$; $p=0,823$; $p=0,202$ y $p=0,239$ respectivamente).

Tabla 4.21.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con la DMT2 en la población estudiada y en función de sexo

Gen	Polimorfismos	Genotipo	Población total	Frec alélica	Hombres	Mujeres	P
CLOCK C	rs4580704		n=1034		n=384	n=650	0,774
		CC (%)	35,0	C=0,602	34,1	35,5	
		CG (%)	50,4	G=0,398	51,8	49,5	
		GG (%)	14,6		14,1	14,9	
IRS1	rs2943641		n=1000		n=371	n=629	0,502
		CC (%)	41,7	C=0,647	29,6	42,9	
		TC (%)	46,0	T=0,353	46,9	45,5	
		TT (%)	12,3		13,5	11,6	
IRS1	rs2943634		n=970		n=358	n=612	0,464
		AA (%)	9,6	A=0,323	8,4	10,3	
		AC (%)	45,4	C=0,677	47,5	44,1	
		CC (%)	45,1		44,1	45,6	
OGG1	rs1052133		n=1039		n=387	n=652	0,152
		CC (%)	64,7	C=0,800	66,7	63,5	
		CG (%)	30,7	G=0,200	27,6	32,5	
		GG (%)	4,6		5,7	4	

P: Valor de la P obtenido mediante un test Chi-cuadrado al comparar las frecuencias genotípicas según el sexo

4.2.4.2.1.- Polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en los participantes del estudio PREDIMED-Valencia

El primer polimorfismo relacionado con la DMT2 estudiado fue el polimorfismo rs4580704 localizado en el gen CLOCK C. Los resultados del análisis de asociación de este polimorfismo con datos antropométricos, lipídicos generales, glucosa y presión arterial se muestran en la tabla 4.22.

Tabla 4.22.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en la población estudiada

	CC (n=362)	CG (n=521)	GG (n=151)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	66±6	0,432
Peso (kg)	76,7±12,2	76,4±10,0	75,2±11,4	0,442
IMC (kg/m ²)	30,5±4,3	30,3±4,5	29,9±4,2	0,301
Cintura (cm)	102,9±12,4	103,1±12,1	100,9±10,2	0,137
CT (mg/dl)	205,8±39,3	205,3±39,7	209,3±35,1	0,533
c-LDL (mg/dl)	126,9±34,8	128,4±35,9	129,4±33,3	0,716
c-HDL (mg/dl)	52,9±13,4	52,1±12,7	54,8±13,2	0,074
TG (mg/dl)	129,1±65,1	126,9±66,2	125,4±61,3	0,854
Glucosa (mg/dl)	121,6±38,5	120,2±40,3	107,6±29,1	0,001**
PAS (mmHg)	146,7±19,7	146,8±20,6	143,6±18,8	0,195
PAD (mmHg)	81,8±11,0	81,2±10,4	81,0±10,5	0,583

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; 1: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

Existe diferencia significativa en el nivel de glucosa, detectándose una tendencia en los niveles de glucosa, donde los homocigotos CC presentaban mayores valores frente a los homocigotos GG y los heterocigotos CG tiene valores intermedios (p=0,001 p tend<0,001). En estos resultados iniciales, también se observa que los

individuos GG presentaban mayor nivel de c-HDL ($54,8 \pm 13,2$ mg/dl) que los otros dos genotipo (CC: $52,9 \pm 13,4$ mg/dl; CG: $52,1 \pm 12,7$ mg/dl), aunque estas diferencias se quedaron cerca de la significación ($p=0,074$). No se encontró heterogeneidad en los resultados entre hombre y mujeres al realizar estos mismos análisis en función del sexo.

En el análisis de estos parámetros en función de la obesidad, se encontraron diferencias en el valor medio de los TG. Dentro de los individuos obesos, los homocigotos CC presentaban una mayor concentración de TG ($145,6 \pm 73,0$ mg/dl), frente a los individuos CG ($131,3 \pm 63,9$ mg/dl) y los homocigotos GG ($123,5 \pm 60,1$ mg/dl). Estas diferencias llegaron a ser significativas ($p=0,030$, $p_{tend}=0,020$). En cambio, en los individuos no obesos se observó la tendencia contraria donde los genotipos CC presentaban menores niveles de TG que los GG ($111,9 \pm 50,4$ mg/dl vs $127,6 \pm 62,7$ mg/dl) y los heterocigotos CG un nivel intermedio ($122,5 \pm 68,3$ mg/dl). Las diferencias en el caso de los no obesos no fueron significativas ($p=0,209$) (Figura 4.8). La interacción se mantuvo significativa tras ajuste por edad y sexo ($p_{int}=0,001$).

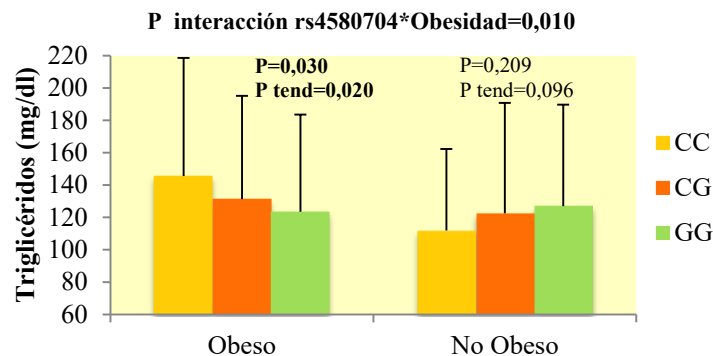


Figura 4.8.- Medida de la concentración de triglicéridos entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA)

Al realizar los análisis en función de la DMT2, se hallaron diferencias significativas entre diabéticos y no diabéticos en el valor de IMC en función del genotipo de este polimorfismo. Los individuos diabéticos con genotipo CC presentaban mayor IMC que los diabéticos CG y los diabéticos GG ($31,2 \pm 4,5$

kg/m², 30,2±4,5 kg/m² y 29,8±4,3 kg/m² respectivamente). Las diferencias alcanzaron la significación estadística (p=0,050, ptend=0,040). No se encontraron estas diferencias en los participantes no diabéticos. La interacción se quedó en el límite de la significación tras ajustar por edad y sexo (p int=0,055) (Figura 4.9).

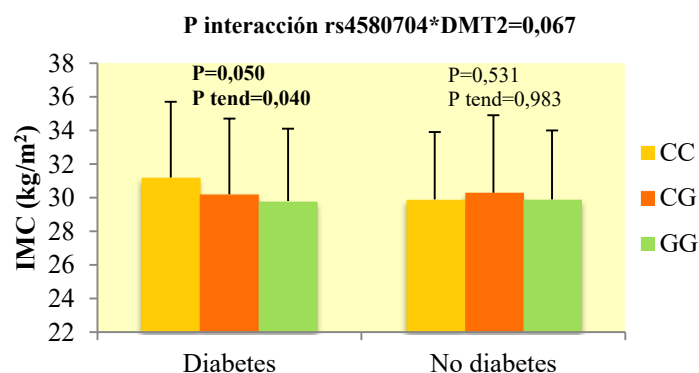


Figura 4.9.- Medida del índice de masa corporal entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA)

Debido a los resultados obtenidos se analizó el riesgo de obesidad y de DMT2 asociado al polimorfismo en la población estudiada. Para ello se agrupó a los individuos portadores del alelo G para analizar el riesgo frente a los individuos CC, bajo un modelo de herencia dominante. No se encontraron diferencias en la prevalencia de obesos y diabéticos según el genotipo, ni diferencias en el riesgo de padecer ninguna de las patologías estudiadas (OR: 0,94 IC95% (0,73-1,21) p=0,629 en obesidad; OR: 0,91 IC95% (0,70-1,18) p=0,481 en DMT2).

4.2.4.2.2.- Polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en los participantes del estudio PREDIMED en población total.

El polimorfismo del gen rs4580704 del gen CLOCK C fue estudiado en la población general del estudio PREDIMED. Los resultados han sido publicados (Corella D et al, 2016a). La población estudiada fue de 7098 participantes. La prevalencia genotípica para el polimorfismo fue de CC (37,6%), CG (48,1%) y GG (14,3%), sin encontrar diferencias de genotipo entre los grupos de intervención

($p=0,570$). Al realizar el análisis de las posibles asociaciones con parámetros antropométricos y bioquímicos según el genotipo, se observó que existían diferencias estadísticamente significativas en el peso, el IMC y el perímetro de cintura (Tabla 4.23). Estos parámetros fueron menores en los sujetos homocigotos para el alelo G. No se detectaron ninguna diferencias significativas para la presión arterial, concentración de lípidos plasmáticos y niveles de azúcar en ayunas.

Tabla 4.23.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en la población PREDIMED

	CC (n=2667)	CG (n=3415)	GG (n=1016)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	67±6	0,961
Peso (kg)	76,9±12,0	77,1±12,1	75,4±11,5	<0,001
IMC (kg/m ²)	30,0±3,8	30,0±3,9	29,7±3,8	0,030
Cintura (cm)	100,5±10,3	100,6±10,9	99,3±10,3	0,002
CT (mg/dl)	209,9±37,8	211,2±39,0	210,0±36,2	0,417
c-LDL (mg/dl)	129,2±33,7	130,0±34,0	129,6±32,7	0,635
c-HDL (mg/dl)	53,8±13,7	53,6±13,9	54,5±14,3	0,224
TG (mg/dl)	137,5±75,5	137,6±75,1	132,6±68,6	0,109
Glucosa (mg/dl)	122,9±41,8	121,8±41,8	120,4±39,1	0,268
PAS (mmHg)	149,1±20,8	149,6±20,7	149,5±21,0	0,676
PAD (mmHg)	83,5±11,1	83,5±10,9	83,0±11,0	0,389

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; 1: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA

Al analizar este polimorfismo según la DMT2 se observó una diferencia en los niveles de glucosa en los individuos no diabéticos ($n=3671$). La concentración de los niveles de glucosa en portadores del alelo G fue menor ($p=0,009$). Esta asociación continua siendo estadísticamente significativa tras el ajuste adicional por edad, sexo e IMC ($p=0,014$) (Figura 4.10). No se encontraron estas diferencias en los participantes diabéticos.

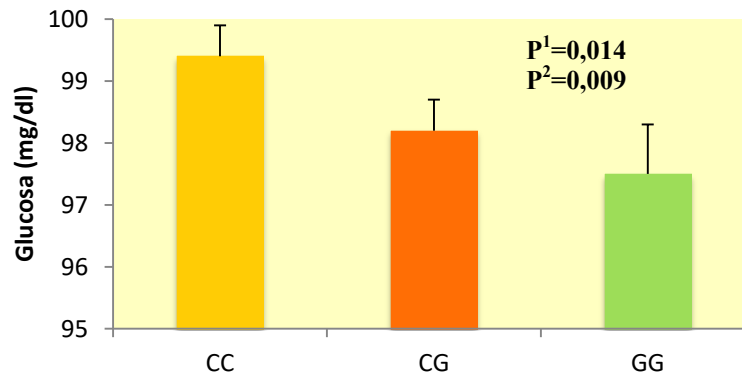


Figura 4.10.- Medida de la concentración de glucosa según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en individuos no diabéticos de la población PREDIMED (P^1 : p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; P^2 : p-valor obtenido tras ajustar por sexo, edad e IMC)

A continuación se analizó la asociación entre el polimorfismo rs4580704 y la incidencia de la DMT2 en sujetos no diabéticos. Como los portadores del alelo G presentaban tasas de incidencia similares en el modelo genético general, se agruparon juntos a estos sujetos (modelo dominante) y se estimó el riesgo de DMT2 para portadores G comparado con los homocigotos CC. Los portadores del alelo G presentaban un menor riesgo de DMT2 que los sujetos homocigotos CC (OR: 0,68 IC95 % (0,54-0,86) $p=0,001$). Esta asociación protectora se mantuvo estadísticamente significativa tras ajustar por factores de confusión (OR: 0,69 IC95% (0,54-0,87) $p=0,002$).

4.2.4.2.3.- Polimorfismos cerca del gen IRS-1

Se estudiaron los polimorfismos rs2943641 y rs2943634, ambos situados cerca del gen IRS-1. En ambos casos, en el análisis se agrupó en genotipo homocigoto menos prevalente junto con el heterocigoto para comparar sus resultados frente al homocigoto más frecuente.

Los resultados del polimorfismo rs2943641 se presentan en la tabla 4.24. En los análisis de asociación iniciales, no se encontraron diferencias significativas en parámetros antropométricos según el genotipo del polimorfismo. Con respecto a los valores bioquímicos, se halló una diferencia significativa en los niveles plasmáticos de glucosa. En el caso de los individuos CC, el valor medio de glucosa era mayor que los individuos portadores del alelo T (124,8±42,8 mg/dl vs 116,0±35,2 mg/dl). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,001$) y esta significación se mantuvo después de ajustar por factores de confusión ($p=0,024$).

Tabla 4.24.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 en la población estudiada

	CC (n=417)	CT+TT (n=583)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	66±6	67±6	0,009
Peso (kg)	76,6±11,9	76,2±10,1	0,624
IMC (kg/m ²)	30,4±4,4	30,3±4,4	0,766
Cintura (cm)	103,3±11,1	102,2±12,5	0,192
CT (mg/dl)	206,4±39,7	205,7±37,9	0,788
c-LDL (mg/dl)	128,5±35,0	127,7±35,6	0,705
c-HDL (mg/dl)	53,1±13,8	52,3±12,2	0,334
TG (mg/dl)	126,2±66,7	128,7±64,6	0,427
Glucosa (mg/dl)	124,8±42,8	116,0±35,2	0,001**
PAS (mmHg)	146,8±20,2	146,0±20,1	0,519
PAD (mmHg)	81,6±10,7	81,3±10,5	0,613

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

En el caso del rs2943634, no hubo diferencias entre los parámetros antropométricos con respecto al genotipo del polimorfismo. Como ocurrió en el polimorfismo anterior, cuando se examinaron las posibles asociaciones con los datos bioquímicos se encontraron diferencia en los valores de glucosa. En este caso, los portadores del alelo A presentaban menor concentración de glucosa ($116,3 \pm 35,2$ mg/dl) con respecto al genotipo CC ($123,2 \pm 42,4$ mg/dl), siendo estas diferencias significativas ($p=0,007$) y manteniéndose ese valor tras ajustar por factores de confusión ($p=0,014$). Los resultados se presentan en la tabla 4.25.

Tabla 4.25.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2943634 en la población estudiada

	AA+AC (n=565)	CC (n=455)	p ¹
	Media \pm DS	Media \pm DS	
Edad (años)	67 \pm 6	66 \pm 6	0,049
Peso (kg)	76,3 \pm 12,2	76,3 \pm 11,8	0,968
IMC (kg/m ²)	30,4 \pm 4,5	30,3 \pm 4,2	0,632
Cintura (cm)	102,4 \pm 12,5	103,1 \pm 11,4	0,368
CT (mg/dl)	206,2 \pm 38,3	206,8 \pm 39,4	0,803
c-LDL (mg/dl)	128,6 \pm 35,5	128,6 \pm 35,0	0,987
c-HDL (mg/dl)	52,1 \pm 12,0	53,5 \pm 14,1	0,104
TG (mg/dl)	126,9 \pm 63,9	126,2 \pm 65,4	0,822
Glucosa (mg/dl)	116,3 \pm 35,2	123,2 \pm 42,4	0,007**
PAS (mmHg)	146,0 \pm 20,4	147,0 \pm 19,9	0,431
PAD (mmHg)	81,1 \pm 10,3	81,6 \pm 10,6	0,491

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

Por tanto, ambos polimorfismos están relacionados con la concentración de glucosa plasmática, donde los homocigotos más prevalentes se relacionan con un mayor

valor de glucosa frente a los portadores del alelo minoritario (Figura 4.11). No se encontró heterogeneidad en los resultados entre hombres y mujeres ni entre obesos y no obesos, en ninguno de los dos polimorfismos del gen IRS1.

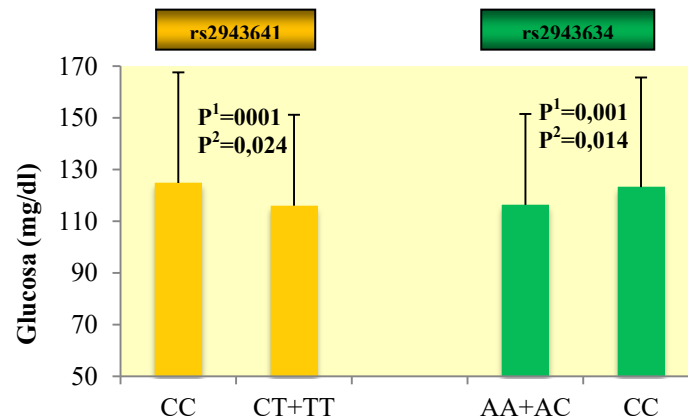


Figura 4.11.- Medida de la concentración de glucosa según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 y del polimorfismo rs2943634 (P¹: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student; P²:p-valor tras ajustar por factores de confusión)

A continuación se realizaron los análisis en función de la DMT2. En el caso del polimorfismo rs2943641 se observó en la población diabética que el genotipo CC presentaba mayores niveles de glucosa que los portadores del alelo T (150,8±44,7 mg/dl vs 139,5±37,8 mg/dl; p=0,004), no encontrándose estas diferencias en los individuos no diabéticos donde ambos genotipos presentaban valores similares de glucosa (Figura 4.12). La interacción se mantuvo significativa tras ajustar por edad y sexo (p int=0,020).

En el caso del polimorfismo rs2943634 también se encontraron diferencias en los valores de glucosa en función del genotipo y de la DMT2. Los individuos diabéticos portadores del alelo A presentaban menores niveles de glucosa (139,6±37,5 mg/dl) que los diabéticos CC (151,1±44,9 mg/dl). Las diferencias fueron estadísticamente significativas (p=0,005). Los individuos no diabéticos presentaban niveles de glucosa similares en ambos genotipos (Figura 4.13). Como en el caso anterior, tras ajuste por edad y sexo, la interacción se mantuvo significativa (p int=0,021).

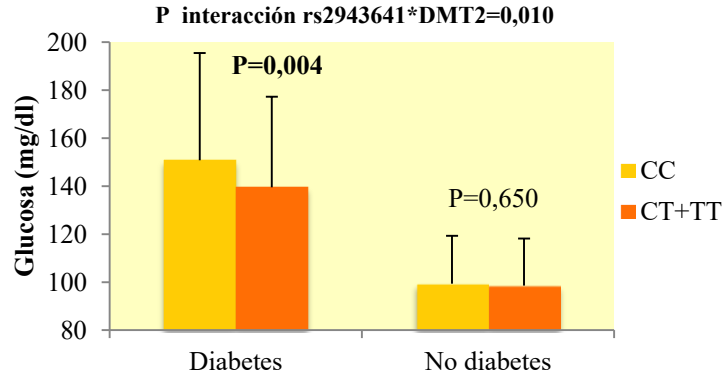


Figura 4.12.- Medida de la concentración de glucosa entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

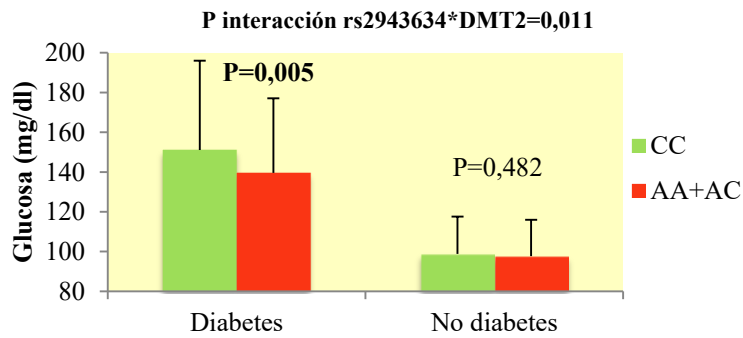


Figura 4.13.- Medida de la concentración de glucosa entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs2943634 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

A continuación, se analizó las diferencias en las frecuencias genotípicas y se calculó el posible riesgo de obesidad y de DMT2. Con respecto a la obesidad, no se encontraron diferencias genotípicas para ninguno de los dos polimorfismos. Tampoco se encontró diferencias estadísticamente significativas en el cálculo de riesgo de obesidad para el polimorfismo rs2943641 (OR=0,96 IC95% (0,75-1,23), p=0,748) ni para el polimorfismo rs2943634 (OR=0,99 IC95% (0,77-1,27), p=0,938).

Sí que se hallaron diferencias en el cálculo de riesgo de DMT2 (Tabla 4.26). Se utilizó un modelo dominante donde los portadores del alelo menos frecuente se analizaron frente a los homocigotos mayoritarios. Las frecuencias genotípicas del rs2943641 fueron diferentes entre diabéticos y no diabéticos, con mayor porcentaje de individuos diabéticos entre los homocigotos CC. Los valores de riesgo de DMT2 obtenidos mostraban que los homocigotos CC presentaban mayor riesgo de DMT2 que los portadores del alelo T ($p=0,033$), incluso tras ajustar por sexo y edad ($p=0,007$). En el caso del polimorfismo rs2943634, no se encontró diferencias en la prevalencia de la DMT2 respecto al genotipo ($p=0,243$). Se observó que los homocigotos CC presentaban mayor riesgo de DMT2 respecto a los portadores del alelo A, pero no fue significativo.

Tabla 4.26.- Análisis del riesgo de DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 y del polimorfismo rs2943634 en la población estudiada

Genotipo	DMT2 %	No DMT2 %	P ¹	OR (IC 95%) CC vs CT +TT	P ²	OR (IC 95%) CC vs CT +TT	P ³
rs2943641							
CC	45,2	38,5	0,033	1,32 (1,02 - 1,70)	0,033	1,43 (1,10 - 1,86)	0,007
CT	45,4	46,5					
TT	9,4	14,7					
rs2943634				CC vs AC+AA		12 + 22 vs 11	
AA	6,7	12,1	0,243	1,10 (0,85 - 1,42)	0,446	1,15 (0,88 - 1,49)	0,305
AC	47,1	44,1					
CC	46,2	43,8					

11: homocigoto mayoritario; 12: heterocigoto; 22: homocigoto minoritario. P¹: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre diabéticos y no diabéticos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple. P³: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

Por otro lado, se analizó el desequilibrio de ligamiento existente entre los dos polimorfismos. Se mostró que los polimorfismos rs2943634 y rs2943641 se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento (Figura 4.14).

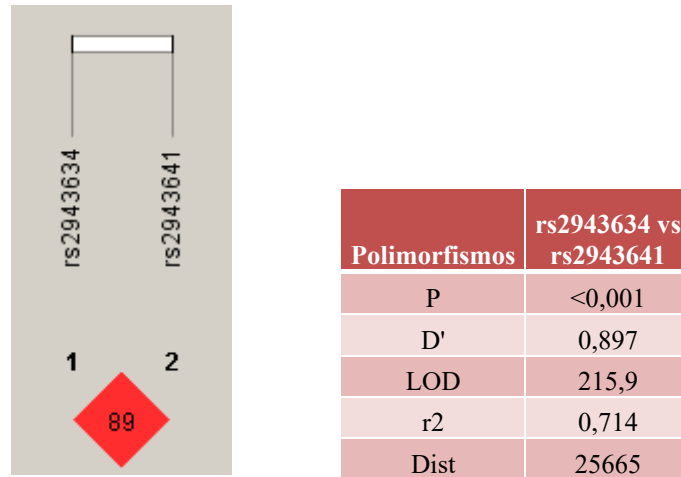


Figura 4.14.- Gráfico de disequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs2943634 y rs2943641 del gen IRS1 y tabla con los parámetros medidos para el disequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de disequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r²: coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci

Los dos polimorfismos mostraron asociación con la concentración de glucosa plasmática, por ello, se analizó si existían diferencias en este parámetro al comparar los individuos portadores del alelo T y A, respectivamente frente a los individuos que poseían el haplotipo homocigoto mutado para ambos polimorfismos (CC y CC) (Tabla 4.27). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de glucosa, incluso al ajustar por factores de confusión ($p=0,001$), donde el haplotipo CC/CC presentaba mayores niveles de glucosa. Se analizó la frecuencia entre diabéticos y no diabéticos según el haplotipo formado por ambos polimorfismos quedándose estas diferencias al límite de la significación ($p=0,079$). Por último, se analizó el riesgo de DMT2 en función de estos haplotipos donde se mostraba que el haplotipo Port.T/Port.A presentaba menor riesgo de DMT2 frente al haplotipo CC/CC manteniéndose en el límite de la significación al ajustar por edad y sexo ($p=0,055$).

Tabla 4.27.- Valores medios de concentración de glucosa según el haplotipo de los polimorfismos rs2943641 y rs2943634 del gen IRS1 en la población estudiada y análisis del riesgo de DMT2 según estos haplotipos

	Glucosa (mg/dl)	P ¹	OR (IC95%) P ²	OR (IC95%) P ³
Port. T/Port. A Media±DS	116,4±35,4	0,002**	0,81 (0,62-1,07)	0,76 (0,58-1,01)
CC/CC Media±DS	125,2±43,4		P=0,139	P=0,055

Port.: portadores; 1: p-valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student. *: p-valor >0,050 de comparación de medias tras ajustar por edad, sexo, obesidad, tabaco, actividad física y adherencia a la DM. **: p-valor <0,050 de comparación de medias tras ajustar por edad, sexo, obesidad, tabaco, actividad física y adherencia a la DM. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple. P³: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

4.2.4.2.4.- Polimorfismo rs1052133 del gen OGG1

En el siguiente apartado se mostraran los resultados más relevantes del polimorfismo rs1052133 localizado en el gen OGG1. Se realizaron los análisis de asociación con parámetros antropométricos y bioquímicos según el genotipo de este polimorfismo sin encontrar diferencias significativas. Tampoco se vieron diferencias entre estas variables y el genotipo entre hombres y mujeres y tampoco en función de la obesidad y la DMT2.

Tras la obtención de estos resultados, se estudió la prevalencia de este polimorfismo entre obesos y no obesos y diabéticos y no diabéticos, así como el riesgo de obesidad y DMT2 asociado al mismo. No se observaron diferencias en la prevalencia de obesidad según el genotipo ($p=0,172$) y tampoco en el riesgo de obesidad (OR: 1,24 IC95% (0,96-1,61) $p=0,092$). En el caso de la DMT2, tampoco hubo diferencias en la prevalencia de la misma según el genotipo ni del riesgo de DMT2 (OR: 0,90 IC95% (0,69-1,17) $p=0,445$).

4.2.4.3.- Estudio de polimorfismos de genes relacionados con el ancestro genético

En este apartado se analizaron el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK, el polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C, el polimorfismo rs2116830 del gen KCNMA1, el polimorfismo rs6086473 del gen PLCB1, el polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16, el polimorfismo rs10509954, el polimorfismo rs293553, el polimorfismo rs822759, el polimorfismo rs26891982 del gen SLC45A2 y el polimorfismo rs17638989 del gen ZNF564.

En la tabla 4.28 se muestran las frecuencias genotípicas en población total y según el sexo de estos polimorfismos, así como las frecuencias alélicas para cada uno de ellos. No se encontraron diferencias por sexo en los polimorfismos excepto en el rs822759, donde la diferencia sí fue significativa ($P=0,011$).

La distribución de los genotipos de estos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,324$; $p=0,343$; $p=0,069$; $p=0,719$; $p=0,123$; $p=0,137$; $p=0,109$; $p=0,646$; $p=0,869$ y $p=0,356$ respectivamente).

En todos los polimorfismos, excepto el rs17638989 del gen ZNF664, se agrupó el genotipo menos prevalente junto con el heterocigoto para aumentar el poder estadístico en el análisis de los resultados frente al genotipo homocigoto más prevalente.

Tabla 4.28.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con el ancestro genético en la población estudiada y en función de sexo

Gen	Polimorfismos	Genotipo	Población total	Frec alélica	Hombres	Mujeres	P
CLNK	rs2014303	AA (%)	n=1027 5,1	A=0,213 C=0,787	n=380 6,8 33,9 59,2	n=647 4 31,7 64,3	0,077
		AC (%)	32,5				
		CC (%)	62,4				
FAM5C	rs2419063	AA (%)	n=950 82,9	A=0,912 G=0,088	n=351 82,9 16,8 0,3	n=599 83 16,4 0,7	0,725
		AG (%)	16,5				
		GG (%)	0,5				
KCNMA1	rs2116830	CC (%)	n=1012 61,5	C=0,778 A=0,222	n=375 62,4 30,9 6,7	n=637 60,9 33,6 5,5	0,564
		CA (%)	32,6				
		AA (%)	5,9				
PLCB1	rs6086473	CC (%)	n=930 50,0	C=0,705 T=0,295	n=342 49,1 40,4 10,5	n=588 50,5 41,5 8	0,426
		CT (%)	41,1				
		TT (%)	8,9				
PRDM16	rs11807062	AA (%)	n=1016 72,4	A=0,847 C=0,153	n=379 74,1 23,7 2,1	n=637 71,4 25,1 3,5	0,392
		AC (%)	24,6				
		CC (%)	3,0				
	rs10509954	AA (%)	n=1029 1,2	A=0,089 G=0,911	n=379 1,1 14,2 84,7	n=650 1,2 16,2 82,6	0,687
		AG (%)	15,5				
		GG (%)	83,4				
	rs293553	AA (%)	n=1025 44,7	A=0,660 G=0,340	n=380 48,2 40,3 11,6	n=645 42,6 44 13,3	0,222
		AG (%)	42,6				
		GG (%)	12,7				
	rs822759	GG (%)	n=1015 47,0	G=0,683 T=0,317	n=378 52,6 39,4 7,9	n=637 43,6 44,6 11,8	0,011
		GT (%)	42,7				
		TT (%)	10,3				
SLC45A2	rs16891982	CC (%)	n=1024 1,8	C=0,130 G=0,870	n=382 1,3 22,0 76,7	n=642 2 22,9 75,1	0,647
		CG (%)	22,6				
		GG (%)	75,7				
ZNF564	rs17638989	CC (%)	n=987 31,1	C=0,551 T=0,449	n=370 34,1 45,4 20,5	n=617 29,3 49,6 21,1	0,282
		TC (%)	48,0				
		TT (%)	20,9				

P: Valor de la P obtenido mediante un test Chi-cuadrado al comparar las frecuencias genotípicas según el sexo

- Los resultados del análisis de asociación del polimorfismo rs2014303 de gen CLNK con datos antropométricos y bioquímicos se muestran en la tabla 4.29. Se encontró una diferencia en la concentración media de c-LDL, donde los portadores del alelo A presentaban mayores niveles que los individuos homocigotos CC. Estos resultados alcanzaron la significación estadística ($p=0,016$) que se mantuvo después de ajustar por los factores de confusión ($p=0,035$). Para el resto de datos antropométricos y bioquímicos no se obtuvieron diferencias según el genotipo. No se detectaron diferencias en los resultados en función del sexo, la obesidad y la DMT2.

Tabla 4.29.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2014303 del gen CLNK en la población estudiada

	AA+AC (n=386)	CC (n=641)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	66±6	67±6	0,880
Peso (kg)	76,6±11,4	76,1±12,3	0,558
IMC (kg/m ²)	30,3±4,4	30,3±4,4	0,943
Cintura (cm)	103,0±12,0	102,5±11,9	0,517
CT (mg/dl)	208,6±39,8	204,6±38,0	0,111
c-LDL (mg/dl)	131,5±35,5	125,9±35,0	0,016**
c-HDL (mg/dl)	52,2±12,1	53,1±13,5	0,298
TG (mg/dl)	125,3±61,3	128,8±67,6	0,500
Glucosa (mg/dl)	116,8±38,5	120,8±38,7	0,110
PAS (mmHg)	146,7±19,8	146,0±20,2	0,600
PAD (mmHg)	81,9±10,7	81,1±10,5	0,224

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

Posteriormente se estudió la prevalencia de este polimorfismo entre obesos y no obesos, donde no se detectaron diferencias según el genotipo ni diferencias en el riesgo de obesidad (OR=1,03 IC95% (0,80-1,33) p=0,803). Analizando la prevalencia de este polimorfismo entre diabéticos y no diabéticos, tampoco hubo diferencias en la prevalencia ni en el riesgo de DMT2 (OR=0,97 IC95% (0,75-1,26), p=0,845).

- El siguiente polimorfismo analizado fue el rs2419063 localizado en el gen FAM5C. Se analizaron las posibles asociaciones entre variables antropométricas y bioquímicas según el genotipo de este polimorfismo (tabla 4.30). En el caso de los parámetros antropométricos, los individuos con genotipo AA mostraron menor perímetro de cintura que los portadores del alelo G, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p=0,010), sin mantenerla tras ajustar por factores de confusión (p=0,075). También se observó que los homocigotos AA mostraban mayor concentración de c-HDL que los portadores del alelo G aunque perdió la significación tras ajustar por factores de confusión (p=0,145).

Tabla 4.30.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C en la población estudiada

	AA (n=788)	AG+GG (n=162)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	66±6	0,415
Peso (kg)	76,1±12,1	77,3±11,6	0,252
IMC (kg/m ²)	30,2±4,4	30,7±4,5	0,160
Cintura (cm)	102,0±12,1	104,8±11,4	0,010*
CT (mg/dl)	205,7±38,6	207,0±40,3	0,703
c-LDL (mg/dl)	127,3±35,1	130,7±36,3	0,272
c-HDL (mg/dl)	53,3±13,4	50,9±11,7	0,038*
TG (mg/dl)	125,6±63,6	133,9±76,2	0,362
Glucosa (mg/dl)	118,5±37,9	116,3±35,5	0,495
PAS (mmHg)	145,9±19,9	148,4±20,4	0,144
PAD (mmHg)	81,2±10,5	82,7±11,3	0,121

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

No se encontraron diferencias en el análisis según el sexo, la obesidad y la DMT2. Al analizar la prevalencia entre obesos y no obesos y diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo, tampoco hubo diferencias en el riesgo de obesidad entre el homocigoto AA frente a los portadores del alelo G (OR=1,18 IC95% (0,84-1,66) p=0,327), ni tampoco se hallaron diferencias en el riesgo de DMT2 (OR=0,95 IC95% (0,67-1,33) p=0,757).

- El polimorfismo rs2116830 del gen KCNMA1 no presentó asociaciones con parámetros antropométricos ni con bioquímicos estadísticamente significativas. Tampoco se encontraron diferencias entre hombres y mujeres, obesos y no obesos ni entre diabético y no diabéticos.

El análisis de la prevalencia entre obesos y no obesos en función del genotipo no presentó diferencias, ni tampoco en el riesgo de obesidad (OR=1,07 (0,83-1,38), p=0,605). Los mismos resultados se encontraron en el caso de DMT2, donde no se halló diferencias en la prevalencia de diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs2116830. Tampoco hubo diferencias en el riesgo de DMT2 (OR=0,91 (0,71-1,18), p=0,474).

- El polimorfismo rs6086473 se encuentra localizado en el gen PLBC1. En este polimorfismo se observó diferencias en los valores de cintura y PAD (tabla 4.31). Los individuos homocigotos CC presentaban mayor perímetro de cintura y mayor PAD que los portadores del alelo T, quedándose ambos valores en el límite de la significación (p=0,059 y p=0,054 respectivamente).

Tabla 4.31.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs6086473 del gen PLBC1 en la población estudiada

	CC (n=465)	CT+TT (n=465)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	66±6	67±6	0,167
Peso (kg)	77,1±12,1	75,8±12,1	0,104
IMC (kg/m ²)	30,6±4,5	30,3±4,4	0,304
Cintura (cm)	103,6±12,2	102,1±11,8	0,059
CT (mg/dl)	206,1±37,9	206,1±39,4	0,998
c-LDL (mg/dl)	128,4±36,2	127,9±34,3	0,815
c-HDL (mg/dl)	52,6±12,4	53,3±13,8	0,449
TG (mg/dl)	126,5±68,6	124,6±61,4	0,858
Glucosa (mg/dl)	120,6±39,3	118,7±38,3	0,464
PAS (mmHg)	146,7±19,8	146,4±20,2	0,838
PAD (mmHg)	82,1±10,2	80,7±10,8	0,054

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.

Al realizar los análisis según el sexo, tanto hombres como mujeres presentaron diferencias significativas en la concentración de c-HDL según el genotipo. En el caso de los hombres, los individuos CC presentaban mayor concentración de c-HDL que los individuos portadores del alelo T (CC: 49,3±11,1 mg/dl; CT+TT: 46,8±10,3 mg/dl p=0,035). En cambio, las mujeres con genotipo CC presentaban menor concentración de c-HDL que las mujeres portadoras del alelo T (CC: 54,4±12,7 mg/dl; CT+TT: 57,1±14,1 mg/dl p=0,016). (Figura 4.15). La interacción del polimorfismo y el sexo fue significativa incluso al ajustar por edad (p int=0,002).

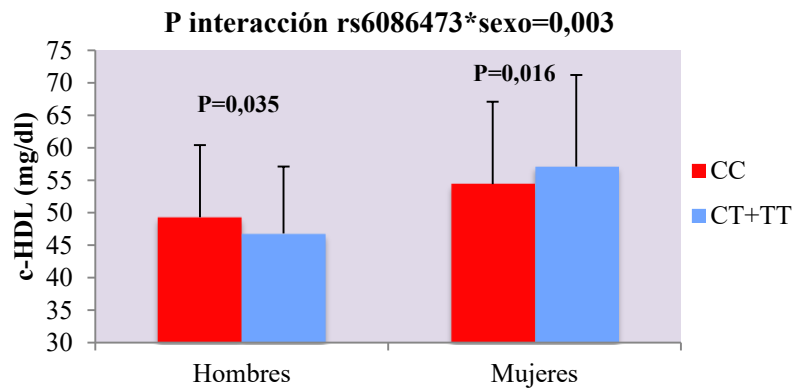


Figura 4.15.- Medida de la concentración de c-HDL entre hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs6086473 del gen PLBC1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

No se encontraron diferencias en los análisis entre obesos y no obesos ni entre diabéticos y no diabéticos. Tampoco se observaron diferencias en la prevalencia según el genotipo en función de la obesidad ni la DMT2. El cálculo del riesgo de obesidad (OR=0,93 IC95% (0,72-1,20) $p=0,555$) y de DMT2 (OR=0,91 IC95% (0,70-1,18) $p=0,471$) tampoco mostró diferencias.

- El siguiente polimorfismo analizado fue rs11807062 situado en el gen PRDM16. En el análisis inicial de diferencias entre los parámetros antropométricos y bioquímicos según el genotipo no mostró ninguna diferencia significativa. Tampoco hubo diferencias entre hombres y mujeres ni entre diabéticos y no diabéticos.

En relación con la obesidad, se observó una diferencia de peso en función del genotipo. Los individuos obesos homocigotos AA presentaban menor peso que los participantes obesos portadores del alelo C (AA: $83,2 \pm 10,1$ kg; AC+CC: $85,0 \pm 10,4$ kg; $p=0,083$). Dentro de la población no obesa ocurría que el genotipo AA presentaba mayor peso que los portadores del alelo C (AA: $69,5 \pm 9,2$ kg; AC+CC: $67,7 \pm 9,3$ kg; $p=0,026$) (Figura 4.16). La significación se mantuvo al ajustar por edad y sexo ($p_{int}=0,020$).

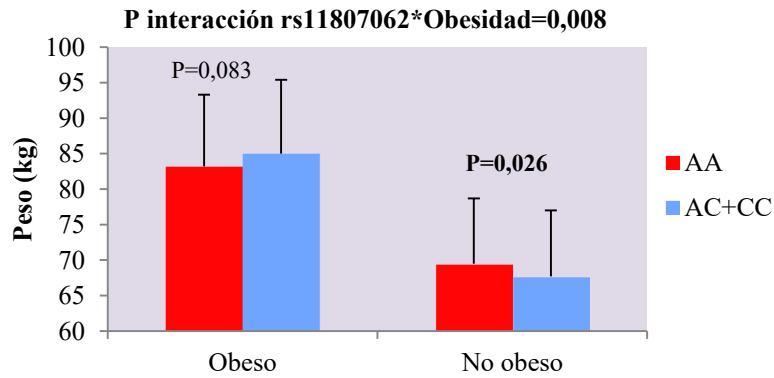


Figura 4.16.- Medida del peso entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs1180062 del gen PRDM16 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Debido a este resultado, se analizó la prevalencia de la obesidad según el genotipo aunque no mostró diferencias significativas. Tampoco hubo diferencias en el riesgo de obesidad (OR=1,01 IC95% (0,76-1,32) $p=0,969$). No observaron diferencias en la prevalencia y riesgo de DMT2.

- El polimorfismo r10509954 fue el siguiente polimorfismo relacionado con el ancestro genético que se estudió. En el análisis inicial no se encontraron diferencias significativas en variables antropométricas y bioquímicas según el genotipo. Tampoco hubo heterogeneidad en los resultados entre obesos y no obesos ni entre diabéticos ni no diabéticos.

A continuación, se examinaron las posibles asociaciones de estos parámetros antropométricos y bioquímicos tanto en hombres como en mujeres, donde se encontraron interacciones significativas del polimorfismo con respecto al sexo en el peso (p interacción=0,018), el IMC (p interacción=0,004) y la cintura (p interacción=0,013) mientras que en los niveles de glucosa se quedó en el límite estadístico (p interacción=0,064). En el caso de los hombres, no se encontraron diferencias significativas en estos cuatro parámetros. En el caso de las mujeres, los resultados mostraron que las portadoras del alelo A presentaban menor peso, menor IMC, menor perímetro de cintura y menor nivel de glucosa frente a las mujeres homocigotas GG, siendo todas estas diferencias significativas (Tabla 4.32).

Tabla 4.32.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de glucosa según el genotipo del polimorfismo rs10509954 en la población estudiada

	Hombres		p ¹	Mujeres		p ¹
	AA+AG (n=58)	GG (n=321)		AA+AG (n=113)	GG (n=537)	
	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
Peso (kg)	83,2 ± 10,0	80,7 ± 12,1	0,150	71,2 ± 11,2	74,1 ± 11,3	0,014**
IMC (kg/m ²)	30,2 ± 3,4	29,2 ± 3,9	0,084	29,8 ± 4,4	31,1 ± 4,6	0,006**
Cintura (cm)	105,8 ± 11,9	104,4 ± 11,6	0,400	98,7 ± 11,8	102,2 ± 12,6	0,006**
Glucosa (mg/dl)	129,1 ± 38,8	125,1 ± 41,0	0,537	108,7 ± 28,2	116,4 ± 38,3	0,015**

IMC: índice de masa corporal. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

Así mismo, se examinó el riesgo de obesidad en función del genotipo del polimorfismo, donde no se encontraron diferencias (OR: 0,93 IC95% (0,67-1,30) p=0,686). En cambio, en el análisis del riesgo de DMT2 se observó que los portadores del alelo A presentaban menor riesgo de DMT2 que los homocigotos GG siendo esta diferencia significativa al ajustar por edad y sexo (p=0,014) (Tabla 4.33).

Tabla 4.33.- Análisis del riesgo de DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs10509954 en la población estudiada

Genotipo	DMT2 %	No DMT2 %	P ¹	OR (IC 95%) AA + AG vs GG	P ²	OR (IC 95%) AA + AG vs GG	P ³
rs10509954							
AA	0,9	1,4	0,010	0,64 (0,45 – 0,90)	0,010	0,65 (0,46 – 0,92)	0,014
AG	12,4	18,0					
GG	86,7	80,6					

P¹: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre diabéticos/no diabéticos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple. P³: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

Debido a los resultados obtenidos al hacer los análisis en función del sexo, se volvió a calcular el riesgo de obesidad y DMT2 en función del genotipo del polimorfismo rs10509954 en hombres y mujeres por separado. Con respecto a la obesidad, se encontró una interacción entre este polimorfismo y el sexo (p interacción=0,007). Los hombres portadores del alelo A presentaban mayor riesgo de obesidad que el genotipo GG, quedándose estos resultados al límite de la significación estadística tras ajustar por edad y sexo (OR: 1,72 IC95% (0,98-3,03) $p=0,060$). En cambio, en las mujeres portadoras del alelo A presentaban menor riesgo de obesidad que las mujeres GG, siendo este resultados estadísticamente significativo ($p=0,048$). Tras ajustar por edad, se quedó en el límite de la significación ($p=0,073$) (Figura 4.17).

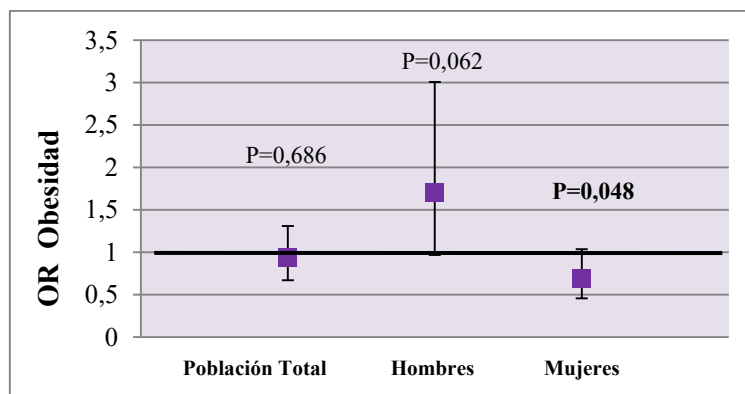


Figura 4.17.- Representación del riesgo de obesidad (OR) asociado al polimorfismo rs10509954 en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad

Al analizar el riesgo de DMT2 en función de este polimorfismo, en el caso de los hombres no se encontró diferencias significativas (OR: 0,65 IC95%(0,37-1,14) $p=0,132$). En el caso de las mujeres, se observó que las mujeres portadoras del alelo A presentaban menor riesgo de DMT2 con respecto al otro genotipo, (OR: 0,64 IC95% (0,42-0,99) $p=0,046$) manteniéndose la significación estadística de este resultado tras ajustar por edad ($p=0,034$) (Figura 4.18).

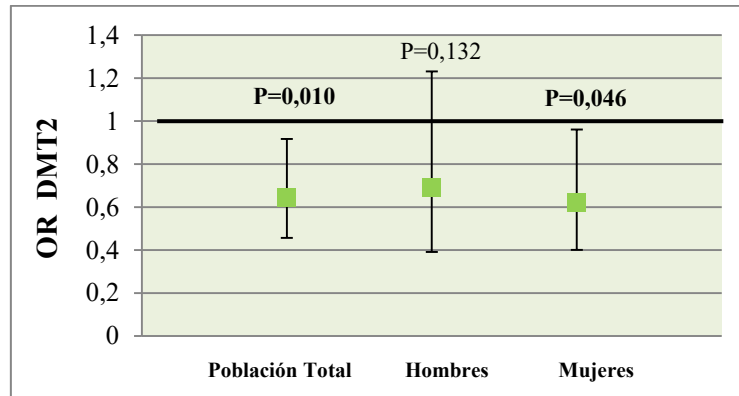


Figura 4.18.- Representación del riesgo de DMT2 (OR) asociado al polimorfismo rs10509954 en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad

- A continuación se mostraran los resultados obtenidos del polimorfismo rs293553. Los resultados principales del análisis de las asociaciones con parámetros antropométricos y bioquímicos según el genotipo no mostraron diferencias significativas. Tampoco mostraron diferencias en estos parámetros ni tras segmentar por sexo o DMT2.

A continuación de realizaron los análisis en función de la obesidad, donde se hallaron diferencias en la concentración de la glucosa. En la población obesa, no hubo diferencias significativas en función del genotipo (AA: $120,7 \pm 35,5$ mg/dl; AG+GG: $121,5 \pm 36,0$ mg/dl; $p=0,814$). En cambio, dentro de los individuos no obesos, el genotipo AA presentaba mayor concentración de glucosa que los genotipos AG y GG (AA: $121,7 \pm 46,3$ mg/dl; AG+GG: $113,4 \pm 36,4$; $p=0,026$) (Figura 4.19). La interacción no fue significativa ($p_{int}=0,064$) pero quedó en el límite de la significación tras ajustar por edad y sexo ($p_{int}=0,055$).

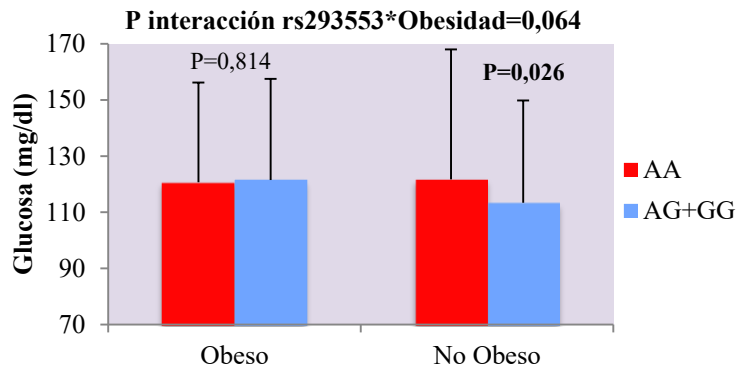


Figura 4.19.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs293553 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Por último se analizó la prevalencia del polimorfismo entre obesos y no obesos, así como el riesgo de obesidad asociado al mismo. Los individuos AA presentaron mayor porcentaje de individuos no obesos mientras que entre los GG había mayor prevalencia de obesos, quedándose estas diferencias en el límite de la significación ($p=0,061$). En el riesgo de obesidad, no se encontraron diferencias significativas (OR: 0,81 IC95% (0,64-1,04) $p=0,103$). No hubo diferencias en la prevalencia y riesgo de DMT2.

- A continuación se presentarán los resultados obtenidos del polimorfismo rs822759. En la tabla 4.34 Se presentan los resultados más relevantes del análisis de las posibles asociaciones según el genotipo de este polimorfismo con variables antropométricas y bioquímicas. No se encontraron diferencias en los datos antropométricos. En cambio, al comparar los parámetros bioquímicos se observó una diferencia tanto en el CT como en el c-LDL. Los individuos con genotipo homocigoto GG presentaban menor concentración de ambas variables en comparación con los portadores del alelo T, siendo estas diferencias estadísticamente significativas tras ajustar por factores de confusión ($p=0,007$ en ambos casos). No se encontró heterogeneidad en los resultados según el sexo, ni entre obesos y no obesos ni entre diabéticos y no diabéticos.

En el estudio de la prevalencia del polimorfismo según la obesidad y la DMT2 no se encontraron diferencias significativas en ningún caso. Lo mismo ocurrió en el análisis del riesgo de estas patologías asociado al polimorfismo, donde no se obtuvo ningún resultado significativo para obesidad (OR=0,85 IC95% (0,67-1,09), p=0,212) ni para DMT2 (OR=1,03 (0,80-1,32), p=0,830).

Tabla 4.34.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs822759 en la población estudiada

	GG (n=477)	GT+TT (n=538)	p¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	66±6	0,268
Peso (kg)	76,6±12,3	76,1±11,8	0,509
IMC (kg/m ²)	30,3±4,5	30,3±4,3	0,809
Cintura (cm)	102,9±12,2	102,6±11,8	0,657
CT (mg/dl)	201,6±37,7	209,8±39,0	0,001**
c-LDL (mg/dl)	124,7±33,6	130,7±36,3	0,007**
c-HDL (mg/dl)	52,1±13,0	53,4±13,1	0,108
TG (mg/dl)	124,8±62,9	129,3±67,4	0,315
Glucosa (mg/dl)	118,6±35,3	119,7±41,3	0,631
PAS (mmHg)	146,5±20,6	146,0±19,6	0,714
PAD (mmHg)	81,5±10,5	81,3±10,7	0,788

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

- El siguiente polimorfismo analizado fue el rs16891982 localizado en el gen SLC45A2. Los resultados iniciales mostraron una asociación del nivel de TG plasmáticos según el genotipo del polimorfismo (Tabla 4.35). Los portadores del alelo C presentaban menor concentración de TG (118,3±58,7 mg/dl) que los homocigotos GG (130,4±67,1 mg/dl), siendo estas diferencias significativas (p=0,014). Al ajustar por factores de confusión, el resultado quedó en el límite de la significación (p=0,052).

No se encontraron diferencias según el sexo, la obesidad y la DMT2. Tampoco hubo diferencias de prevalencia del polimorfismo en función de la obesidad ni de la DMT2 ni en el riesgo de estas patologías.

Tabla 4.35.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs16891982 del gen SLC45A2 en la población estudiada

	CC+CG (n=249)	GG (n=775)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	0,739
Peso (kg)	76,0±11,3	76,5±12,2	0,570
IMC (kg/m ²)	30,1±4,0	30,4±4,5	0,440
Cintura (cm)	102,2±11,9	103,0±12,0	0,400
CT (mg/dl)	204,5±39,7	206,4±38,6	0,507
c-LDL (mg/dl)	126,4±35,9	128,3±35,2	0,466
c-HDL (mg/dl)	53,8±13,3	52,4±12,9	0,150
TG (mg/dl)	118,3±58,7	130,4±67,1	0,014*
Glucosa (mg/dl)	119,4±39,2	119,2±38,4	0,943
PAS (mmHg)	145,9±19,3	146,4±20,4	0,721
PAD (mmHg)	81,1±10,5	81,5±10,6	0,648

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

- El último polimorfismo estudiado dentro de los asociados a ancestro genético fue el rs17638989 situado en el gen ZNF564, analizando los tres genotipos por separado. No se encontraron diferencias en los parámetros antropométricos y bioquímicos en función del genotipo. Tampoco hubo heterogeneidad en los resultados en función del sexo ni entre obesos y no obesos ni entre diabéticos y no diabéticos.

En el cálculo de la prevalencia y el riesgo de obesidad no hubo ningún resultado significativo (OR: 1,09 IC95% (0,83-1,42) $p=0,544$). Lo mismo ocurrió en los resultados en función de la DMT2 (OR: 0,91 IC95% (0,69-1,19) $p=0,473$).

4.2.4.4.- Estudio de polimorfismos de genes relacionados con obesidad y DMT2 determinados con el array de genotipado denso de GWAs

En este apartado se estudian los polimorfismos cuyo genotipo se obtuvo con el array de genotipado denso GWAs. Se analizaron los polimorfismos rs4671327 y rs11892385 del gen ASB3, los polimorfismos rs1063192 y rs3217986 del gen CDKN2B, los polimorfismos rs655497 y rs693370 del gen DMRTA1, el polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 y el polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B.

En la tabla 4.36 se muestran las frecuencias genotípicas de estos polimorfismos en población total y en función del sexo. Sólo se observaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas según sexo en el polimorfismo rs655497 del gen DMRTA1 ($p=0,034$). También se muestra en la tabla las frecuencias alélicas para cada polimorfismo.

La distribución de los genotipos de estos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,297$; $p=0,180$; $p=0,290$; $p=0,482$; $p=0,256$; $p=0,396$; $p=0,057$ y $p=0,948$ respectivamente).

En todos los polimorfismos, se agrupó el genotipo menos prevalente junto con el heterocigoto para aumentar el poder estadístico en el análisis de los datos frente al genotipo homocigoto más prevalente.

Tabla 4.36.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con la obesidad y DMT2 en la población estudiada y en función de sexo

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Población total	Frec alélica	Hombres	Mujeres	P
ASB3	rs4671327	TT (%)	n=1041 43,9	T=0,657 C=0,343	n=371 43,4	n=619 44,3	0,625
		CT (%)	43,6		45,8	41,8	
		CC (%)	12,5		10,8	13,9	
	rs11892385	AA (%)	n=1040 11,4	A=0,325 G=0,675	n=390 8,9	n=619 13,2	0,104
		AG (%)	42,0		44,3	40,5	
		GG (%)	46,5		46,8	46,2	
CDKN2B	rs1063192	TT (%)	n=1039 39,7	T=0,636 C=0,364	n=371 38,5	n=617 40,4	0,785
		CT (%)	47,8		48,2	47,6	
		CC (%)	12,5		13,2	12,0	
	rs3217986	AA (%)	n=1038 89,1	A=0,945 C=0,055	n=371 89,2	n=616 89,0	0,922
		AC (%)	10,7		10,5	10,9	
		CC (%)	0,2		0,3	0,2	
DMRTA1	rs655497	AA (%)	n=1042 55,6	A=0,741 G=0,259	n=372 52,2	n=619 57,8	0,034
		AG (%)	37,0		38,2	36,5	
		GG (%)	7,4		9,7	5,7	
	rs693370	AA (%)	n=1041 1,6	A=0,117 G=0,883	n=371 1,9	n=619 1,1	0,434
		AG (%)	20,1		21,3	19,2	
		GG (%)	78,3		76,8	79,6	
INAFM2	rs961090	TT (%)	n=1041 57,0	T=0,747 C=0,253	n=371 53,9	n=619 59,1	0,194
CT (%)		35,5	37,2		34,2		
CC (%)		7,5	8,9		6,6		
MTNR1B	rs10830963	CC (%)	n=1040 50,2	C=0,708 G=0,292	n=371 49,9	n=618 49,5	0,404
CG (%)		41,3	39,9		42,6		
GG (%)		8,6	10,2		7,9		

P: Valor de la P obtenido mediante un test Chi-cuadrado al comparar las frecuencias genotípicas según el sexo

4.2.4.4.1- Polimorfismos cerca del gen ASB3

Se estudiaron los polimorfismos rs4671327 y rs11892385, ambos variantes intergénicas situadas cerca del gen ASB3. En ambos casos, en el análisis se agrupó en genotipo homocigoto menos prevalente junto con el heterocigoto para comparar sus resultados frente al homocigoto más frecuente.

En la tabla 4.37 se muestran los resultados obtenidos al analizar la posible relación de ambos polimorfismo con variables antropométricas y bioquímicas. En el caso de rs4671327, los resultados mostraron una diferencia en la concentración de la glucosa, donde los portadores del alelo C presentaban mayor concentración que los homocigotos TT (121,4±39,8 mg/dl vs 116,2±36,2 mg/dl; p=0,035). Esta diferencia se quedaba al límite de la significación al ajustar por factores de confusión (p=0,059). También se encontró una diferencia en la PAD, donde los homocigotos TT presentaban mayor niveles (82,3±10,3 mmHg) que los individuos portadores del alelo C (80,8±10,8 mmHg), que se mantuvo significativa tras ajustar por variables de confusión (p=0,023).

Respecto al polimorfismo rs11892385 del gen ASB3, el análisis de la relación con variables antropométricas y bioquímicas mostró diferencias en la concentración de la glucosa en función del genotipo (tabla 4.43). Los individuos portadores del alelo A tenían mayor concentración de glucosa que los homocigotos GG (AA+AG: 121,7±39,5 mg/dl; GG: 116,0±36,5 mg/dl; p=0,021). Al ajustar por variables de confusión, se perdió la significación estadística (p=0,082).

Tabla 4.37.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4671327 (izquierda) y rs11892385 (derecha) del gen ASB3 en la población estudiada

	rs4671327		p ¹	rs11892385		p ¹
	TT (n=457)	CT+CC (n=584)		AA+AG (n=556)	GG (n=484)	
	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	66±6	67±6	0,035*	67±6	67±6	0,146
Peso (kg)	76,5±12,4	76,3±11,8	0,840	76,3±11,7	76,4±12,4	0,983
IMC (kg/m ²)	30,5±4,3	30,2±4,4	0,304	30,2±4,4	30,4±4,3	0,449
Cintura (cm)	102,4±11,8	102,8±11,7	0,604	102,8±11,7	102,5±11,9	0,692
CT (mg/dl)	205,6±36,7	206,1±40,7	0,859	207,1±40,5	204,7±37,2	0,353
c-LDL (mg/dl)	127,5±34,3	128,4±36,4	0,684	129,5±36,1	126,8±34,7	0,312
c-HDL (mg/dl)	52,4±13,4	53,0±12,9	0,471	53,3±12,9	52,2±13,1	0,182
TG (mg/dl)	128,4±63,4	126,0±67,3	0,390	125,9±67,1	128,2±63,8	0,447
Glucosa (mg/dl)	116,2±36,2	121,4±39,8	0,035*	121,7±39,5	116,0±36,5	0,021*
PAS (mmHg)	146,4±19,3	146,3±20,9	0,914	146,3±20,9	146,3±19,5	0,997
PAD (mmHg)	82,3±10,3	80,8±10,8	0,031**	81,1±10,8	81,9±10,3	0,184

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

A continuación se realizaron los mismos análisis en función del sexo, la DMT2 y la obesidad. No se encontraron diferencias para ninguno de los polimorfismos en función del sexo y la DMT2. En el caso de la obesidad, el análisis mostró diferencias de la concentración plasmática de glucosa en función del genotipo en ambos casos. En el polimorfismo rs4671327, no hubieron diferencias significativas de concentración en los individuos no obesos (TT: 116,5±38,5 mg/dl; CT+TT: 118,3±43,2 mg/dl; p=0,636). En cambio, los individuos obesos portadores del alelo C tenían mayor concentración de glucosa que los individuos TT (TT: 115,9±34,0 mg/dl; CT+CC: 124,6±35,8 mg/dl; p=0,007). Los resultados están representados en la figura 4.20.

Respecto al polimorfismo rs11892385, también existía una mayor diferencia de concentración en los individuos obesos en función del genotipo. Dentro del grupo de participantes no obesos, no se mostraron diferencias significativas (AG+GG: 118,6±42,9 mg/dl; GG: 115,6±38,5 mg/dl; $p=0,426$). En individuos obesos, los portadores del alelo A presentaban mayor concentración de glucosa (124,6±35,5 mg/dl) que los homocigotos GG (116,3±34,5 mg/dl), siendo esta diferencia significativa ($p=0,009$) (Figura 4.21).

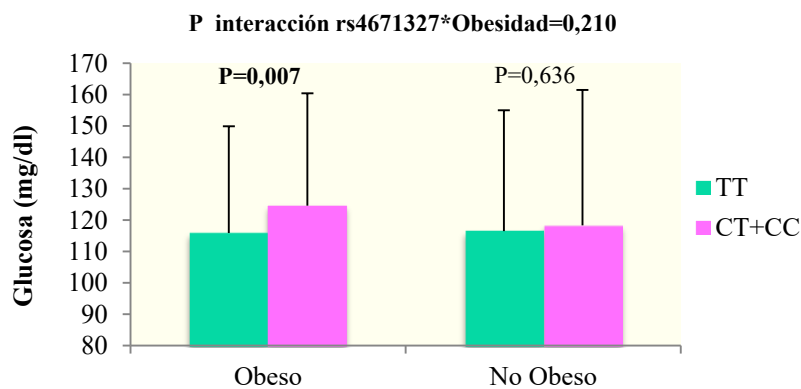


Figura 4.20.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs4671327 del gen ASB3 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

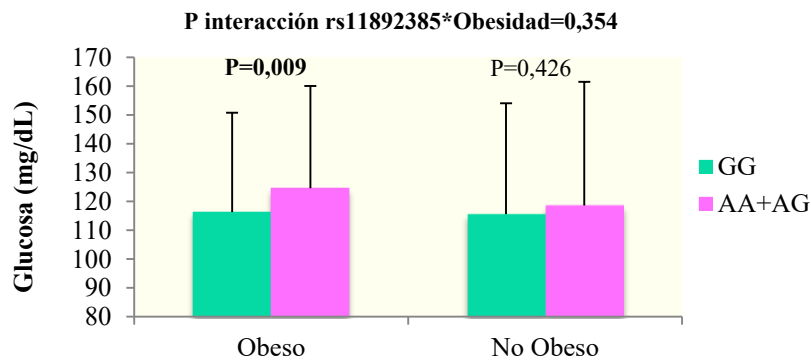


Figura 4.21.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs11892385 del gen ASB3 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Por último, se analizó la prevalencia y el riesgo de obesidad y DMT2. En el caso de la obesidad no hubo ningún resultado significativo en el polimorfismo rs4671327 (OR: 1,04 IC95% (0,81-1,34) $p=0,761$) ni en el polimorfismo rs11892385 significativo (OR: 1,01 IC95% (0,78-1,29) $p=0,965$). Tampoco se mostraron diferencias en los resultados en función de la DMT2 según el polimorfismo rs4671327 (OR: 0,81 IC95% (0,63-1,04) $p=0,102$). Tras ajustar por edad, sexo y obesidad, tampoco se obtuvieron resultados significativos ($p=0,171$). El cálculo del riesgo de DMT2 según el polimorfismo rs11892385 presentaba la misma situación, donde no se encontraron resultados significativos (OR: 1,26 IC95% (0,98-1,62) $p=0,075$), ni tras ajustar por las variables antes mencionadas ($p=0,101$).

A tenor de los resultados obtenidos, se realizó el cálculo del riesgo de DMT2 en función de la obesidad. Para el polimorfismo rs4671327 no se encontraron resultados significativos ni en obesos (OR: 0,75 IC95%(0,52-1,07) $p=0,111$) ni en participantes no obesos (OR: 0,87 IC95%(0,61-1,25) $p=0,463$). En el caso del polimorfismo rs11892385, en el grupo de individuos obesos se observó que los portadores del alelo A presentaban mayor riesgo de DMT2 (OR: 1,43 IC95%(1,00-2,04) $p=0,051$). El resultado se quedó al límite de la significación estadística al ajustar por edad y sexo (OR: 1,38 IC95%(0,96-1,90) $p=0,079$).

Tras estos análisis, se estudió el desequilibrio de ligamiento de ambos polimorfismos. Se observó que los polimorfismos rs4671327 y rs11892385 están en fuerte desequilibrio de ligamiento (Figura 4.22)

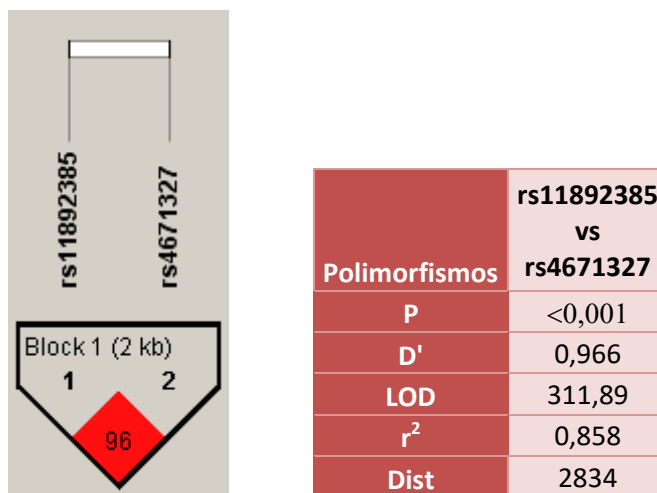


Figura 4.22.- Gráfico de disequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs11892385 y rs4671327 del gen ASB3 y tabla con los parámetros medidos para el disequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de disequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r²: coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci

Los dos polimorfismos mostraron asociación con la concentración de glucosa plasmática, por ello, se analizó si existían diferencias en estos parámetros al comparar los individuos portadores del alelo C (rs4671327) y A (rs11892385) frente a los individuos que poseían el haplotipo homocigoto mutado para ambos polimorfismos (TT y GG respectivamente) (Tabla 4.46). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de glucosa ($p=0,022$), donde los portadores del alelo C y A presentaban mayor concentración que el haplotipo TT/GG. El resultado se quedó en el límite de la significación estadística tras ajustar por factores de confusión ($p=0,067$). Se analizó la frecuencia entre diabéticos y no diabéticos según el haplotipo formado por ambos polimorfismos encontrando diferencias significativas ($p=0,046$). Dentro de los individuos diabéticos, había mayor porcentaje del genotipo Port C/Port A que individuos TT/GG (57,9 % vs 42,1% respectivamente), no encontrándose esta diferencia en individuos no diabéticos (52,2% vs 47,8%).

Por último, se analizó el riesgo de DMT2 en función de estos haplotipos donde se mostraba que el haplotipo Port.C/Port.A presentaba mayor riesgo de DMT2 frente al haplotipo TT/GG aunque no llegó a alcanzar este resultado la significación estadística (Tabla 4.38).

Tabla 4.38.- Valores medios de concentración de glucosa según el haplotipo de los polimorfismos rs4671327 y rs11892385 del gen ASB3 en la población estudiada y análisis del riesgo de DMT2 según estos haplotipos

	Glucosa (mg/dl)	P ¹	OR (IC95%) P ²	OR (IC95%) P ³
Port. C/Port. A Media±DS	121,7±39,5	0,022*	1,26 (0,97-1,63)	1,22 (0,94-1,59)
TT/GG Media±DS	115,9±35,9		P=0,080	P=0,130

Port.: portadores; 1: p-valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student.*: p-valor >0,050 de comparación de medias tras ajustar por edad, sexo, obesidad, DMT2, tabaco, actividad física y adherencia a la DM. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple. P³: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

4.2.4.4.2- Polimorfismos del gen CDKN2B

Se continuó el estudio analizando los polimorfismos rs1063192 y rs3217986, ambos situados en el gen CDKN2B. Como en casos anteriores, en el análisis se agrupó en genotipo homocigoto menos prevalente junto con el heterocigoto para comparar sus resultados frente al homocigoto más frecuente y aumentar el poder estadístico de los análisis.

En primer lugar se estudió si existían diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos en función de los genotipos en ambos polimorfismos (Tabla 4.39). En el caso del rs1063192, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros analizados. En el caso del rs3217986, sí que hubo un resultado significativo, concretamente en la concentración de c-HDL. Los portadores del alelo C presentaban mayor concentración plasmática que los homocigotos AA (p=0,043), siendo esta diferencia significativa tras ajustar por factores de confusión (p= 0,034).

Tabla 4.39. - Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs1063192 (izquierda) y rs3217986 (derecha) del gen CDKN2B en la población estudiada

	rs1063192		p ¹	rs3217986		p ¹
	TT (n=412)	CT+CC (n=627)		AA (n=925)	AC+CC (n=113)	
	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	0,328	67±6	67±6	0,379
Peso (kg)	76,2±12,5	76,5±11,7	0,738	76,5±11,9	75,7±13,1	0,520
IMC (kg/m ²)	30,4±4,2	30,3±4,4	0,729	30,4±4,3	29,8±4,7	0,155
Cintura (cm)	103,0±11,7	102,4±11,8	0,495	102,7±11,7	102,0±12,5	0,519
CT (mg/dl)	206,7±38,3	205,4±39,5	0,597	206,0±39,2	206,2±37,1	0,960
c-LDL (mg/dl)	128,6±35,2	127,6±35,7	0,653	128,2±35,6	127,5±34,0	0,842
c-HDL (mg/dl)	52,8±12,5	52,7±13,3	0,945	53,3±12,9	55,1±13,0	0,043**
TG (mg/dl)	129,9±69,5	125,3±62,9	0,499	128,0±66,1	118,2±61,9	0,107
Glucosa (mg/dl)	120,7±41,1	118,0±36,4	0,256	118,8±37,5	121,8±44,8	0,443
PAS (mmHg)	146,7±20,3	146,2±20,2	0,701	146,3±20,6	146,5±17,6	0,928
PAD (mmHg)	81,4±10,5	81,6±10,7	0,788	81,5±10,7	81,5±9,6	0,985

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student. *:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

A continuación se analizaron diferencias en estos parámetros en función del sexo o la obesidad, sin encontrar ninguna para ninguno de los dos polimorfismos. Al realizar estos mismos cálculos en función de la DMT2, aparecieron varias diferencias. En el polimorfismo rs1063192 de gen CDKN2B, la concentración de glucosa variaba en función de la DMT2, mientras que en individuos diabéticos, los homocigotos TT presentaban mayor concentración que los portadores C (148,6±42,9 mg/dl vs 140,4±39,3 mg/dl; p=0,039), en los participantes no diabéticos no se encontraban estas diferencias (Figura 4.23). La interacción se mantuvo significativa tras ajustar por edad y sexo (p=0,037).

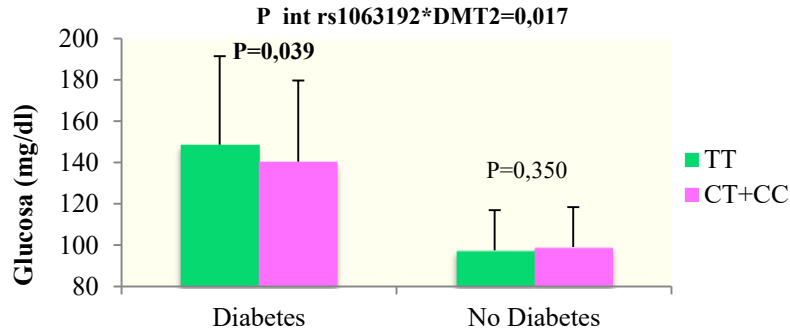


Figura 4.23.- Medida de la concentración de glucosa entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

En el caso del rs3217986, también se encontraron diferencias en función de la DMT2 pero, en esta ocasión, en la concentración de c-HDL. Se observó que los participantes diabéticos presentaban menores concentraciones de c-HDL que los no diabéticos, pero en diabéticos los valores eran similares para ambos genotipos. En cambio, en los individuos no diabéticos sí que presentaban diferencias en la concentración en función del genotipo. Los resultados mostraban que los portadores del alelo C presentaban mayor concentración de c-HDL que los homocigotos AA, siendo la diferencia estadísticamente significativa (AA: $54,2 \pm 13,3$ mg/dl; AC+CC: $59,3 \pm 12,9$ mg/dl; $p=0,006$) (Figura 4.24). La interacción se mantuvo significativa tras ajustar por edad y sexo ($p=0,036$).

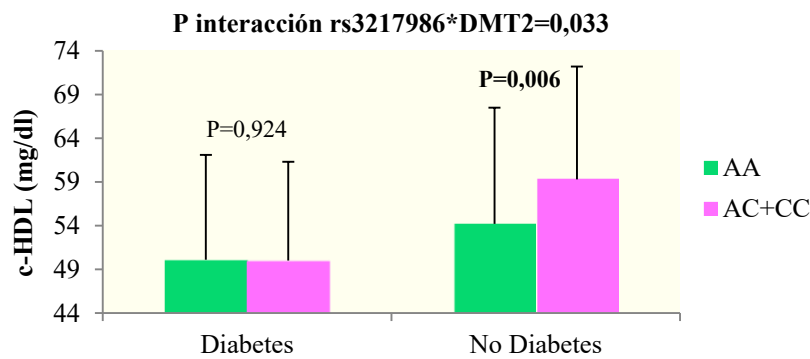


Figura 4.24.- Medida de la concentración de c-HDL entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs3217986 del gen CDKN2B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Con respecto al cálculo de la prevalencia y el riesgo de la obesidad, no se obtuvieron resultados significativos ni en el polimorfismo rs1063192 (OR: 1,10 IC95% (0,85-1,41) $p=0,483$) ni en el polimorfismo rs3217986 (OR: 1,34 IC95% (0,89-2,00) $p=0,158$). En el caso de la DMT2, tampoco se observaron resultados significativos en el cálculo de la prevalencia y el riesgo de la patología en el rs1063192 (OR: 1,01 IC95% (0,78-1,30) $p=0,962$) ni en el rs3217986 (OR: 1,05 IC95% (0,70-1,56) $p=0,823$).

Debido a la localización de ambos polimorfismos en el gen CDKN2, se procedió al análisis del desequilibrio de ligamiento donde se mostró que ambos estaban en total desequilibrio (Figura 4.25).

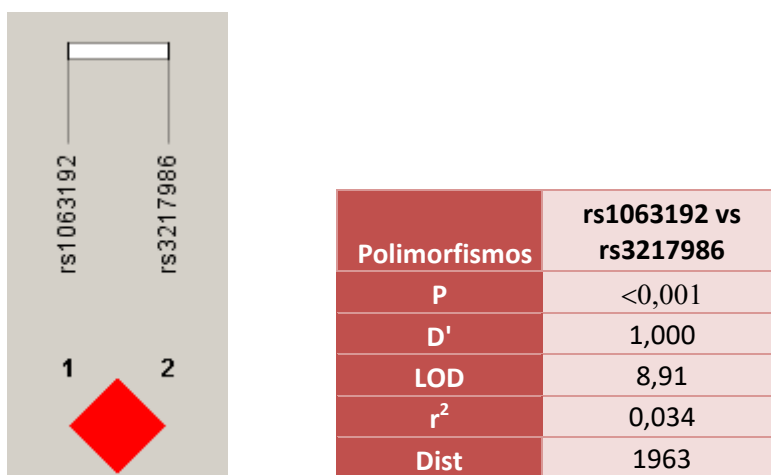


Figura 4.25.- Gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1063192 y rs3217986 del gen CDKN2B y tabla con los parámetros medidos para el desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r^2 : coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci

Se agruparon los individuos portadores del alelo más frecuente (TT/AA respectivamente) frente a los individuos portadores del alelo mutado (Port C/Port C) y se analizó si existían diferencias en las concentraciones de glucosa y de c-HDL, como ocurría en los resultados previos (Tabla 4.40).

En el caso de la glucosa, no se encontraron diferencias en su concentración en función del haplotipo. En el caso de de la concentración de c-HDL, los Port C/Port C presentaban mayor concentración que los individuos TT/AA, quedándose en el límite de la significación ($p=0,079$). Tras ajustar por sexo, edad y DMT2, la diferencia sí que fue estadísticamente significativa ($p=0,023$). También se precedió al cálculo del riesgo de DMT2 sin encontrar resultados significativos (Tabla 4.46).

Tabla 4.40.- Valores medios de concentración de glucosa y c-HDL según el haplotipo de los polimorfismos rs1063192 y rs3217986 del gen CDKN2B en la población estudiada y análisis del riesgo de DMT2 según estos haplotipos

	Glucosa (mg/dl)	P ¹	c-HDL (mg/dl)	P ¹	OR (IC95%) P ²
AA+TT Media±DS	120,67±40,2	0,837	52,3±12,6	0,079**	0,98 (0,53-1,84)
Port C_Port C Media±DS	122,0,0±43,5		56,0±15,5		P=0,963

Port.: portadores; 1: p-valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student. *:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, sexo y DMT2. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, sexo y DMT2. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple.

Por último se analizó si la concentración de c-HDL variaba en función del haplotipo teniendo en cuenta la existencia o no de DMT2. Los individuos diabéticos de la población estudiada presentaban una concentración similar de c-HDL. Pero los participantes no diabéticos con el haplotipo Port C/Port C presentaban mayor c-HDL que los no diabéticos con haplotipo AA+TT (Figura 4.26).

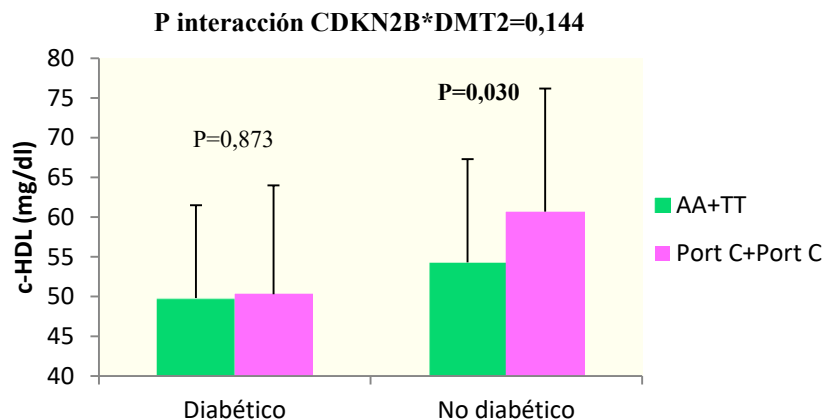


Figura 4.26.- Medida de la concentración de c-HDL entre diabéticos y no diabéticos según los haplotipos de los polimorfismos rs1063192 y rs3217986 del gen CDKN2B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

4.2.4.4.3- Polimorfismos del gen DMRTA1

En el siguiente apartado se mostrarán los resultados obtenidos del estudio del polimorfismo rs655497 y del polimorfismo rs693370 ambos situados en el gen DMRTA1. Siguiendo la línea de los resultados anteriores, en el análisis se agrupó en genotipo homocigoto menos prevalente junto con el heterocigoto para comparar sus resultados frente al homocigoto más frecuente y aumentar el poder estadístico de los análisis.

Se analizó la relación entre variables antropométricas y bioquímicas y estos dos polimorfismos del gen DMRTA1. Sólo se obtuvieron resultados significativos en el polimorfismo rs655497 (Tabla 4.41). Se observó que los individuos homocigotos AA presentaban mayor peso ($p=0,040$) y mayor IMC ($p=0,002$) que los portadores del alelo G, aunque la significación estadística de estos resultados se perdió al ajustar por variables de confusión.

No se encontraron diferencias entre las variables antropométricas y bioquímicas en función del genotipo de los dos polimorfismos al realizar el análisis en función del sexo, la obesidad o la DMT2.

Tabla 4.41. - Variables antropométricas, niveles plasmáticos de, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs655497 (izquierda) y rs693370 (derecha) del gen DMRTA1 en la población estudiada

	rs655497		p ¹	rs693370		p ¹
	AA (n=579)	AG+GG (n=463)		AA+AG (n=226)	GG (n=815)	
	Media ± DS	Media ± DS		Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	0,780	66±6	67±6	0,212
Peso (kg)	77,1±12,2	75,5±11,8	0,040*	76,4±12,4	76,4±11,9	0,959
IMC (kg/m ²)	30,7±4,4	29,8±4,3	0,002*	30,1±4,5	30,4±4,3	0,353
Cintura (cm)	103,1±11,8	102,1±11,7	0,173	102,5±11,6	102,7±11,8	0,864
CT (mg/dl)	206,4±40,5	205,3±37,1	0,661	204,2±37,6	206,3±39,3	0,504
c-LDL (mg/dl)	128,1±36,4	127,9±34,3	0,932	126,3±34,3	128,4±35,8	0,438
c-HDL (mg/dl)	52,7±13,3	52,8±12,6	0,896	53,7±13,3	52,5±12,9	0,220
TG (mg/dl)	127,6±64,4	126,2±67,1	0,335	125,7±63,6	127,3±66,1	0,581
Glucosa (mg/dl)	117,7±36,0	120,8±41,0	0,201	118,9±35,1	119,1±39,2	0,938
PAS (mmHg)	146,1±20,3	146,7±20,2	0,654	147,5±19,7	146,0±20,4	0,348
PAD (mmHg)	81,4±10,5	81,6±10,7	0,771	82,2±10,2	81,3±10,7	0,303

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student. *:p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, DMT2, obesidad, tabaco, adherencia a la DM y actividad física.

Al realizar el análisis de la prevalencia y riesgo de obesidad se encontraron resultados significativos en el polimorfismo rs655497. Los resultados mostraron diferencias en la frecuencias del genotipo en función de la obesidad, donde los individuos obesos presentaban mayor porcentaje del genotipo AA, siendo estas diferencias significativas (p=0,004). Al realizar el cálculo del riesgo de obesidad, se vio que el genotipo AA presentaba mayor riesgo que los portadores del alelo G, manteniéndose la significación estadística al ajustar por la edad y el sexo (Tabla 4.42). Al segmentar lo datos en función de sexo, se observó que el riesgo de obesidad se mantenía estadísticamente significativo en el caso de los hombres, incluso al ajustar por edad (OR: 1,75 IC95% (1,15-2,65) p=0,009), no siendo significativo en las mujeres (OR: 1,21 IC95% (0,98-1,03) p=0,243). En este polimorfismo no se encontraron un riesgo significativo de DMT2.

En el caso del polimorfismo rs693370, en el cálculo de la prevalencia y el riesgo de obesidad no hubo ningún resultado significativo (OR: 0,79 IC95% (0,59-1,08 p=0,138). Lo mismo ocurrió en los resultados en función de la DMT2 (OR: 1,03 IC95% (0,76-1,40) p=0,829).

Tabla 4.42.- Análisis del riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs655497 del gen DMRTA1 en la población estudiada

Genotipo	Obeso %	No obeso %	P ¹	OR (IC 95%) AA vs AG+GG	P ²	OR (IC 95%) AA vs AG+GG	P ³
rs655497							
AA	60,0	51,4	0,004	1,42 (1,10-1,83)	0,006	1,39 (1,08-1,79)	0,011
AG	32,0	42,2					
GG	7,9	6,4					
Genotipo	DMT2 %	No DMT2 %	P ¹	OR (IC 95%) CC vs CT + TT	P ²	OR (IC 95%) CC vs CT + TT	P ³
rs655497							
AA	55,2	55,9	0,722	0,97 (0,75-1,25)	0,824	1,00 (0,77-1,30)	0,987
AG	37,0	37,6					
GG	7,8	6,5					

P¹: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre diabéticos y no diabéticos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple. P³: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

A continuación se procedió al cálculo el desequilibrio de ligamiento, el cual mostró un alto grado de desequilibrio entre ambos polimorfismos (Figura 4.27). Posteriormente, se agruparon los alelos más frecuentes, AA para el polimorfismo rs655497 y GG para el polimorfismo rs693370 en un haplotipo y los portadores del alelo G y del alelo A en otro haplotipo. Se estudió las posibles diferencias en las variables antropométricas y bioquímicas en función de los haplotipos pero no se hallaron resultados significativos. La prevalencia y riesgo de DMT2 tampoco fue significativa en función del haplotipo (OR: 0,95 (0,69-1,31) p=0,775). En cambio, el cálculo de estos parámetros en función de la obesidad dio resultados relevantes. El GG/AA era más prevalente en obesos que en los no obesos (p=0,024). El haplotipo GG/AA presentaba más riesgo de obesidad que los individuos con el haplotipo Port A/Port G, siendo las diferencias significativas (p=0,040) y manteniéndose en el límite tras ajustar por edad y sexo (p=0,052) (Tabla 4.43).

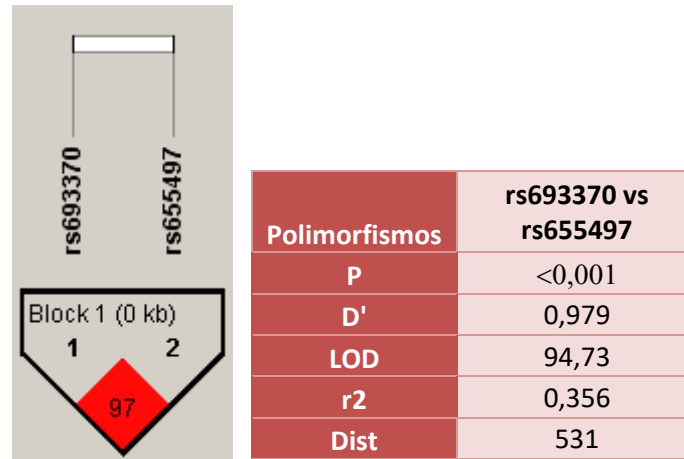


Figura 4.27.- Gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs693370 y rs655497 del gen DMRTA1 y tabla con los parámetros medidos para el desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r²: coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci

Tabla 4.43.- Análisis de la prevalencia y el riesgo de obesidad y DMT2 según los haplotipos de los polimorfismos rs693370 y rs655497 del gen DMRTA1 en la población estudiada

	Obesos	No Obesos	P ¹	OR (IC95%) P ²	OR (IC95%) P ³
GG/AA (%)	75,5	68,8	0,024	1,40 (1,01-1,92)	1,37 (1,00-1,89)
Port A/Port G (%)	24,5	31,1		P=0,040	P=0,052

P¹: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre diabéticos/no diabéticos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. P²: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística simple. P³: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

4.2.4.4- Polimorfismos rs961090 del gen INAFM2

A continuación se presentarán los resultados obtenidos del estudio del polimorfismo rs961090 situado en el gen INAFM2. En este caso, debido a la baja frecuencia del genotipo homocigoto menos prevalente, se agrupó con el heterocigoto y se comparó con el alelo más prevalente, aumentando el poder estadístico de los resultados.

En los primeros resultados obtenidos no se encontraron diferencias en los parámetros antropométricos ni bioquímicos en función del genotipo del polimorfismo (Tabla 4.44). Tampoco se encontraron diferencias en estas variables en función del sexo, la obesidad o la DMT2.

Tabla 4.44.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 en la población estudiada

	TT (n=593)	CT+CC (n=448)	p ¹
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	67±6	67±6	0,290
Peso (kg)	76,4±12,1	76,3±12,0	0,929
IMC (kg/m ²)	30,3±4,4	30,3±4,3	0,880
Cintura (cm)	102,9±11,8	102,3±11,6	0,450
CT (mg/dl)	207,1±39,1	204,2±38,9	0,246
c-LDL (mg/dl)	129,1±35,2	126,6±35,9	0,294
c-HDL (mg/dl)	53,0±12,6	52,4±13,5	0,518
TG (mg/dl)	125,1±63,1	129,5±68,8	0,441
Glucosa (mg/dl)	119,4±39,8	118,6±36,3	0,772
PAS (mmHg)	145,9±20,6	146,8±19,7	0,483
PAD (mmHg)	81,2±10,5	81,9±11,7	0,335

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba t-Student

El estudio de la prevalencia y el riesgo de obesidad no mostró resultados significativos para este polimorfismo (OR: 0,88 IC95% (0,68-1,13 p=0,313). Los mismos resultados se obtuvieron en el análisis de la prevalencia y el riesgo de DMT2 (OR: 0,83 IC95% (0,64-1,07) p=0,142).

4.2.4.4.5- Polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B

El último polimorfismo examinado en este apartado fue el rs10830963 del gen MTNR1B. Para su estudio, previamente se agrupó el genotipo homocigoto menos prevalente junto con el heterocigoto, como en todos los polimorfismos anteriores. No se observaron diferencias en las distintas variables antropométricas y bioquímicas analizadas en el presente trabajo en función del genotipo del gen MTNR1B.

En el análisis de estos parámetros en función del sexo, obesidad y DMT2, sólo se encontró resultados relevantes entre la concentración de glucosa y el genotipo del polimorfismo en función de la obesidad. En los participantes obesos con genotipo CC presentaban menor concentración de glucosa plasmática que los obesos portadores del alelo G (CC: $117,5 \pm 36,2$ mg/dl; CG+GG: $123,8 \pm 34,1$ mg/dl; p=0,048). Estas diferencias no se encontraron en los participantes no obesos (Figura 4.28)

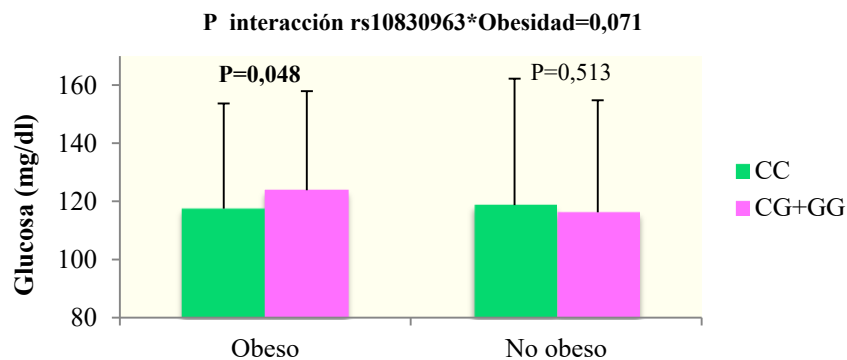


Figura 4.28.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

En el cálculo de la prevalencia y el riesgo de obesidad no hubo ningún resultado significativo (OR: 0,94 IC95% (0,73-1,21 p=0,633). En cambio, respecto al riesgo de DMT2 se observó que los homocigotos CC presentaban menor riesgo que los portadores del alelo G, quedándose el resultado cerca de la significación estadística (OR: 0,79 IC95% (0,62-1,02) p=0,074), incluso al ajustar por edad y sexo (OR: 0,79 IC95% (0,61-1,02) p=0,067).

4.2.5.- Estudio de posibles interacciones gen*ambiente sobre la obesidad, DMT2 y otros factores de riesgo cardiovascular

En este apartado se analizarán las interacciones que presentan los polimorfismos estudiados en la población PREDIMED del nodo de Valencia con el consumo del tabaco, la práctica de actividad física y la adherencia a la DM o con la frecuencia de consumo de alguno de sus componentes.

4.2.5.1.- Estudio de interacciones gen*tabaco

En el próximo apartado se examinarán las interacciones gen*tabaco que presenta el polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor con el consumo de tabaco y parámetros relacionados con la obesidad y la DMT2.

4.2.5.1.1.- Interacción del polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor con el consumo de tabaco sobre el IMC y el perímetro de cintura

Se encontraron diferencias en el perímetro de cintura y el IMC entre los individuos fumadores y no fumadores según el genotipo del polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor (Figura 4.29).

Se observó que los participantes no fumadores, los individuos TT mostraban mayor perímetro de cintura (TT: 103,0±11,5 cm, TC+CC: 100,1±13,6 cm) y mayor IMC (TT: 29,2±4,1 cm, TC+CC: 30,7±4,1 cm) que los portadores del alelo C, siendo estas diferencias significativas en ambos casos (p=0,022 y p=0,029 respectivamente). Dentro de la población fumadora del estudio, los individuos con genotipo homocigoto TT presentaban menor perímetro de cintura y menor IMC frente a los individuos portadores del alelo C, no llegando a ser significativa esta diferencia en ninguno de los casos (Cintura: TT: 102,7±12,4 cm, TC+CC: 104,3±11,4 cm, p=0,612; IMC: TT: 29,2±4,4 kg/m², TC+CC: 30,7±4,1 kg/m², p=0,173). La interacción entre rs662799 y el consumo de tabaco en la

determinación de la cintura no fue estadísticamente significativa ($p=0,169$), quedándose en el límite de la significación tras ajustar por edad y sexo ($p=0,060$). En cambio, la determinación del IMC si que mostró interacción significativa ($p=0,041$), perdiendo la significación tras ajustar por edad y sexo ($p=0,073$).

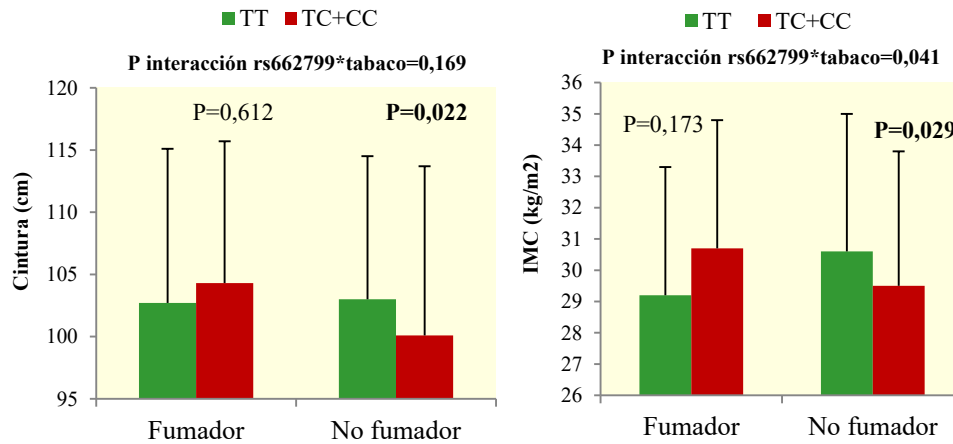


Figura 4.29.- Medida del perímetro de la cintura (izquierda) y del IMC (derecha) entre individuos fumadores y no fumadores según el genotipo del polimorfismo rs662799 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student

Además se estudió el riesgo de obesidad según el genotipo del polimorfismo en función del consumo o no del tabaco. Entre los no fumadores de genotipo TT mostraron mayor riesgo de obesidad que los portadores del alelo C, aunque no llegó a la significación estadística ni tras ajustar por sexo y edad. La interacción para la determinación de la obesidad fue estadísticamente significativa (p interacción rs662799*tabaco=0,031).

4.2.5.2.- Estudio de interacciones gen*actividad física

En este apartado se presentarán las interacciones gen*actividad física encontradas en la población estudiada que presentan el polimorfismo rs9939609 del gen FTO, el polimorfismo rs10883463 del gen SCD1, el polimorfismo rs1052133 del gen OGG1, los polimorfismos asociados al ancestro genético rs2419063 del gen FAM5C y rs11807062 del gen PRDM16 y los polimorfismos analizados por GWAs rs1063192 del gen CDKN2B y rs961090 del gen INAFM2 con la realización de actividad física sobre parámetros relacionados con la obesidad y la DMT2.

4.2.5.2.1.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs9939609 del gen FTO con la actividad física sobre el perímetro de cintura y el IMC

Debido a que en la población PREDIMED estudiada no se encontró asociación entre este polimorfismo del gen FTO con parámetros relacionados con obesidad y el hecho de mantener un estilo de vida sedentario se asocia con mayor peso, IMC y cintura se examinó si la actividad física podía influir en el efecto de las variantes genéticas sobre parámetros relacionados con la obesidad.

Se observó una relación entre este polimorfismo y la actividad física que determinaba la asociación de dicho polimorfismo con el perímetro de cintura y el IMC (p interacción= 0,007 para la cintura y p interacción=0,033 para el IMC). Tras ajustar por edad y sexo, la interacción con cintura se mantuvo significativa ($p=0,026$) mientras que la del IMC no ($p=0,101$). Se mostró que los individuos sedentarios con genotipo AA presentaba mayor IMC y perímetro de cintura que los individuos TA y TT. En el resto de participantes que sí que realizaban actividad física, el efecto del genotipo AA desapareció, sin encontrarse diferencias significativas (Figura 4.30).

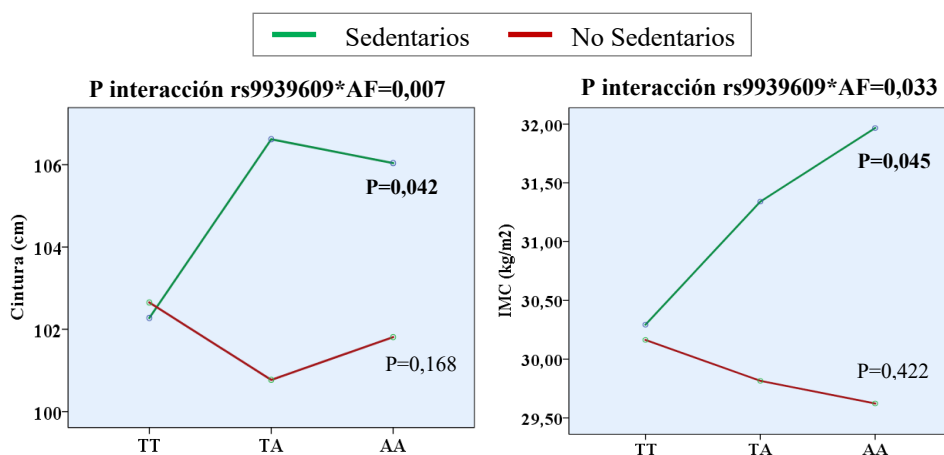


Figura 4.30.- Perímetro de la cintura (A) e IMC (B) en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs9939609 del gen de la FTO en la población estudiada (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA)

Tras estos resultados se calculó el riesgo de obesidad en función de la actividad física realizada sin encontrar diferencias significativas.

4.2.5.2.2.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs10883463 del gen SCD1 con la actividad física sobre el IMC

El polimorfismo rs10883463 localizado en el gen SCD1 no se asoció con variables antropométricas y bioquímicas (apartado 4.2.4.1.7). Al estudiar la interacción de este polimorfismo con la actividad física se vio una modulación del valor del IMC según estos parámetros (p interacción=0,044), manteniéndose tras ajustar por edad y sexo (p interacción=0,035).

En la población sedentaria, el genotipo TT presentaban mayor IMC que los portadores del alelo C (TT: $31,4 \pm 4,7$ kg/m²; CC+TC: $29,8 \pm 4,3$ kg/m²), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,047$). No se encontraron estas variaciones en el IMC en los individuos no sedentarios (Figura 4.31). Tampoco se encontraron diferencias en el riesgo de obesidad según el genotipo en función de la actividad física realizada.

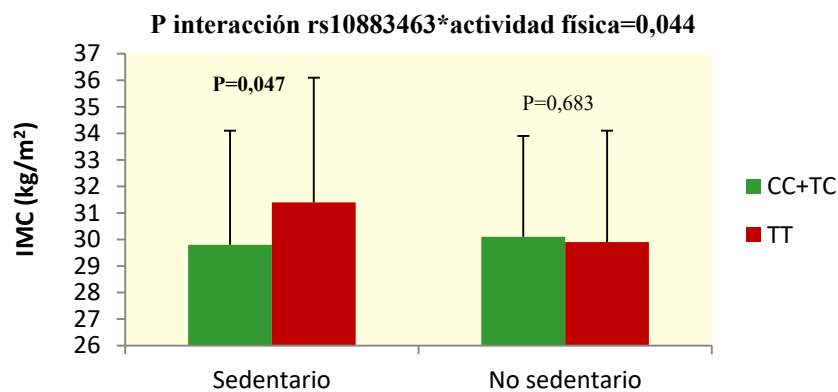


Figura 4.31.- Medida del IMC entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs10883463 del gen SCD1 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student

4.2.5.2.3.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs1052133 del gen OGG1 con la actividad física sobre la concentración de glucosa

Al analizar el polimorfismo rs1052133 localizado en el gen OGG1, se observó una interacción entre este polimorfismo y la actividad física sobre la concentración plasmática de glucosa (p interacción=0,001). Los individuos sedentarios mostraban mayor concentración de glucosa que los no sedentarios. Dentro de este grupo de participantes sedentarios, el genotipo CC tenían menor concentración de glucosa que los portadores del alelo G (CC: $122,7 \pm 39,4$ mg/dl; CG+GG: $132,1 \pm 48,5$ mg/dl), quedándose cerca de la significación estadística ($p=0,086$). En cambio, en la población no sedentaria, eran los portadores del alelo G los que presentaban menor concentración de glucosa (CC: $119,1 \pm 37,3$ mg/dl; CG+GG: $109,9 \pm 33,1$ mg/dl), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$), manteniéndose tras ajustar por edad y sexo ($p=0,008$) (Figura 4.32).

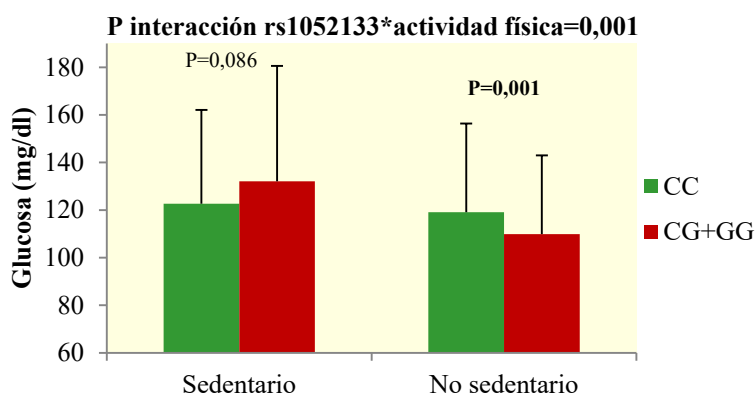


Figura 4.32.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs1052133 del gen OGG1 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student

Debido a estos resultados, se estudió el riesgo de DMT2 en función de este genotipo tanto en individuos sedentarios y no sedentarios. En el caso de la población que no realizaba actividad física, el genotipo CC presentaba menor riesgo de DMT2, quedándose en el límite de la significación al ajustar por sexo y edad ($p=0,056$). En cambio, al analizar el riesgo en la población no sedentaria, ese mismo genotipo CC presentaba mayor riesgo de DMT2 siendo significativo al ajustar por sexo y edad ($p=0,022$) (Tabla 4.45).

Tabla 4.45.- Riesgo de DMT2 asociado al polimorfismo rs105213 del gen OGG1 en individuos sedentarios y no sedentarios en la población estudiada

	OR ¹	OR ²
Sedentario	0,61 (0,37-1,01) P=0,056	0,61 (0,37-1,01) P=0,056
No sedentario	1,52 (1,11-2,08) P=0,009	1,45 (1,05-2,00) P=0,022

OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario C frente a los homocigotos TT, entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95% y p-valor obtenido al calcular la OR mediante una regresión logística. ¹: estimaciones brutas mediante regresión logística simple. ²: estimaciones ajustadas por edad y sexo mediante regresión logística múltiple.

4.2.5.2.4.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C con la actividad física sobre la concentración de c-HDL

Por último, al analizar las posibles interacciones entre la actividad física con los genes asociados al ancestro genético, hubo dos polimorfismos que presentaban estas interacciones sobre la concentración de c-HDL.

El polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C presentaba una interacción significativa con la actividad física (p interacción=0,040) en la determinación de la concentración de c-HDL, aunque se queda en el límite de la significación tras ajustar por edad y sexo (p=0,055). En los individuos sedentarios de la población estudiada, los portadores del alelo G presentaba menor concentración que el genotipo AA, siendo estas diferencias significativas (AG+GG: 47,2±9,7 mg/dl; AA: 52,9±13,7 mg/dl; p=0,006). No se encontraron estas diferencias en los individuos que realizaban actividad física (Figura 4.33).

A continuación se analizó el riesgo de obesidad y DMT2 en función del genotipo de este polimorfismo tanto en el grupo sedentario como en el grupo no sedentario, sin encontrarse diferencias significativas en ningún caso.

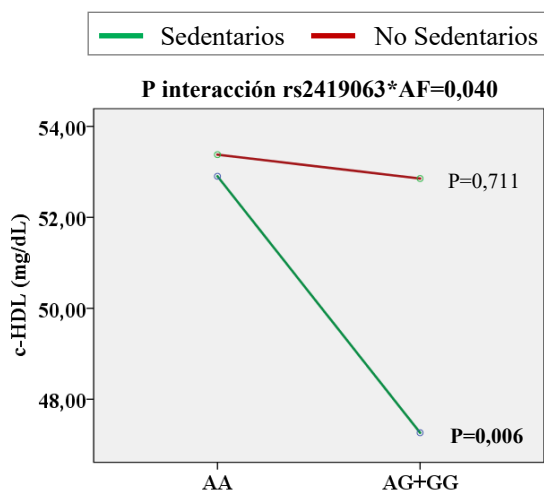


Figura 4.33.- Concentración de c-HDL en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C en la población estudiada (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

4.2.5.2.5.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16 con la actividad física sobre la concentración de c-HDL y el IMC

En el caso del polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16, también se encontró una interacción del mismo con la actividad física en la determinación de la concentración de c-HDL (p interacción=0,025; p ajustada=0,021) y en el IMC (p interacción=0,052; p ajustada=0,053). Los individuos sedentarios con el genotipo AA presentaban mayor concentración de c-HDL frente a los portadores del alelo C, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa (AA: 52,0±13,0 mg/dl; AC+CC: 49,9±12,4 mg/dl; p=0,224). Por el contrario, en el grupo de participantes no sedentarios era el genotipo AA el que presenta menor concentración de c-HDL frente a los portadores del alelo C, llegando en esta ocasión a la significación estadística (AA: 52,6±12,7 mg/dl; AC+CC: 55,1±13,4 mg/dl; p=0,024) (Figura 4.34 izquierda). Al analizar el valor de IMC, el homocigoto AA sedentario presentaban menor IMC que los portadores del alelo C sedentarios (AA: 30,8±4,6 kg/m²; AC+CC: 32,0±4,8 kg/m²; p=0,049), no encontrando estas diferencias en el grupo no sedentario (Figura 4.34 derecha).

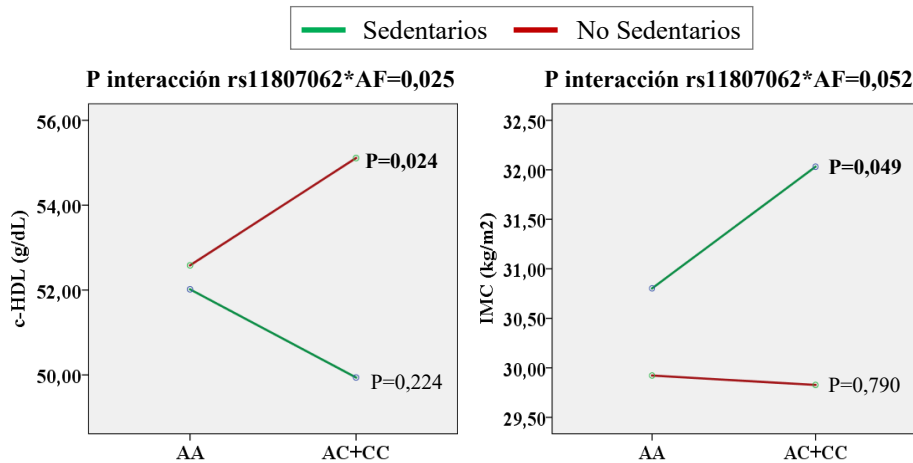


Figura 4.34.- Concentración de c-HDL (izquierda) y medida del IMC (derecha) en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16 en la población estudiada (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Debido a estos resultados, se analizó el riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo del polimorfismo y la realización de actividad física, no encontrando diferencias en la DMT2. En el caso del riesgo de obesidad en el grupo sedentario, se mostró que el genotipo AA presentaba menor riesgo de obesidad (OR: 0,63 IC95% (0,37-1,07) $P=0,090$), quedándose en el límite de la significación al ajustar por sexo y edad ($p=0,065$) no encontrándose estas diferencias en la población no sedentaria.

4.2.5.2.6.- Estudio de la interacción polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B con la actividad física sobre la concentración de glucosa

Debido a la interacción encontrada entre el polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B y la DMT2 (apartado 4.2.4.4.2), se procedió a estudiar si era posible una interacción entre la actividad física y parámetros relacionados con esta patología. Los resultados mostraron que los individuos homocigotos TT que eran sedentarios presentaban mayor concentración de glucosa que los portadores del alelo C sedentarios (TT: $135,8 \pm 51,4$ mg/dl; CT+CC: $118,5 \pm 32,1$ mg/dl; $p=0,003$). En los individuos no sedentarios no se observó diferencias en la concentración de glucosa en función del genotipo del polimorfismo (Figura 4.35), siendo la interacción significativa ($p_{int}=0,001$), manteniéndose en el mismo valor tras ajustar por edad y sexo.

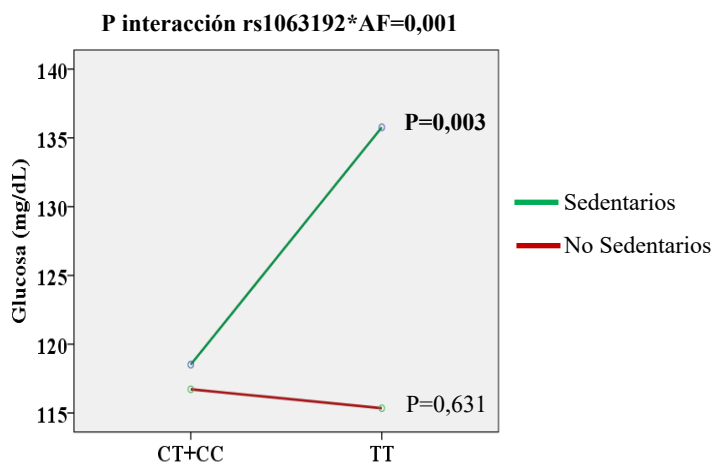


Figura 4.35.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student

Se calculó el riesgo de DMT2 en función de la actividad física pero no se encontró resultados significativos ni en sedentarios (OR: 1,35 IC95%(0,82-2,23) $p=0,234$) ni en no sedentarios (OR: 0,94 IC95%(0,69-1,28) $p=0,709$).

Debido a los resultados obtenidos, donde se vio la existencia de una interacción entre la DMT2 y la concentración de glucosa en función del polimorfismo estudiado, se procedió a analizar la influencia de la actividad física sobre la glucosa en función del genotipo en los individuos diabéticos y no diabéticos de manera independiente. Dentro de los participantes diabéticos, los individuos TT que se consideraron sedentarios presentaban mayor concentración de glucosa que los portadores del alelo C (TT: $163,8 \pm 52,7$ mg/dl; CT+CC: $139,1 \pm 33,4$ mg/dl; $p=0,002$). Esta diferencia de concentración de glucosa no se observó en los individuos diabéticos no sedentarios. Al analizar estos mismos parámetros en la parte de la población estudiada no diabética, no se encontraron diferencias en la concentración de glucosa en función del genotipo ni en los participantes sedentarios ni en los participantes no sedentarios (Figura 4.36).

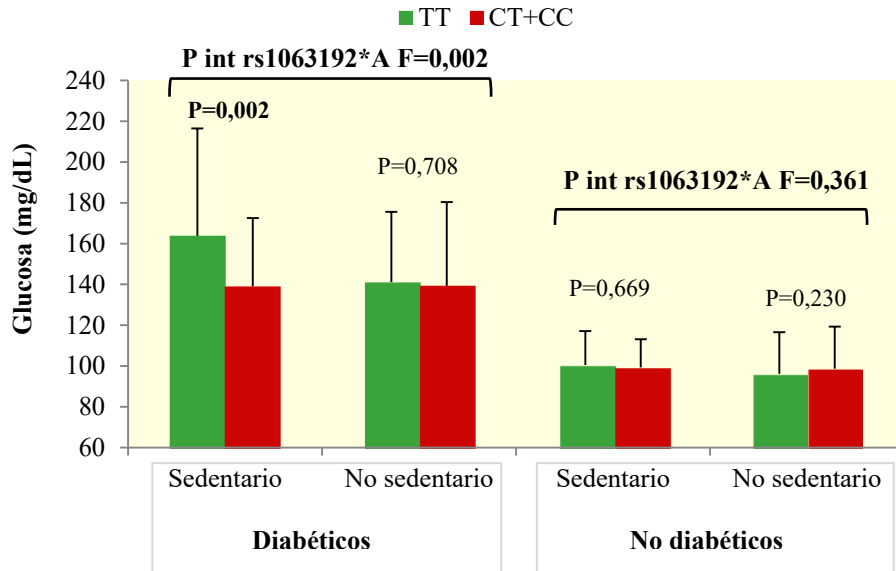


Figura 4.36.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B en la población estudiada en función de la DMT2. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student

4.2.5.2.7.- Estudio de la interacción polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 con la actividad física sobre la concentración de glucosa

Como en el apartado anterior, en el análisis inicial del polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 se observó relación entre la concentración de glucosa y la DMT2 en función del genotipo. Debido a estos resultados, se analizó si existía una relación entre la concentración de la glucosa plasmática y la actividad física realizada por los participantes.

En el caso de los individuos sedentarios, los homocigotos TT presentaban mayor concentración de glucosa ($130,6 \pm 46,1$ mg/dl) que los portadores del alelo C ($118,7 \pm 35,8$ mg/dl), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,023$). En cambio, en los individuos no sedentarios se observó que la concentración de glucosa era mayor en los portadores del alelo C que los homocigotos TT, no siendo estas diferencias significativas (Figura 4.37), siendo la p de interacción de 0,006. Tras ajustar por edad y sexo la interacción de mantuvo significativa ($p_{int} = 0,006$).

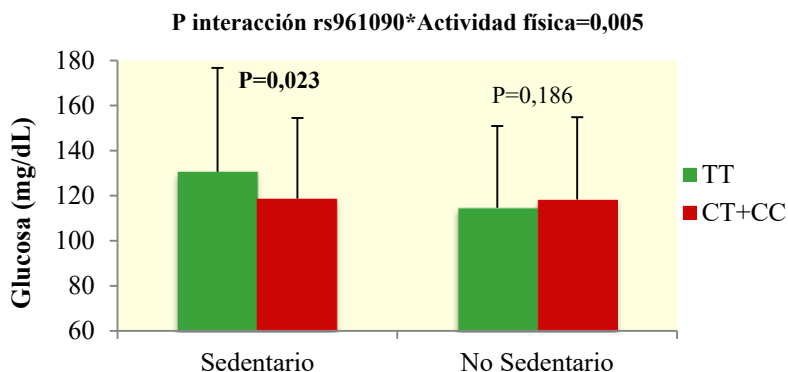


Figura 4.37.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student

A continuación, se realizó el cálculo del riesgo de DMT2 en relación a la actividad física para este polimorfismo. No se encontraron resultados significativos ni en la población sedentaria (OR: 0,79 IC95%(0,48-1,29) p=0,345) ni en la no sedentaria (OR: 0,84 IC95%(0,62-1,14) p=0,262).

4.2.5.3.- Estudio de interacciones gen*dieta

En el siguiente apartado se presentarán las interacciones gen*dieta encontradas en algunos de los polimorfismos estudiados en el presente trabajo. Estas interacciones se han detectado en el polimorfismo asociados con obesidad, como son rs662799 del gen ApoA5 promotor, rs4731702 del gen KLF14 y el rs2568958 del gen NEGR1. Dentro de los polimorfismos relacionados con DMT2, se observó una interacción en el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C y el rs2943634. Por último, en polimorfismos asociados al ancestro genético como son rs2014303 situado en el gen CLNK y rs2116830 del gen KCNMA1. Estas interacciones se analizaron con el grado de adherencia al patrón dietéticos de la DM en su conjunto, así como la frecuencia de consumo de diferentes componentes de la dieta como el consumo de AOV y FS en el caso de KLF14, CLOCK C y el gen CLNK, así como la frecuencia del consumo de carnes rojas en el caso del gen NEGR1 con parámetros relacionados con la obesidad y la DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

4.2.5.3.1.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor con la adherencia a la DM sobre la concentración de triglicéridos

En la población analizada se observó que la asociación del polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor con el nivel de TG plasmáticos está modulada por el grado de adherencia a la DM (Figura 4.38). Se observa que los individuos portadores de alelo C presentan mayor nivel de TG si presentan un patrón dietético con baja adherencia a la DM ($146,8 \pm 73,7$ mg/dl) que los individuos portadores de alelo C con una alta adherencia a la dieta ($115,8 \pm 52,3$ mg/dl). En cambio, en los individuos TT no se encontraron estas diferencias. La interacción para la determinación de TG entre el polimorfismo y la adherencia a la dieta alcanzó la significación estadística ($p=0,037$), manteniéndose al ajustar por edad y sexo ($p=0,038$).

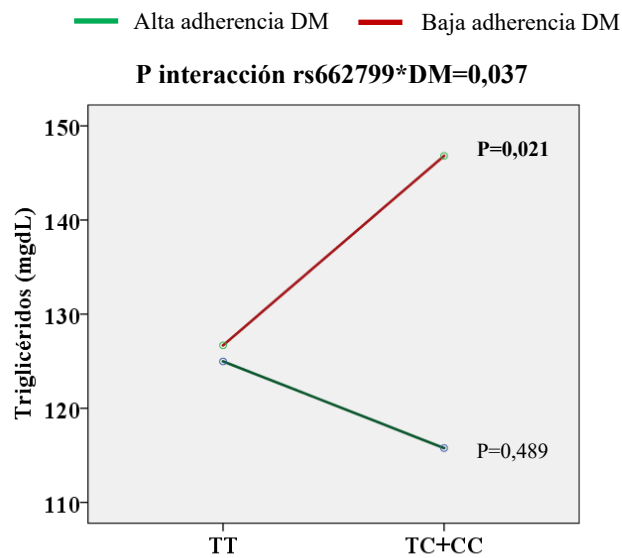


Figura 4.38.- Interacción entre el polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor y la adherencia a la DM sobre los TG en la población estudiada (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student)

4.2.5.3.2.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C con el consumo de aceite de oliva y frutos secos sobre la concentración de c-HDL

Se observó una interacción entre el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C y dos alimentos característicos de la DM, el consumo de AOV como principal grasa para cocinar y el consumo de FS, sobre los niveles de c-HDL. La interacción entre el polimorfismo y el consumo de AOV fue estadísticamente significativa ($p=0,004$) tras ajustar por edad y sexo, no ocurriendo lo mismo en el caso del consumo de los FS ($p=0,078$). Los resultados de este análisis se resumen en la tabla 4.46.

En el caso del AOV, en el grupo que no consumía esta grasa preferentemente para cocinar, se vio diferencias significativas ($p=0,004$) entre los genotipos de este polimorfismo, siendo los individuos CC los que presentaban menores niveles de c-HDL que el resto de genotipos. Al consumir preferentemente el AOV, no se encontraban diferencias significativas entre los genotipos.

Se observaron resultados similares al analizar el consumo de FS. El grupo que los consumían menos 3 veces a la semana presentaban diferencias significativas entre genotipos ($p=0,041$), donde los individuos CC presentaban menores niveles de c-HDL frente al resto de genotipos. Como ocurría con el consumo de AOV, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos en el grupo de participantes que consumían FS tres o más veces a la semana.

Tabla 4.46.- Interacción del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C, el uso de AOV como principal grasa para cocinar y la frecuencia de consumo de FS sobre los niveles de c-HDL en la población estudiada

c-HDL (mg/dl)	CC Media±DS	CG Media±DS	GG Media±DS	P ¹
No uso principal de AOV	49,7±11,7	50,0±10,6	59,8±18,3	0,004
Uso principal de AOV	53,4±13,5	52,5±12,9	58,8±13,0	0,468
P²	0,035	0,134	0,170	
FS menos 3 veces/semana	51,6±12,5	51,4±12,5	55,0±13,1	0,041
FS 3 o más veces/semana	55,6±14,7	54,0±13,1	54,0±13,8	0,653
P²	0,014	0,054	0,684	

AOV: aceite de oliva. FS: frutos secos. ¹: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba t-Student, ²: p valor de comparación de medias entre individuos según la utilización de aceite de oliva o el consumo de frutos secos mediante una prueba t-Student

4.2.5.3.3.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C con la intervención dietética sobre la incidencia de la DMT2 en la población PREDIMED población total

Dentro del estudio del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en la población total del estudio PREDIMED, se analizó la modulación de este polimorfismo y la incidencia de DMT2 dependiendo del grupo de intervención dietética, donde se obtuvo una p interacción=0,052 tras ajustar por factores de confusión. La figura 4.39 muestra las curvas Kaplan-Meier para la supervivencia acumulada de mantenerse sin desarrollar DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs4580704 (modelo dominante) en sujetos sin DMT2 en un periodo de seguimiento de 4,8 años de media y dependiendo del grupo de intervención dietética (A: grupo DM (n=2477); B: grupo control (n=1194)). Se observó que la asociación protectora del alelo G frente a la incidencia DMT2 que se había observado anteriormente era más fuerte y estadísticamente significativa en el grupo de intervención de DM (OR: 0,58 IC95% (0,43-0,78) p < 0.001) sin ser significativa en el grupo de control (OR: 0,95 IC95% (0,63-1,44) p=0.818) en el modelo ajustado por factores de confusión.

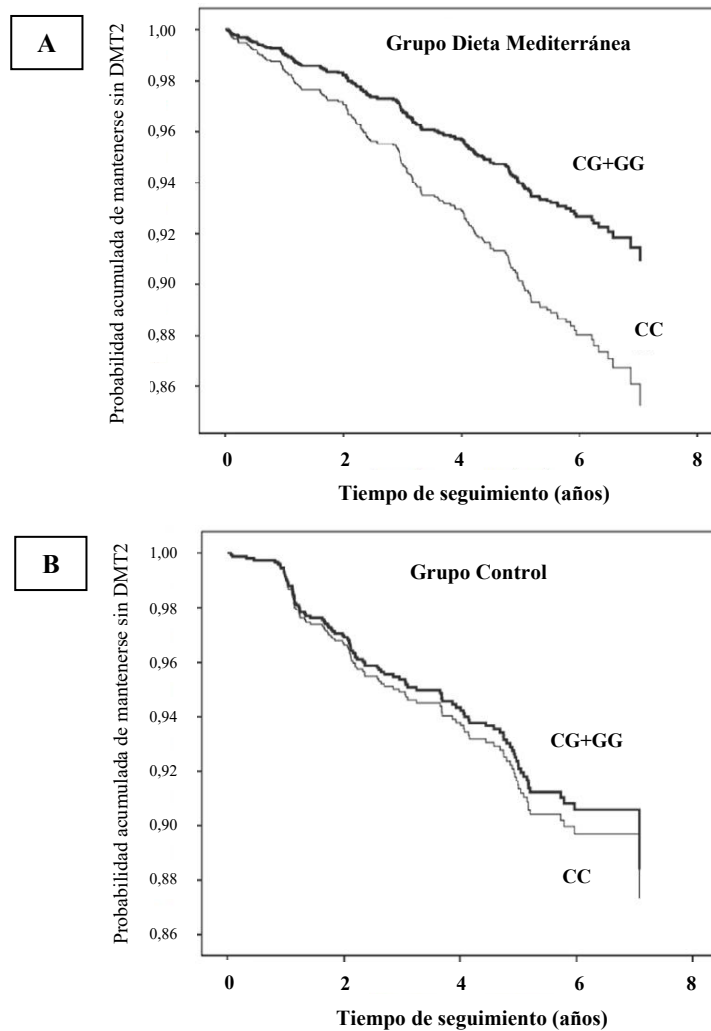


Figura 4.39.- Supervivencia sin DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en participantes no diabéticos dependiendo del grupo de intervención. A: grupo DM (n=2477), B: grupo Control (n=1194)

4.2.5.3.4.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs2943634 con la adherencia a la DM sobre la concentración de c-HDL

En este apartado se presentará la interacción encontrada entre el polimorfismo rs2943634 y la adherencia a la DM sobre los niveles de c-HDL. En el grupo que presentaba baja adherencia a este patrón dietético, presentaban menor nivel de c-HDL que las que tenían alta adherencia y sin detectar diferencias según el genotipo (AA+AC: 51,8±11,0 mg/dl; CC: 51,6±14,5 mg/dl; p=0,825). En cambio, en el grupo de alta adherencia a la dieta, el genotipo CC presentaba mayores niveles de c-HDL que los portadores A, siendo estas diferencias significativas (AA+AC: 52,2±12,4 mg/dl; CC:55,6±13,6 mg/dl; p=0,006). Esta interacción fue significativa tras ajustar por edad y sexo (p interacción=0,037) (Figura 4.40).

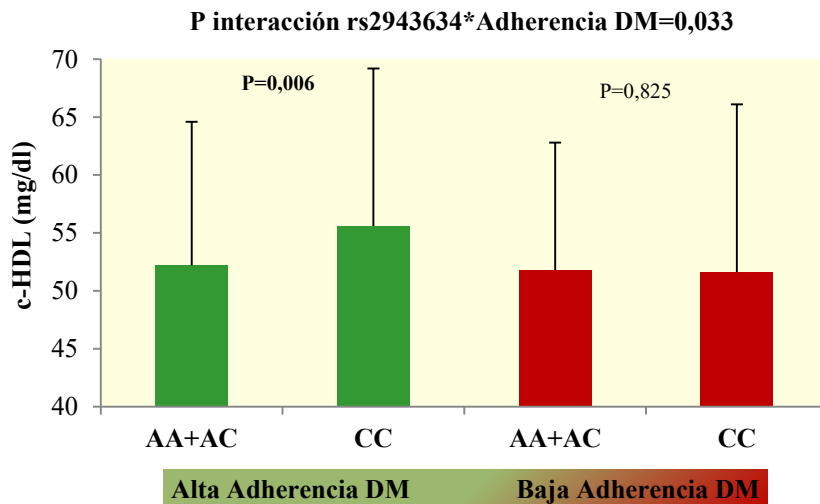


Figura 4.40.- Concentración de c-HDL en individuos con alta o baja adherencia a la DM según el genotipo del polimorfismo rs2943634 en la población estudiada. DM: dieta mediterránea. P: p valor de comparación de medias mediante una t-Student

4.2.5.3.5.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs2014303 del gen CLNK con la adherencia a la DM y al consumo de aceite de oliva sobre la concentración de c-HDL

A continuación se analizó las posibles interacciones del polimorfismo rs2014303 situado en el gen CLNK con la dieta. Se encontró diferencias en la concentración del c-HDL en función del genotipo modulado por la adherencia a la DM. Mientras que los individuos CC presentaban un nivel de concentración de c-HDL similar en ambos grupos independientemente de la adherencia a la dieta, los portadores del alelo A presentaban mayores niveles de c-HDL si presentaban mayor adherencia ($55,2 \pm 13,1$ mg/dl) que cuando su adherencia era baja ($49,2 \pm 9,9$ mg/dl). Dentro del grupo de alta adherencia, las diferencias de niveles de c-HDL según el genotipo rozaron el límite de la significación ($p=0,056$) presentando los individuos portadores de alelo A mayor concentración, mientras que en el grupo de baja adherencia, la diferencias según el genotipo fueron significativas ($p=0,001$), siendo los individuos CC los que presentaban mayor concentración (Figura 4.41). La interacción entre el genotipo y la adherencia sobre los niveles de c-HDL era estadísticamente significativa tras ajustar por edad y sexo (p interacción= $0,004$).

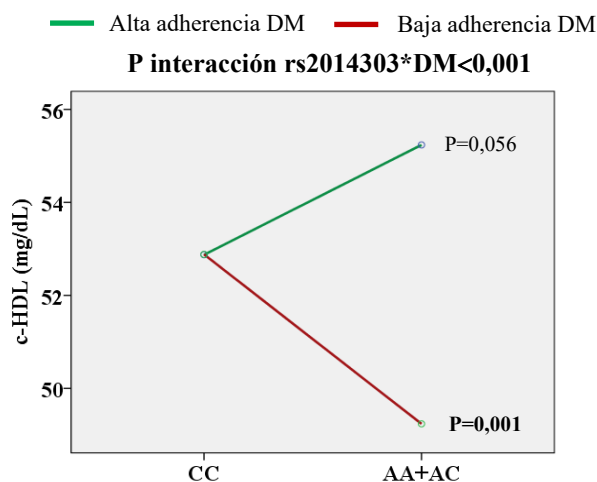


Figura 4.41.- Interacción entre el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK y la adherencia a la DM sobre la concentración de c-HDL en la población estudiada (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student)

Tras estos resultados, se analizó si algún alimento característico de la DM podía influir concretamente en la concentración de c-HDL en función del genotipo. Se observó que el consumo de AOV como principal grasa para cocinar podía influir en dicho parámetro. Entre los individuos que consumían el AOV, no había diferencias significativas entre los genotipos. En el grupo de individuos que no lo consumían, los portadores del alelo A presentaban menor concentración que los individuos CC, siendo un resultado similar al hallado en la adherencia a la DM (Figura 4.42). La interacción entre este polimorfismo y el consumo de AOV fue estadísticamente significativo tras ajustar por edad y sexo ($p=0,026$).

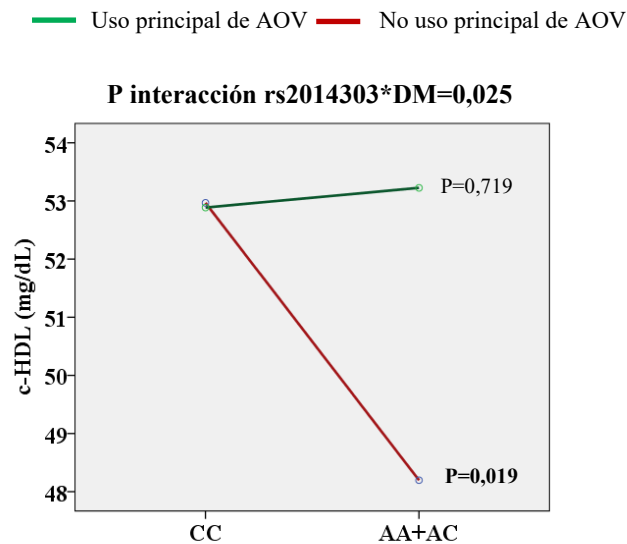


Figura 4.42.- Interacción del polimorfismo rs2014303 del gen CLNK , el uso de AOV como principal grasa para cocinar sobre los niveles de c-HDL en la población estudiada

4.2.5.3.6.- Estudio de la interacción del polimorfismo rs2116830 del gen KCNMA1 con la adherencia mediterránea sobre el peso

El polimorfismo rs2116830 localizado en el gen KCNMA1 fue el último polimorfismo que mostró una interacción*dieta, concretamente con la adherencia a la DM sobre el peso. En el grupo de participantes que presentaban una baja adherencia a la DM, no se encontraron diferencias significativas en función del genotipo (GG: 76,6±11,9 kg; GT+TT: 77,3±11,5 kg, $p=0,490$). Sin embargo, en el grupo de alta adherencia los portadores del alelo T presentaban menor peso que los individuos GG (GG: 76,6±12,3; GT+TT: 73,8±11,9 kg) siendo estas diferencias significativas ($p=0,013$). La interacción del polimorfismo y la dieta fue significativa en el primer análisis ($p=0,023$) pero perdió la significación tras ajustar por edad y sexo ($p=0,156$) (Figura 4.43).

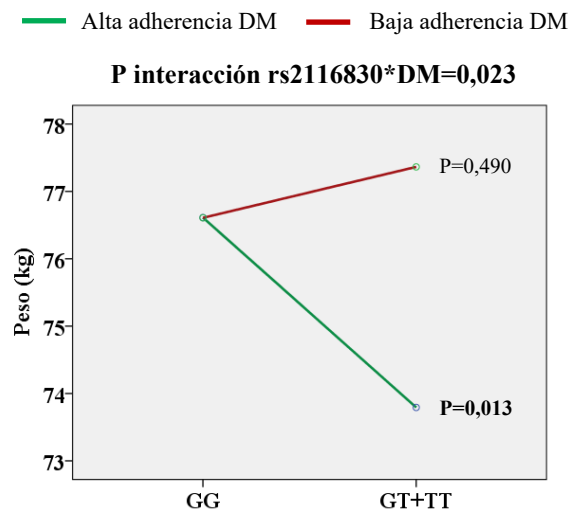


Figura 4.43.- Interacción entre el polimorfismo rs2116830 del gen KCNMA1 y la adherencia a la DM sobre el peso en la población estudiada (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student)

4.2.6.- Estudio de posibles interacciones gen*gen sobre la obesidad y la DMT2

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de las interacciones gen*gen entre los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK C y el polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 sobre los niveles de triglicéridos en la población.

4.2.6.1.- Estudio de la interacción gen*gen de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK C y el polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1

Como se mostró en apartados anteriores, en la población estudiada se observó la asociación de estos dos polimorfismos con los niveles de TG en función de la obesidad. Por este motivo, se analizó la posible interacción de estos dos polimorfismos. Se detectó una interacción gen*gen de estos polimorfismos en la concentración de TG de manera estadísticamente significativa tras ajustar por sexo y edad (p interacción=0,031) (Figura 4.44). Por tanto, se observó que los individuos CC para el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C no presentaban diferencias significativas en el nivel de TG según el genotipo del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 (genotipo CC del gen NR1D1: $130,0 \pm 67,4$ mg/dl; portadores del alelo T del gen NR1D1: $130,3 \pm 59,4$ mg/dl; $p=0,709$). En cambio, se observó que los portadores del alelo G del gen CLOCK C mostraban menores niveles de TG si a su vez eran portadores del alelo T del gen NR1D1 (genotipo CC del gen NR1D1: $130,3 \pm 65,2$ mg/dl; portadores del alelo T del gen NR1D1: $116,6 \pm 63,9$ mg/dl; $p=0,009$).

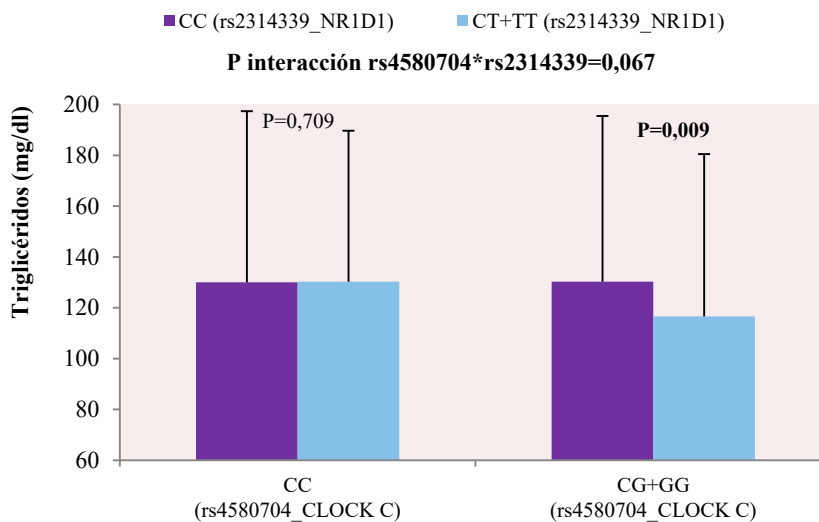


Figura 4.44.- Niveles de triglicéridos según el genotipo de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK C y rs2314339 del gen NR1D1 en la población estudiada (p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student)

4.2.7.- Estudio epigenético de genes relacionados con la obesidad y la DMT2

En el presente trabajo se realizó un estudio epigenético para el cual se seleccionaron dos genes ampliamente relacionados en la bibliografía con la obesidad y la DMT2. Se seleccionaron dos amplicones para cada uno de los genes seleccionados y se analizaron distintas islas de metilación (CpG). Estos amplicones cubrían regiones próximas a polimorfismos de interés en cada uno de los genes seleccionados, como son rs9939609 en el caso del gen FTO y el rs7903146 para el gen TCF7L2. En el caso del gen FTO, en el amplicón A se estudiaron 10 islas CpG mientras que en el amplicón B, fueron 7 islas CpG. En el caso del gen TCF7L2, en el amplicón A se analizaron 4 islas CpG y en el amplicón B 7 islas CpG.

Para la realización de este estudio se seleccionaron 195 participantes de la población estudiada, de los cuales 98 fueron hombres y 97 mujeres. Para su selección se tuvo en cuenta diferentes criterios como el grupo de intervención, el genotipo del polimorfismo a estudiar así como la obesidad y la DMT2, como se detalla en el apartado de material y métodos.

Se hizo un análisis inicial del porcentaje de metilación de las diferentes islas CpG en la visita basal y se comparó si existían diferencias en individuos obesos y no obesos y en los participantes diabéticos y no diabéticos. Los resultados se muestran en la tabla 4.47.

En el caso del análisis en función de la obesidad, se encontraron diferencias significativas en los dos amplicones del polimorfismo del gen TCF7L2. Concretamente, en la isla CpG 3 del amplicón A los individuos obesos presentaban menor porcentaje de metilación que los individuos no obesos (92,8% vs 93,%), quedándose estas diferencias en el límite de la significación estadística ($p=0,053$). En el amplicón B del mismo gen, en la isla CpG 1 los obesos tenían menor porcentaje de metilación (23,2% vs 32,2%) y en la isla CpG 2 ocurría lo contrario, los individuos obesos presentaban mayor metilación (96,4% y 95,1%). Ambas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,004$ y $p=0,035$ respectivamente).

Tabla 4.47.- Porcentaje de metilación de las diferentes islas de metilación estudiadas en el polimorfismo rs9939609 del gen FTO y el polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2

FTO rs9939609	Isla CpG	Población total (n=195)	Obesos (n=95)	No obesos (n=100)	P ¹	Diabéticos (n=98)	No diabéticos (n=97)	P ¹		
		%	%	%		%	%			
Amplicon A Región 53819571 - 53820018	1	95,8	95,6	96,0	0,495	95,4	96,2	0,180		
	2	97,3	97,3	97,4	0,905	97,3	97,4	0,791		
	3	93,2	93,8	92,7	0,316	94,2	92,3	0,140		
	4	96,0	96,0	96,0	0,289	96,0	96,0	0,562		
	5	57,9	58,5	57,4	0,678	59,3	56,5	0,254		
	6	57,9	58,5	57,4	0,680	59,3	56,5	0,261		
	7	93,9	92,8	94,8	0,092	93,6	94,1	0,674		
	8	15,7	15,5	15,9	0,974	15,7	15,8	0,778		
	9_10	94,6	95,0	94,3	0,423	95,5	93,7	0,028		
	13	16,5	16,4	16,6	0,968	16,7	16,3	0,990		
	Amplicon B Región 53820764 - 53821197	1	91,4	92,6	90,3	0,159	92,6	90,1	0,146	
		3	54,6	52,8	56,3	0,215	56,1	53,1	0,170	
		4	96,4	95,9	96,9	0,295	96,9	96,0	0,345	
5		79,9	80,3	79,5	0,500	81,0	78,7	0,177		
6		79,8	81,2	78,8	0,205	81,8	77,7	0,053		
7		93,2	99,0	99,0	0,702	99,0	99,0	0,400		
8		99,0	93,1	93,2	0,783	93,4	93,0	0,515		
8		99,0	93,1	93,2	0,783	93,4	93,0	0,515		
TCF7L2 rs7903146	Isla CpG	%	%	%	P ¹	%	%	P ¹		
		Amplicón A	1	96,4	97,1	95,9	0,063	96,7	96,2	0,387
		Región	2	88,1	87,5	88,7	0,291	88,6	87,6	0,369
		114758002- 114758469	3	93,2	92,8	93,6	0,053	93,0	93,4	0,333
		4	93,5	93,7	93,3	0,448	93,5	93,5	0,959	
		Amplicón B	1	27,8	23,2	32,2	0,004	26,5	29,1	0,460
		2	95,7	96,4	95,1	0,035	95,7	95,7	0,947	
		Región	4	94,5	94,3	94,6	0,627	94,5	94,5	0,922
		114759036- 114759535	5	90,6	89,9	81,2	0,387	90,5	90,7	0,876
		6	7,9	8,7	7,2	0,222	8,2	7,6	0,553	
		7	63,6	64,0	63,2	0,553	64,0	63,2	0,551	
		8	41,8	41,1	42,3	0,553	41,4	42,2	0,805	

Isla CpG: isla de metilación. P¹: p-valor de comparación del porcentaje medio de metilación mediante una prueba t-Student

A continuación se estudiaron las diferencias de metilación entre los individuos diabéticos y no diabéticos. En este caso, las diferencias se encontraron en dos islas de los dos amplicones analizados en el gen FTO. La primera diferencia se encontró en el amplicón A, en la isla CpG 9-10 se vio que los individuos diabéticos tenían mayor porcentaje de metilación (95,5%) que los no diabéticos (93,7%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,028$). También en la isla CpG 6 del amplicon B del mismo gen se observó que los diabéticos también presentaban mayor porcentaje de metilación que los no diabéticos, quedando esta diferencia al límite de la significación (81,8% y 777% respectivamente, $p=0,053$).

También se analizó si existían diferencias en el porcentaje de metilación según el genotipo de cada polimorfismo a nivel basal. En el caso del polimorfismo rs9939609 del gen FTO, se observó una diferencia en la metilación de la isla CpG8 del amplicón A del gen FTO, donde los individuos con genotipo AA presentaban menor metilación que el resto de genotipos (TT: 34,8%, TA:10,8%, AA: 1,5%) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,0001$) (Figura 4.45A). En el caso del polimorfismo rs7903146 del gen TCFL2, también se observó una diferencia de metilación en la isla CpG 7 del amplicón B del gen TCF7L2, donde los portadores del alelo T presentaban mayor porcentaje de metilación que los homocigotos CC que los otros genotipos, llegando estas diferencias a la significación estadística (CC: 61,3%, CT: 65,5% y TT: 63,1%; $p=0,011$) (Figura 4.45B).

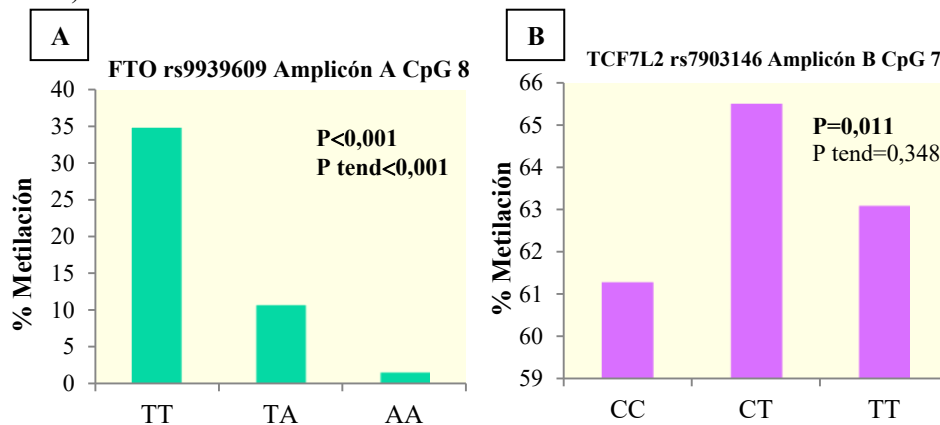


Figura 4.45.- Diferencias del porcentaje de metilación en diferentes amplicones del polimorfismo rs9939609 del gen FTO (A) y del polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 (B) (p tend: p de tendencia; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba ANOVA)

Una vez realizados los análisis de los niveles de metilación en las regiones estudiadas a nivel basal según todos los criterios mencionados, se continuó el estudio epigenético estudiando si la intervención dietética podía influir en la metilación. Para ello se seleccionaron 28 individuos de las 195 muestras estudiadas, 18 del grupo de AOV y 10 del grupo control. Se calcularon los porcentajes de metilación basales y al año de la intervención. Se encontraron diferencias de metilación en el gen FTO, concretamente en la isla CpG 5 del amplicón B. Tras un año de intervención, se veía que el porcentaje de metilación de esta isla disminuía en ambos grupos de intervención. En el caso del grupo de AOV, el porcentaje a nivel basal fue de 86,6% el cual disminuía hasta un 80,1% tras un año de intervención, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,022$). En el grupo control también se observó una disminución en el porcentaje de metilación, pasando de un 85,6% en la visita basal a un 82,6% al año de la intervención, sin llegar a la significación estadística ($p=0,408$) (Figura 4.46). El descenso del porcentaje de metilación, por tanto, fue mayor en el grupo de AOV, donde la metilación disminuía un 6,4% frente al grupo control, donde disminuía un 3%, aunque esta diferencia entre grupos no llegó a la significación estadística ($p=0,421$).

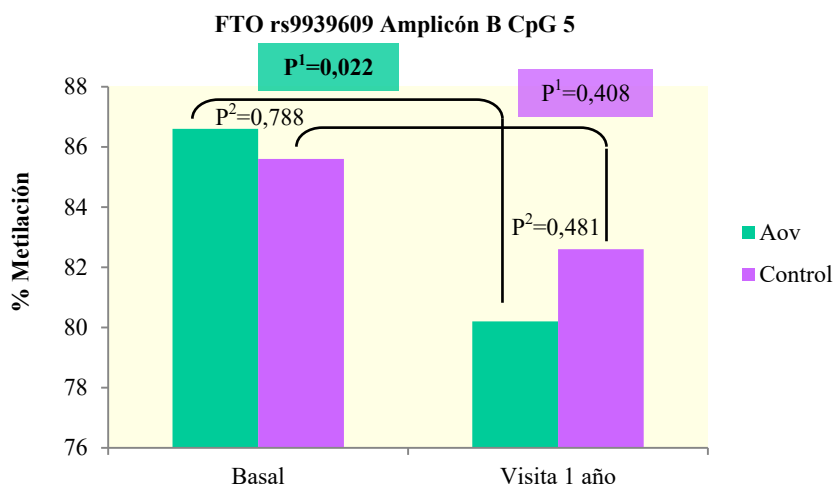


Figura 4.46.- Porcentaje de metilación a nivel basal y tras un año de intervención de la isla CpG 5 del amplicón B del polimorfismo rs9939609 del gen FTO según el grupo de intervención (AOV: aceite de oliva. P¹: p-valor comparación del porcentaje de metilación tras la intervención obtenido mediante una prueba t-Student de muestras emparejadas. P²: p-valor comparación de las diferencias de metilación mediante una prueba t-Student de muestras)

Posteriormente, se realizó un análisis de las posibles correlaciones entre los diferentes porcentajes de metilación de las islas CpG y los parámetros antropométricos y bioquímicos de las muestras seleccionadas. Simultáneamente, también se realizó un estudio para conocer la existencia de interacciones entre la adherencia a la DM y las patologías estudiadas en el presente trabajo relacionadas con la diferencia de metilación. Para ello se seleccionaron las islas más interesantes en ambos genes. En el caso del gen FTO, se analizó la isla CpG 8 del amplicón A. En el caso del gen TCF7L2, la isla seleccionada fue la CpG 7 del amplicón B.

Se analizó la posible correlación de los parámetros antropométricos y bioquímicos con el porcentaje de metilación a nivel basal, sin encontrar ninguna relación significativa. A continuación, se analizó si las diferencias encontradas en las variables antropométricas y bioquímicas presentadas tras un año de intervención podían estar correlacionadas con variaciones en el porcentaje de metilación. Los resultados no mostraron ninguna relación significativa para ninguno de los dos amplicones estudiados. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.48.

Tabla 4.48.- Estudio de correlación de variables antropométricas y bioquímicas con la metilación basal y la diferencia de metilación de la isla CpG 8 del amplicón A del gen FTO y de la isla CpG7 del amplicón B del gen TCF7L2

	Metilación Basal				Diferencias de metilación			
	Gen FTO Amplicón A CpG8		Gen TCF7L2 Amplicón B CpG 7		Gen FTO Amplicón A CpG8		Gen TCF7L2 Amplicón B CpG 7	
	r	P	r	P	r	P	r	P
Peso (kg)	0,126	0,109	0,047	0,528	0,189	0,425	-0,239	0,212
IMC (kg/m ²)	-0,010	0,903	0,008	0,912	0,195	0,411	-0,238	0,214
Cintura (cm)	0,062	0,432	0,006	0,936	0,309	0,184	0,087	0,660
Glucosa (mg/dl)	0,046	0,566	-0,042	0,577	0,245	0,312	-0,323	0,094
Colesterol total (mg/dl)	0,081	0,307	-0,003	0,965	0,282	0,229	-0,036	0,854
c-HDL (mg/dl)	-0,092	0,243	0,073	0,330	-0,002	0,993	-0,128	0,507
c-LDL (mg/dl)	0,090	0,256	0,008	0,917	0,189	0,426	0,107	0,582
Triglicéridos (mg/dl)	0,089	0,262	-0,121	0,109	0,103	0,666	-0,205	0,286

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; r: coeficiente de correlación de Pearson. P: p valor del estudio de correlación.

A continuación se analizó la posible existencia de interacciones entre la adherencia a la DM y la obesidad y la DMT2. Para ello se comprobó si la diferencia de la metilación tras la intervención podía variar según la adherencia a la DM en función de la obesidad y la DMT2. El análisis se realizó en las dos islas de metilación previamente seleccionadas.

En la isla CpG 8 del amplicón A del gen FTO se observó que las diferencias de metilación entre individuos obesos y no obesos variaban según la adherencia a la DM (Figura 4.47). En este caso, se encontró una interacción significativa entre la obesidad y la adherencia (p interacción=0,035). En individuos obesos, tras la intervención, los que presentaban mayor adherencia presentaban un aumento de un 4,4% de metilación de la isla frente a los individuos obesos con menor adherencia, que presentaban un descenso de la metilación de la isla de un 11,5%, aunque las diferencias no fueron significativas ($p=0,197$). En el grupo de individuos no obesos seleccionados ocurría lo contrario. Cuando la adherencia era alta, la metilación disminuía un 1,2% mientras que los individuos con baja adherencia presentaban un aumento de la metilación de un 2,5%, aunque tampoco fueron diferencias significativas ($p=0,131$).

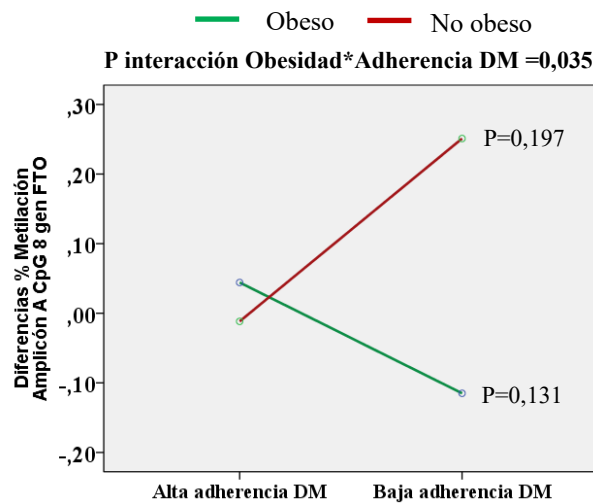


Figura 4.47.- Interacción entre la obesidad y la adherencia a la DM sobre la diferencia de metilación de la isla CpG 7 del amplicón B del polimorfismo rs9939609 del gen FTO (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student)

En el caso del polimorfismo rs7903146 del gen TCFL2, en la diferencia de metilación de la isla CpG 7 del amplicón B se vio una interacción entre la adherencia a la DM y la DMT2, llegando a alcanzar la significación estadística (p interacción=0,002) (Figura 4.48). En el caso de los individuos diabéticos, una alta adherencia a la dieta presentaba un aumento de un 19,6% de la metilación de esta isla mientras que si existía una baja adherencia, la metilación disminuía un 2,9%. En el caso de los individuos no diabéticos, una alta adherencia mostraba una disminución de un 1,2% y una baja adherencia aumentaba un 13,8% la metilación de la isla. Ambas diferencias de metilación según la adherencia fueron significativas.

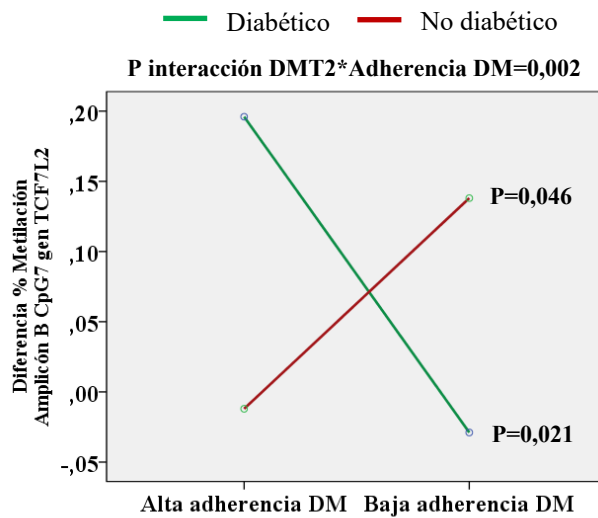


Figura 4.48.- Interacción entre la DMT2 y la adherencia a la DM sobre la diferencia de metilación de la isla CpG 7 del amplicón B del polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student)

4.3.- Estudio de la puntuación de riesgo genético (GRS) en polimorfismos relacionados con la obesidad y la DMT2

Se analizó el efecto de varios polimorfismos en genes separados mediante el cálculo de las puntuaciones de alelo genético denominadas GeneticRisk Scores (GRS). Para ello se sumó el número de alelos de riesgo de cada polimorfismo incluido en el score (0, 1, 2, 3 ó 4) y se estudió las posibles asociaciones con obesidad, DMT2 y parámetros relacionados. Se realizaron GRS para obesidad pero no se han obtenido resultados significativos. Esto podría ser debido a un que la modulación ambiental modifica en mayor medida el efecto genético para los fenotipos antropométricos. Serían necesarios estudios posteriores que tuvieran en cuenta esta posible modulación y que tuvieran un tamaño muestral superior. En la población estudiada sí que se encontraron resultados significativos con parámetros bioquímicos relacionados con la obesidad y la DMT2.

4.3.1.- Asociación de la puntuación del riesgo genético entre el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK y el polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 sobre la concentración de glucosa.

El polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK se asoció con niveles de glucosa, donde los portadores del alelo C mostraron mayores concentraciones. En el caso del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1, los portadores del alelo C también presentaban mayores concentraciones de glucosa plasmática. Por tanto, los alelos C de ambos polimorfismos se podrían considerar los alelos de riesgo. Tras puntuar el GRS en función del número de alelos de riesgo presentes para ambos polimorfismos, se analizó su posible asociación con los niveles de glucosa. Se observó que, conforme aumentaba el número de alelos de riesgo, aumentaba la concentración de glucosa (Figura 4.49), manteniéndose estas diferencias significativas tras ajustar por variables de confusión ($p=0,004$). Por tanto, la combinación genotípica que no presentaba alelos de riesgo (GG/TT) tenía menor concentración de glucosa ($107,3\pm 30,6$ mg/dl) y la combinación genotípica con los cuatro alelos de riesgo (CC/CC) tenía la mayor concentración ($126,9\pm 42,1$ mg/dl).

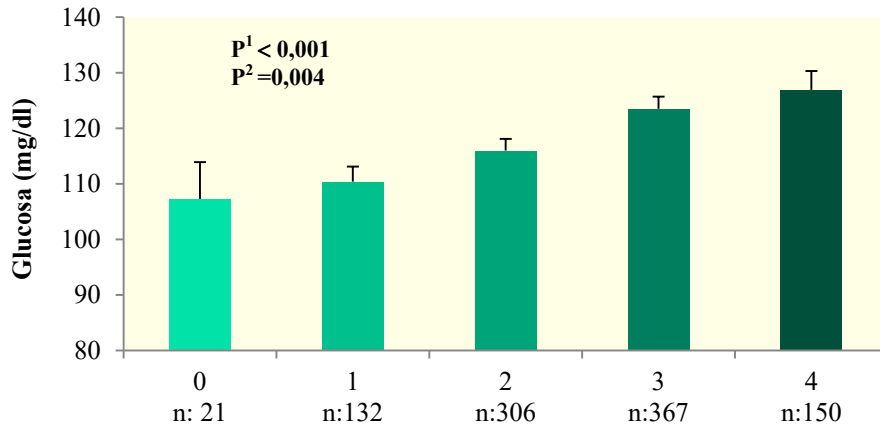


Figura 4.49.- Asociación entre las puntuaciones de riesgo genético (GRS) de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK y rs2943641 del gen IRS1 y la concentración de glucosa. Barras de error: error estándar. 0 puntos (no alelos de riesgo), 1 punto (1 alelo de riesgo de CLOCK o IRS1); 2 puntos (2 alelos de riesgo); 3 puntos (3 alelos de riesgo); 4 puntos (4 alelos de riesgo). P^1 : p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA; P^2 : p-valor ajustado por sexo, edad, DMT2, obesidad, actividad física, adherencia a la DM

A continuación se calculó el riesgo de DMT2 para cada combinación genotípica. Utilizando como referencia el genotipo sin alelos de riesgo, los resultados mostraron como el riesgo de DMT2 iba aumentando conforme aumentaban el número de alelos de riesgo, aunque los resultados no mostraron significación estadística debido al limitado tamaño de muestra en cada estrato. Sin embargo, cuando se consideró la variable de manera continua, sí que se obtuvo una asociación estadísticamente significativa entre la GRS y el riesgo de DMT2 de manera que cada alelo aumento el riesgo un 18% ($P=0,01$) en el modelo crudo, pasando a un 22% en el modelo ajustado ($P=0,004$). (Tabla 4.56).

Tabla 4.49.- Análisis del riesgo de DMT2 según la puntuación de riesgo de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK y rs2943641 del gen IRS1

Nº Alelos de Riesgo	OR	IC (95%)	P ¹	OR	IC (95%)	P ²
0	1,00	Referencia		1,00	Referencia	
1	1,13	(0,44-2,91)	0,798	1,19	(0,45-3,11)	0,729
2	1,18	(0,47-2,92)	0,723	1,23	(0,48-3,10)	0,666
3	1,30	(0,53-3,22)	0,566	1,38	(0,55-3,48)	0,489
4	2,04	(0,80-5,20)	0,137	2,31	(0,89-6,02)	0,086
Efecto por variante alélica**	1,18	(1,04-1,35)	0,010	1,22	(1,07-1,39)	0,004

OR: valor de odds ratio; IC: intervalo de confianza al 95%. P¹: p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística multivariante. P²: estimaciones ajustadas por edad y sexo; ** Para la estimación del efecto por variante alélica la puntuación de la combinación genotípica fue considerada como variable continua

4.3.2.- Asociación de la puntuación del riesgo genético entre el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK y el polimorfismo rs822759 sobre la concentración de c-LDL.

Los polimorfismos rs2014303 del gen CLNK y rs822759, ambos marcadores de ancestro genético, mostraron relación la concentración de c-LDL en la población estudiada. El alelo A y el alelo T de estos polimorfismos respectivamente mostraban mayores niveles de c-LDL en la población estudiada. Al realizar el GRS, los resultados mostraron un aumento de concentración de c-LDL al aumentar el número de alelos de riesgo, siendo los participantes sin ningún alelo de riesgo (CC/GG) los que presentaban menores niveles de c-LDL (121,1±32,9 mg/dl), mientras que portadores de cuatro alelos de riesgo (AA/TT) presentaban mayor concentración de c-LDL (154,8±23,9 mg/dl) (Figura 4.50). La significación estadística se perdió tras ajustar con factores de confusión entre los que se consideraron la obesidad y la DT2M, indicando que este aumento de c-LDL depende no es independiente del efecto de estos genes sobre obesidad y/o DMT2.

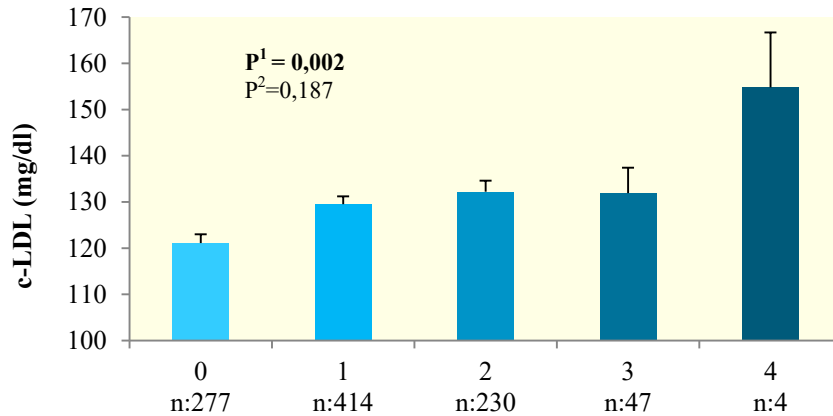


Figura 4.50.- Asociación entre las puntuaciones de riesgo genético (GRS) de los polimorfismos rs2014303 del gen CLNK y rs822759 y la concentración de c-LDL. Barras de error: error estándar. 0 puntos (no alelos de riesgo), 1 punto (1 alelo de riesgo de CLNK o rs822759); 2 puntos (2 alelos de riesgo); 3 puntos (3 alelos de riesgo); 4 puntos (4 alelos de riesgo). $P^1 = 0,002$; $P^2 = 0,187$. P^1 : p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA; P^2 : p-valor ajustado por sexo, edad, DMT2, obesidad, actividad física, adherencia a la DM

4.4.- Estudio piloto de GWAs para la selección de nuevos polimorfismos candidatos relacionados con obesidad y DMT2

Se realizó un estudio de GWAs piloto para la selección de nuevos polimorfismos candidatos relacionados con la obesidad y la DMT2. Para ello se utilizaron muestras del estudio PREDIMED PLUS-Valencia. A continuación se analizó la replicación de los resultados obtenidos en el GWAs en la población del PREDIMED estudiada para los mismos fenotipos basales.

4.4.1.- Estudios PREDIMED PLUS

4.4.1.1.- Características generales de la población

Se incluyeron 308 participantes reclutados en el nodo de Valencia dentro del estudio PREDIMED-PLUS, de los cuales 142 eran hombres (46,1%) y 166 mujeres (53,9%). Todos ellos mostraban un IMC mayor de 27 Kg/m² y al menos 3 criterios de síndrome metabólico pero ninguno había sufrido un evento cardiovascular al inicio del estudio. En la Tabla 4.50 se resumen las características

antropométricas y bioquímicas obtenidas en la visita inicial, analizadas a nivel global y comparando por sexo.

Los hombres mostraron mayores valores medios de peso, cintura, y PAD y menores valores medios con respecto a la edad, CT y c-HDL que las mujeres, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, en la Tabla 4.51 se muestran las características clínicas de la población. Entre los participantes incluidos el 37,6% eran diabéticos, el 69% obesos, el 88,1% hipertensos, el 83,1% hipercolesterolémicos, y el 10,2% presentaban antecedentes familiares de cardiopatía isquémica. El 62,7 % tomaba medicación hipolipemiente, el 77,5% medicación antihipertensiva, el 4,7% insulina y el 32,8% antidiabéticos orales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres.

Tabla 4.50.- Características antropométricas y bioquímicas de la población estudiada y comparación por sexos

	Población total (n=308)	Hombres (n=142)	Mujeres (n=166)	
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	p ¹
Edad (años)	65 ± 5	64 ± 5	67 ± 4	< 0,001
Peso (kg)	84,7 ± 13,4	92,4 ± 13,2	77,6 ± 9,1	< 0,001
IMC (kg/m ²)	32,3 ± 3,4	32,2 ± 3,4	32,4 ± 3,7	0,920
Cintura (cm)	106,2 ± 10,2	110,9 ± 9,2	102,2 ± 9,3	< 0,001
CT (mg/dl)	199,1 ± 36,3	193,5 ± 37,0	204,7 ± 34,3	0,020
c-LDL (mg/dl)	128,1 ± 30,1	126,5 ± 31,6	129,7 ± 27,9	0,432
c-HDL (mg/dl)	51,1 ± 11,0	47,8 ± 9,4	54,7 ± 11,4	< 0,001
TG (mg/dl)	139,5 ± 56,5	137,4 ± 56,4	140,5 ± 56,9	0,429
Glucosa (mg/dl)	115,2 ± 29,8	117,4 ± 30,8	113,9 ± 29,8	0,395
PAS (mmHg)	144,9 ± 18,3	146,4 ± 18,1	143,9 ± 18,6	0,307
PAD (mmHg)	82,7 ± 10,8	84,4 ± 11,6	81,1 ± 10,0	0,036

IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; ¹: p valor de comparación de medias entre sexos mediante una prueba t-Student.

Tabla 4.51.- Características clínicas de la población estudiada y comparación por sexos

	Población total (n=308)	Hombres (n=142)	Mujeres (n=166)	P¹
	%	%	%	
Diabéticos	37,6	41,3	34,2	0,236
Obesos	69,0	70,6	66,4	0,492
Hipertensos	88,1	88,1	88,0	0,209
Hipercolesterolémicos	83,2	83,5	82,9	0,562
Antecedentes de CI	10,2	10,2	10,3	0,877
Medicación:				
Hipolipemiente	62,7	49,2	49,8	0,972
Antihipertensivo	77,5	76,2	77,1	0,880
Insulina	4,7	4,8	4,6	0,952
Antidiabéticos orales	32,8	38,1	29,4	0,176

CI: cardiopatía isquémica; ¹: p valor obtenido al analizar la diferencia de porcentajes entre hombres y mujeres mediante un test Chi-Cuadrado.

4.4.1.2.- Estudio GWAs

Se realizó un estudio de GWAs piloto en 308 participantes del estudio PREDIMED PLUS. Se analizaron alrededor de 700.000 polimorfismos para cada muestra para realizar un cribado e identificar nuevos polimorfismos asociados a obesidad, DMT2 o parámetros relacionados. A continuación se representaron los resultados de manera visual mediante gráficas Manhattan plot donde se mostraron el logaritmo negativo del valor de p como función de la localización cromosómica. Debido a que el tamaño muestral analizado fue bajo, se utilizó el nivel de significación $P < 1 \times 10^{-5}$ ($-\log P = 5$) en lugar del valor que habitualmente se utiliza en los estudios de GWAs ($P < 1 \times 10^{-8}$). Todo punto superior a ese umbral se consideró estadísticamente significativo.

En el caso de la obesidad, se analizaron dos parámetros antropométricos muy relacionados como son el IMC (Figura 4.51) y el perímetro de cintura (Figura 4.52). Se seleccionaron los 25 polimorfismo asociados de manera más significativa con ambos parámetros. La relación de polimorfismos se detallan en la tabla 4.52 para el IMC y en la tabla 4.53 con el perímetro de cintura.

En el caso de la DMT2, se identificaron polimorfismos asociados a los niveles de glucosa plasmática representados gráficamente en la figura 4.53. Se identificaron más de 80 polimorfismos relacionados de manera significativa con la concentración de glucosa (Tabla 4.54). A continuación se analizó el riesgo de DMT2. Se observaron diferentes polimorfismos que, de manera significativa, se relacionaban con el riesgo a desarrollar esta patología. De estos resultados se seleccionaron los 25 polimorfismos cuyos resultados fueron más estadísticamente significativos, donde se encontraron variantes genéticas que conferían mayor riesgo y otras variantes que eran protectores frente a la enfermedad (Tabla 4.55).

Estos resultados muestran una probable asociación con parámetros relacionados con obesidad y DMT2. Para poder confirmarlos, estos polimorfismos se testaron posteriormente en la población del estudio PREDIMED que presentaba mayor tamaño poblacional mayor.

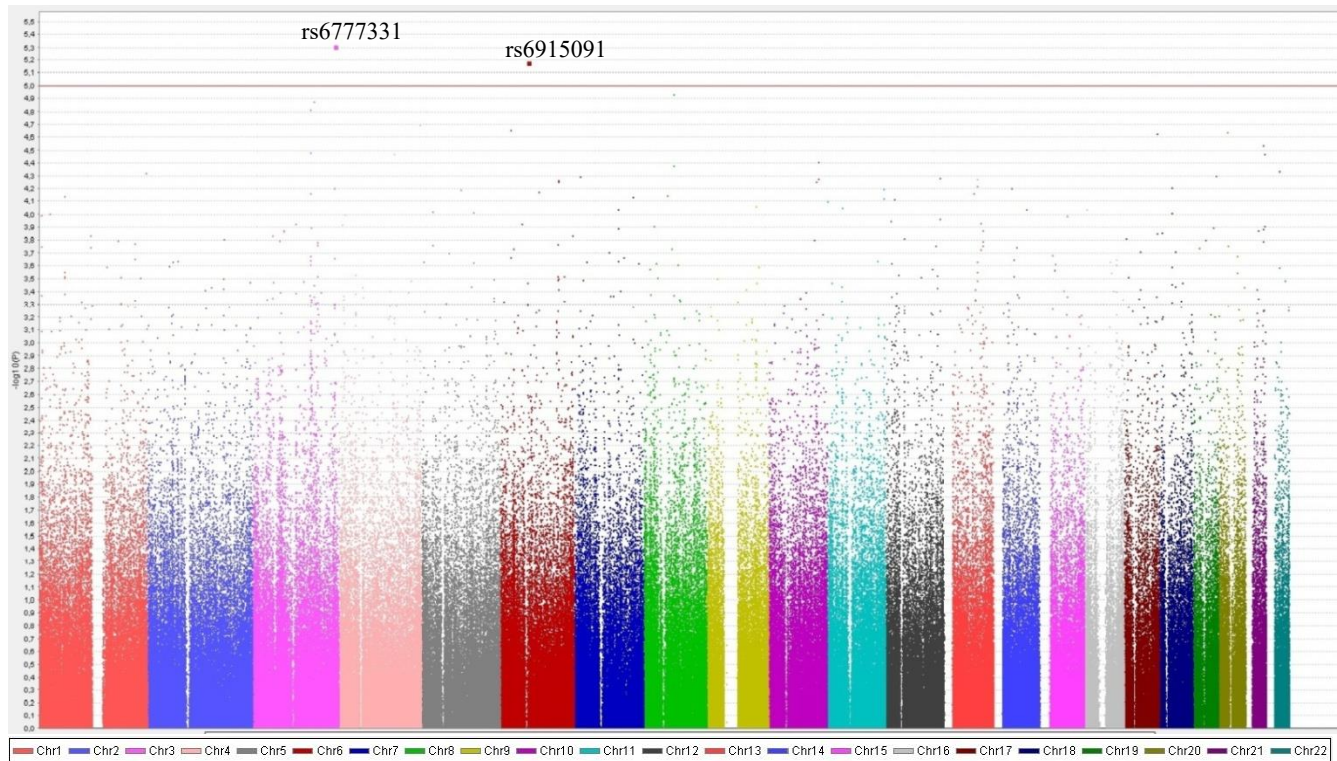


Figura 4.76.- Gráfica Manhattan Plot para el estudio de asociaciones de polimorfismos con IMC en el estudio PREDIMED PLUS. Línea indicada: $p=1 \times 10^{-5}$

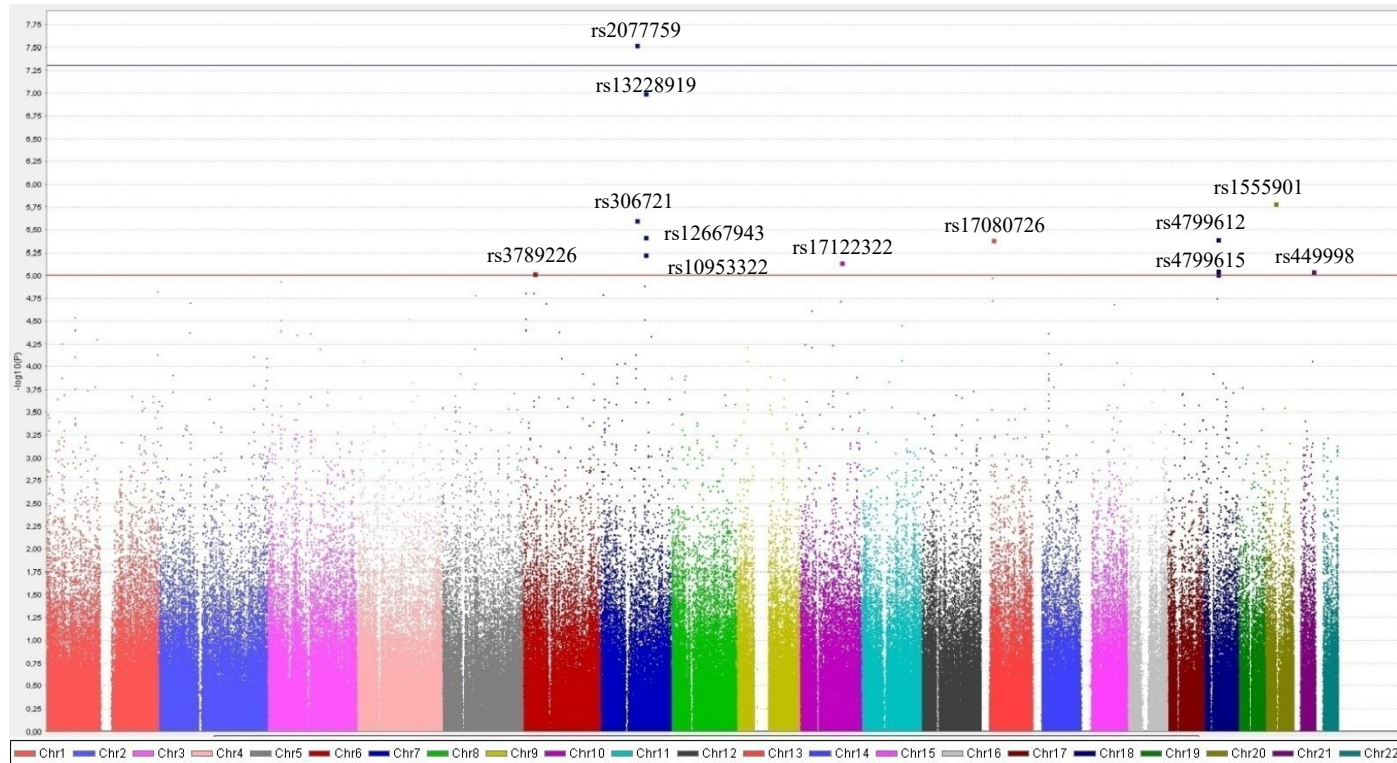


Figura 4.77.- Gráfica Manhattan Plot para el estudio de asociaciones de polimorfismos con perímetro de cintura en el estudio PREDIMED PLUS. Línea superior: $p=5 \times 10^{-8}$; línea inferior: $p=1 \times 10^{-5}$

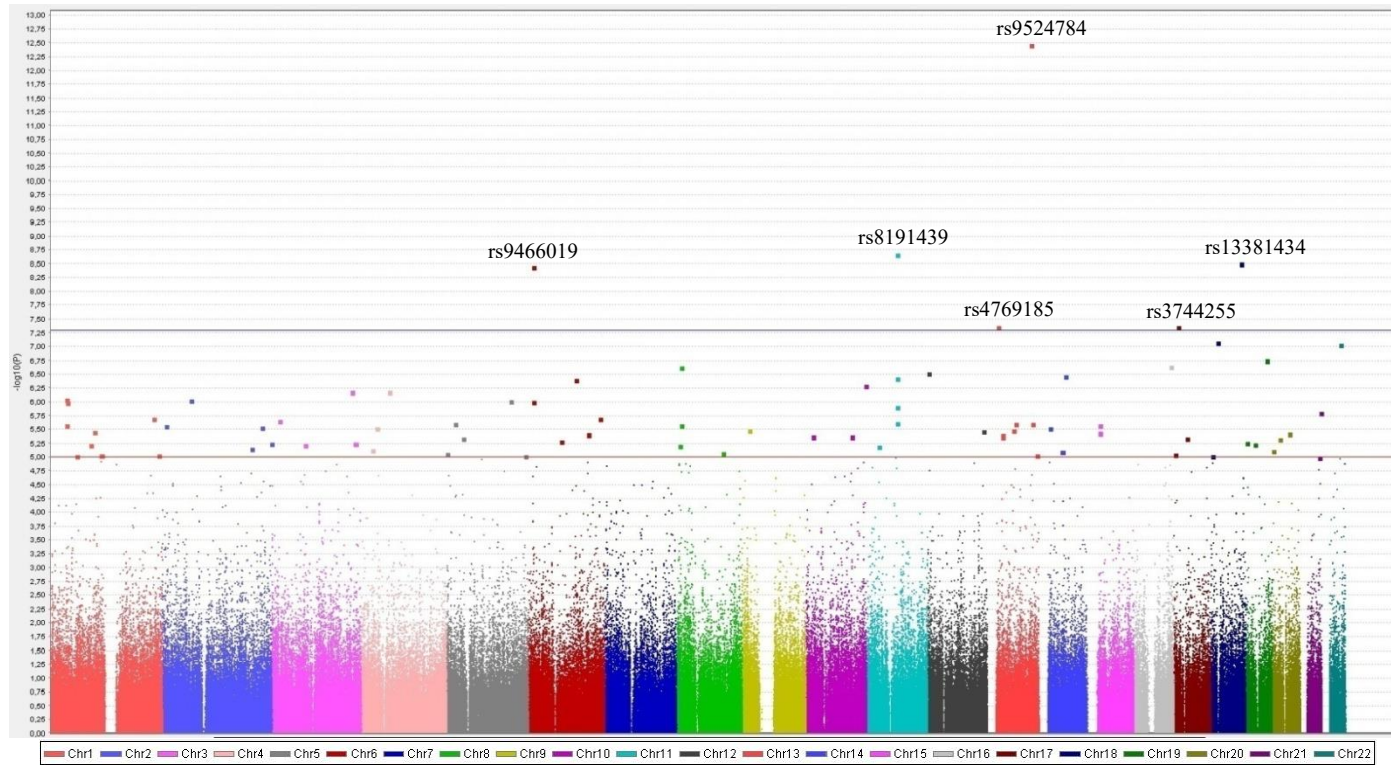


Figura 4.78.- Gráfica Manhattan Plot para el estudio de asociaciones de polimorfismos con niveles de glucosa plasmática en el estudio PREDIMED PLUS. Línea superior: $p=5 \times 10^{-8}$; línea inferior: $p=1 \times 10^{-5}$

Tabla 4.52.- Relación de polimorfismos identificados por estudio de GWAS asociados más significativamente con IMC en la población PREDIMED PLUS

SNP	GEN	Cr	Posición	BETA	SE	R ²	P
rs6777331	LINC01991	3	187683685	-1,259	0,270	0,068	4,88E-06
rs6915091	Intergénico	6	63954459	1,583	0,345	0,066	6,62E-06
rs6472439	LINC01592	8	69997500	-1,403	0,315	0,063	1,18E-05
rs10513093	CLSTN2	3	139728371	-1,662	0,376	0,062	1,34E-05
rs1197298	TMEM108	3	133105729	-1,208	0,275	0,061	1,54E-05
rs1868893	F11-AS1	4	187287475	-2,189	0,506	0,059	2,04E-05
rs3789226	DCDC2	6	24286502	1,790	0,415	0,059	2,23E-05
rs1555901	Intergénico	20	20814132	1,237	0,288	0,059	2,32E-05
rs9900564	PGS1	17	76377458	-1,167	0,272	0,059	2,40E-05
rs449998	DSCAM	21	41467826	1,425	0,336	0,057	2,91E-05
rs4854719	TMEM108	3	133097119	-1,215	0,288	0,057	3,32E-05
rs35518193	HSPA4L	4	128741710	2,842	0,675	0,056	3,39E-05
rs13340012	UMODL1	21	43486079	-2,100	0,499	0,056	3,40E-05
rs1127687	CASP7	10	115490109	-1,390	0,333	0,055	3,95E-05
rs1896135	LINC01592	8	69995213	-1,335	0,321	0,055	4,19E-05
rs2179100	Intrónico	22	27756439	-1,241	0,300	0,054	4,60E-05
rs12126135	CNST	1	246814806	2,109	0,511	0,054	4,74E-05
rs4801988	ZNF331	19	54011384	1,574	0,383	0,054	5,03E-05
rs6962343	Intrónico	7	13910748	-1,156	0,281	0,055	5,07E-05
rs4765602	Intrónico	12	125172685	-1,190	0,290	0,054	5,20E-05
rs11196454	Intrónico	10	115493733	-1,367	0,333	0,054	5,30E-05
rs9593136	LMO7DN	13	76453458	1,198	0,292	0,054	5,32E-05
rs9375987	TARID	6	134178405	-1,103	0,270	0,054	5,52E-05
rs11813768	Intrónico	10	110598065	-1,692	0,414	0,053	5,61E-05
rs1126392	LINC01312	6	134172950	-1,082	0,265	0,053	5,67E-05

SNP: Polimorfismo; Cr: cromosoma; BETA: coeficiente de regresión; SE: error estándar; R²: coeficiente de correlación; P: p-valor

Tabla 4.53.- Relación de polimorfismos identificados por estudio de GWAS asociados más significativamente con perímetro de cintura en la población PREDIMED PLUS

SNP	GEN	Cr	Posición	BETA	SE	R ²	P
rs2077759	Intrónico	7	79888510	-4,644	0,815	0,099	2,96E-08
rs13228919	Intergénico	7	100711147	6,614	1,210	0,092	9,76E-08
rs1555901	Intergénico	20	20814132	4,084	0,834	0,075	1,59E-06
rs306721	Intrónico	7	79902287	-4,617	0,960	0,073	2,42E-06
rs12667943	Intergénico	7	100755709	5,629	1,194	0,070	3,72E-06
rs4799612	Intergénico	18	29554761	3,833	0,815	0,070	3,94E-06
rs17080726	PARP4	13	25042041	-6,847	1,458	0,069	4,06E-06
rs10953322	Intrónico	7	100746658	5,157	1,116	0,067	5,73E-06
rs17122322	SLC16A12	10	91238209	11,880	2,597	0,066	7,07E-06
rs4799615	Intrónico	18	29561668	3,581	0,791	0,065	8,73E-06
rs972357	Intrónico	18	29551854	3,708	0,820	0,065	8,81E-06
rs449998	DSCAM	21	41467826	4,419	0,978	0,064	8,89E-06
rs3789226	DCDC2	6	24286502	5,462	1,211	0,064	9,36E-06
rs4239371	Intrónico	18	29547585	3,818	0,848	0,064	9,57E-06
rs9553322	PARP4	13	25069574	-6,378	1,424	0,063	1,08E-05
rs11922492	Intrónico	3	30399578	-3,852	0,864	0,063	1,18E-05
rs13239478	MUC17	7	100666552	5,080	1,146	0,062	1,32E-05
rs12126135	CNST	1	246814806	6,549	1,488	0,061	1,50E-05
rs9295616	DCDC2	6	24233032	5,342	1,216	0,062	1,56E-05
rs2768990	Intrónico	6	6936571	3,906	0,889	0,062	1,56E-05
rs17137412	UMAD1	7	7800687	5,836	1,331	0,061	1,61E-05
rs7715806	Intergénico	5	75034387	-3,547	0,810	0,061	1,66E-05
rs2009538	Intrónico	18	29551711	3,439	0,789	0,060	1,78E-05
rs7985561	PARP4	13	25065550	-6,302	1,449	0,060	1,88E-05
rs7918159	SLC16A12	10	91201269	11,320	2,606	0,060	1,93E-05

SNP: Polimorfismo; Cr: cromosoma; BETA: coeficiente de regresión; SE: error estándar; R²: coeficiente de correlación; P: p-valor

Tabla 4.54.- Relación de polimorfismos identificados por estudio de GWAS asociados más significativamente con niveles de glucosa plasmática en la población PREDIMED PLUS

SNP	GEN	Cr	Posición	BETA	SE	R ²	P
rs9524784	ABCC4	13	95707227	60,50	7,94	0,166	3,48E-13
rs8191439	GSTP1	11	67351297	51,71	8,36	0,116	2,10E-09
rs13381434	Intergénico	18	65690189	69,66	11,40	0,113	3,14E-09
rs9466019	Intrónico	6	10356036	50,23	8,25	0,113	3,55E-09
rs3744255	DNAH2	17	7637789	64,90	11,53	0,098	4,30E-08
rs4769185	Intergénico	13	22561282	61,45	10,93	0,097	4,38E-08
rs8097356	Intrónico	18	13924133	63,40	11,53	0,093	8,25E-08
rs5750871	CACNA1I	22	40069449	39,07	7,13	0,093	9,25E-08
rs4445998	EML2	19	46116787	41,98	7,84	0,089	1,70E-07
rs3745816	EML2	19	46112907	41,99	7,85	0,089	1,77E-07
rs8063275	Intrónico	16	82048234	58,31	11,00	0,087	2,29E-07
rs7822872	Intergénico	8	8378925	52,93	9,99	0,087	2,31E-07
rs11061686	ERC1	12	1395130	43,93	8,38	0,086	3,01E-07
rs242385	PELI2	14	56596392	35,47	6,79	0,085	3,34E-07
rs7396248	Intrónico	11	67029223	54,42	10,46	0,084	3,69E-07
rs4930198	Intrónico	11	67144747	54,42	10,46	0,084	3,69E-07
rs887316	RAD9A	11	67158848	54,42	10,46	0,084	3,69E-07
rs2066494	RAD9A	11	67165015	54,42	10,46	0,084	3,69E-07
rs6906370	Intergénico	6	104503032	33,81	6,52	0,084	3,99E-07
rs12572521	Intergénico	10	132473616	63,95	12,45	0,082	5,10E-07
rs531622	Intergénico	4	60931440	35,05	6,89	0,081	6,46E-07
rs4550834	Intrónico	3	177981071	68,61	13,49	0,082	6,55E-07
rs12064550	Intrónico	1	35635453	67,70	13,48	0,079	8,98E-07
rs6732313	Intrónico	2	62892214	52,22	10,40	0,079	9,05E-07
rs4151681	PCDHA1	5	140201219	44,51	8,88	0,079	9,42E-07
rs9368317	Intergénico	6	10378167	40,97	8,18	0,079	9,65E-07
rs16866306	PSMB2	1	36068790	58,07	11,62	0,078	1,00E-06
rs1573536	SSH3	11	67079177	54,77	11,04	0,078	1,20E-06

rs756574	PDE9A	21	44177438	43,58	8,89	0,076	1,55E-06
rs350289	SYNJ2	6	158509750	22,25	4,59	0,074	2,01E-06
rs16847852	Intergénico	1	227642730	35,71	7,36	0,074	2,01E-06
rs7625615	ANKRD28	3	15838761	53,26	11,02	0,074	2,17E-06
rs887315	Intrónico	11	67088720	46,38	9,64	0,073	2,41E-06
rs2938416	Intergénico	5	18212238	60,15	12,51	0,073	2,46E-06
rs9584842	FARP1	13	99067805	30,51	6,35	0,073	2,48E-06
rs2153747	Intergénico	13	60876431	19,65	4,09	0,073	2,48E-06
rs12090691	Intergénico	1	35067543	30,26	6,31	0,073	2,59E-06
rs4841161	Intergénico	8	9357874	20,53	4,28	0,073	2,60E-06
rs7171937	SNORD116-18	15	25329547	48,23	10,07	0,073	2,66E-06
rs16864032	LINC01248	2	5798242	23,60	4,93	0,072	2,70E-06
rs16859228	TTL4	2	219583858	59,92	12,56	0,072	2,89E-06
rs7695326	Intergénico	4	33217636	41,34	8,68	0,072	2,96E-06
rs2180852	Intrónico	14	23964516	22,83	4,79	0,072	2,98E-06
rs10756538	NFIB	9	14194856	64,38	13,56	0,072	3,25E-06
rs9537220	Intergénico	13	56212716	23,81	5,02	0,071	3,25E-06
rs28439749	VPS33A	12	122716189	55,73	11,76	0,071	3,34E-06
rs841339	LINC01057	1	95142843	28,40	6,01	0,071	3,50E-06
rs12592215	SNRPN	15	25114867	17,03	3,61	0,071	3,62E-06
rs6026793	ARHGAP40	20	37239167	23,79	5,05	0,070	3,72E-06
rs7773477	ENPP1	6	132168997	26,00	5,52	0,071	3,82E-06
rs9534262	BRCA2	13	32936646	-12,98	2,76	0,070	3,92E-06
rs535182	HPSE2	10	100324333	22,56	4,81	0,070	4,18E-06
rs7092449	FAM107B	10	14797275	63,22	13,48	0,070	4,20E-06
rs4942486	BRCA2	13	32953388	-12,99	2,77	0,070	4,23E-06
rs9908931	PIPOX	17	27381531	54,63	11,68	0,070	4,45E-06
rs37438	DNAJC21	5	34952081	63,20	13,52	0,069	4,50E-06
rs16997703	KIF16B	20	16466126	39,06	8,37	0,069	4,67E-06
rs16881166	Intrónico	6	72058762	51,59	11,10	0,068	5,08E-06
rs7246173	STK11	19	1224259	62,69	13,53	0,068	5,41E-06

rs4572747	VPS8	3	184700356	48,83	10,55	0,068	5,57E-06
rs10207474	HDAC4	2	240055931	51,37	11,10	0,068	5,61E-06
rs16996008	Intrónico	19	19365400	62,23	13,48	0,068	5,81E-06
rs4534351	Intergénico	1	88117423	28,75	6,23	0,068	5,82E-06
rs1490508	Intrónico	3	72766902	28,12	6,10	0,067	5,94E-06
rs17073828	Intrónico	8	5368274	25,06	5,44	0,067	6,13E-06
rs16914101	Intergénico	11	25563493	62,54	13,59	0,068	6,29E-06
rs1371122	SLC39A10	2	196521002	53,91	11,77	0,067	6,81E-06
rs9288252	DNAH7	2	196617272	53,91	11,77	0,067	6,81E-06
rs13409329	DNAH7	2	196746094	53,91	11,77	0,067	6,81E-06
rs9884254	Intrónico	4	23579235	57,37	12,56	0,066	7,26E-06
rs6105249	Intergénico	20	1485337	50,38	11,05	0,066	7,51E-06
rs2182078	MGAT2	14	50090446	37,06	8,15	0,066	7,90E-06
rs16868356	NCALD	8	102770464	53,40	11,77	0,065	8,38E-06
rs2672715	AHRR	5	404804	14,11	3,12	0,065	8,65E-06
rs11871926	SMG6	17	2084712	29,79	6,59	0,065	8,80E-06
rs7317600	Intergénico	13	109207317	43,25	9,57	0,065	9,02E-06
rs1857514	CYMP	1	111027035	26,18	5,79	0,065	9,04E-06
rs12077338	PGCP1	1	111930916	39,06	8,65	0,065	9,16E-06
rs12041334	CHRM3	1	239683556	-13,06	2,89	0,065	9,18E-06
rs322372	Intrónico	5	172176461	45,55	10,10	0,065	9,34E-06
rs7539051	PLPP3	1	57042954	33,32	7,39	0,065	9,40E-06
rs623573	SMCHD1	18	2687926	43,37	9,62	0,065	9,49E-06
rs2837433	DSCAM	21	41492475	19,39	4,31	0,064	9,87E-06
rs11568304	RELA	11	65421339	52,89	11,78	0,064	1,03E-05
rs5757760	CACNA1I	22	40044402	25,83	5,76	0,064	1,06E-05

SNP: Polimorfismo; Cr: cromosoma; BETA: coeficiente de regresión; SE: error estándar; R²: coeficiente de correlación; P: p-valor

Tabla 4.55.- Análisis del riesgo de DMT2 en polimorfismos identificados mediante GWAs en el estudio PREDIMED PLUS

SNP	GEN	Cr	Posición	P	SE	OR (IC95)
rs2074142	DFNA5	7	24742585	4,50E-06	0,25	0,32 (0,20-0,53)
rs13187383	Intergénico	5	31010683	1,27E-05	0,18	2,15 (1,52-3,03)
rs13439699	Intergénico	8	78060354	1,34E-05	0,19	0,45 (0,31-0,64)
rs12713828	TACR1	2	75276081	2,00E-05	0,17	2,07 (1,48-2,90)
rs7860122	HAUS6	9	19087429	2,13E-05	0,20	2,28 (1,55-3,36)
rs1431114	PDZRN4	12	41628502	2,70E-05	0,18	2,08 (1,47-2,93)
rs9302760	SIAH1	16	48471330	2,76E-05	0,20	2,25 (1,53-3,29)
rs3739668	TBC1D2	9	100963653	2,92E-05	0,18	0,47 (0,33-0,67)
rs2275387	GCM2	6	10882175	2,96E-05	0,26	2,83 (1,71-4,67)
rs9645832	Intergénico	12	41531873	3,03E-05	0,17	2,04 (1,46-2,86)
rs16875333	Intrónico	5	5324983	3,06E-05	0,33	3,66 (1,92-6,97)
rs13310494	LHFPL3	7	104416645	3,26E-05	0,17	0,49 (0,35-0,69)
rs4303857	Intergénico	3	994754	3,66E-05	0,20	2,27 (1,53-3,38)
rs7964073	Intergénico	12	41551465	3,84E-05	0,18	2,05 (1,45-2,90)
rs10838251	ALX4	11	44311968	3,97E-05	0,18	2,11 (1,47-3,01)
rs6561194	Intergénico	13	45476808	4,01E-05	0,19	2,21 (1,51-3,23)
rs6947831	EXOC4	7	133234255	4,27E-05	0,18	2,04 (1,45-2,88)
rs3828595	GRIA1	5	152871721	4,36E-05	0,23	0,41 (0,26-0,63)
rs6017418	RIMS4	20	43402696	4,37E-05	0,18	2,11 (1,47-3,02)
rs4768335	PDZRN4	12	41606680	4,43E-05	0,18	2,04 (1,45-2,89)
rs10498454	Intrónico	14	54238997	4,52E-05	0,24	0,38 (0,23-0,61)
rs12894060	Intergénico	14	54226373	4,68E-05	0,21	0,43 (0,28-0,65)
rs4862031	TENM3	4	183068987	4,85E-05	0,18	2,04 (1,44-2,88)
rs281832	Intergénico	12	41538663	4,99E-05	0,18	2,03 (1,44-2,85)
rs1431104	PDZRN4	12	41594551	4,99E-05	0,18	2,03 (1,44-2,85)

SNP: Polimorfismo; Cr: cromosoma; P: p-valor; SE: error estándar; OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente; IC95: intervalo de confianza al 95%

4.4.2.- Replicación de los resultados en el estudio PREDIMED

En el próximo apartado se presentarán los resultados más relevantes obtenidos al analizar los polimorfismos más asociados a IMC, perímetro de cintura y glucosa del GWAs PREDIMED PLUS en el estudio PREDIMED.

4.4.2.1.- Estudio de los polimorfismos más asociados a IMC

El polimorfismo más significativamente asociado con IMC en la muestra de participantes PREDIMED PLUS ha sido el rs6777331. Al analizar la asociación de este SNP con IMC en el estudio PREDIMED, no hemos encontrado significación estadística ni en el total de la población, ni en hombres ni en mujeres

Tampoco hemos encontrado asociación estadísticamente significativa con el SNP segundo en significación estadística (polimorfismo intergénico rs6915091), ni con el tercero (otro polimorfismo situado en un RNA largo no codificante, rs6472439).

Elegimos al azar un polimorfismo (rs4801988) situado en un gen, en este caso el gen ZNF331 (zinc fingerprotein 331) para analizar su asociación en IMC en los participantes del estudio PREDIMED. En el estudio PREDIMED, el polimorfismo rs4801988 en el gen ZNF331 presenta una asociación en el límite de la significación estadística con el IMC (Ptendencia=0,089), y estadísticamente significativa su asociación con perímetro de la cintura (P tendencia=0,049). La significación estadística no varía tras ajuste multivariante por edad y sexo (Tabla 4.56).

Tabla 4.56.- Variables antropométricas (IMC y perímetro de cintura) según el genotipo del polimorfismo rs4801988 del gen ZNF331 en la población PREDIMED

	TT	CT	CC	
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	P tend
IMC (kg/m ²)	30,8±4,7	30,4±4,7	29,3±3,6	0,089
Cintura (cm)	103,6±12,4	102,1±11,7	99,5±8,9	0,049

P tend: p de tendencia tras comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA

4.4.2.2.- Estudio de los polimorfismos más asociados a perímetro de cintura

El polimorfismo rs2077759 situado en el cromosoma 7, en una localización funcional todavía no bien definida, que ha sido el que más significación estadística ha mostrado en el GWAs realizado en los participantes PREDIMED PLUS, también ha mostrado asociación estadísticamente significativa con el perímetro de la cintura en los pacientes PREDIMED ($P=0,022$). Sin embargo, aunque la P de tendencia es estadísticamente significativa ($P=0,034$), ascendiendo la cintura en los portadores de la variante alélica, este incremento no se observa en los homocigotos para la variante mutada. Este efecto se observa de manera similar en hombres y en mujeres, aunque sin alcanzar la significación estadística por separado.

Analizando hombres y mujeres conjuntamente y ajustando adicionalmente por sexo, edad y diabetes en un modelo multivariante, el polimorfismo siguió asociado con el perímetro de la cintura de manera significativa ($P=0,011$), mostrando similar tendencia en las medias ajustadas de los efectos (Tabla 4.57).

Tabla 4.57.- Perímetro de cintura en función del polimorfismo rs2077759.

	Cintura (cm)	P ¹	P tend	P ²
	Media ± DS			
AA	102,2±4,7	0,022	0,034	0,011
AG	104,3±12,4			
GG	102,1±12,8			

P tend: p de tendencia; ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA; ²: p valor ajustado por sexo, edad y diabetes en un modelo multivariante

El segundo polimorfismo más significativo para el perímetro de la cintura en el GWAS PREDIMED PLUS, el rs13228919, también ha mostrado asociación significativa con el perímetro de la cintura en el estudio PREDIMED. Su frecuencia es menor que el polimorfismo anterior, pero también está localizado en el cromosoma 7, de manera poco definida en su asignación a algún gen. Debido a su menor frecuencia, se agrupan los portadores del alelo menor utilizando un modelo dominante. Estas diferencias permanecen estadísticamente significativas al ajustar en un modelo multivariante por sexo y edad ($P=0,049$) (Figura 4.54).

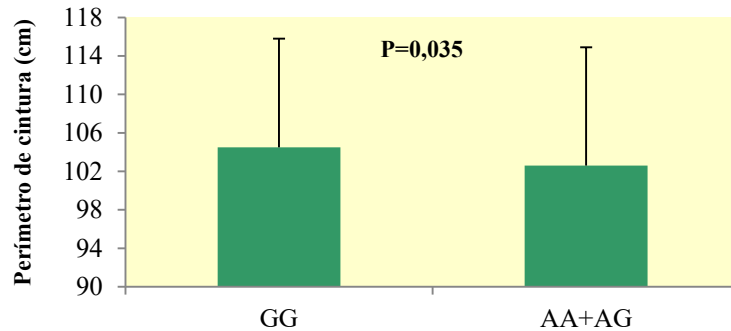


Figura 4.54.- Medida del perímetro de cintura según el genotipo del polimorfismo rs13228919 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Tras analizar los dos polimorfismos más significativos, elegimos al azar otra variante genética del listado de los 25 polimorfismos más significativos, con la condición de que estuviera localizada en algún gen. Esta fue el polimorfismo rs13239478, localizado en el gen MUC17 situado en el cromosoma 7. Al estudiar la asociación del SNP en el gen MUC17 y perímetro de la cintura, se observa que a medida que aumenta el número de alelos mutados, el perímetro se incrementa, sin embargo este incremento no alcanza la significación estadística. Sin embargo, al analizar su efecto en mujeres, se obtiene una asociación estadísticamente significativa en mujeres (P tendencia=0,037). Este mismo polimorfismo también se asocia con mayor índice de masa corporal en mujeres (P tendencia= 0,014). Estos resultados no pierden la significación estadística tras ajuste por la edad.

Tabla 4.58.- Variables antropométricas (IMC y perímetro de cintura) según el genotipo del polimorfismo rs13239478 del gen MUC17 en mujeres de la población PREDIMED

	AA	AC	CC	P tend
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
Cintura (cm)	101,7±12,4	103,5±11,6	108,9±11,8	0,037
IMC (kg/m ²)	31,0±5,0	31,6±5,0	34,7±6,7	0,014

P tend: p de tendencia tras comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA

4.4.2.3.- Estudio de los polimorfismos más asociados a glucemia

El polimorfismo rs9524784 del gen ABCC4 se asoció fuertemente con los niveles de glucemia en el GWAs realizado en el estudio PREDIMED PLUS. En el estudio PREDIMED no se asocia significativamente con glucemia, sin embargo, hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa con mortalidad total, que es uno de los end-points secundarios del PREDIMED y posiblemente refleje la implicación de este polimorfismo en distintas funciones relacionadas con la glucemia y enfermedades metabólicas asociadas. Dada la novedad del hallazgo y el interés farmacológico de este gen, hemos incluido este resultado en la Tesis, aunque mortalidad no fuera un fenotipo seleccionado a priori.

En el estudio PREDIMED, 1025 personas poseen datos de este genotipo. De ellos, en el primer seguimiento hasta el 1 de diciembre de 2010, fallecieron 48 personas. Los portadores del alelo mutado (T) fueron agrupados en un modelo dominante debido a la baja frecuencia. En las personas homocigotas normales, en el primer seguimiento, el 4.4% fallecieron (eventos confirmados por el Comité de Eventos del PREDIMED), sin embargo en los portadores del alelo mutado, esta cifra ascendió al 11.4% ($P=0,031$). Se verificó también si esta asociación se presentaba en el seguimiento extendido de los pacientes PREDIMED hasta el 30 de junio de 2012. Hasta dicha fecha, se produjeron 71 fallecimientos (confirmados por el Comité de Eventos) en las 1025 personas con genotipo para este polimorfismo. La incidencia de fallecimientos en los homocigotos normales fue del 6,5%, mientras que en los portadores del alelo mutado ascendió al 15.9% ($P=0,016$) (Figura 4.56).

Centrándonos en las defunciones ocurridas hasta el seguimiento extendido, y ajustado por la intervención con DM (los tres grupos) y el sexo, y teniendo en cuenta el tiempo que transcurre hasta la defunción mediante el ajuste de un modelo de regresión de Cox multivariante, obtenemos un riesgo de fallecer de más del doble en los portadores del alelo mutado que en los homocigotos normales (OR: 2,32 IC95% (1,05-5,10); $P=0,037$). Tras ajustar por DMT2 y edad, la asociación con mortalidad permanece estadísticamente significativa ($P=0,046$). Seguiremos investigando el efecto de este polimorfismo en un mayor número de pacientes PREDIMED así como su modulación por la dieta mediterránea.

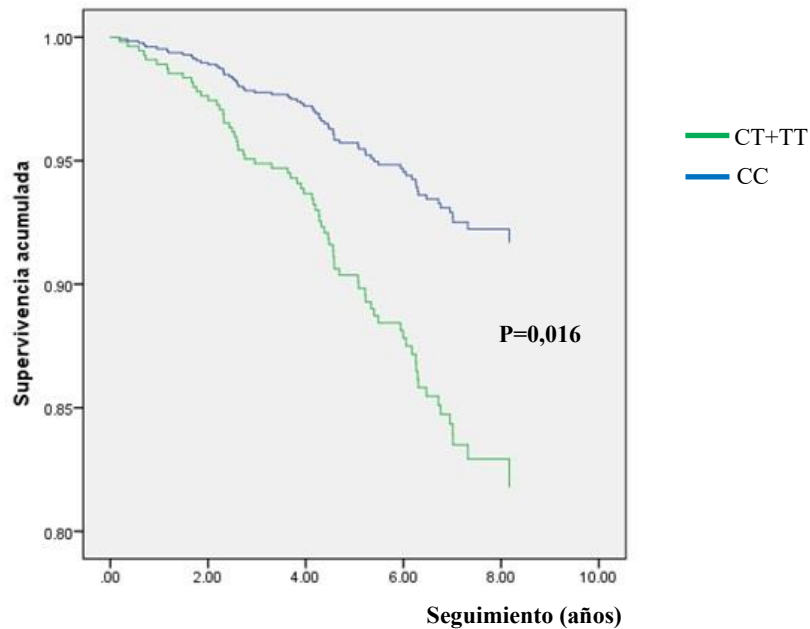


Figura 4.55.- Supervivencia según el genotipo del polimorfismo rs9524784 del gen ABCC4 en participantes del estudio PREDIMED

El segundo polimorfismo más asociado con glucemia en el PREDIMED PLUS fue el rs8191439 del gen GSTP1 (glutathione S-transferase pi 1). Aunque el gen GSTP1 ha sido asociado con DMT2, este polimorfismo concretamente ha sido poco estudiado quizá por su baja prevalencia o porque sea más específico de la población mediterránea.

En el estudio PREDIMED hemos encontrado una asociación con las concentraciones plasmáticas de glucosa basal en el límite de la significación estadística al considerar hombre y mujeres conjuntamente ($P=0,059$). Sin embargo, en las mujeres las diferencias entre los genotipos alcanzaron la significación estadística ($P=0,016$).

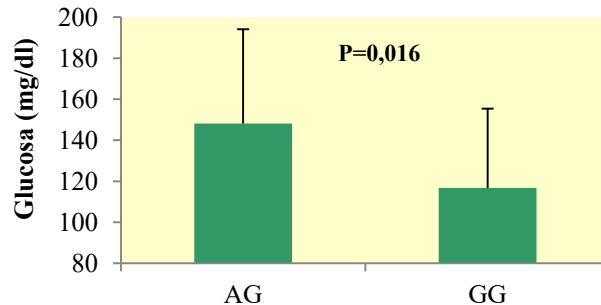


Figura 4.56.- Niveles de glucosa en función del polimorfismo rs8191439 del gen GSTP1 en mujeres del estudio PREDIMED (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)

Esta asociación perdió la significación estadística al ajustar por DMT2 ($P=0,095$), sugiriendo que este polimorfismo podría estar asociado al propio estado de diabetes. Por ello analizamos la asociación del polimorfismo con DMT2. Del mismo modo que para la glucemia, encontramos una mayor asociación en las mujeres que en los hombres, alcanzando en las primeras la significación estadística ($P=0,032$).

Eligiendo al azar otros polimorfismos del listado de los que han presentado valores significativos de GWAS o sugerentes de asociación, hemos hallado una gran asociación del polimorfismo rs3745816 en el cromosoma 19 (así como el rs4445998, situado en el mismo gen en alto desequilibrio de ligamiento), gen EML2, y la DMT2. Este gen no ha sido asociado previamente con DMT2. En nuestro estudio, la asociación con DMT2 la observamos en la población en su conjunto ($P=0,038$) y el efecto es muy similar en hombres y en mujeres. El riesgo conjunto asociado a ser portador del alelo mutado es OR: 1,99 IC95% (1,02-3,88); $P=0,032$.

Otros polimorfismos elegidos al azar han sido asociado también con glucemia en el estudio PREDIMED, sin embargo no realizamos un análisis detallado de los mismos ya que escapa de los objetivos de esta Tesis y este aspecto será abordado en profundidad con posterioridad ampliando el tamaño de muestra y realizando colaboraciones con otros estudios para conocer la replicación en poblaciones de otros orígenes geográficos.

5

DISCUSIÓN

La obesidad y la DMT2 son enfermedades y, a su vez, factores de riesgo para otras patologías importantes, siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial debido al incremento de su prevalencia en los últimos años. La obesidad se define como una enfermedad crónica multifactorial producida por un desequilibrio entre el aporte de energía y el gasto energético, lo que provoca un aumento de la grasa corporal. La DMT2, por otro lado, es un desorden metabólico que se caracteriza por un defecto en la secreción de la insulina, un defecto en su acción o ambas, provocando un elevado nivel de azúcar en sangre. Investigaciones realizadas en las últimas épocas han permitido una mejor comprensión de ambas enfermedades así como los factores relacionados con ellas. Se ha demostrado que en ambas patologías tanto los factores genéticos como los factores ambientales influyen en el posible desarrollo de ellas, definiéndolas como poligénicas y multifactoriales. Ambas enfermedades se consideran factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Recientes estudios han mostrado que alteraciones en la regulación epigenética pueden afectar a la etiología y progresión de la obesidad y la DMT2. Esto ha hecho que los estudios de epigenética están emergiendo como un campo de estudio muy importante para el incremento de conocimiento sobre la predisposición a estas enfermedades.

En el presente trabajo se analizó, en una población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular, la posible influencia de diversas variantes genéticas en el desarrollo de la obesidad y la DMT2, así como las variaciones fenotípicas expresadas en función de las interacciones gen*ambiente y gen*gen. Por último, se realizó un estudio de metilación en regiones de dos genes, el gen FTO y el gen TCF7L2, ambos muy relacionados con ambas patologías y se observó su posible asociación con estas patologías.

En el presente apartado se presenta, en primer lugar, la discusión de los resultados obtenidos con las características generales de la población estudiada, así como los factores ambientales o de estilo de vida. A continuación, se realiza la discusión de los polimorfismos analizados y las interacciones gen*ambiente y gen*gen.

Seguidamente se abordan los resultados de genotipado obtenidos mediante la técnica de GWAs. Por último, se analizan los resultados del estudio epigenético de metilación.

5.1.- Características generales de la población estudiada y en relación con el desarrollo de la obesidad y la DMT2

En el presente trabajo se analizaron las características basales de los participantes del estudio PREDIMED reclutados en el nodo de Valencia. Estos participantes se caracterizan por presentar elevado riesgo cardiovascular al tratarse de población de edad elevada, bien diabéticos o con tres o más de los siguientes criterios: dislipemia, hipertensión arterial, sobrepeso, antecedentes familiares de cardiopatía precoz o tabaquismo. Así pues, en esta población, la prevalencia de diabéticos, obesos, hipercolesterolémicos e hipertensos es elevada con respecto a población general (Lahoz C et al, 2007; Bertomeu V et al, 2008; Gabriel R et al, 2008).

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial, por lo que su prevención es un desafío para la salud pública (OMS, 2015b). El sobrepeso, la obesidad y la DMT2 se conocen como las pandemias del siglo XXI. La obesidad abdominal y la resistencia a la insulina son factores de riesgo de DMT2 y de enfermedades cardiovasculares. Con la edad, la masa magra, incluyendo la masa muscular, va disminuyendo y aumenta la masa grasa, que se acumula sobre todo en el área central, tanto visceral como abdominal (Yoneshiro et al, 2011; Lee CG et al 2011; Lee M-J et al 2012) y se da tanto en hombres como en mujeres. Este acúmulo de grasa conlleva un mayor riesgo de complicaciones metabólicas como la hipertensión, la DMT2, ECV, enfermedades pulmonares y cáncer. En el presente estudio al ser criterios de inclusión, los participantes presentaban diferentes fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular aunque se observaron diferencias en función del sexo en varios aspectos de riesgo cardiovascular.

La prevalencia de la hipercolesterolemia fue elevada en la población estudiada. Aunque se encontraron diferencias según el sexo, donde las mujeres presentaban mayor porcentaje de hipercolesterolemia. Se ha definido la dislipemia, es decir, alteraciones de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en sangre, como un factor de riesgo cardiovascular. Por ejemplo, se ha relacionado la aparición de

cardiopatía isquémica asociada directamente a los valores de c-LDL (Yusuf S et al, 2004). También se reconoce la hipertrigliceridemia y el c-HDL como factores de riesgo independiente (Cordero A et al, 2012). Estudios epidemiológicos muestran que los valores poblacionales de colesterol en España son similares, o ligeramente inferiores al resto de países europeos (Reiner Z et al, 2013). La prevalencia de dislipemia en población general española se encuentra en torno al 30-51%, lo que hace que sea uno de los factores de riesgo cardiovascular más importante (Cordero A and Fácila L, 2015). En población española, se ha detectado que la concentración de CT se incrementa con la edad, especialmente en mujeres. Además, la edad, parece invertir las diferencias entre sexos, tanto en los valores medios de CT como en la prevalencia de hipercolesterolemia (Suárez C et al, 1998, Gabriel R et al, 2008). En hombres, el CT aumenta hasta los 65 años y luego se estabiliza o incluso disminuye. El c-HDL no aumenta con la edad pero las cifras mayores se observan en las mujeres (Gabriel R et al, 2008). En nuestra población las mujeres presentan mayor concentración de CT y c-LDL pero, a su vez, mayor concentración de c-HDL y menor concentración de TG.

Otro de los factores de riesgo cardiovascular es la hipertensión. La prevalencia de hipertensión en la población estudiada fue elevada, más de un 80%, sin detectarse en nuestros resultados diferencias entre hombres y mujeres. Estudios previos han indicado que la incidencia de la hipertensión aumenta con el avance de la edad (Mozaffarian D et al, 2015). Estudios en población española mostraron que en individuos entre 45-64 años, la prevalencia de hipertensos en hombres y mujeres es similar pero, en individuos mayores de 65 años, la prevalencia es mayor en mujeres (Gabriel R et al, 2008).

Con respecto a la DMT2, se observó una mayor porcentaje en hombre que en mujeres presentando mayores niveles de glucosa plasmática, aunque no podemos indicar una mayor prevalencia a nivel global ya que la DMT2 fue un criterio de inclusión. A nivel mundial se observa mayor prevalencia de DMT2 en hombre que en mujeres (Wändell PE and CarlssonSC, 2014) y las personas con edad más avanzada tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Lopez JM et al, 2014). Estos datos se corroboraron en estudios realizados en población española los cuales mostraron que la prevalencia de la DMT2 aumenta con la edad y que se presentaba más en hombres que en mujeres (Soriguer F et al, 2012). Esta mayor prevalencia en hombres se ha asociado a una mayor obesidad abdominal y mayor resistencia a la insulina (Gale EA and Gillespie KM, 2001; Logue J et al, 2011).

Respecto a los parámetros antropométricos, también se encontraron diferencias en función del sexo. Los hombres presentaron mayor peso y mayor perímetro de cintura. Sin embargo, fueron las mujeres las que presentaron mayor IMC y también presentaron mayor prevalencia de la obesidad. Esta mayor prevalencia en mujeres se ha observado a nivel global en todos los continentes (Mauvais-Jarvis F, 2015) y es debido a la diferente distribución del tejido adiposo debido a factores hormonales (Bouchard C, 1997; Bann D et al, 2015; Shea K et al, 2015). En mujeres durante la menopausia se producen cambios en la distribución de la grasa corporal, incrementándose en la zona intraabdominal (Zhang H and Sairam MR, 2014). Estudios en población española indican que se incrementaba la prevalencia de la obesidad con la edad, acentuándose las diferencias según el sexo en individuos mayores de 65 años, siendo las mujeres las que presentaban mayor prevalencia de la obesidad (Gutiérrez-Fisac JL et al, 2004; Gabriel R et al, 2008). A pesar de estas diferencias en la prevalencia, fueron los hombres los que presentaron mayor peso y mayor perímetro de cintura. En este sentido, en otros estudios se ha mostrado que, en hombres, la grasa abdominal y el perímetro de cintura suele ser mayor que en mujeres (Carr MC et al, 2001).

A continuación se analizaron las características de la población en función de la obesidad y la DMT2. En el caso de la obesidad se observaron diferencias significativas en los parámetros antropométricos esperados ya que los individuos obesos presentaban mayor peso, IMC y perímetro de cintura todos ellos parámetros utilizados para la clasificación del sobrepeso y la obesidad.

En el perfil lipídico también se observaron diferencias ya que los individuos obesos presentaban menor concentración de c-HDL y mayores niveles de TG. Estos resultados concuerdan con lo observados en otros estudios, donde una acumulación del tejido adiposo visceral produce una variedad de cambios metabólicos, como pueden ser la aparición de resistencia a la insulina, un aumento de TG, de c-LDL y un descenso de c-HDL (Bastien M et al, 2014).

Cuando el tejido adiposo alcanza su máxima capacidad de almacenamiento, aumentan los ácidos grasos libres circulantes. Estos lípidos comienzan a almacenarse en sitios ectópicos provocando un estado de inflamación y de resistencia a la insulina. También se produce un incremento de la secreción de citoquinas y adipocitoquinas que inducirán la sobreproducción de triglicéridos y VLDL, la cual conducen a la formación de c-LDL (Bjorntorp P, 1990).

Por último, los resultados mostraron que los participantes obesos presentaban mayor PAS y PAD. Existe una relación demostrada entre la obesidad y la hipertensión (Kannel WB et al, 1993; Wilson PW et al, 2002). Además, la relación entre obesidad e hipertensión varía con la edad, el sexo y la raza (González-Albarrán O et al, 1999). Hay diversos mecanismos relacionados con la hipertensión en individuos obesos. Por ejemplo, un descenso en la adiponectina se relaciona con una menor respuesta de vasodilatación endotelial (Wang ZV and Scherer PE, 2008). También se ha visto que el incremento del tejido adiposo visceral se asocia con un aumento de la inflamación y estrés oxidativo que producen rigidez arterial (Dorresteijn JA et al, 2012). En resumen, la disfunción del tejido adiposo en casos de obesidad conduce a una disfunción endotelial, hipertrofia vascular y una desregulación metabólica con un desequilibrio de adipoquinas y un aumento de citoquinas inflamatorias, mecanismos que conducen a la hipertensión (Kang YS, 2013).

En el caso de la DMT2, también encontramos diferencias en los parámetros analizados. La primera diferencia obtenida fue en la edad, ya que la media fue mayor en individuos diabéticos. Como ya se ha comentado previamente, las personas con edad más avanzada tiene mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad (Lopez JM et al, 2014). En relación con los parámetros antropométricos, los participantes diabéticos presentaron mayor peso y mayor perímetro de cintura que los no diabéticos. Estudios realizados en población española relacionaron la DMT2 con obesidad abdominal (Soriguer F et al, 2012). También presentaron mayores niveles de glucosa plasmática, como era esperado ya que la DMT2 se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina, un defecto en su acción o ambas los que provoca que las células no puedan absorber la glucosa, aumentando los niveles de glucosa en sangre.

En el caso de los parámetros lipídicos, encontramos diferencias en todos ellos. Los individuos diabéticos presentaron menores concentraciones de c-HDL y mayores niveles de TG. Otros trabajos han mostrado que los individuos diabéticos presentan mayor riesgo de presentar un perfil lipídico alterado, caracterizado con alta concentración de triglicéridos, de c-LDL y una baja concentración de c-HDL. Esto se atribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina (Lorber D, 2014). En nuestros resultados, en cambio, los niveles de c-LDL en individuos diabéticos eran menores. La prevalencia de hipercolesterolemia no ha mostrado diferencias en función de la DMT2, de hecho, nuestros resultados muestran que la concentración de CT es

menor en individuos diabéticos. En cambio, la prevalencia de hipertrigliceridemia y un c-HDL disminuido es mayor en la población diabética diabética (Siegel RD et al, 1996), datos que coinciden con los resultados obtenidos en nuestra población. En relación con el nivel de estudios, entre los participantes había mayor prevalencia de individuos con bajo nivel de estudios, siendo las mujeres las que presentaban menor nivel de estudios, observándose igualmente esta tendencia en el estudio realizado por López-Suárez A y colaboradores (2008) llevado a cabo en población española de edad avanzada. En función de la obesidad, la población obesa presentó, en general, menor nivel educativo que los individuos no obesos. Esto concuerda con lo obtenido en otros estudios donde se observó que un mayor nivel de educación disminuye el riesgo de obesidad (Sulander TT and Uutela AK, 2007). A nivel global, el estudio MONICA realizado en 26 países por la OMS observó esta relación inversa entre el nivel educacional y el IMC en todas las mujeres y en la mitad de la población masculina (Molarius A et al, 2000).

En relación con la DMT2, los individuos diabéticos presentan mayor prevalencia de estudios primarios mientras que la prevalencia de estudios universitarios era mayor en individuos no diabéticos. La asociación entre el nivel de estudios y el riesgo de DMT2 es consistente en diferentes países, donde a menor nivel educativo aumenta el riesgo de la enfermedad. Dentro de los diferentes niveles educativos se han observado diferencias muy elevadas entre la educación terciaria con respecto a la educación elemental o secundaria (Espelt A et al, 2008), como ocurre en nuestro resultados. Un alto nivel educativo puede hacer a las personas tener una mayor capacidad para cambiar su comportamiento en su salud y usar de manera correcta los servicios del sistema de salud (Sacerdote C et al, 2012).

5.2.- Asociación de factores ambientales con obesidad y DMT2

En el presente apartado se describirán las características basales de la población respecto a factores ambientales como son el consumo de tabaco, la actividad física y la dieta, en función de la obesidad y la DMT2.

En la población estudiada, la prevalencia de individuos fumadores fue del 12,5% y un 22,3% fueron exfumadores. Encontramos diferencias también en función del sexo, debido a que los hombres presentaban mayor porcentaje tanto de fumadores (26,3%) como de exfumadores (46,6%) respecto a las mujeres, donde sólo un 4,4%

de la población era fumadora. Según la Encuesta Nacional de Salud de 2011-2012, la prevalencia de fumadores comprendidos entre 65-74 años, intervalo donde se encuentra la media de edad de la población estudiada, fue de 16,2% en hombres y de 4,6% en mujeres (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013), concordando estos datos con nuestros resultados. También se ha observado que el consumo de tabaco disminuye con la edad (Gabriel R et al, 2008; Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013). De hecho, en nuestra población los fumadores son más jóvenes que los no fumadores.

En función de la obesidad, la prevalencia de fumadores fue mayor en los individuos no obesos que los obesos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios que mostraban menor prevalencia de fumadores en individuos obesos (Escribano-García S et al, 2011; Tyrovolas S et al, 2011). Existe una relación entre el peso corporal y el consumo de tabaco. El consumo de nicotina puede aumentar el metabolismo y disminuir el apetito, ya que afecta al sistema de la melanocortina (Thorgeirsson TE et al. 2013) y a la acción de la leptina (Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011; Morton GJ et al, 2014). En cambio, los fumadores tienden a acumular otros hábitos, como una mala alimentación o baja actividad física, que conducen a un incremento de peso (Chiolero A et al, 2006).

Con respecto a la DMT2, se ha observado que el tabaco puede ser un factor de riesgo para esta patología ya que fumar provoca un estado de inflamación crónica que puede desarrollar una resistencia a la insulina (Morimoto A et al, 2012). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la prevalencia del consumo de tabaco en función de la DMT2.

A continuación, se analizó la relación entre los parámetros antropométricos y bioquímicos con el consumo del tabaco. Los individuos fumadores presentaban mayor peso pero menor IMC, mayores niveles de TG y PAD y menores niveles de c-HDL. Se han detectado estas mismas asociaciones obtenida en este estudio en otros trabajos previos (Lahoz C et al, 2007; Rahman MM and Laher I, 2007). Como se ha comentado previamente, fumar provoca un estado de inflamación crónica que causa disfunción endotelial, aumenta la trombogénesis, se asocia con un perfil lipídico aterogénico y puede causar resistencia a la insulina. La adiponectina es una hormona con propiedades antiinflamatorias, además de incrementar la combustión de los ácidos grasos y el consumo de energía lo que

conduce a un descenso en el contenido de triglicéridos. Se ha descrito que el consumo de nicotina disminuye la secreción y expresión de adiponectina en los adipocitos (Hilawe EH et al, 2015).

Hay una fuerte evidencia epidemiológica que apoya que comportamientos sedentarios están asociados adversamente con riesgos en la salud y el papel del ejercicio en la prevención de la obesidad y la DMT2. Las recomendaciones de actividad física para la salud según la OMS se dividen según grupos de edad. Para personas mayores de 65 años, se recomiendan 150 minutos a la semana de actividad física moderada o 75 minutos a la semana de actividad vigorosa (OMS, 2010). En nuestra población, el 27,2% de la población presentaba un patrón sedentario, considerando como sedentario el hecho de no cumplir con las recomendaciones de la *American College of Sport Medicine* y la AHA para individuos de avanzada edad (Nelson ME et al, 2007). Respecto al sexo, las mujeres fueron las que presentaron mayor prevalencia de sedentarismo que los hombres. Estos resultados también se encontraron en otras poblaciones (Eaton CB et al, 1994; Elizondo-Armendáriz JJ et al, 2005).

En función de la obesidad, encontramos una mayor prevalencia de sedentarismo en los individuos obesos que en los no obesos (31% vs 23,5%). La población sedentaria también presentaba mayor riesgo de obesidad. Se ha observado que un gran número de horas sentado contribuye al desarrollo de sobrepeso, debido a que se asocia a una mayor ingesta de energía con grasas saturadas, carne roja, carnes procesadas, aperitivos, dulces y postres, así con mayor consumo de tabaco y alcohol, lo que produce un mayor riesgo de hipertensión e hipercolesterolemia (Hu FB, 2003).

En función de la DMT2, también se encontró mayor porcentaje de sedentarismo en individuos diabéticos frente a los no diabéticos (31% vs 24,1%), detectándose más riesgo de DMT2 en individuos sedentarios. Se ha observado que individuos que aumentan sus niveles de actividad física tienen un riesgo 36% menor de desarrollar DMT2 (Aune D et al, 2015) mientras que un estilo de vida sedentario está relacionado directamente con el riesgo de la enfermedad (Hu FB, 2003). Una actividad física alta también se relaciona con otros factores protectores para la DMT2, como son menor prevalencia de obesidad, menor prevalencia de consumo de tabaco y mayor consumo de dietas altas en fibra y

cereales integrales y menor consumo de carnes rojas y procesadas (Aune D et al, 2015).

A continuación se analizó la relación entre el sedentarismo con diversos parámetros. El efecto beneficioso de la actividad física también se ha constatado en nuestra población ya que respecto a los parámetros antropométricos en población general observamos que los individuos no sedentarios presentaban menor peso, IMC y cintura que los sedentarios. En cuanto los parámetros bioquímicos, los individuos no obesos presentaban mejor perfil lipídico, debido a que presentaban menor concentración de TG y mayor nivel de c-HDL. Además también presentaban menores niveles de glucosa plasmática. Estos efectos se han observado en otros estudios con respecto a los niveles de TG y c-HDL (Leon SA et al, 2001), obesidad (Wing RR et al, 2001), y la glucosa y otros parámetros relacionados con DMT2 (Thompson PD et al, 2001). Diversos estudios han mostrado que la práctica de ejercicio aumenta la masa muscular, aumenta el metabolismo basal, aumentando el gasto energético (López-Mojares LM, 2006). Los músculos consumen energía derivada de la grasas y del glucógeno (Zhang Y et al, 2014). La práctica de ejercicio también mejora el perfil lipídico, aumentando el c-HDL, y el metabolismo de la glucosa (Hu FB, 2003). Estos resultados concuerdan con las diferencias obtenidas en nuestra población de estudio entre los individuos sedentarios y no sedentarios.

Se realizaron los mismos análisis en función de la obesidad. Dentro de los individuos obesos, los sedentarios presentaban más peso, IMC y perímetro de cintura. Dentro de los individuos no obesos, los sedentarios presentaban mayor perímetro de cintura y mayor concentración de glucosa. Por tanto, la realización de actividad física mejoraban tanto los parámetros antropométricos y bioquímicos incluso cuando la obesidad ya se ha desarrollado. Estudios realizados en jóvenes con sobrepeso u obesidad mostraron que un ejercicio aeróbico de 20 a 40 minutos después de clase mejoraban el porcentaje de grasa corporal y mejoraban la sensibilidad a la insulina frente al grupo control que no realizaba el ejercicio (González-Gross M and Meléndez A, 2013). Otros estudios mostraron que individuos con sobrepeso que realizaban un ejercicio moderado regular reducían el riesgo de DMT2 y las enfermedades cardiovasculares (Resnick H et al, 2000).

En el caso de la DMT2, los individuos diabéticos sedentarios presentaban más IMC, más perímetro de cintura y mayores niveles de glucosa. En el caso de los

participantes no diabéticos, los que presenta un estilo de vida sedentario también presentaban mayor peso, mayor IMC y mayor perímetro de cintura. En población de edad avanzada se ha visto que reemplazar 10 minutos de sedentarismo con la cantidad equivalente de actividad física moderada o vigorosa está asociada con efectos favorables en la hemoglobina glicosilada y el IMC. En este grupo de población y personas con DMT2, incluso la actividad física ligera puede ser suficientemente intensa para ver los beneficios en la salud (Falconer CL et al, 2015), como ocurre en los resultados obtenidos. Una actividad física regular mejora la sensibilidad a la insulina (Mayer-Davis EJ et al, 1998), el control glucémico (Avery L et al 2012) y el perfil metabólico de personas mejorando el metabolismo lipídico y disminuyendo la presión arterial (Siegel et al, 2009).

En ambos casos se calculó el riesgo de desarrollar ambas patologías. En ambos casos, el sedentarismo tiene mayor riesgo de obesidad y de DMT2. Estos resultados son similares a los obtenidos en múltiples trabajos previos. Uno de los factores del desarrollo de la obesidad es un balance energético positivo, que puede ser debido a un bajo gasto energético. La práctica de ejercicio físico es muy efectiva tanto en la prevención como en la pérdida de peso y como en el mantenimiento del mismo a lo largo del tiempo (Pate RR et al, 2015; Street SJ et al, 2015). Se ha observado que cualquier tipo de actividad, sea ligera, moderada o vigorosa, así como ejercicios de resistencia, la actividad laboral o andar, está asociada a una disminución del riesgo de DMT2 (Aune D et al, 2015).

El último factor ambiental que se analizó fue la dieta, concretamente la adherencia a la DM. En nuestra población, la mayor prevalencia de individuos obtuvo una puntuación comprendida entre 7-9 puntos sobre un total de 14. La prevalencia de individuos que consumen una dieta con bajo grado de adherencia a la DM fue del 50%, ya que se realizó un punto de corte en la media del total de puntos obtenidos en el cuestionario de adherencia a la DM para clasificar a los participantes según una baja o alta adherencia a la DM. No se detectaron diferencias entre hombres y mujeres con respecto a la adherencia a la DM. En cambio, al analizar estos resultados en función de la obesidad, se observó que el mayor porcentaje de individuos obesos obtuvo 8 puntos (20,6%) mientras que en la población no obesa fue de 9 puntos (19,4%). En relación a la DMT2 se obtuvieron los mismos resultados entre los diabéticos (8 puntos el 21,4%) y no diabéticos (9 puntos el 17,5%).

Al segmentar la población en alta o baja adherencia se observó que la población no obesa presentaba mayor grado de adherencia a la DM y una reducción del riesgo de obesidad. Con respecto a la DMT2, también se vio que los individuos no diabéticos presentaban mayor adherencia a la DM y un descenso del riesgo de DMT2. Numerosos estudios a nivel internacional como nacional muestran una asociación inversa entre la DM y la obesidad en adultos (Schröder H et al, 2004; Panagiotakos DB et al, 2006; Romaguera D et al, 2009), una prevención del sobrepeso y obesidad (Buckland et al, 2008) y un descenso en el riesgo de obesidad (Méndez et al, 2006). En el caso de la DMT2, una mayor adherencia a este patrón dietético está inversamente asociado al riesgo de DMT2 en población general, individuos con alto riesgo cardiovascular y en pacientes con una ECV establecida (Georgoulis M et al, 2014). Esta afirmación se basa en los datos obtenidos en diversos estudios diseñados para analizar la relación entre el patrón de la DM y la prevención de la enfermedad, que mostraron la relación inversa entre la adherencia a la dieta y el riesgo de DMT2 (Panagiotakos DB et al, 2005; de Koning L et al, 2011; InterAct Consortium et al, 2011; Salas-Salvadó J et al, 2011; Tobias DK et al, 2012; Rossi M et al, 2013).

Se observó que los individuos que presentaban alta adherencia al patrón de DM tenían menor IMC, menor perímetro de cintura y un mayor nivel de c-HDL. Al estratificar por sexo se observaron las mismas tendencias que en la población total. A pesar de que existen resultados contradictorios en la literatura científica sobre el efecto de la DM, cada vez son mayores los estudios que avalan los beneficios dicha dieta. Varios estudios han mostrado la asociación entre una mayor adherencia a la dieta y una reducción del perímetro abdominal (Tortosa et al, 2007; Rumawas ME et al, 2009). También se ha visto que el alto consumo de fibra, la baja densidad energética de la dieta y el alto consumo de AOV puede aumentar el nivel de c-HDL, reducir el daño oxidativo a los lípidos, disminuir la inflamación, mejorar la función endotelial y disminuir la presión arterial sistólica (Estruch R et al, 2006; Schröder H et al, 2007; Covas MI et al, 2015).

Con respecto a la obesidad, se encontraron diferencias significativas en los niveles de c-HDL dentro del grupo de no obesos donde los individuos con alta adherencia a la dieta presentaban mayores niveles. Estos resultados se observaron previamente. El patrón dietético característico de la DM puede reducir el ratio CT:c-HDL (Estruch R et al, 2006), así como un aumento en la concentración de c-HDL (Covas MI et al, 2015).

En el análisis en base a la DMT2, se observó que los individuos con alta adherencia, tanto en el grupo de diabéticos como en el grupo de individuos no diabéticos, presentaban menor cintura y menor IMC que los individuos con una baja adherencia. Está bien establecido que un exceso en la grasa abdominal puede desarrollar una resistencia a la insulina aumentando el riesgo de DMT2. Por tanto, si la DM puede prevenir la ganancia de peso, tendría un efecto protector frente a la DMT2 (Georgoulis M et al, 2014). Otro estudio mostró un descenso en el perímetro de cadera con una mayor adherencia a la DM (Lasa et al, 2014). Múltiples estudios han mostrado una relación entre la adherencia a la DM y un descenso en los niveles de glucosa, en los niveles de HbA1c y una caída del índice HOMA que marca la resistencia a la insulina (Estruch et al, 2006; Shai et al, 2008; Esposito et al, 2009; Lasa et al, 2014). Pero no encontramos estas diferencias en nuestros resultados, ni en la población general ni tras segmentar por obesidad o DMT2.

Posteriormente se analizó el cuestionario de Adherencia a la DM para conocer las diferencias del patrón de alimentación entre hombres y mujeres y en función de la obesidad y la DMT2. Se observaron diferencias al segmentar por sexo, donde se observó que los hombres consumían más carnes rojas, más vino, más legumbres, más FS y menos carnes blancas que las mujeres.

Respecto a la obesidad, los individuos obesos consumían menos verduras, más carne roja, menos vino, menos legumbres, menos pescado, más repostería comercial, menos FS y cocinaban menos sofritos. Al segmentar por DMT2, los participantes diabéticos consumían menos fruta, más mantequillas, margarinas o natas, menos vino, menos legumbres, menos pescado y más repostería comercial. Por tanto, los individuos no obesos y no diabéticos presentan mayor consumo de alimentos característicos de la DM.

Los participantes obesos y diabéticos presentan mayor consumo de alimentos que se recomiendan consumir ocasionalmente en el patrón de DM. La carne roja, por ejemplo, posee un alto contenido en AGS y colesterol por lo que se asocia a un mayor riesgo de DMT2, síndrome metabólico y ECV (Amiano P et al, 2015; Micha R et al, 2012). Todo tipo de repostería y bollería comercial y las margarinas duras están compuestas por altas cantidades de grasas trans que provocan un aumento de c-LDL y un descenso de c-HDL, una aumento en la inflamación y de la resistencia a la insulina (Carbajal et al, 2000; Mensink R et al, 2003; Kummerow FA, 2009).

En cambio, consumían menos alimentos típicos del patrón alimentario de la DM, como son la verdura, el vino, las legumbres, el pescado, la fruta.

El pescado, las frutas y verduras son fuente de diversas sustancias capaces de mejorar diferentes factores de riesgo cardiovascular a través de múltiples mecanismos (Márquez-Sandoval F et al, 2008) y las legumbres, con un alto contenido en fitosteroles e isoflavonas, pueden ayudar a reducir los niveles de colesterol contribuyendo a reducir el riesgo de ciertas enfermedades crónicas. Gran parte de los efectos beneficiosos asociados a la DM se atribuyen a su alto contenido en AGM y sus alimentos con propiedades antioxidantes que mejoran la presión arterial, la sensibilidad a la insulina, el perfil lipídico y las moléculas inflamatorias circulantes (Ros E et al, 2014; Widmer RJ et al, 2015).

Por tanto, los individuos no obesos y no diabéticos presentan un patrón alimentario más próximo a la DM, por lo que debido a las propiedades que presentan los alimentos característicos del patrón de DM, se ha indicado que disminuye el riesgo de obesidad y DMT2.

Por todo lo indicado, hemos podido observar que los diferentes factores ambientales han mostrado una influencia en el riesgo de obesidad, DMT2 o parámetros antropométricos relacionados, así como en otros FRCV, principalmente en los niveles de c-HDL, de ahí la importancia de considerar los hábitos de estilo de vida en el estudio de la etiología de estas patologías.

5.3- Asociación de los polimorfismos analizados con la obesidad y la DMT2 y de las interacciones gen*ambiente

5.3.1- Polimorfismos asociados con obesidad

5.3.1.1.- Polimorfismos del gen ApoA5

Se analizaron los polimorfismos rs3135506 (S19W) y rs662799 (-1131T>C) del gen APOA5. Este gen codifica para la proteína ApoA5 implicada en los niveles de lípidos plasmáticos, en especial de los TG y aumento del riesgo cardiovascular (De Caterina E et al, 2010; Ye H et al, 2015).

En el caso del polimorfismo S19W, la frecuencia del alelo menos frecuente S19W (0,064) fue similar al encontrado en otras poblaciones europeas (Olano-Martin E et al, 2008) y en población China (Yin RX et al, 2011). En otras poblaciones, como en población americana de origen Puerto Rico, la frecuencia fue ligeramente mayor (0,104) (Smith CE et al, 2010), mientras que en población americana de ascendencia japonesa la frecuencia era menor (0,010) (Austin MA et al, 2004). En el caso del polimorfismo -1131T>C, la frecuencia del alelo C encontrada en la población mediterránea estudiada fue de 0,061, similar a la encontrada en otra región española (0,061), así como en otros países europeos como Italia e Inglaterra (0,084 y 0,093 respectivamente) (Sánchez-Moreno C et al, 2011; De Caterina R et al, 2011; Olano-Martin E et al, 2008). En cambio, la frecuencia del alelo C era mayor en población asiática (0,279) así como en población americana de ascendencia japonesa (0,370) (Yin RX et al, 2011; Austin MA et al, 2004).

El polimorfismo S19W se asoció en análisis iniciales a los niveles de c-LDL, donde los homocigotos SS presentaban mayores concentraciones frente a los portadores del alelo W. En el polimorfismo S19W produce un cambio de aminoácido, de serina (S) por triptófano (W). Este cambio puede alterar la capacidad de unión de los receptores de las lipoproteínas al producirse un cambio hidrofílico de S por el hidrófobo W en el péptido señal, pudiendo producir cambios en la estructura secundaria de la proteína. Esta alteración estructural produciría la incapacidad para la interacción con los receptores lipídicos (Lai CQ et al, 2004). Esta variante del gen se ha asociado en diversos estudios con la concentración de TG plasmáticos, donde la variante 19W presentan cifras más elevadas de TG (Pennacchio LA et al, 2001; Lai CQ et al 2003; Qi L et al, 2007b), aunque estos resultados no se han podido replicar en algunas poblaciones, como canadiense y en indios Pima (Lee KW et al, 2004; Chandak GR et al, 2006), quizá debido a las diferencias en las frecuencias alélicas de este polimorfismo. Aunque no se ha relacionado directamente el polimorfismo S19W con los niveles de c-LDL, sí que se ha observado una influencia del polimorfismo con el tamaño de las partículas de c-LDL, donde el alelo menos frecuente se asocia con un descenso del tamaño y un incremento de TG (Austin MA et al, 2004). Los niveles altos de TG se asocia con un aumento de la presencia de partículas pequeñas de c-LDL y un descenso de c-HDL, características de anomalías lipídicas (Austin MA et al, 1990). Nuestros resultados no muestran una relación del polimorfismo con las concentraciones de TG. Además, el genotipo SS es el que presenta mayores niveles de c-LDL, mientras que en diversos estudios es el alelo W el considerado de riesgo al

asociarse con mayores niveles de TG. Serían necesarios más estudios para comprobar la relación del polimorfismo con las concentraciones de c-LDL ya que no se ha descrito en estudios anteriores.

Al realizar los análisis segmentando la población por sexo observamos diferencias entre hombres y mujeres. En el caso de hombres, se asoció los portadores del alelo W con mayores concentraciones de TG, sin encontrar diferencias en mujeres. Este resultado concuerda con resultados obtenidos por Martin y colaboradores en población caucásica masculina (Martin S et al, 2003). En cambio, en mujeres se vio una diferencia en el peso, donde las portadoras del alelo W presentaban menor peso que las homocigotas SS, sin encontrar diferencias significativas en hombres. Diversos estudios han mostrado diferencias en el efecto del polimorfismo en función del sexo (Hubacek JA et al, 2007). Las hormonas sexuales esteroideas, como estrógeno, se expresan en el hígado y regulan los niveles de lípidos a través de su efecto en el metabolismo de las lipoproteínas modulando el efecto de las variantes génicas sobre ellas. El perfil de riesgo genético para enfermedades cardiovasculares difiere en función del sexo (Silander K et al, 2008). Previos estudios mostraron que las mujeres presentaban menores niveles de TG y mayor concentración de c-HDL que los hombres, diferencias que desaparecían en mujeres post-menopáusicas. Esto mostraba que estrógenos en mujeres pre-menopáusicas podían influir en el metabolismo de las lipoproteínas (Knopp R, 2002; Olano-Martin E et al, 2008). Por tanto, el efecto del polimorfismo S19W sobre el metabolismo de los TG puede estar enmascarado por la concentración de hormonas esteroideas. El estudio realizado por Smith y colaboradores en población americana de origen caribeño mostró una relación entre el polimorfismo S19W con parámetros antropométricos, donde el alelo minoritario W se asociaba con mayor IMC, mayor perímetro de cintura y cadera (Smith CE et al, 2010).

Nuestros resultados muestran esa misma tendencia en los hombres, donde los portadores del alelo W presentaban mayor peso, aunque las diferencias no eran lo suficientemente significativas. En cambio, las mujeres presentaban la tendencia inversa. Hay que recordar que hay una mayor prevalencia de obesidad en mujeres, hecho que aparece en todos los continentes (Mauvais-Jarvis F, 2015) Además existe una distribución diferente del tejido adiposo según el sexo, donde en las mujeres el mayor acúmulo de grasa se da en la zona glúteo- femoral (Bouchard C, 1997). Además, las mujeres almacenan el tejido adiposo en áreas subcutáneas que son áreas con una función de almacenamiento a largo plazo (Palme BF and Clegg

DJ, 2015). Estas diferencias de distribución se deben a factores hormonales, con un predominio de testosterona en hombres y de estrógenos en mujeres (Bann D et al, 2015; Shea K et al, 2015). En mujeres durante la menopausia se producen cambios en la distribución de la grasa corporal, incrementándose en la zona intraabdominal (Zhang H and Sairam MR, 2014). Son necesarios estudios que analicen la posible variación del efecto de este polimorfismo según el sexo en población de edad avanzada.

En el caso del polimorfismo rs662799 (-1131T>C) los análisis iniciales no mostraron relación significativa con ningún parámetro antropométrico o bioquímico. Este polimorfismo situado en el promotor del gen APOA5 se asoció de forma muy consistente con la concentración de TG, donde los portadores del alelo C presentaban mayor riesgo de hipertrigliceridemia (Garelnabi M et al, 2013). Estos resultados se encontraron en diferentes poblaciones (Endo K et al, 2002; Martin M et al, 2003; Lai CQ et al, 2003). Su efecto se ha visto más pronunciado en hispánicos que en caucásicos y no fue detectable en afroamericanos (Pennacchio LA et al, 2002). El polimorfismo también se ha asociado a mayor riesgo de cardiopatía isquémica y otros parámetros relacionados con enfermedad cardiovascular (Sotos-Prieto M et al, 2010; De Caterina E et al, 2010; Ye H et al, 2015). Se ha propuesto que el polimorfismo podría modular la actividad transcripcional de la proteína pero no se ha podido demostrar.

Numerosos estudios han descrito interacciones entre ambos polimorfismos y factores ambientales (Corella D et al, 2007; Sotos-Prieto M et al, 2010; Sánchez-Moreno C et al, 2011; Yin RX et al, 2011; Wu Y et al, 2016). En nuestros resultados hemos observado interacciones entre el polimorfismo (-1131T>C) con el consumo de tabaco y con la dieta.

En el análisis del consumo del tabaco, las diferencias significativas se obtuvieron en los individuos no fumadores. Los homocigotos TT presentaban mayor cintura e IMC, además de mayor riesgo de desarrollar la obesidad. En los participantes fumadores se observó la tendencia inversa donde los portadores del alelo C presentaban mayor cintura e IMC. No hay resultados previos que describan esta asociación. Si que se conoce la relación entre el consumo de tabaco y la regulación del peso corporal. Varios estudios se ha mostrado que las personas fumadoras pesan una media de entre 4-5 kg menos que los no fumadores y que dejar de fumar produce un aumento en el peso, lo que a su vez puede dificultar el éxito del cese

del hábito tabáquico (Williamson et al, 1991; Chiolero A et al, 2008; Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011). La nicotina produce una supresión del apetido a través de la liberación de catecolaminas y otros neurotransmisores (Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011; Thorgeirsson TE et al. 2013). También aumenta el efecto de la leptina, lo que produce la supresión de la ingesta calórica y el aumento del metabolismo corporal (Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011; Morton GJ et al, 2014). Serían necesarios estudios que confirmaran esta relación debido a diversos aspectos. Primero, las interacciones se quedaron en el límite de la significación tras ajustar tanto para el caso de la cintura (p interacción=0,060) como para el IMC (p interacción=0,073). Segundo, el porcentaje de fumadores en la población estudiada no era elevado (12,5%) lo que podría afectar a los resultados obtenidos. Por último, la población estudiada tiene alto riesgo cardiovascular, lo que podría contribuir a la aparición de interacciones no descritas anteriormente.

Otra de las interacciones observadas en la población estudiada fue con la adherencia a la DM (p interacción=0,037). Mientras que en los homocigotos TT no se observaban diferencias, la población que presentaba baja adherencia a la dieta y era portadora del alelo C presentaba mayores niveles de TG, mientras que, si presentaban alta adherencia a la dieta, los niveles de TG disminuían incluso por debajo de los valores que presentaban los homocigotos TT de ambos grupos. Numerosos estudios han confirmado la asociación del polimorfismo -1131T>C con la dieta, sobre todo con la ingesta de AGP. En el estudio realizado por Lai y colaboradores observaron que el alelo C del polimorfismo -1131T>C se asociaban con mayores niveles de TG sólo en los individuos que consumían una dieta alta en AGP, específicamente con los ácidos grasos n-6 (Lai CQ et al, 2004). Otro estudio realizado por Corella y colaboradores en la cohorte Framingham mostraron que las variantes del gen ApoA5 estaban moduladas por el efectos de la ingesta dietética sobre el IMC y el riesgo de obesidad. Cuando la ingesta de AGM era alta, los portadores del alelo C presentaban menor IMC que los homocigotos TT. Este hecho no ocurría con ingesta de AGM más bajas (Corella D et al, 2007). La DM se caracteriza por la utilización aceite de oliva como principal fuente de grasa y está compuesta por AGM. También se caracteriza por el consumo de FS que presentan un bajo contenido de AGS y cerca de la mitad de su contenido de ácidos grasos insaturados, la mayor parte de AGM. Por tanto, una dieta rica en AGM podría modular el efecto del polimorfismo -1131T>C sobre la concentración de TG.

En conclusión, el polimorfismo rs3135506 (S19W) del gen APOA5 mostró relación con diversos parámetros relacionados con la obesidad, observando una diferencia de concentración de c-LDL en función del genotipo. Los resultados también pusieron de manifiesto un impacto del género sobre los niveles de TG y el peso corporal. En el caso del polimorfismo rs662799 (-1131T>C) del gen APOA5, aunque no aparecieron asociaciones iniciales, sí que se observaron la regulación del efecto del polimorfismo a través de factores de estilo de vida como fueron el consumo del tabaco y la adherencia a la DM. Mientras que la interacción con el hábito tabáquico no había sido descrita en la literatura científica previa, los resultados obtenidos en la interacción con la adherencia a la DM se corroboraban con estudios previos en otras poblaciones.

5.3.1.2.- Polimorfismo rs9939609 del gen FTO

Estudios de GWAs de genes relacionados con DMT2 identificaron una variante genética del gen FTO, el polimorfismo rs9939609, que predispone a la DMT2 través de su efecto sobre e IMC (Frayling TM et al, 2007; Dina C et al, 2007; Scuteri A et al, 2007). Posteriores estudios realizados en diversas poblaciones han mostrado una relación del polimorfismo con la obesidad y parámetros relacionados con la obesidad, como son la grasa corporal, el IMC, el perímetro de cintura y cadera y peso corporal (Scuteri A et al, 2007; Willer CJ et al, 2009; Peng S et al, 2011).

Las frecuencias alélicas del polimorfismo rs9939609 obtenidas de esta población mediterránea es similar a la encontrada en otras poblaciones españolas (González-Sánchez JL et al, 2009) y en otros países europeos, siendo una frecuencia alrededor de 0,450 (Frayling TM et al, 2007; Hinney A et al, 2007; Poveda A et al, 2014). También se encontraron frecuencias similares en población americana (Qi L et al, 2008; Marcadenti A et al, 2013). Estudios en poblaciones asiáticas mostraron una diferencia en las frecuencias del polimorfismo, donde el alelo menor presentaba una frecuencia de aproximadamente 0,240 (Hotta K et al, 2008; Karasawa S et al, 2010).

Diversos estudios de GWAs mostraron una fuerte asociación entre el gen, la obesidad y parámetros relacionados con ella como son la grasa corporal, IMC, perímetro de cintura y cadera (Dina C et al, 2007; Frayling TM et al, 2007, Scuteri A et al, 2007). El alelo menor del polimorfismo rs9939609 se asocia con mayor

riesgo de obesidad y ha mostrado una fuerte influencia sobre el IMC (Hinney A et al, 2007; Peng S et al, 2011; Li H et al, 2012; Marcadenti A et al, 2013). En cambio, en nuestra población estudiada no se encontraron asociaciones significativas con estos parámetros. Esto puede ser debido a que muchos de los estudios que encontraron la relación del polimorfismo y parámetros relacionados con la obesidad se realizaron en poblaciones más jóvenes mientras que la población del estudio PREDIMED es de edad avanzada (Dina C et al, 2007; Frayling TM et al, 2007; Xi B et al, 2010). Un estudio realizado en población de edad avanzada en 2009 no mostró asociación del polimorfismo con el IMC (Jacobsson JA et al, 2009). El polimorfismo rs9939609 del gen FTO también se asocia con un mayor riesgo de DMT2 (Li H et al, 2012) aunque nuestros resultados no mostraron ninguna asociación significativa con la patología o parámetros relacionados.

El gen de la FTO codifica para una 2-oxoglutarato demetilasa dependiente de ácido nucleico, se expresa abundantemente en el hipotálamo y tejido adiposo. Además, estudios funcionales lo involucran en la regulación de la ingesta energética (Gerken et al, 2007). El hipotálamo es parte del sistema límbico implicado en el control de la obtención de comida como un mecanismo de supervivencia muy conservado para la defensa contra el hambre (Lenard NR and Berthoud HR, 2008). Esto podría sugerir que variantes genéticas en el gen FTO podrían sufrir una desregulación entre el apetito y el gasto energético, ya sea por un exceso del primero o un descenso del segundo. Además, el efecto de estas variantes genéticas podría estar modulado por diversos factores ambientales como pueden ser la dieta o la actividad física (Andreasen CH et al, 2008; Corella D et al, 2011; Corella D et al, 2012; Lee H et al, 2015; Livingstone KM et al, 2016).

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con estos trabajos previos ya que se halló una interacción entre el polimorfismo rs9939609 y la actividad física la cual modulaba dos parámetros relacionados con la obesidad como son el perímetro de cintura y el IMC. En ambos casos, el alelo A se asociaba con mayor perímetro de cintura y mayor IMC sólo en individuos clasificados como sedentarios sin encontrar estas diferencias en individuos no sedentarios. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otros estudios donde en los portadores homocigotos del alelo A, la inactividad física se asociaba con un incremento del IMC en comparación con los heterocigotos o no portadores en población de mediana edad (Andreasen CH et al, 2008). Otros estudios han mostrado la influencia de la inactividad física en la asociación del alelo A de

polimorfismo rs9939609 y parámetros relacionados con la obesidad (Ruiz JR et al, 2010; Xi B et al, 2011)

Para concluir, el polimorfismo rs9939609 localizado en el gen FTO no ha mostrado relación con el riesgo de obesidad o parámetros relacionados en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular. Se ha observado una asociación del polimorfismo con el perímetro de cintura y el IMC modulada por la actividad física. Estos resultados muestran la importancia de la actividad física para prevenir la obesidad en individuos portadores del alelo A del polimorfismo.

5.3.1.3.- Polimorfismo rs4731702 cerca del gen KLF14

El polimorfismo rs4731702 se encuentra localizado a 14 kb del gen KLF14, gen perteneciente a una extensa familia de genes muy conservada. La familia de genes KLF codifican para factores de transcripción que regulan diversos procesos biológicos que incluyen proliferación, diferenciación, crecimiento, desarrollo, supervivencia y respuesta a estrés externo. Alteraciones en sus funciones se han asociado con numerosas enfermedades como enfermedades cardiovasculares, desórdenes metabólicos y cáncer (McConnell BB and Yang VW, 2010). El gen KLF14 está situado en el cromosoma 7 y se ha visto que actúa como un regulador de la expresión génica del tejido adiposo. Diversos estudios de GWAs ha relacionado este gen con lípidos sanguíneos, DMT2 y enfermedades cardiovasculares (Chasman DI et al, 2009; Teslovich TM et al, 2010; Voight BF et al, 2010; Chen X et al, 2012).

La frecuencia alélica del alelo menor T del polimorfismo rs4731702 obtenida en nuestro estudio fue de 0,423. Esta frecuencia fue ligeramente superior a la observada en diferentes poblaciones chinas (0,357 y 0,334) (Huang PH et al, 2013). Estudios de GWAs en poblaciones no europeas con ancestro europeo presentaron una frecuencia alélica similar a la obtenida en el presente estudio (0,480) (Teslovich TM et al, 2010) así como estudios realizado en población norteamericana también con ancestro europeo (0,490) (Chasman DI et al, 2009).

Los datos obtenidos en el estudio muestran una relación entre el polimorfismo rs4731702 y parámetros antropométricos y bioquímicos relacionados con la obesidad, como el c-HDL y el IMC. Estos resultados concuerdan con lo observado en estudios de GWAs donde el polimorfismo se ha asociado con rasgos

metabólicos como c-LDL, c-HDL, TG e IMC (Chasman DI et al, 2009; Weissglas-Volkov D and Pajukanta P, 2010; Small KS et al, 2011). La asociación entre el polimorfismo y los niveles lipídicos plasmáticos se debe a que actúa como un factor regulador. El polimorfismo se sitúa a 14 kb del gen KLF14. El alelo T del polimorfismo rs4731702 se asocia con un aumento de la expresión del gen KLF14 en el tejido adiposo, regulando el metabolismo lipídico (Huang P et al, 2013). Los resultados muestran que el genotipo TT presenta mayor concentración de c-HDL y menor IMC. Este resultado es similar al obtenido en un estudio en población china (Chen X et al, 2012). Otro trabajo que realizaba un análisis de las asociaciones de este polimorfismo con los lípidos plasmáticos en dos poblaciones distintas de China mostraban que la población Mulao presentaban un resultado similar, donde el alelo T se asociaba a mayor concentración de c-HDL mientras que en la población Han se asociaba con menor c-HDL. Esto podría indicar que la asociación del polimorfismo rs4731702 del gen KLF14 y los niveles de lípidos plasmáticos podría ser diferente según los grupos étnicos (Huang P et al, 2013).

El análisis de los resultados en función de la DMT2 mostró diferencias en la concentración de c-HDL y de TG sólo en los individuos diabéticos, sin encontrar diferencias en los individuos no diabéticos. El gen KLF14 se había identificado como un gen de susceptibilidad a DMT2 previamente. (Voight BF et al, 2010). Estudios de GWAs en polimorfismo rs4731702 mostraron que el alelo T del polimorfismo se asociaba con mayor riesgo de DMT2. Los resultados indicaban que el efecto primario que se producía era una disminución de sensibilidad a la insulina periférica (Small KS et al, 2011). Por tanto, los portadores del alelo de riesgo C presentan una relación con la resistencia a la insulina mientras que el alelo T se relaciona con un aumento de c-HDL. No conocemos el mecanismo por el cual se produce esta relación en los niveles de c-HDL y TG en función de la DMT2 para este polimorfismo pero esta relación sí que se ha observado en otros polimorfismos del gen KLF14. Concretamente, el polimorfismo rs972283 se han asociado con un mayor riesgo de niveles de TG elevados en población diabética (Kong X et al, 2015). La relación entre la insulina y metabolismo lipídico es ampliamente conocida. La insulina promueve el almacenamiento de TG en adipocitos por diferentes mecanismos como la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, estimula el transporte de glucosa y síntesis de TG además de inhibir la lipólisis. La insulina también aumenta la actividad lipasa en el tejido adiposo. Una alteración de la acción de la insulina alteraría todos estos mecanismos (Kahn BB and Flier JS, 2000).

Por tanto, el alelo T del polimorfismo rs4731702 se asocia con mayores niveles de c-HDL y menor IMC. La relación con c-HDL parece estar influida por la presencia de DMT2, así como los niveles de TG. Estos resultados coinciden con asociaciones encontradas en estudios previos, aunque no se conocen los mecanismos por los que se producen.

5.3.1.4.- Polimorfismo rs13702 del gen LPL

En el estudio de genes relacionados con la obesidad, se continuó analizando el polimorfismo rs13702 del gen LPL, debido a su función de absorción de los ácidos grasos en los tejidos. Este gen fue identificado en relación con el metabolismo lipídico en varios estudios de GWAs, predominantemente de ancestro europeo (Kathiresan S et al, 2008; Willer CJ et al, 2008). El gen LPL contribuye al almacenamiento de la grasa en adipocitos y la regulación de la termogénesis en el músculo esquelético (Ma Y et al, 2014). La obesidad es un factor importante en la dislipemia, el cual actúa a través de diversos mecanismos metabólicos, como pueden ser la sensibilidad a la insulina y cambios en el metabolismo de los ácidos grasos (Bays H et al, 2005). El gen codifica para una enzima con un papel clave en el catabolismo de los TG influyendo a su vez en la concentración de c-HDL (Stein Y and Stein O, 2003; Elber CC et al, 2012). Se ha observado que alteraciones en el gen LPL se asocia con cambios en el metabolismo lipídico. Cambios en el ratio TG/c-HDL se asocian con mayor riesgo de ECV debido a su relación con la arterioesclerosis o el infarto de miocardio (Gaziano JM et al, 1997; Nordestgaard BG and Varbo A, 2014; Turak O et al, 2015).

En el presente estudio se mostró que la frecuencia del alelo menor C fue de 0,324 en la población mediterránea estudiada. Esta frecuencia es similar a la encontrada en otros estudios de población europea como el estudio HBCS realizado en Helsinki (0,290) o el Rotterdam Study (0,310) (Richardson K et al, 2013). En el estudio CARDIA realizado en EEUU mostró que la población con ancestro europeo tenía una frecuencia del alelo C de 0,323 mientras que la población de ancestro africano mostraba una frecuencia alélica de 0,507 (Tang W et al, 2010). Un estudio realizado en Nigeria mostraba una frecuencia de 0,459 coincidiendo con la encontrada en el estudio CARDIA (Pirim D et al, 2015).

El gen LPL codifica para una enzima que hidroliza TG desde los quilomicrones y VLDL en ácidos grasos libres y glicerol, los cuales son degradados por el hígado o convertidos a partículas de LDL por la lipasa hepática. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que los portadores del alelo C presentaban menor concentración de CT y de TG. La relación del polimorfismo rs13702 del gen LPL y la concentración de TG está previamente documentada en estudios previos. En ellos se observó que el alelo menor C presentaban menor concentración de TG y mayor concentración de c-HDL (Tang W et al, 2010; Richardson K et al, 2013). En nuestros resultados no encontramos una relación significativa del polimorfismo con los niveles de c-HDL. La influencia del gen LPL sobre el metabolismo lipídico está bien documentada. Su actividad lipolítica produce la hidrólisis de TG, disminuye su concentración y aumenta la transferencia de proteínas, fosfolípidos y colesterol desde las partículas VLDL aumentando la formación de c-HDL (Corella D et al, 2002; López-Miranda J et al, 2004; Elber CC et al, 2012; Pirim D et al, 2015). La relación entre el gen LPL y el metabolismo lipídico varía en función del sexo, donde se ha observado más esta asociación en mujeres, o del origen étnico, ya que se ha observado que el locus LPL se asocia con TG en población tanto con ancestro europeo como con africano, pero esta relación se muestra más fuertemente en este último grupo (Kusunuru K et al, 2012; Ma Y et al, 2014). En nuestros resultados no se obtuvieron diferencias significativas en función del género. Por tanto, la presencia del alelo menor C del polimorfismo rs13702 del gen LPL se asocia con menor concentración de TG y mayor concentración de c-HDL. En cambio, la presencia del alelo T disminuye un 40% la actividad del gen LPL, aumentando la concentración de TG (Tang W et al, 2010; Richardson K et al, 2013).

Los resultados obtenidos en el estudio muestran una relación del alelo menor C del polimorfismo rs13702 del gen LPL con los niveles de TG plasmáticos coincidiendo con resultados de estudios previos. Además, se observó una relación con la concentración de CT, no mostrada previamente.

5.3.1.5.- Polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1

Existe una gran evidencia científica de la relación entre desórdenes del ciclo circadiano y la obesidad, así como sus comorbilidades como son enfermedades cardiovasculares, DMT2, resistencia a la insulina, hipercolesterolemia, hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipertensión (Gimble JM and Floyd ZE, 2009). Los ritmos circadianos coordinan procesos fisiológicos durante ciclos de 24

horas abarcando estados de sueño y vigilia, funciones endocrinas y actividad cardiovascular (Takeda N et al, 2015). Uno de los genes centrales del ciclo circadiano es el gen CLOCK el cual codifica una proteína que forma un heterodímero con la proteína codificada por el gen BMAL1. El heterodímero actúa como un promotor de la expresión de otros genes del ciclo como PER y CRY (Ribas-Latre A and Eckel-Mahan, 2016; Micó V et al, 2016). El gen NR1D1 tiene como función regular la transcripción del gen BMAL1. Estudios en modelos animales mostraron que la ausencia del gen NR1D1 produce una alteración del ritmo circadiano (Preitner N et al, 2002; Bugge A et al, 2012). Alteraciones en los ritmos circadianos pueden tener efectos adversos sobre la salud ya que pueden contribuir a la patología de enfermedades cardiovasculares, cáncer, síndrome metabólico y envejecimiento (Van Cauter E et al, 1997; Takahashi JS et al, 2008; Brum MC et al, 2015).

En el presente estudio se analizó la existencia de relación entre el polimorfismo rs231439 del gen NR1D1 y parámetros relacionados con la obesidad. La frecuencia alélica de alelo menor T encontrada en este estudio fue de 0,126. Esta frecuencia es similar que la encontrada en otros estudios europeos realizados en países como Dinamarca (0,123), Italia (0,136), Holanda (0,117) y Grecia (0,153) (Dashti HS et al, 2015). También se encontraron frecuencias similares en población de EEUU en diversos estudios como CARDIA (0,121), CHS (0,121), GOLDN (0,128) y MESA (0,136) (Dashti HS et al, 2015). Frecuencias muy diferentes se encontraron en población coreana (0,467) (Kang JI et al, 2015).

Nuestros resultados mostraron una relación con los niveles plasmáticos de TG, donde los individuos homocigotos CC presentaban mayores niveles que los portadores del alelo T. Si lo analizábamos en función de la obesidad, esta diferencia de nivel de TG en función del genotipo se observaba sólo en los individuos obesos. Estos resultados son similares a los encontrados en otras variantes genéticas del gen NR1D1, donde se observaba una relación entre el gen y la obesidad en individuos obesos (Ruano EG et al, 2014). El gen NR1D1 regula directamente genes relacionados en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Solt LA et al, 2012). El gen NR1D1 se expresa altamente en el tejido adiposo y su expresión se induce durante la adipogénesis, mostrando un papel del gen en el almacenamiento de energía (Laitinen A et al, 2004). Alteraciones en el gen NR1D1 se relacionan con una disminución de la lipogénesis y síntesis de colesterol en el

hígado, un aumento de la oxidación de lípidos y glucosa en el músculo esquelético y un descenso en la síntesis de TG y almacenamiento en el tejido adiposo blanco. Estudios con agonistas del gen NR1D1, es decir, con sustancias que se unen al receptor celular para provocar la acción que produce el gen han mostrado que aumenta del gasto energético disminuyendo la masa grasa y los TG plasmáticos y CT (Solt LA et al, 2012). Por tanto, alteraciones del gen pueden producir alteraciones en los niveles de TG, como se observa en los resultados obtenidos.

En estos individuos obesos, los homocigotos CC también mostraban mayor perímetro de cintura. Estos resultados también se encontraron en otros estudios realizados en el mismo polimorfismo, donde el alelo menor T se asociaba con menor perímetro de cintura (Garaulet M et al, 2015). Estudios en otras variantes del gen también mostraban una relación del gen con un mayor perímetro de cintura, resultados encontrados en individuos obesos (Ruano EG et al, 2014).

Los resultados también mostraron una relación del polimorfismo rs2314339 y la obesidad, donde los individuos homocigotos CC presentaban mayor riesgo de obesidad sin llegar a ser estos resultados significativos. Este mismo resultado se observó en otras poblaciones, donde los portadores del alelo T del polimorfismo rs2314339 presentaban mayor protección contra la obesidad que los homocigotos CC tanto en población mediterránea como en población norteamericana con origen europeo (Garaulet M et al, 2015).

Por tanto, los resultados obtenidos del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 muestran una relación entre el polimorfismo y la obesidad, relacionado con el metabolismo lipídico y parámetro antropométricos relacionados con esta patología.

5.3.1.6.- Polimorfismo rs10883463 del gen SCD1

Los lípidos tienen una función fundamental en diversos procesos biológicos como señales de transducción, tráfico de membrana, morfogénesis y proliferación (Moreno-Indias I and Tinahones FJ, 2015). Las enzimas desaturasas de ácido grasos juegan un papel fundamental en la determinación del perfil de ácidos grasos. El gen SCD1 codifica una enzima que cataliza la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados a partir de AGS, concretamente el ácido palmítico y esteárico (Merino DM et al, 2010). Estudios en modelos animales han mostrado una relación entre un aumento de la actividad de la enzima SCD1 y la obesidad. La ausencia de SCD1 significa un descenso en tejidos de TG, ésteres de colesterol y diacilglicerol,

como una reducción de la síntesis de lípidos y un aumento de la β -oxidación, termogénesis y sensibilidad a la insulina, en el hígado, músculo, y tejido adiposo pardo (Flowers MT and Ntambi JM, 2008). Variaciones genéticas en el gen SCD1 podría afectar a la actividad enzimática y contribuir al desarrollo de la enfermedad.

En el presente estudio se analizó el polimorfismo rs10883463 del gen SCD1. La frecuencia obtenida para el alelo menor C (0,068) fue similar a la encontrada en otras poblaciones europeas como población sueca (0,068) o alemana (0,076) (Warensjö E et al, 2007; Arregui M et al, 2012 (b)). El alelo menor del polimorfismo rs10883463 se ha asociado previamente a un menor IMC, menor circunferencia de cadera, una mejora de la sensibilidad a la insulina (Warensjö E et al, 2007; Merino DM et al, 2010; Arregui M et al, 2012 (b)). Otros estudios mostraron una relación entre el polimorfismo y el tipo de aceite consumido, donde los portadores del alelo C que consumían AOV presentaban menor actividad enzimática que los que consumían aceite de girasol. Por tanto, este resultado mostraba una asociación entre un polimorfismo del gen SCD1, la ingesta de aceite y la actividad desaturasa, sugiriendo que variaciones genéticas del gen están implicadas en la regulación de los niveles de ácidos grasos plasmáticos y están relacionadas en desórdenes en el metabolismo lipídico (Martín-Núñez GM et al, 2013). En nuestro análisis inicial, no se encontraron asociaciones entre el polimorfismo y parámetros antropométricos como mostraban resultados de estudios previos.

En cambio, al analizar los resultados en función de la obesidad, sí que observamos una relación entre el polimorfismo rs10883463 y la cintura. Dentro de los individuos obesos, los homocigotos TT presentaban mayor perímetro de cintura que los portadores del alelo C sin encontrar estas diferencias en los participantes no obesos. Estos datos coincidirían con resultados previos donde se vio que los individuos obesos presentaban mayor actividad enzimática en el músculo esquelético. Este aumento de la actividad aumentaba la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, lo que provocaba un descenso de la oxidación de ácidos grasos, un aumento de la síntesis del triacilglicerol y un aumento de la monosaturación de lípidos en el músculo. Esto contribuirá a un metabolismo lipídico anormal y la progresión de la obesidad (Hulver MW et al, 2005).

Nuestros resultados también sugirieron una interacción entre el polimorfismo y el IMC modulada por la actividad física, donde se observó que los individuos sedentarios homocigotos TT presentaban mayor IMC que los portadores del alelo C sin observarse diferencias en individuos no sedentarios. Este resultado coincide con datos previos que relacionaban el alelo C del polimorfismo con un menor IMC (Warensjö E et al, 2007). Estudios en modelos animales mostraron una relación entre la actividad de SCD1 y la inflamación. Ratones deficientes en SCD1 ha mostrado una prevención de la inflamación en el tejido adiposo blanco, reflejado en una reducción de la expresión de genes pro-inflamatorios. La pérdida de SCD1 atenuaba la inflamación de adipocitos y la regulación de inflamación en macrófagos y células endoteliales (Liu X et al, 2010). Estudios en humanos han mostrado la relación entre variantes genéticas en el gen SCD1 con una alteración de los niveles de ácidos grasos plasmáticos lo cual puede contribuir a la regulación de la inflamación sistemática (Stryjecki C et al, 2012). También está bien documentado la efectividad del ejercicio en los desórdenes metabólicos y sus efectos anti-inflamatorios (Karstoft K and Pedersen BK, 2016). Por tanto, existe una relación entre este polimorfismo, la inflamación y la actividad física, aunque serían necesarios estudios adicionales para conocer el mecanismo molecular por el cual podría ocurrir esta relación.

Por tanto, el homocigoto TT de polimorfismo rs10883463 se relacionaría con parámetros antropométricos relacionados con la obesidad, como el perímetro de cintura y el IMC y su efecto podría estar modulado por la obesidad y la actividad física.

5.3.2.- Polimorfismos asociados con DMT2

5.3.2.1.- Polimorfismo rs4580704 de gen CLOCK.

5.3.2.1.1.- Polimorfismo rs4580704 de gen CLOCK en los participantes del estudio PREDIMED-Valencia

El gen CLOCK es un miembro clave del sistema circadiano. Como se ha comentado previamente, los ritmos circadianos coordinan procesos fisiológicos durante ciclos de 24 horas abarcando estados de sueño y vigilia, funciones endocrinas y actividad cardiovascular (Takeda N et al, 2015). Alteraciones en el ritmo circadiano a nivel genético o derivadas del actual estilo de vida, como puede

ser dormir a destiempo, turnos de trabajo rotatorios o comer a horas inusuales durante la noche, están relacionadas con alteraciones metabólicas como pueden ser DMT2, obesidad y síndrome metabólico (Vieira E et al, 2014). El sistema circadiano actúa a nivel central en las neuronas de núcleo hipotalámico y a nivel periférico en órganos o tejidos clave como pueden ser el hígado, el músculo esquelético, los islotes pancreáticos o el tejido adiposo (Yoshino J and Klein S, 2013). La proteína codificada por el gen CLOCK forma un heterodímero con otra proteína perteneciente al sistema circadiano como es la proteína BMAL1. Esto ocurre en el citoplasma y, una vez han dimerizado, se translocan al núcleo donde se unen a regiones promotoras de otros genes circadiano estimulando su expresión (Ribas-Latre A and Eckel-Mahan, 2016; Micó V et al, 2016).

En el presente estudio se analizó el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK. La frecuencia obtenida para el alelo menor G (0,398) fue similar a la encontrada en población americana de ancestro europeo (0,345) y un poco mayor que población argentina (0,298) (Garaulet M et al, 2009; Sookoian S et al, 2008). Este polimorfismo se ha asociado previamente con obesidad, hiperglucemia y gran prevalencia de DMT2 (Sookoian S et al, 2008; Garaulet M et al, 2009). Los resultados obtenidos en el estudio muestran que los individuos con el genotipo GG presentaban menor concentración de glucosa plasmática que los otros dos genotipos. Este resultado podría estar justificado por el control circadiano del metabolismo de la glucosa produciendo una variación diaria de la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (La Fleur SE, 2003; Cailotto C et al, 2005). En humanos, la concentración de insulina plasmática oscila durante el periodo de día/noche, donde hay un pico de secreción durante el día para el aumento del almacenamiento energético y su utilización. Por la noche se produce un descenso de la secreción de insulina y un aumento de la producción de glucosa (Vieira E et al, 2014). Estudios previos, tanto en modelos animales como en cultivos celulares, han mostrado el papel clave que tiene el gen CLOCK en el páncreas endocrino para la función adecuada del islote, en particular en la correcta secreción de la insulina. Se observó que al inhibir o inactivar el gen CLOCK, la formación del heterodímero CLOCK:BMAL1 disminuía, lo que provocaba una disminución en la expresión de genes involucrados en la vía de señalización de la insulina (PI3K, IRS2), en la detección de la insulina (GLUT2) así como genes necesarios para la correcta síntesis, almacenamiento y secreción de la insulina. El resultado final era el fuerte bloqueo de la exocitosis de la insulina y el desarrollo de una diabetes hipoinsulinémica (Rudic RD et al, 2004; Marcheva B et al, 2010; Perelis M et al,

2015; Saini C et al, 2016). Variantes en el gen CLOCK como puede ser el polimorfismo rs4580704, pueden alterar la señalización de la secreción de la insulina, lo que provocará un aumento en la concentración de la glucosa plasmática. Debido a estos resultados se analizó el riesgo de DMT2 aunque no se encontró diferencias según el genotipo del polimorfismo.

Como se ha comentado anteriormente, la alteración del sistema circadiano puede influir en el metabolismo lipídico y conducir a la obesidad (Garaulet M et al, 2010). En modelos animales se observó que ratones obesos con el gen CLOCK mutado mostraban hipertrofia de los adipocitos, esteatosis hepática y alteraciones en los niveles de leptina. Estos resultados mostraban que los mutantes del gen CLOCK desarrollaban obesidad, reducción del gasto energético, adiposidad y desregulación del metabolismo lipídico y del metabolismo de la glucosa (Rudic RD et al, 2004; Turek FW et al, 2005). Al analizar los resultados en función de la obesidad, se observó que los individuos obesos portadores del alelo G presentaban menor nivel de TG que los individuos obesos con el genotipo CC, resultados que concuerdan con los mostrados en el trabajo de Garaulet y colaboradores, donde asociaban el alelo menor G del polimorfismo rs4580704 con un descenso de la producción de las lipoproteínas que transportan a los TG o una degradación más rápida (Garaulet M et al, 2009). Otros estudios donde se analizaron diversos polimorfismos del gen CLOCK agrupándolos en diversos haplotipos, mostraron que las frecuencias obtenidas de esos haplotipos en las personas obesas se diferenciaban significativamente de las obtenidas para las personas no obesas (Sookoian S et al, 2008). Este dato podía esclarecer la razón por la cual la diferencia del valor de los TG plasmáticos sólo fue estadísticamente significativa en los individuos obesos.

En el análisis de los resultados en función de la DMT2, dentro de los participantes diabéticos, se obtuvo una asociación entre el genotipo del polimorfismo rs4580704 y el IMC. Los individuos diabéticos con el genotipo CC presentaban mayor IMC que los individuos portadores del alelo G, sin encontrar diferencias en los individuos no diabéticos. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios para el mismo polimorfismo (Garaulet M et al, 2009), como para otros polimorfismos del gen CLOCK (Scott EM et al, 2008) sugiriendo un posible papel protector del alelo G. En la investigación realizada por Garaulet y colaboradores mostró que los individuos CC que presentaban mayor IMC también mostraban un alto consumo de grasas.

Estudios previos mostraron una interacción gen*dieta entre el polimorfismo rs4580704 y la ingesta de AGM en la determinación de los niveles glucosa plasmática y la resistencia a la insulina (Garaulet M et al, 2009). Nuestros resultados muestran una interacción entre dos de los alimentos característicos de la DM, el aceite de oliva y los FS. En ambos casos, cuando no había un consumo preferente de aceite de oliva o un consumo menor de tres veces por semana de FS, el genotipo CC presentaba menor concentración de c-HDL que los otros genotipos. En cambio, cuando el consumo era mayor de ambos alimentos, estas diferencias no se encontraban. Se ha visto que el sistema circadiano influye en el metabolismo lipídico a través de la regulación de la expresión y/o actividad de algunas enzimas metabólicas y de los sistemas de transporte involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos (Kohsaka A and Bass J, 2007). Además, como se ha comentado previamente, CLOCK funciona como factor de transcripción de diferentes receptores nucleares los cuales son conocidos como respuesta a los lípidos. El aceite de oliva virgen es la principal fuente de grasa vegetal compuesta por AGM, en su mayor parte ácido oleico y los FS presentan una composición de ácidos grasos beneficiosa debido a que tienen un bajo contenido de AGS y cerca de la mitad de su contenido de ácidos grasos insaturados, la mayor parte de AGM. Por tanto, los resultados muestran una interacción gen*dieta entre los AGM y el metabolismo lipídico. Los resultados muestran que el genotipo CC presenta un mayor riesgo de alteración del metabolismo lipídico debido a que presentan menor concentración de c-HDL. Pero un mayor consumo de AGM reduce este riesgo y las concentraciones de c-HDL se igualan.

Por tanto, el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK ha mostrado una asociación con diversos parámetros relacionados tanto con la DMT2 como con la obesidad. El alelo menor G ha presentado un posible papel protector, presentando menor concentración de glucosa, TG y menor IMC. También se ha mostrado una interacción entre el alto consumo de AGM típico de la DM y el metabolismo lipídico, concretamente con la concentración de c-HDL.

5.3.2.1.2.- Polimorfismo rs4580704 de gen CLOCK en los participantes del estudio PREDIMED en población total

Los resultados obtenidos en los 7098 participantes del estudio PREDIMED muestran la relevancia del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK en la incidencia de la DMT2 y procesos relacionados, lo cual en última instancia conduce a una mayor incidencia de ECV en individuos diabéticos, estrechando la conexión entre variantes genéticas de los genes clock, alteraciones metabólicas y riesgo de ECV. Estudios previos mostraron que diferentes variantes alélicas en otros polimorfismos del mismo gen se asociaban con baja hiperglucemia y prevalencia de DMT2 (Garaulet M et al, 2009; Uemura H et al, 2015). Los resultados obtenidos en la población total del estudio PREDIMED muestran una relación entre el polimorfismo y el peso corporal. Se observa que la asociación entre el polimorfismo rs4580704 y la concentración de glucosa además de la incidencia de DMT2 se mantiene significativa tras ajustar por IMC.

También se mostró la asociación entre el polimorfismo y la incidencia de DMT2 está modulada por la dieta. La asociación protectora entre el alelo menor G y el riesgo de DMT2 era mayor en el grupo de intervención de DM llegando a la significación estadística. No se encontró el efecto protector del alelo G en el grupo control. Esta hipótesis se basa en resultados obtenidos previamente en otras poblaciones (Garaulet M et al, 2009). Los resultados apoyan que la asociación entre el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK y la DMT2 puede ser modulada por la dieta, teniendo la DM al aumento del efecto protector del alelo G en contra de la enfermedad.

La modulación por la dieta del efecto de la expresión gen CLOCK en los fenotipos metabólicos se han demostrado previamente en modelos animales (Turek et al, 2005; Scott EM et al, 2008; Marcheva B et al, 2010). Previos estudios en una población blanca americana mostraron una interacción gen*dieta entre rs4580704 y la contribución de los AGM en la dieta determina la concentración de glucosa y la resistencia a la insulina. Cuando la ingesta de AGM era mediana (<13,2%) no se encontraron diferencias según el genotipo. Cuando la ingesta de AGM era alta ($\geq 13,2\%$) los portadores del alelo G tenían menor concentración de glucosa plasmática y menor resistencia a la insulina que los no portadores. La DM se caracteriza por una alta concentración de AGM (alrededor de 20%) aportado en su mayor parte por el aceite de oliva. En la intervención con DM, el contenido de

AGM fue significativamente mayor que en el grupo control bajo en grasa, como se describió previamente (Estruch R et al, 2013). El alto contenido en AGM en el grupo de DM puede ser uno de los factores que pueden contribuir a explicar el mayor efecto protector frente a la incidencia de DMT2 observada en los portadores del alelo G en el grupo de intervención pero no en el grupo control de acuerdo con resultados previos obtenidos (Garaulet M et al, 2009). Los mecanismos para explicar esta interacción gen*dieta que modula la DMT2 no son conocidos, estudios recientes han sugerido que la metilación del ADN puede ser un mecanismo que influya en el ciclo circadiano (Azzi A et al, 2014; Welberg L, 2014). Apoyando estos resultados, en población mediterránea, el porcentaje de metilación de ciertas islas CpG en el gen CLOCK se asoció con la ingesta de AGM y AGS (Milagro FI et al, 2012).

En este estudio, el alelo G se asocia con menor concentración de glucosa en individuos no diabéticos, menor incidencia de DMT2 y menor riesgo de ECV en individuos diabéticos. En los estudios en modelos animales (Turek et al, 2005; Scott EM et al, 2008; Marcheva B et al, 2010), la reducción de la expresión del gen CLOCK se asocia con hiperglucemia, hiperinsulinemia y síndrome metabólico y la supresión del gen CLOCK en las células β conducía a una severa intolerancia a la glucosa, el alelo menor G en humanos podría estar asociado con una gran conservación de la funcionalidad del gen. Los portadores del alelo G pueden adaptarse mejor a la alteración circadiana o pueden mantener el ritmo de sus procesos con menos alteraciones, manteniendo una gran protección contra la obesidad, DMT2 y futura ECV.

En este estudio se muestra una relación entre polimorfismos de los genes que conforman el núcleo del ciclo circadiano y la incidencia de ictus. La asociación entre rs4580704 del gen CLOCK con ictus sólo es presente en individuos diabéticos. Variaciones circadianas en factores de riesgo relevantes para ECV como la sensibilidad a la insulina, presión sanguínea, función renal, ritmo cardíaco, concentración de hormonas, etc. (Eckel RH et al, 2015; Solocinski K and Gumz ML, 2015; Takeda N et al, 2015) puede explicar la relación con el infarto de miocardio, el ictus y otros eventos cardiovasculares (Marsh EE et al, 1990). Estas variaciones circadianas pueden ser muy importantes en los individuos con DMT2 y su alteración contribuye a una mayor incidencia de ECV (principalmente ictus) en individuos más susceptibles como los participantes con el genotipo CC del polimorfismo rs4580704. Aunque es conocido que individuos diabéticos tienen

mayor riesgo de ECV que individuos no diabéticos (Wannamethee SG et al, 2011) se ha descrito una gran heterogeneidad (Gore MO et al, 2015). Según los resultados, se puede sugerir que alteraciones circadianas debidas a variantes genéticas funcionales en el núcleo de los genes clock como CLOCK; como otro factor que puede contribuir a esta heterogeneidad y mayor riesgo de ECV (principalmente ictus) en estos sujetos. Como el proceso de la desregulación circadiana es complejo, el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK puede considerarse como representante de un mayor de riesgo de cronodisrupción en individuos CC.

Por tanto, hemos observado una asociación entre el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK y la incidencia de DMT2 en la población total del estudio PREDIMED, resultado en concordancia con conocimientos previos en estudios en animales y humanos. Además, se encontró que la asociación con DMT2 puede estar modulado por la dieta en un marco de un ensayo controlado aleatorizado, con la DM aumentaba el efecto protector de alelo G contra la DMT2. Los resultados también mostraron una asociación entre el alelo G y una protección contra ictus en individuos diabéticos.

5.3.2.2.- Polimorfismos cerca del gen IRS1

El gen IRS1 codifica para una proteína con un papel fundamental en la vías de señalización de la insulina que conducirá, en última instancia, a la incorporación intracelular de la glucosa para su consumo y posterior síntesis de glucógeno (Kaburagi Y et al, 1999; Boura-Halfon S and Zock Y, 2009). Variaciones cerca del gen IRS1 se asocian con una reducción en su expresión en los tejidos diana de la insulina. Por tanto, este locus se asocia con un aumento de resistencia a la insulina en todo el cuerpo y un mayor riesgo de DMT2, así como hiperinsulinemia y adiposidad (Voight BF et al, 2010; Kilpeläinen TO et al, 2011(a)). También se ha observado que la ingesta dietética puede influir en la expresión de los receptores de insulina y, de este modo, afectar a la fosforilación de IRS1 y la señalización de la insulina (Danielsson A et al, 2009). Esta proteína contiene 21 sitios de fosforilación de tirosina y alrededor de 30 sitios de fosforilación serina/treonina. La unión de la hormona al receptor activa las enzimas con actividad tirosin quinasa que fosforilan los residuos de tirosina de la proteína IRS. Esta fosforilación genera una cascada de señalización posterior donde se activa la enzima fosfatidil-inositol quinasa (PI3-k)

que, a su vez, activa el transportador de la glucosa 4 (GLUT4) estimulando el transporte de glucosa al interior de la célula y la posterior síntesis de glucógeno (Kaburagi Y et al, 1999; Boura-Halfon S and Zock Y, 2009).

En el presente estudio se analizaron dos polimorfismos situados en regiones no codificantes cerca del gen IRS1, el polimorfismo rs2943641 y rs2943634. Ambos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento aunque no se han encontrado estudios previos que analizaran el patrón de segregación de ambos polimorfismos conjuntamente.

Respecto al polimorfismo rs2943641, la frecuencia obtenida para el alelo menor T (0,353) es similar a las observadas en otras poblaciones europeas (Rung J et al, 2009; Yiannakouris N et al, 2011; Ericson U et al, 2013), en población puertorriqueña-americana (Zheng JS et al, 2014) y en población americana de ancestro europeo (Zheng JS et al, 2013). Sin embargo, este alelo presenta una frecuencia mucho más disminuida en población china (0,071-0,061) (Tang Y et al, 2013).

Diversos estudios han asociado el alelo C de este polimorfismo a un aumento de riesgo de DMT2 así como a un aumento de los niveles de glucosa plasmática (Rung J et al, 2009; Yiannakouris N et al, 2011). En el presente estudio en población de alto riesgo cardiovascular se observó que los participantes homocigotos para el alelo C presentaban mayores niveles de glucosa en sangre que los portadores del alelo T. Al analizar los resultados en función de la presencia de DMT2, los individuos diabéticos con el genotipo CC presentaban mayores concentraciones de que los portadores del alelo T sin encontrarse estas diferencias en los individuos no diabéticos. Además, se encontró un mayor riesgo de DMT2 para el genotipo CC del polimorfismo rs2943641. El gen IRS1 codifica para la proteína IRS1 implicada en la cascada de señalización de la insulina. Cuando la hormona se une a su receptor, se inicia una actividad tirosin quinasa intrínseca que fosforila los residuos de tirosina de la proteína IRS1, activando una cascada de señalización fosfatidilinositol-quinasa (PI3K). Esta cascada inicia la activación de proteínas-quinasas que, en última instancia, conducen al transporte de la glucosa al interior de la célula y a la posterior síntesis de glucógeno (Boura-Halfon S and Zock Y, 2009). El alelo C del polimorfismo rs2943641 se asocia con un descenso de la expresión de la proteína IRS1 en los tejidos diana de la insulina como pueden ser el músculo esquelético o el tejido adiposo, reduciendo la actividad PI3K y descendiendo la

incorporación de la glucosa plasmática al interior de la célula. Esto puede provocar el desarrollo de DMT2 (Rung J et al, 2009).

También se ha relacionado este polimorfismo con un aumento de la resistencia a la insulina y con diferentes anormalidades lipídicas como pueden ser un descenso de c-HDL y un aumento de TG plasmáticos (Kilpeläinen TO et al, 2011(a); Sharma R et al, 2011). Otros estudios han mostrado la influencia de la interacción de este polimorfismo con la ingesta de carbohidratos y grasas en la incidencia de DMT2. Una dieta con alta cantidad de grasa se asocia a una reducción de la fosforilación de la tirosina conduciendo a una supresión de la actividad PI3K y disminuyendo la sensibilidad a la insulina (Samuel VT et al, 2010). Zheng y colaboradores observaron que el alelo T mostraba efectos más beneficiosos en la resistencia a la insulina y los niveles de glucosa que el genotipo CC sólo cuando el ratio entre AGS y carbohidratos era bajo (Zheng et al, 2013). En el presente estudio basado en población mediterránea de alto riesgo cardiovascular no se encontraron diferencias en las concentraciones lipídicas de los diferentes genotipos. Tampoco se encontró interacción entre el polimorfismo y la dieta, debido a que el grupo control presentaba una baja ingesta de ácidos grasos y el patrón dietético del grupo de DM se basaba en la ingesta de AGM.

En conclusión, en esta población de alto riesgo cardiovascular el polimorfismo rs2943641 se ha mostrado como un marcador de DMT2, ya que este polimorfismo influye en la concentración de glucosa y un mayor riesgo de padecer la enfermedad.

En el caso del polimorfismo rs2943634, la frecuencia alélica obtenida para el alelo menos frecuente A (0,323) fue similar a la obtenida en población europea en diversos estudios (0,300-0,340) (Samani NJ et al, 2007; Karvanen J et al, 2009; Arregui M et al, 2012(a)). En población hispana americana se encontró una frecuencia ligeramente menor (0,270) (Qi Q et al, 2016).

Estudios de asociación de genoma completo han mostrado que el polimorfismo rs2943634 se asocia con un mayor riesgo de enfermedad coronaria arterial, una de las mayores causas de muerte a nivel mundial ((Samani NJ et al, 2007). Concretamente es el alelo con mayor prevalencia, el alelo C que se asocia con un mayor riesgo de diabetes y de riesgo cardiovascular. Como se ha descrito previamente, variaciones cerca del gen IRS1 se asocian con resistencia a insulina,

DMT2, concentración de TG y de c-HDL, factores todos ellos de riesgo cardiovascular (Arregui M et al, 2012 (a); Lim S et al, 2013). Adicionalmente, se ha descrito una asociación entre el alelo C polimorfismo rs2943634 y menores niveles de c-HDL (Karvanen J et al, 2009).

Al analizar la población participante del presente estudio se observó que los individuos con el genotipo CC presentaban mayores niveles de glucosa plasmática que los individuos portadores del alelo A. Al analizar los resultados en función de la presencia de DMT2, esta diferencia de concentración de glucosa en función del genotipo se presentaba en los individuos diabéticos. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde asociaban el alelo C de este polimorfismo con un aumento de glucosa plasmática, tanto en estudios en animales modelo (Kilpeläinen TO et al, 2012) o en estudios poblacionales (Rung J et al, 2009). Estos estudios también asociado este polimorfismo a un mayor riesgo de DMT2 (Rung J et al, 2009), aunque nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el cálculo del riesgo.

Diversos estudios han relacionado el polimorfismo rs2943634 con niveles de c-HDL plasmático, concretamente el alelo C se asociaban con menores niveles (Karvanen J et al, 2009; Sharma R et al, 2011; Arregui M et al, 2012). Nuestros resultados no mostraron diferencias en la concentración de c-HDL en función del genotipo. En cambio, sí que se observó esta relación en nuestra población pero modulada por la adherencia a la DM. Nuestros resultados mostraron que los individuos con genotipo CC presentaban mayores niveles de c-HDL sí estos individuos presentaban una alta adherencia a la DM. La interacción entre el gen y la dieta se ha descrito previamente pero en el polimorfismo anterior, el rs2943641, cuya regulación se veía influenciada por la ingesta de carbohidratos y grasa (Ericson U et al, 2013). En la literatura científica encontramos diversos estudios que asocian una mayor concentración de c-HDL con la DM (Damasceno NR et al, 2013; Mertens E et al, 2014; Yang J et al, 2014). Esto puede ser debido a que alimentos típicos de la DM como en AOV o los FS son ricos en polifenoles lo que puede incrementar los niveles de c-HDL (Covas MI et al, 2006; Covas MI et al, 2015). Nuestros resultados muestran que una alta adherencia a la dieta influye sobre el alelo de riesgo C, aumentando los niveles de c-HDL.

Por tanto, nuestros resultados muestran una relación entre el polimorfismo rs2943634 con los niveles de glucosa plasmática y una relación con los niveles de c-HDL modulada por la adherencia a la DM.

Debido a la proximidad de los polimorfismos rs2943641 y rs2943634, se calculó el desequilibrio de ligamiento de ambos polimorfismos y se confirmó que ambos se segregan de manera conjunta. En los resultados obtenidos, los alelos de riesgo de ambos polimorfismos se asociaban con mayor concentración de glucosa plasmática. Se agruparon los homocigotos más prevalentes de ambos polimorfismos frente a los portadores de los alelos menos prevalentes y los resultados mostraron una relación con los niveles de glucosa. Los portadores de los genotipos de riesgo CC/CC también presentaban mayor concentración de glucosa. El análisis del riesgo mostró que los portadores del alelo menos frecuentes T y A respectivamente, presentaban menor riesgo de DMT2. Por tanto, ambos polimorfismos influyen en el gen IRS1, lo que podría provocar un descenso en la expresión y que llevaría a un aumento de la resistencia a la insulina y a un descenso de la incorporación de la glucosa a la célula aumentando los niveles de glucosa plasmática (Rung J et al, 2009).

En conclusión, los polimorfismos rs2943641 y rs2943634 situados cerca del gen IRS1 se relacionan con los niveles de glucosa plasmática, siendo esta asociación muy significativa en pacientes diabéticos, y riesgo de DMT2. Además, se halló una interacción con factores ambientales, donde se mostró una asociación entre el polimorfismo rs2943634 y los niveles de c-HDL modulada por la adherencia a la DM.

5.3.2.3.-Polimorfismo rs1052133 del gen OGG1

En un estado libre de patologías, las especies reactivas al oxígeno son producidas por el metabolismo aeróbico. Parte de estos radicales actúan como mediadores reguladores en varias vías de señalización. El exceso de radicales libres se inactiva por la acción del sistema antioxidante. Una alteración en el equilibrio de producción/eliminación de estos radicales libre que puede provoca una situación de estrés oxidativo provocar daños en el ADN (Pácal L et al, 2011). Un aumento del daño oxidativo juega un papel importante en la disfunción celular y en la apoptosis, que son críticos para el desarrollo de diversas patologías como el envejecimiento o enfermedades degenerativas crónicas (D'Errico M et al, 2008; Thameem F et al,

2010). El daño oxidativo al ADN a través de especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en la disfunción de las células β que contribuye al desarrollo de la DMT2 y sus complicaciones (Hadjivassiliou V et al, 1998).

Una de las bases mutagénicas producidas por este estrés oxidativo es la 7,8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) que produce una alteración al utilizar residuos de adenina en lugar de los residuos usuales de citosina produciendo una transversión aumentando la proporción de G:C a T:A (Thameem F et al, 2010). El gen OGG1 codifica una enzima responsable de la eliminación de 8-OHdG (Jensen A et al, 2012). El polimorfismo rs1052133 es el más común del gen OGG1, también denominado Ser326Cys. Es un cambio de citosina a guanina en el nucleótido 1245, la cual conduce a una sustitución serina a cisteína localizada en el dominio C terminal de la proteína, concretamente en el codón 326, siendo el alelo menor G el que codifica para la cisteína (Simonelli V et al, 2013). Este polimorfismo se ha asociado con diferentes tipos de cáncer (Weiss JM et al, 2005) y con otras patologías influidas por la aparición de un mayor número de radicales libres debido al estrés oxidativo, como puede ser la DMT2 (Daimon M et al, 2009; Thameem F et al, 2010; Sun C et al, 2010; Pácal L et al, 2011; Hara M et al, 2014).

La frecuencia alélica obtenida del polimorfismo rs1052133 fue 0,200 para el alelo menor G. Esta frecuencia es muy similar a las encontradas en otras poblaciones europeas como población checa (0,210), danesa (0,228), italiana (0,180) o portuguesa (0,172) (Pácal L et al, 2011; Jensen A et al, 2012; Simonelli V et al, 2013; Soares JP et al, 2015, respectivamente). En cambio, la frecuencia del alelo menor G varía en otras poblaciones como la americana-mejicana donde es ligeramente mayor (0,360) (Thameem F et al, 2010) y en población japonesa, donde la frecuencia de los dos alelos se iguala y varía según el estudio. En el trabajo de Daimon y colaboradores las frecuencias observadas fueron 0,536 para el alelo C y 0,464 para el alelo G (Daimon M et al, 2009) mientras que Hara y colaboradores calcularon una frecuencia 0,445 para el alelo C y de 0,555 para el alelo G (Hara M et al, 2014).

En nuestros resultados no hemos observado ninguna asociación del polimorfismo con parámetros antropométricos o bioquímicos asociados a la obesidad o a la DMT2. Al analizar la concentración de glucosa plasmática más en profundidad, se observó una interacción con la actividad física. Esta relación entre el posible efecto del ejercicio físico sobre el daño y reparación del ADN y polimorfismos del gen

OGG1 ya se mostró en un estudio anterior (Soares JP et al, 2015). El genotipo GG del polimorfismo rs1052133 se asocia con mayores niveles de daño oxidativo y con una menor actividad reparadora (Jensen A et al, 2012). Diversos trabajos han mostrado un mayor riesgo de DMT2 asociado al alelo G del polimorfismo ya que se relaciona con una menor actividad de la enzima codificada por el gen. Por tanto, individuos portadores del alelo G no tienen un incremento de la actividad enzimática suficiente para atenuar el daño del ADN. Por tanto, cuando los niveles de glucosa plasmática aumentan, el estrés oxidativo aumenta y los portadores del alelo G pueden perder funcionalidad de las células β mucho antes (Daimon M et al, 2009; Thameem F et al, 2010). En la población estudiada, los individuos sedentarios portadores del alelo G presentan mayores niveles de glucosa plasmática que los individuos sedentarios CC, aunque estas diferencias no llegaron a la significación estadística. Estos resultados coinciden con los estudios previos antes mencionados donde el alelo G confiere mayor riesgo de DMT2.

En cambio, al analizar la población no sedentaria, los portadores del alelo G presentaban menor concentración de glucosa mientras que la concentración de glucosa de los individuos CC era muy parecida a la obtenida en los individuos CC sedentarios, siendo estos resultados estadísticamente significativos. Estudios en modelos animales mostraron que un ejercicio moderado y habitual tenía un efecto protector frente al daño del ADN debido al estrés oxidativo. Esto era probablemente atribuido al incremento en la expresión de enzimas antioxidantes (SOD2 y catalasa) y de enzimas reparadoras del ADN, aunque no se incluía la codificada por el gen OGG1 (Siu PM et al, 2011). El trabajo realizado por Soares y colaboradores, relacionaban el polimorfismo rs1052133 con la actividad física pero de manera diferente a nuestras observaciones (Soares JP et al, 2015). Sus resultados mostraron que los participantes con genotipo CC incrementaban la capacidad antioxidante pero no encontraron cambios en los portadores del alelo G. La diferencia en los resultados puede ser debida a la diferencia en las características de la población seleccionada así como en el número de participantes total. En el estudio de Soares y colaboradores, los participantes seleccionados estaban en edades comprendidas entre los 40 y los 74 años, no fumadores y sin desórdenes endocrinos, llegando a un total de 32 participantes. Los participantes incluidos en el presente estudio tenían mayor edad y riesgo de enfermedad cardiovascular, llegando a un total de 1050 participantes.

Por tanto, un ejercicio moderado en los portadores del alelo G podría contrarrestar la menor actividad enzimática reparadora con la activación de otros componentes del sistema antioxidante y así atenuar el daño del ADN producido por el estrés oxidativo.

5.3.3.- Polimorfismos asociados con ancestro genético

Actualmente, ha habido un auge en el estudio de la estructura genética de las poblaciones y la selección de marcadores informativos ancestrales (AIM: ancestry informative marker). Esto es debido a la implicación de estos conocimientos en distintas áreas de genética así como su utilización en diversos campos de la investigación, desde las ciencias forenses hasta la genética poblacional y la genética médica (Drineas P et al, 2010). Los AIMs son marcadores genéticos autosómicos utilizados para deducir de manera probabilística el ancestro genético de individuos y grupos (Tian C et al, 2008; Yu J-H et al, 2012). La prevalencia de diferentes enfermedades se ha observado que varía según la población que se estudie. Variantes genéticas asociadas con la hipertensión, la DMT2, enfermedades renales, cáncer de próstata o respuestas a tratamientos médicos difieren significativamente según el grupo poblacional que se esté estudiando (Royal CD et al, 2010; Smart A et al, 2017). La estimación del ancestro genético tiene el potencial de ayudar a descubrir la contribución genética a las enfermedades y de reducir el sesgo estadístico debido al análisis de muestras con diferentes orígenes genéticos (Yu J-H et al, 2012). Es muy importante la estratificación de la población, en particular en los estudios de casos y controles. La presencia de niveles de ancestro discordantes entre los casos y los controles puede llevar a falsos positivos en las asociaciones de estudio o reducir el poder de detección de las mismas (Bauchet M et al, 2007). El análisis de componentes (PCA: principal components analysis) es una técnica que puede extraer de manera efectiva la estructura fundamental de un conjunto de datos y se utiliza para descomponer la estructura genética de las poblaciones humanas así como para identificar AIMs (Drineas P et al, 2010). En población europea se han descrito unas docenas de AIMs que distinguen claramente un eje norte-sur, permitiendo una estratificación de la población en la búsqueda de identificar genes etiológicos para enfermedades comunes y complejas, sobre todo cuando el número de muestras a estudiar es de gran envergadura (Drineas P et al, 2010; Pino-Yanes M et al, 2011).

Diversos estudios han mostrado la relación entre el ancestro genético de diversas poblaciones con diferentes enfermedades, como pueden ser el asma (Choudhry S et al, 2006; Flores C et al, 2012), el riesgo de DMT2 (Meigs JB et al, 2014; Hu H et al, 2015), o el riesgo de cáncer de mama (Fejerman L et al, 2010). En el presente estudio se eligieron 10 AIMS con gran relevancia en población española (Pino-Yanes M et al, 2011) y se estudió su posible asociación con parámetros relacionados con la obesidad y la DMT2. Debido a que en la literatura científica no se han hallado mucha información de muchos de estos polimorfismos y para poder establecer una mayor comparación entre las frecuencias obtenidas en el presente estudio con las observadas en otras poblaciones, se referenciaron las disponibles en la base de datos Hapmap (<http://hapmap.org>).

El primer polimorfismo analizado fue el rs2014303 del gen CLNK. Este gen, también denominado MIST, está localizado en el cromosoma 4p16.1 y se expresa en diversos tipos celulares, incluyendo las células T y está implicado en la señalización inmunoreceptora en respuesta a la estimulación de citoquinas (Cao MY et al, 1999; Jin TB et al, 2015). El polimorfismo rs2014303 se ha descrito como uno de los 20 marcadores de ancestro genético europeo más relevante en la estratificación norte-sur de la población europea (Bauchet M et al, 2007). La frecuencia del alelo menos prevalente fue ligeramente mayor (0,213) a la encontrada en la población europea (0,176). En cambio, el alelo A era menos frecuente en la población asiática (0,064) y mayor en la población africana (0,274). En nuestro estudio, se observó que los portadores del alelo ancestral A que, a su vez, era el menos frecuente presentaban mayor nivel de c-LDL plasmático. Además, al analizar la posible interacción del polimorfismo con la DM, se observó que los individuos con el genotipo CC presentaban similar concentración de c-HDL mientras que en los portadores del alelo A había diferencias. Los individuos que presentaban menor adherencia a la dieta presentaban una menor concentración de c-HDL. En cambio, si la adherencia era alta, la concentración de c-HDL era mayor, superando incluso a la concentración que presentaban los individuos CC. Más concretamente, uno de los alimentos más característicos de la DM, el consumo de AOV como principal grasa, influía en la concentración de c-HDL según el genotipo. Las diferencias se encontraron una vez más en los portadores del alelo A, que presentaban mayor concentración de c-HDL cuanto mayor era el consumo de AOV. El consumo de aceite de oliva virgen como principal grasa tiene numerosos efectos beneficiosos por su composición en grasas monoinsaturadas. El consumo del aceite aumenta el HDL, reduce el daño oxidativo a los lípidos, disminuye la

inflamación, mejora la función endotelial y disminuye la presión arterial sistólica (Covas MI et al, 2015). Los resultados obtenidos indican que el polimorfismo rs2014303 podría estar relacionado con el metabolismo lipídico. Otros trabajos realizados en otras variantes genéticas del gen CLNK, asociaban este gen con mayores niveles de ácido úrico, glucosa y menores niveles de c-HDL en distintas poblaciones (Jin TB et al, 2015; Lan B et al, 2016). Los resultados obtenidos en estos estudios permiten intuir que estos polimorfismos podrían afectar al metabolismo de macromoléculas relevantes, como son los azúcares y los lípidos. Sin embargo, ninguno de los estudios ha podido esclarecer el mecanismo exacto por el que ocurre tal influencia. Por tanto, sería necesario realizar futuros estudios enfocados dilucidar estos mecanismos de acción.

A continuación, se analizó el polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C (Family with sequence similarity 5, member C). El gen se sitúa en el cromosoma 1p31.1y originariamente se identificó en el cerebro de modelos animales como un gen que era inducido por la proteína morfogénica ósea y la señalización del ácido retinoico, por eso se le denominó BRINP3 (Kawano H et al, 2004). La función de este gen no está caracterizada de manera clara. Se ha visto que la proteína que codifica está altamente conservada en humanos, por lo que es un buen marcador de ancestro genético. Se ha asociado diversas variantes del gen con enfermedades como el carcinoma de células escamosas (Kuroiwa T et al, 2009), el cáncer gástrico (Chen L et al, 2012), la periodontitis (Carvalho FM et al, 2010) y el infarto de miocardio (Connelly JJ et al, 2008).

La frecuencia del alelo minoritario G fue similar a la encontrada en la población europea. Tanto en población asiática como africana, la frecuencia de este alelo era mayor (0,200 y 0,308 respectivamente). Nuestros resultados muestran una posible relación entre el genotipo del polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C con parámetros relacionados con la obesidad como son el perímetro de cintura y la concentración de c-HDL. Los individuos portadores del alelo G presentaban mayor perímetro de cintura y menores concentraciones de c-HDL. Al analizar en más profundidad estos resultados, se observó que la concentración de c-HDL podía estar regulada por la actividad física. Mientras que los individuos AA presentaban una concentración similar de c-HDL, los portadores del alelo G tenían menor concentración de c-HDL si eran clasificados como sedentarios. Estudios de localización subcelular de otros polimorfismo del gen han mostrado que el gen FAM5C se localiza en la mitocondria (Cline JL and Beckie TM, 2013). Una

sobreexpresión del gen induce un aumento en la producción de especies reactivas al oxígeno, aumentando a su vez el estrés oxidativo produciendo un aumento de la inflamación vascular, aunque el mecanismo por el que se produce es todavía desconocido. Por tanto, FAM5C puede considerarse un mediador en la inflamación vascular (Sato J et al, 2014). Esta inflamación vascular es una parte importante del síndrome metabólico y en aterosclerosis, aumentando el riesgo cardiovascular (Gustafson B et al, 2007; Connelly JJ et al, 2008; Sato J et al, 2014). Estudios tanto en modelos humanos como animales han mostrado que procesos de inflamación, ya sea aguda o crónica, afectan al metabolismo lipídico provocando dislipemias (van Diepen JA et al 2013). Estudios realizados en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas se observó una reducción de c-HDL y un aumento de TG (Park YB et al, 1999). Esto podría esclarecer los resultados obtenidos, ya que la expresión del polimorfismo de estudio podría aumentar el estrés oxidativo provocando una situación de inflamación en los tejidos vasculares que afectaría al metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles de c-HDL. Futuros estudios serían necesarios para conocer el mecanismo por el que se produce este proceso.

Un estudio realizado en población japonesa mostró una relación entre el estrés oxidativo y la grasa visceral. En él se observó que un aumento en marcadores de estrés oxidativo estaba fuertemente asociado con la acumulación de grasa visceral (Fujita K et al, 2006). Este incremento de estrés oxidativo y de grasa visceral contribuye a la aceleración del estrés oxidativo en diversos órganos que están involucrados en la patogénesis del síndrome metabólico, incluyendo el hígado, el músculo esquelético, el cerebro y las células β (Matsuda M and Shimomura I, 2013). Nuestras observaciones muestran un incremento en el perímetro de la cintura en los individuos portadores del alelo G del polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C. Por tanto, según los resultados en estudios previos, podríamos sugerir que el alelo G del polimorfismo se asocia con un aumento del estrés oxidativo produciendo un aumento en la inflamación vascular que influiría directamente sobre el metabolismo lipídico y la acumulación de grasa visceral.

La realización de ejercicio de manera continuada se asocia con menores niveles de marcadores de estrés oxidativo y un aumento de la capacidad antioxidante enzimática y no enzimática en personas jóvenes, de mediana edad e individuos mayores (Gimenes C et al, 2015; Joseph AM et al, 2016). Estas observaciones coincidirían con los resultados obtenidos en este estudio, debido a que los

individuos portadores del alelo G que realizaban actividad física continuada presentaban unos valores de concentración de c-HDL similares a los individuos con genotipo AA. Por lo tanto, la actividad física neutralizaba el mayor estrés oxidativo producido por el alelo G del polimorfismo rs2419063, reduciendo la alteración en el metabolismo lipídico.

Dentro del gen KCNMA1 (Potassium Calcium-activated channel subfamily M alpha 1) se sitúa el polimorfismo rs2116830. El gen está localizado en el cromosoma 10q22.3. y codifica la subunidad α de los canales de potasio implicados en diversos procesos biológicos como la regulación en la proliferación de linfocitos, de células vasculares endoteliales, células epiteliales o células madre mesenquimales (Hu H et al, 2009). Variaciones genéticas de este gen se ha relacionado con diversas patologías como hipertensión severa y el infarto de miocardio (Tomás M et al, 2008).

La frecuencia alélica del alelo menor del polimorfismo rs2116830 de la población estudiada (0,222) fue similar a otras poblaciones europeas como población sueca (0,180), francesa (0,202) o alemana (0,166) (Jiao H et al, 2011). El alelo G del polimorfismo se sitúa en el intrón 28 del gen KCNMA1 y se ha asociado con obesidad. Para conocer como el polimorfismo contribuye a la obesidad se realizaron estudios de expresión en tejido adiposo y se observó un aumento de su expresión (Jiao H et al, 2011). La estimulación de los canales de KCNMA1 aumenta la proliferación de pre-adipocitos *in vitro* (Hu H et al, 2009). El número de adipocitos es un determinante importante para la masa grasa en adultos (Spalding KL et al, 2008). Por tanto, se puede suponer que la contribución del polimorfismo a la aparición de la obesidad podría deberse a su actuación en el tejido adiposo con un aumento de la masa grasa (Jiao H et al, 2011). Los resultados de nuestro estudio no mostraron ninguna asociación del polimorfismo rs2116830 de gen KCNMA1 con variables antropométricas y bioquímicas relacionadas con la obesidad.

Al analizar estas variables relacionadas con obesidad con factores ambientales, se observó que existía una interacción entre el genotipo del polimorfismo y la adherencia a la DM que influía sobre el peso. Mientras que en el genotipo GG no existían diferencias, los portadores del alelo T que presentaban una alta adherencia a la dieta presentaban menor peso incluso que los individuos con el genotipo GG. Se ha observado que una desregulación de los canales de potasio regula la

proliferación de preadipocitos causando a su vez una desregulación de la masa adiposa que conduce a la obesidad (Hu H et al, 2009). El polimorfismo rs2116830 podría estar implicado en la desregulación de los canales de potasio. Las características de la DM podrían modular el efecto del polimorfismo ayudando a la neutralización de esta desregulación, disminuyendo la proliferación de la masa grasa. Los mecanismos biológicos que determinan la interacción entre la DM y el polimorfismo rs2116830 en la determinación del peso no son conocidos y se requerirían estudios moleculares directos para su conocimiento.

A continuación se analizó el polimorfismo rs6086473 del gen PLCB1 (Phospholipase C beta 1). Este polimorfismo es una variante intrónica del gen, el cual está localizado en el cromosoma 20p12.3. El polimorfismo se utiliza como marcador de ancestro genético en estudios poblacionales (Tian C et al, 2007). El gen PLC tiene un papel principal en las vías de transducción de señalización transmembrana, ya se encarga de catalizar la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato produciendo 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato. Esta reacción produce la liberación de Ca^{2+} intracelular y el DAG activa a su vez la protein quinasa C (PKC). Todo este proceso puede provocar diferentes respuestas biológicas como la proliferación, diferenciación, supervivencia y secreción (Caricasole A et al, 2000; Martelli AM et al, 2005). La activación del gen se produce en respuesta a una amplia variedad de estímulos incluyendo factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores, que actúan en receptores específicos localizados en la membrana plasmática (Martelli AM et al, 2001). La isoforma de gen PLCB1 se asocia al núcleo y tiene un papel importante en el control de la proliferación celular (Ju H et al, 1998; Peruzzi D et al, 2002). Se expresa en muchos tejidos, principalmente en el cerebro, con diferentes niveles de expresión. La proteína que codifica se encuentra en el citoplasma (Caricasole A et al, 2000). La frecuencia del alelo menos frecuente T fue similar a la obtenida en la población europea (0,296), siendo similar en población asiática (0,302) y africana (0,353). Los resultados de nuestro estudio no mostraron ninguna asociación significativa entre el polimorfismo rs6086473 y parámetros antropométricos o bioquímicos asociados a la obesidad o a la DMT2. Si que se obtuvo una asociación significativa al analizar los resultados en función del sexo. Se observó que la concentración de c-HDL era diferente en función del genotipo del polimorfismo en hombres y mujeres. En hombres con genotipo CC presentaban mayor concentración de c-HDL mientras que en las mujeres ocurría lo contrario, el genotipo CC es el que presentaba menor c-HDL.

Estos resultados podrían sugerir que el polimorfismo rs 6086473 puede afectar a la funcionalidad de la proteína que codifica que puede estar relacionado con la formación de c-HDL ya que el gen está involucrado en el metabolismo lipídico del inositol nuclear implicado en la señalización celular, aunque serían necesarios futuros estudios para conocer el mecanismo molecular de esta relación. Además de la posible variación según el género, estudios previos han mostrado la diferencia de concentración de c-HDL según el género. Normalmente, se asocian concentraciones más elevadas de c-HDL en mujeres que en hombres (Pascot A et al, 2002). Esta diferencia podría deberse a la diferente distribución de la grasa corporal y las hormonas esteroideas endógenas, con una asociación positiva entre la obesidad central y el estradiol en mujeres y una asociación inversa entre la obesidad central y la testosterona en hombres (Goodman-Gruen D and Barrett-Connor E, 2000).

Por tanto, los resultados obtenidos muestran una diferencia de concentración de c-HDL según el sexo, coincidiendo con resultados de estudios previos, influenciada por el polimorfismo rs6086473 del gen PLCB1, aunque no conocemos el mecanismo molecular por el cual se produce.

El polimorfismo rs11807062 es una variante intrónica del gen PRDM16, localizado en el cromosoma 1p36.3. El gen codifica para una proteína que actúa como un factor de transcripción en el desarrollo de la grasa parda (Frühbeck G et al, 2009). La frecuencia del alelo menos frecuente fue ligeramente superior (0,153) a la encontrada en la población europea (0,081). En este polimorfismo se encontró una gran diferencia en las frecuencias alélicas, ya el alelo C es mucho más frecuente en otras poblaciones como la asiática (0,586) y africana (0,750), convirtiéndose en el alelo mayoritario. Nuestros resultados mostraron una relación entre el genotipo del polimorfismo sobre el peso modulado por la obesidad. Mientras que los individuos obesos con genotipo AA presentaban menor peso, los individuos no obesos con el mismo genotipo presentaban mayor peso.

Existen dos tipos de tejido adiposo, el blanco especializado en el almacenamiento la energía como triglicéridos, y el pardo, que disipa la energía en forma de calor. Estudios en modelos animales han mostrado que el desarrollo del tejido adiposo pardo ofrece la posibilidad de aumentar el gasto energético y está asociado con un fenotipo sano y delgado. Por el contrario, una pérdida de función de este tipo de tejido adiposo se asocia a obesidad y enfermedades metabólicas (Seale P et al,

2008). La expresión del gen PRDM16 promueve la diferenciación del tejido adiposo pardo e inhibe la diferenciación de células del músculo esquelético, lo que conlleva una reducción de la masa grasa (Urano T et al, 2014). La supresión de PRDM16 en ratones disminuye la oxidación de la grasa conduciendo a un aumento del tamaño de los adipocitos y una disfunción del tejido adiposo (Cohen P et al, 2014), mostrando la función de este gen en el mantenimiento de la homeostasis metabólica de los adipocitos (Moreno-Navarrete JM et al, 2015). Estos estudios también mostraron que los niveles de expresión de la proteína codificada por el gen PRDM16 descendían en individuos obesos. Nuestros resultados muestran que el alelo A se asocia con un mayor peso, lo que se relacionaría con la función anormal del gen. Sin embargo, en individuos obesos ocurre lo contrario, por lo que la obesidad podría estar modulando el efecto del polimorfismo.

El presente estudio también muestra una interacción del polimorfismo rs11807062 con un factor ambiental, la actividad física, en parámetros relacionados con la obesidad. En concreto, los niveles de c-HDL y el IMC se asocian con el polimorfismo del gen PRDM16, concretamente con el alelo C, y está modulado por la realización de actividad física. Estudios previos han mostrado la relación entre otros polimorfismos del gen y el IMC (Yue H et al, 2013). En individuos portadores del alelo C sedentarios muestran mayor IMC. La realización de la actividad física disminuye el valor de IMC en ambos genotipos, neutralizando el efecto del genotipo de los portadores del alelo C igualando el valor del IMC. Estudios en modelos animales han mostrado que ambientes con estímulos sociales y físicos mejora la salud cognitiva y metabólica. Estos estímulos pueden aumentar la expresión de PRDM16, marcadores específicos de la grasa parda y genes involucrados en la termogénesis, aumentando la disipación de energía (Cao L et al, 2011). La inducción del gen se realiza a través de mecanismos que incluyen la acción de un factor hipotalámico (BDNF) que funciona como mediador entre los estímulos ambientales, el sistema nervioso simpático y el tejido adiposo pardo. En este estudio muestran la influencia de factores ambientales como la temperatura ambiental o la dieta sobre el gen, pero no encuentran la influencia de la actividad física individualmente sobre el gen PRDM16, como sí que vemos en nuestros resultados.

Los niveles de c-HDL pueden aumentar con la realización de actividad física (Kodama S et al, 2007; Loprinzi PD and Addoh O, 2016). Se ha observado un incremento de c-HDL durante la realización de ejercicio aeróbico, aumentando la

capacidad de transporte reverso de peróxidos lipídicos del HDL (Tiainen S et al, 2016). En nuestro polimorfismo, el alelo C está influenciado por la actividad física. En individuos sedentarios, los niveles de c-HDL de los portadores del alelo C son menores que los encontrados en los individuos homocigotos AA. En cambio, en los individuos no sedentarios, los niveles de c-HDL aumentan notablemente. Por tanto, la actividad física potencia la producción de c-HDL plasmático independientemente del genotipo de este polimorfismo, aunque futuros estudios serían necesarios para conocer los mecanismos por los que se produce.

El polimorfismo rs10509954 es una variante intergénica situado en el cromosoma 10. Se considera un marcador de ancestro genético importante en la población española (Pino-Yanes et al, 2011). Existe poca información sobre este polimorfismo y tampoco se ha asociado a ninguna patología. La frecuencia del alelo minoritario en nuestra población fue similar a la encontrada en población europea (0,033). La frecuencia de este alelo fue superior en otras poblaciones, convirtiéndose en el alelo mayoritario en población asiática (0,533). Nuestros resultados muestran una relación de este polimorfismo con parámetros antropométricos relacionados con obesidad y con parámetros bioquímicos con DMT2. Estas asociaciones sólo se encontraron en mujeres. En relación con la obesidad, las mujeres portadoras del alelo A mostraban menor peso, más IMC y más cintura. En cambio, en hombres ocurría al contrario, aunque sus diferencias no fueron significativas. Por eso, al analizar el riesgo de obesidad, los hombres portadores del alelo A tenían mayor riesgo de obesidad, mientras las mujeres portadoras del alelo A tenían menor riesgo de obesidad. En relación con la DMT2, las mujeres homocigotas GG mostraban mayor concentración de glucosa plasmática. Posteriormente, en población total se observó que el alelo A presentaba menor riesgo de DMT2, pero al analizar los resultados por sexo, este riesgo sólo era significativo en mujeres. Por tanto, el polimorfismo rs10509954 se puede asociar con la DMT2 en mujeres, donde el alelo A presenta menor riesgo de esta patología.

Estos resultados muestran la posible relación del polimorfismo rs10509954 con ambas patologías pero esta asociación vendría determinada por el sexo. El polimorfismo está localizado a poco más de un millón de pares de bases (1Mb) de un gen muy estudiado como es el TCF7L2 (Transcription factor 7-like 2). El gen abarca 215863 pares de bases en la región del cromosoma 10q25.3. Diferentes variantes génicas del gen se han asociado con riesgo de DMT2 en diversas

poblaciones y grupos étnicos (Cauchi S et al, 2007; Lyssenko V et al, 2007; Peng S et al, 2013; Jia HY et al, 2016). También se ha relacionado diversos polimorfismos del gen con la obesidad (Cauchi S et al, 2008a; Klünder-Klünder M et al, 2011; Ngwa EN et al, 2015). A tenor de esta información sería interesante ver la posibilidad que el polimorfismo rs10509954 se encuentre en desequilibrio de ligamiento con el gen TCF7L2 por su proximidad. Serían necesarios estudios adicionales para confirmar esta posible asociación.

Otro de los marcadores de ancestro genético europeo es el polimorfismo rs293553. Es una variante intrónica situada dentro del gen NOL4L (Nucleolar protein 4 like) localizado en la región del cromosoma 20q11.21. La frecuencia del alelo G, menos frecuente, es igual a la obtenida en población europea (0,313). En cambio, en población asiática no existe variabilidad alélica ($G=1,000$) y en población africana el alelo G es el más prevalente (0,741). En los resultados encontramos una asociación del polimorfismo con la concentración de glucosa modulada por la existencia de obesidad. En la población no obesa, los portadores del alelo G presentaban menor concentración de glucosa mientras que en la población obesa esta diferencia se iguala, aunque no se encontraron resultados significativos en el riesgo de obesidad o de DMT2. Varios estudios han mostrado que el gen NOL4L se fusiona con otros dos genes PAX5 and RUNX1 debido a una translocación cromosómica en humanos en personas con leucemia mieloide y leucemia linfoblástica (Guastadisegni MC et al, 2010; Kawamata N et al, 2012). Sin embargo, el gen codifica para una proteína cuya función no es conocida pero sí que se conoce que está muy conservada (Borah S et al, 2016). Debido a la falta de información, no podemos describir el proceso por el que el polimorfismo influye en la concentración de glucosa. Serían necesarios estudios para la caracterización de la función del gen y su función para poder entender su relación con la obesidad o la DMT2.

El polimorfismo rs822759 es una variante intergénica situada en el cromosoma 3. El alelo minoritario presenta la misma prevalencia que la población europea (0,316). En otras poblaciones la frecuencia es mayor, tanto en la asiática (0,611) y africana (0,458). En la población mediterránea estudiada se ha observado la influencia del genotipo del polimorfismo y los niveles de CT y de c-LDL. El genotipo GG presentaba menor concentración de ambos tipos de colesterol que los portadores del alelo T. Como ocurrió con el polimorfismo intergénico anterior, se analizó los genes localizados cerca del polimorfismo debido a la falta de

información del polimorfismo rs822759. A unas 2700 kb del mismo se encuentra el gen UBE2E2. Este gen se expresa en el páncreas, hígado, tejido adiposo y en la línea celular de secreción de insulina (Hicke L, 1999). El gen codifica para una proteína que juega un papel muy importante en la síntesis y secreción de insulina (Kazakova EV et al, 2015; Xu K et al, 2016). Variantes genéticas de este gen alteran la secreción de la insulina, por lo que este gen está asociado con el desarrollo y riesgo de la DMT2 (Hartley T et al, 2009). Se ha demostrado que alteraciones en la secreción de la insulina puede influir en el metabolismo lipídico (Leavens KF and Birnbaum MJ, 2011; Dimitriadis G et al, 2011). Por tanto, sería interesante conocer si el polimorfismo rs822759 y algunos polimorfismos del gen UBE2E2 se encuentran en desequilibrio de ligamiento y la posible relación entre sus funciones.

El polimorfismo rs16891982 del gen SLC45A2 situado en el cromosoma 5p13.2 fue el siguiente polimorfismo estudiado. Tiene 7 exones y codifica para una proteína de 530 aminoácidos y 12 dominios transmembrana. El gen codifica para una proteína transportadora que media en la síntesis de melanina. Variantes en este gen están asociadas con variaciones en el color de piel y de ojos. Se ha visto que sus frecuencias alélicas difieren según el grupo étnico. En nuestra población mediterránea, el alelo minoritario C presentó una frecuencia mayor (0,130) que la hallada en población europea (0,017). En cambio, este polimorfismo no presentó variabilidad alélica, siendo el alelo C el más prevalente en población asiática (0,988) y siendo el único en población africana (1,000). En un estudio de ancestro europeo, el polimorfismo rs16891982 se encontró significativamente asociado con el color de pelo y el color de ojos (Branicki et al, 2008; Andersen JD et al, 2013). En nuestros resultados, los portadores del alelo C presentaban mayores niveles de TG que los homocigotos. No hemos encontrado estudios en la literatura científica donde relacionen el gen con el metabolismo lipídico. Serían necesarios otros estudios para corroborar la existencia de esta relación.

El último marcador de ancestro genético estudiado fue el polimorfismo rs17638989 del gen ZNF564 (Zinc finger protein 564) localizado en el cromosoma 19p13.2. Se conoce que el gen codifica para una proteína de 55 aminoácidos y que está implicada en la regulación transcripcional. La frecuencia del alelo minoritario en nuestra población mediterránea fue similar al encontrado en población europea, siendo esta frecuencia mucho mayor en población asiática (0,925) y africana

(0,689). En nuestro estudio no se encontró ninguna relación entre el polimorfismo y parámetros relacionados con la obesidad o la DMT2.

5.3.4- Polimorfismos relacionados con la obesidad y la DMT2 analizados mediante genotipado de GWAs

5.3.4.1.- Polimorfismos cerca del gen ABS3

Se analizaron las variantes intergénicas rs4671237 y rs11892385 próximas al gen ASB3. Este gen codifica para una proteína SOCS3 relacionada con la señalización de la insulina pudiendo tener un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Howard JK and Flier JS, 2006). No se han encontrado referencias en la literatura científica que examinaran estos polimorfismos. De modo que para poder establecer una mayor comparación entre las frecuencias obtenidas en el presente estudio con las observadas en otras poblaciones se referenciaron las disponibles en la base de datos Hapmap (<http://hapmap.org>). De esta manera, la frecuencia del alelo menor C del polimorfismo rs4671237 (0,343) y del alelo menor A del polimorfismo rs11892385 (0,325) obtenida en población mediterránea fue similar a la indicada en población europea (0,370 y 0,349, respectivamente). En ambos polimorfismos se encontró que la frecuencia del alelo menor era algo inferior en población asiática mientras que en población africana esta frecuencia aumentaba, convirtiéndose en el alelo más frecuente.

Los resultados obtenidos en la población estudiada muestran una asociación de ambos polimorfismos con la concentración de glucosa. Los portadores del alelo menor C del polimorfismo rs4671327 presentan mayor concentración de glucosa plasmática. Lo mismo ocurre con los portadores del alelo menor A del polimorfismo rs11892385, que también muestran mayor concentración. En ambos casos, al segmentar la población por obesidad se observó que esta diferencia se daba en la población obesa. Debido a la cercanía de estos polimorfismos con el gen ASB3, se indagó en la función de este gen.

El papel de las proteínas SOCS codificadas por los genes ABS es de regulación negativa de la señalización de los receptores tirosin-quinasa, como puede ser la señalización de la insulina. Las proteínas SOCS alteran la señalización de la insulina de dos maneras, bien uniéndose a su receptor y/o marcándolo para su degradación (Howard JK and Flier JS, 2006; Li JY et al, 2011). Cuando la insulina se une a su receptor, se inicia una actividad tirosin quinasa intrínseca que fosforila

los residuos de tirosina de la proteína IRS1, activando una cascada de señalización que conducen al transporte de la glucosa al interior de la célula y a la posterior síntesis de glucógeno (Boura-Halfon S and Zock Y, 2009). Concretamente, la proteína SOCS3 codificada por el gen ASB3 se une al receptor de la insulina a través de su dominio central SH2 uniéndose al residuo 960 de tirosina fosforilada, impidiendo la activación de la cascada de señalización e impidiendo la incorporación de la glucosa al interior de la célula (Emanuelli B et al, 2000). Por tanto, los polimorfismos estudiados podrían estar relacionados con el gen ASB3 o influir en su expresión aunque serían necesarios futuros estudios para comprobar esta posible relación o los mecanismos por los cuales estos polimorfismos actúan. También se ha observado que la expresión de la proteína SOCS3 es más elevada en modelos animales obesos y con resistencia a la insulina (Ueki K et al, 2004). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, donde se observaba una diferencia en la concentración de glucosa sólo en los participantes obesos.

Debido a la proximidad de ambos polimorfismos, separados por algo menos de 3 kb, se estudió si se encontraban en desequilibrio de ligamiento. Ambos polimorfismos están en un fuerte desequilibrio de ligamiento. Los individuos portadores de los alelos menores de ambos (Port C/Port A) presentaban mayor concentración de glucosa y mayor riesgo de DMT2, aunque los resultados no llegaron a la significación estadística.

En conclusión, los polimorfismos rs4671327 y rs11892385 muestran una relación con la DMT2, pudiendo estar relacionados con el gen ASB3 próximo a ellos. Serían necesarios estudios adicionales para conocer el funcionamiento de ambos polimorfismos y para confirmar su relación con el gen ASB3.

5.3.4.2.- Polimorfismos del gen CDKN2B

Estudios de genoma completo han permitido identificar nuevas variantes genéticas relacionadas con enfermedades cardiovasculares y con sus factores de riesgo. El gen CDKN2B ha sido identificado como gen candidato relacionado con la DMT2 por estudios de GWAs. El gen CDKN2B es un regulador del ciclo celular y se ha relacionado con el envejecimiento y muchas enfermedades crónicas (Bao XY et al, 2012). Este gen codifica para una proteína denominada p15^{INK4B} que actúa como inhibidora de CDK5 (cyclin-dependent kinase 5) implicada en la regulación del ciclo celular, el envejecimiento, senescencia y apoptosis. Este gen, junto con el gen

CDKN2A se han relacionado con enfermedades cardiovasculares y metabólicas, como la DMT2 (Hannou SA et al, 2015). Nuestro objetivo fue el análisis de los polimorfismos rs1063192 y rs3217986, situados en la región 3'UTR del gen para conocer su posible implicación en el desarrollo de patologías como la obesidad y la DMT2 o parámetros relacionados.

Debido a la escasa información de ambos polimorfismos, se compararon las frecuencias alélicas obtenidas en el estudio con las disponibles en Hapmap. La frecuencia del alelo menor C del polimorfismo rs1063192 en población mediterránea era similar a la encontrada en población europea (0,400), mientras que en población asiática disminuía la frecuencia a la mitad (0,200) (Hu WL et al, 2009). Los datos en población africana mostraban que la frecuencia del alelo menor C disminuía drásticamente (0,008). En el caso del polimorfismo rs3217986, las frecuencia del alelo C también coincidían con las encontradas en población europea (0,100). En población asiática, la frecuencia alélica fue similar mientras que en población africana no existe variabilidad, encontrándose sólo el genotipo AA.

El primer polimorfismo estudiado fue rs1063192. En el primer análisis no mostró ninguna asociación con parámetros antropométricos o bioquímicos relacionados con la obesidad y la DMT2. Al segmentar la población por la presencia de DMT2, se observó que los individuos diabéticos mostraban diferencias en la concentración de glucosa en función del genotipo donde los individuos TT tenían mayor concentración que los portadores del alelo C. Diversas variantes génicas del gen CDKN2B se han asociado previamente con la DMT2 (Nemr R et al, 2011; Bao XY et al, 2012; Peng F et al, 2013; Horswekk SD et al, 2013; Wei F et al, 2015; Kong Y et al, 2016). Estudios en modelos animales han mostrado que la inhibición de CDK5 por parte de la proteína p15^{INK4B} codificada por el gen CDKN2B puede afectar a la masa celular pancreática. CDK5 tiene un papel importante en la función y regeneración de las células β . Una sobreexpresión del gen CDKN2B puede reducir la proliferación de los islotes pancreáticos conduciendo al desarrollo de la DMT2 en modelos animales (Bao XY et al, 2012). Polimorfismos cerca del gen CDKN2B se han asociado con una alteración de la secreción de la insulina inducida por la glucosa (Grarup N et al, 2007). Por tanto, la relación del gen CDKN2B con el desarrollo de DMT2 puede ser debida a una reducción de la capacidad secretora de insulina o por una reducción de la masa de células β (Kong Y et al, 2016). El polimorfismo rs1063192 de la región 3'UTR se ha asociado

previamente a otras enfermedades como glaucoma de ángulo abierto o diferentes tipos de cáncer. Un estudio reciente ha mostrado que este polimorfismo se encuentra en un sitio de unión de miR. Los miR son partículas de RNA no codificante de unos 20 nucleótidos que regulan la expresión post-transcripcional uniéndose a las regiones 3'UTR. En este estudio se vio que la expresión del polimorfismo rs1063192 estaba regulada por un miR y contribuía al desarrollo de la diabetes mellitus gestacional (Wang X et al, 2015). Por tanto, la expresión del polimorfismo podría estar regulada por miRs e influye en la secreción de la insulina o en la proliferación de células β . Estudios adicionales serían necesarios para conocer el mecanismo concreto por el ocurre esta asociación.

Al analizar si los diferentes factores de estilo de vida podrían influir en este polimorfismo, se encontró una asociación significativa con la actividad física. Los resultados mostraron que los individuos sedentarios homocigotos TT presentaban mayor concentración de glucosa mientras que los individuos TT no sedentarios tenían concentraciones similares que los portadores del alelo C. Como estos resultados eran similares a los encontrados inicialmente en los individuos diabéticos, se analizó estos dos parámetros conjuntamente. Se encontró que los individuos diabéticos, sedentarios con genotipo TT presentaban mayores concentraciones de glucosa, sin encontrar diferencias en el resto de grupos.

Diversos estudios han mostrado que una inactividad física puede conducir al desarrollo de resistencia a la insulina, conduciendo a un desarrollo de la DMT2. Una actividad física de moderada a vigorosa puede producir mejoras metabólicas aumentando el gasto energético y aumentando las vías de señalización de la insulina en el músculo (Duvivier BM et al, 2013). Varios grupos de investigación han mostrado que un ejercicio regular puede prevenir la DMT2 (Hawley JA and Gibala MJ, 2012) recomendando al menos 150 minutos/día de actividad de moderada a vigorosa (OMS, 2011). Por tanto, los resultados muestran que el efecto negativo del genotipo TT sobre la concentración de glucosa plasmática puede estar modulado por la realización de actividad física.

A continuación se estudió el polimorfismo rs3217986, situado a menos de 2 kb de distancia del polimorfismo rs1063192. El análisis inicial mostró una relación del polimorfismo con el metabolismo lipídico. Los portadores del alelo menor C presentaban mayor concentración de c-HDL que los homocigotos TT. El gen CDKN2B se expresa altamente en el tejido adiposo subcutáneo y puede inhibir la

capacidad de expansión de este tejido que es un punto crítico en la protección contra la lipotoxicidad, lo que podría contribuir a la alteración del metabolismo lipídico y desarrollo de la obesidad (Horswell SD et al, 2013; Hannou SA et al, 2015; Kong Y et al, 2016). Esta lipotoxicidad provoca un aumento de la liberación excesiva de ácidos grasos debido a que sobrepasa el límite de su almacenamiento redirigiéndolos a otras vías metabólicas no oxidativas que puede producir el aumento de la síntesis de TG y una reducción en los niveles de c-HDL (Schaffer, JE, 2003; Martínez-Sámano J et al, 2013). En nuestros resultados sólo se muestra la diferencia de concentración de c-HDL sin encontrar diferencias en los valores de los TG. Al analizar esta relación en función de la DMT2 se observó que las diferencias seguían existiendo pero sólo en los individuos no diabéticos, donde los portadores del alelo C tenían mayor concentración. Los participantes diabéticos presentaban menor concentración de c-HDL pero sin presentar diferencias en función del genotipo del polimorfismo. La DMT2 se caracteriza por una dislipemia aterogénica donde se acumula c-LDL, aumenta el nivel de TG y disminuye la concentración de c-HDL, además de ser un estado de inflamación y estrés oxidativo (Awad F et al, 2015). La DMT2 se caracteriza por una resistencia a la insulina y un aumento de los ácidos grasos libres lo que contribuye al descenso de los niveles de c-HDL (Wollenweider P et al, 2015), lo que podría explicar que en nuestros resultados la diferencia de concentración de c-HDL en función del genotipo sólo se muestra en los individuos no diabéticos mientras que en los diabéticos tienen menor c-HDL independientemente del genotipo.

Por último, se calculó el desequilibrio de ligamiento entre ambos polimorfismos, mostrando que estaban en desequilibrio. Se agruparon los homocigotos más prevalentes de ambos polimorfismos frente a los portadores de los alelos menos prevalentes y los resultados mostraron una relación con el c-HDL, sin encontrar diferencias en los niveles de glucosa. Los portadores de los alelos menores presentaban mayor concentración de c-HDL, manteniéndose estas diferencias sólo en los individuos no diabéticos. Estos resultados son similares a los encontrados en el polimorfismo rs3217986.

En conclusión, los resultados en una población mediterránea de avanzada edad han mostrado que el polimorfismo rs1063192 puede ser un buen locus candidato relacionado con la DMT2 y que su influencia sobre la concentración de glucosa puede estar modulada por la actividad física. Futuros estudios serían necesarios para confirmar esta modulación de los efectos de este polimorfismo sobre la DMT2

y la concentración de glucosa según la realización de actividad física. Los portadores del alelo C del polimorfismo rs3217986 muestran asociación con parámetros lipídicos, observándose estas asociaciones tanto en población general como en individuos no diabéticos. Además, el haplotipo formado por ambos polimorfismos también se asoció a la concentración de c-HDL. Serían interesantes estudios que confirmaran estas asociaciones.

5.3.4.3.- Polimorfismos cerca del gen DMRTA1

El gen DMRTA1 se ha asociado recientemente con la DMT2 a través de estudios de GWAs. Es escasa la información que se conoce sobre el gen y los mecanismos en los que está implicado. Los polimorfismos estudiados, rs655497 y rs693370, están situados aproximadamente a 20 kb en dirección 5' del gen.

Debida a la escasa información de ambos polimorfismos, comparamos las frecuencias alélicas obtenidas con la información disponible en la base de datos Hapmap. La frecuencia del alelo menor G en nuestra población mediterránea fue similar a la encontrada en población europea. Al comprobar los datos de diversas poblaciones, no existen grandes diferencias en las frecuencias en población europea (0,321), asiática (0,267) o africana (0,296). En el caso del polimorfismo rs693370, la frecuencia del alelo A fue similar a la encontrada en población europea, siendo un poco inferior en población asiática y un poco mayor en población africana.

Los resultados conseguidos del polimorfismo rs655497 mostraron una relación con parámetros antropométricos. Los individuos homocigotos AA presentaban mayor peso e IMC que los portadores del alelo G. Al ver estos resultados se calculó el riesgo de obesidad en función del genotipo encontrando que el genotipo AA confería mayor riesgo de desarrollo de la obesidad. La limitada bibliografía encontrada sobre el gen DMRTA1 ha descrito su función en el desarrollo neuronal debido a que codifica para un factor de transcripción que regula la cascada transcripcional Pax6-Neurog2 (Kikkawa T et al, 2013). Variantes genéticas del gen, el polimorfismo rs1575972, se han asociado con la DMT2 al ver su asociación con un descenso de la insulina plasmática (Imamura M et al, 2016).

Se ha sugerido que el mecanismo que enlaza el gen y la DMT2 podría ser el desarrollo de las células β , debido a que DMRTA1 regula los reguladores transcripcionales Pax6-Neurog3 que, a su vez, regulan la diferenciación de las células endocrinas pancreáticas (Wilson ME et al, 2003). En cambio, nuestros resultados no muestran una relación directa con la DMT2 ni con parámetros relacionados, si no una relación con la obesidad. En el caso de otros genes, con el gen FTO, se ha observado que el gen predispone a la DMT2 a través de su efecto sobre el IMC (Frayling TM et al, 2007), aunque en nuestros resultados no muestran un mayor riesgo de DMT asociado al polimorfismo. Serían necesarios estudios adicionales para confirmar y conocer el mecanismo por el cual este polimorfismo se relaciona con la obesidad y para intentar conocer si hay una posible relación con la DMT2.

Debido a que en el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas se encontraron diferencias entre hombres y mujeres, se realizaron los mismos análisis segmentando la población en función del sexo. La frecuencia del genotipo AA fue más frecuente en mujeres que en hombres. En cambio, el mayor riesgo de obesidad del genotipo AA se mantuvo significativo sólo en hombres. No se encontraron diferencias en el análisis con parámetros antropométricos y bioquímicos en función del sexo. Estudios previos han mostrado diferencias entre hombres y mujeres en parámetros como la prevalencia de la disglucemia, la distribución de la grasa corporal, la función y tamaño de los adipocitos y la regulación hormonal del peso corporal (Pradhan AD, 2014). No encontramos estas diferencias en función del sexo en todos estos parámetros, pero si una diferencia en el riesgo de obesidad. Esto podría ser debido al alto porcentaje de mujeres obesas en la muestra de estudio.

El polimorfismo rs693370 no mostró ningún resultado significativo en esta población. No se encontraron asociaciones con parámetros antropométricos ni bioquímicos en la población general, ni en función de la obesidad, la DMT2 o el sexo. Tampoco se encontraron diferencias en el riesgo de obesidad o DMT2.

A continuación se comprobó que ambos polimorfismos se encontraban en desequilibrio de ligamiento. Posteriormente se agrupó los homocigotos más frecuentes del haplotipo (GG/AA) frente a los portadores del alelo menor (Port A/Port G). Continuando con los resultados ya comentados, se encontró un mayor riesgo de desarrollar la obesidad en los individuos GG/AA.

En conclusión, inicialmente los polimorfismos rs655497 y rs693370 localizados próximos al gen DMRTA1 no se asociaron con parámetros relacionados con la DMT2 como se había descrito en estudios anteriores relacionados con el gen DMRTA1. En cambio, el polimorfismo rs655497 se asoció con parámetros antropométricos como el peso y el IMC, así como con mayor riesgo de obesidad. Además, el haplotipo GG/AA de ambos polimorfismos también presentaba mayor riesgo de obesidad. Por tanto, ambos polimorfismos podrían ser nuevas dianas genéticas relacionadas con la obesidad, aunque serían necesarios estudios adicionales para confirmar la relación entre estos polimorfismos y la obesidad así como su relación con la DMT2 y si estas asociaciones están vinculadas. También hay que tener en cuenta que la población estudiada tenía alto riesgo cardiovascular con diversos fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular por lo que es importante replicar estos estudios en otras poblaciones para ver la relación entre estas variantes y los distintos factores asociados en este estudio.

5.3.4.4.- Polimorfismo rs961090 del gen INAFM2

Este gen es otro de los genes que recientemente se ha asociado como posible loci relacionado con la DMT2. El polimorfismo rs961090 se localiza en la región 3'UTR del gen INAFM2.

Al analizar la frecuencia del alelo menos frecuente C (0,253) fue ligeramente superior a la encontrada en otros estudios en población caucásica (0,115), según la información disponible en la base de datos Hapmap. Se vio una gran variabilidad en otras poblaciones como la asiática, donde el alelo C era el alelo más frecuente (0,803). En los análisis iniciales, no se encontró ninguna asociación significativa entre el polimorfismo rs961070. La función del gen INAFM2 sigue siendo desconocida pero variantes génicas del gen se han asociado a la DMT2 aunque la significación de esta asociación difiere en función de la población estudiada (Imamura M et al, 2016). Estas observaciones no se han podido replicar en la población estudiada de alto riesgo cardiovascular.

Las regiones 3'UTR (3'-untranslated regions) tienen un papel fundamental en el control de la expresión de los genes ya que contienen secuencias diana donde se unen moléculas implicadas en la regulación transcripción del gen, como pueden ser los miRs (Mazumder B et al, 2003; Sethupathy P et al, 2007; Yang L et al, 2012;

Vislovukh A et al, 2014). Las interacciones gen*ambiente pueden regular los niveles de miR, por lo que estarían implicadas en la regulación de la expresión del gen (Sethupathy P and Collins FS, 2008). El polimorfismo rs961090 está situado en la región 3'UTR del gen INAFM2, por lo que se analizaron los distintos factores ambientales que pudieran influir en el polimorfismo. Se encontró una interacción entre el polimorfismo y la actividad física que influía en la concentración de glucosa (p interacción 0,005). Los individuos con genotipo TT que eran sedentarios presentaban mayor concentración de glucosa que los portadores del alelo C, sin encontrar estas diferencias en la población no sedentaria.

Existe una gran evidencia científica que demuestra la influencia de la actividad física con el desarrollo o riesgo de DMT2 (Temelkova-Kurktschiev T and Stefanov T, 2012; Cornelis MC and Hu FB, 2012; Franks PW et al, 2013). Numerosos estudios en modelos animales han mostrado que la realización de actividad física, incluso con intensidad moderada, influye de manera positiva en factores relacionados con la sensibilidad a la insulina, como son la mejora de la sensibilidad a la hormona, favorece la asimilación de la glucosa por el músculo, mejora el perfil lipídico al reducir el ratio CT/c-HDL y reduce el perímetro de cintura (Novials A, 2010). En individuos diabéticos, la preinscripción de un entrenamiento estructurado logra beneficios en el control glucémico, siendo una de las partes del tratamiento de la enfermedad (Quílez Llopiz P and Reig García-Galbis M, 2015). En los resultados obtenidos en el polimorfismo rs961090 han mostrado que la inactividad física influye en la mayor concentración de glucosa en función del genotipo, aunque los resultados obtenidos inicialmente no mostraron asociación del polimorfismo con la DMT2 o parámetros relacionados.

En conclusión, en población mediterránea de alto riesgo cardiovascular no se ha podido demostrar la relación entre el polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 con la obesidad o la DMT2, aunque sí que se mostró una relación entre el genotipo del polimorfismo con la concentración de glucosa modulada por la realización de la actividad física. Serían necesarios estudios adicionales para poder confirmar esta interacción y para intentar conocer una posible influencia de esta interacción sobre la obesidad o la DMT2.

5.3.4.5.- Polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B

La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal, que se encuentra en la línea media del cerebro, además de por otros tejidos periféricos y está implicada en los mecanismos de homeostasis del cuerpo (Lyssenko V et al, 2009; Mulder H et al, 2009; Grotenfelt NE et al, 2016; Ollila HM et al, 2016). Su expresión está regulada circadianamente por la luz desde la retina a la glándula pineal, siendo sus niveles elevados durante la noche y disminuyendo a la luz del día (Lyssenko V et al, 2009; Andersson EA et al, 2010; Lane JM et al, 2016; Ollila HM et al, 2016). La función de la hormona es la regulación del sueño y la homeostasis de la glucosa (Marcheva B et al, 2013; Grotenfelt NE et al, 2016). El hecho de que la secreción de insulina esté controlada por mecanismos circadianos está respaldado por estudios en humanos (Mulder H et al, 2009; Lane JM et al, 2016). Conjuntamente, existen indicios de que la secreción diurna de la melatonina se altera en la diabetes, sobre todo cuando la neuropatía es evidente (Picinato MC et al, 2002; Lyssenko V et al, 2009).

En el presente estudio se analizó el estudio del polimorfismo rs10830963, variante intrónica del gen MTNR1B que codifica para una de las dos isoformas del receptor de la melatonina. La frecuencia alélica del alelo menor G encontrada en la población estudiada (0,292) fue similar a la encontrada en otros estudios realizados en población europea (0,320) (Lyssenko V et al, 2009; Grotenfelt NE et al, 2016; Ollila HM et al, 2016) y población americana (Liu C et al, 2010). En cambio, en población asiática se observó que la prevalencia del alelo G era algo mayor (0,420) que la hallada en las otras poblaciones (Liu C et al, 2010; Ling Y et al, 2011).

Numerosos estudios han asociado el polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B con niveles de glucosa plasmática elevada, disminución de la secreción de la insulina así como una disminución de la sensibilidad a la insulina, además el alelo G estaba relacionado con un mayor riesgo de obesidad (Mulder H et al, 2009; Bouatia-Naji N et al, 2009; Lyssenko V et al, 2009; Andersson EA et al, 2010; Tare A et al, 2014; Grotenfelt NE et al, 2016; Ollila M et al, 2016). El efecto del polimorfismo es menor en población asiática (Liu C et al, 2010; Been LF et al, 2012). Los análisis iniciales no mostraron ninguna asociación con la DMT2 o parámetros relacionados en la población estudiada. Esto podría ser debido a las características de la población, ya que se trata de una población de edad avanzada y alto riesgo cardiovascular cuyas características pueden influir en esta asociación.

En cambio, al realizar nos mismos análisis en función de la existencia de obesidad, si encontramos una relación entre la concentración de glucosa y el polimorfismo rs10830963. En los individuos obesos, los portadores del alelo G presentaban mayor concentración de glucosa que los homocigotos CC. En cambio, no se observaron diferencias en los individuos no obesos. Por tanto, los resultados muestran el alelo G como el alelo de riesgo, hecho que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en diversos estudios, aunque sólo se observó en presencia de obesidad. Estudios en otras variantes génicas del gen MTNR1B mostraron que el riesgo de DMT2 podría estar modulado por la obesidad. Been y colaboradores mostraron que el alelo T del polimorfismo rs174645 se asociaba a menor concentración de glucosa en ausencia de obesidad en población india (Been LF et al, 2012). Este hecho también se ha observado en otras variantes genéticas de genes implicados en la secreción de la insulina, como los genes GCK, HNF1A y SLC30A8, los cuales se asociaban con riesgo de DMT2 sólo en individuos no obesos (Cauchi S et al, 2008c). Hay que indicar que nuestros resultados muestran una relación con la DMT2 en presencia de obesidad, detectándose el efecto del polimorfismo sobre la glucosa sólo en obesos. Un estudio en jóvenes obesos mostró también relación entre el polimorfismo rs10830963 y un aumento en la concentración de glucosa, resultado similar al obtenido en nuestra población de edad avanzada (Zheng C et al, 2015). Otras variantes genéticas se han relacionado con parámetros relacionados con obesidad como el IMC (Andersson AE et al, 2010). El gen MTNR1B puede regular de forma circadiana directamente los niveles de glucosa y la secreción de insulina (Van Cauter E, 1998). Es bien conocida la relación entre la obesidad y la DMT2. Uno de los mecanismos propuestos como el nexo de unión entre ambas patologías es la presencia de inflamación crónica que produce una alteración de los componentes del sistema inmune que, a su vez, conduce a desarrollar una mayor resistencia a la insulina, uno de los factores característicos del desarrollo de DMT2 (Donath MY and Shoelson SE, 2011).

Por tanto, los resultados obtenidos podrían sugerir que el polimorfismo rs10830963 podría influir en la secreción de la insulina o a la respuesta a la misma mediada por la obesidad en población de alto riesgo cardiovascular. Aunque serían necesarios nuevos estudios que confirmaran esta relación, ya que la interacción entre la obesidad y el polimorfismo se quedó en el límite de la significación (p interacción=0,071).

El polimorfismo rs10830963 se ha relacionado con riesgo de DMT2 en diversos estudios (Garaulet M et al, 2015; Salman M et al, 2015). El cálculo del riesgo de DMT2 en nuestros resultados mostró que los portadores del alelo G presentaban mayor riesgo de desarrollar la patología, aunque los resultados se mantuvieron en el límite de la significación. Por tanto, estos resultados no fueron concluyentes. Lyssenko y colaboradores, en su estudio realizado en población del norte de Europa obtuvo una asociación entre los niveles de glucosa y el alelo G. En cambio, el riesgo de DMT2 obtenido fue muy modesto (Lyssenko V et al, 2009).

En conclusión, el alelo G del polimorfismo rs1080963 del gen MTNR1B se asoció con mayores niveles de glucosa en individuos obesos. También se observó que el mismo alelo confería mayor riesgo de DMT2 sin llegar a alcanzar la significación. Serían necesarios estudios para confirmar la relación del polimorfismo con la DMT2 y para conocer su posible modulación por obesidad.

5.4.- Estudio de las interacciones gen*gen

En este apartado se presenta la discusión entre el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C y el polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 sobre la concentración de TG en la población estudiada.

Ambos genes pertenecen al sistema circadiano. Como se ha comentado anteriormente, este sistema controla los estados de sueño y vigilia organizando los procesos biológicos en 24 horas sincronizando la ingesta y el gasto de energía (Turek FW et al, 2005). Este sistema influye en diferentes procesos como el metabolismo de la glucosa, el metabolismo lipídico, la temperatura corporal, la secreción de hormonas endocrinas y en la actividad cardiovascular (Marcheva B et al, 2013; Takeda N and Maemura K, 2015; Valenzuela FJ et al, 2016). La proteína que codifica el gen CLOCK C dimeriza con otro de los componentes principales del sistema circadiano como es BMAL1 para realizar su actividad (Micó V et al, 2016). El gen NR1D1 tiene un papel muy importante en la regulación de los ritmos circadianos, regula la inflamación, el metabolismo de la glucosa, la capacidad oxidativa del músculo esquelético y la adipogénesis (Kumar N et al, 2010; Ruano EG et al, 2014). El gen está considerado un receptor nuclear que regula la transcripción de uno de los genes centrales del ciclo circadiano, el gen BMAL1 (Gimble JM and Floyd ZE, 2009). Por tanto, el gen NR1D1 podría participar en la

regulación de la acción del gen CLOCK C. Estudios previos han mostrado que ambos genes regulan de forma circadiana el metabolismo lipídico (Bass J and Takahashi JS, 2010).

Los resultados obtenidos individualmente en ambos polimorfismos mostraron una relación con la concentración de TG. En el caso del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK, el alelo G presentaba menores concentraciones de TG en individuos obesos. En el caso del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 también se vio una relación entre esta variante genética y el nivel de TG donde los portadores del alelo T presentaban menos concentración, diferencia que se mantenía en individuos obesos. Por todo ello se procedió al estudio de una posible interacción entre ambos polimorfismos.

En el estudio conjunto de las variantes de ambos genes, el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK y el polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 mostraron una interacción significativa sobre los niveles de TG plasmáticos (p interacción=0,031). Se observó que los portadores de los alelos minoritarios de ambas variantes (G y T, respectivamente) presentaban menores niveles de TG, mientras que en el resto de genotipos los niveles de TG eran similares. En el caso del gen CLOCK, el alelo menor G del polimorfismo rs4580704 se asocia con un descenso de la producción de las lipoproteínas que transportan a los TG o una degradación más rápida (Garault M et al, 2009).

El sistema circadiano se ha visto asociado al metabolismo lipídico a través de la regulación de la expresión y/o actividad de algunas enzimas metabólicas y sistemas de transporte que participan en metabolismo de los ácidos grasos (Garault M et al, 2009). Mutaciones en el gen CLOCK se relacionan con modificaciones en el ciclo circadiano que producen variaciones en los niveles de glucosa y TG (Rudic RD et al, 2004). Como hemos indicado anteriormente, la proteína codificada por el gen CLOCK actúa formando un heterodímero con la proteína BMAL1. Este heterodímero se unen a los promotores de otros genes del ciclo circadiano como son PERIOD (PER) y CRYPTOCHROME (CRY). Esta unión provoca un aumento de la transcripción de estos genes. Las proteínas PER y CRY también forman un heterodímero que, a su vez, inhibe la actividad CLOCK/BMAL1 reduciendo la expresión de los genes PER y CRY. Todo ello forma un bucle de retroalimentación responsable de la regulación del ritmo circadiano. Existen dos receptores encargados de modular la actividad de este bucle regulador y que se expresan con

patrones circadianos. Inicialmente se vio que actuaban regulando directamente la expresión de BMAL1. Uno de estos receptores es REV-ERB α , codificado por el gen NR1D1, que se unen al promotor del gen BMAL1 reprimiendo su transcripción (Guillaumond F et al, 2005; Yin L and Lazar MA, 2005). Un estudio más reciente realizado por Crumbley y Burris ha demostrado una regulación directa de la expresión del gen CLOCK por REV-ERB α añadiendo mayor complejidad a la regulación del ritmo circadiano (Crumbley C and Burris TP, 2011). Estos resultados indican como las variantes de un gen pueden afectar a la funcionalidad de la proteína que codifica con el consecuente efecto sobre la cascada metabólica en la que está implicado.

5.5.- Estudio epigenético de genes relacionados con obesidad y DMT2

Dentro de los marcadores epigenéticos, la metilación del ADN es uno de los factores con gran auge en los últimos años. La primera vez que se describió fue en 1981, donde se observó que tenía un papel como regulador transcripcional (Compere SJ and Palmiter RD, 1981). La metilación del ADN es una modificación postranscripcional dentro del genoma que ocurre en los residuos de citosina. Este mecanismo puede producir cambios en el estado funcional de las regiones regulatorias, asociándose mayoritariamente al silenciamiento transcripcional. Estudios previos de este proceso han mostrado que los patrones de metilación pueden cambiar durante el desarrollo y la enfermedad (Schubeler D, 2015). Concretamente, la metilación del ADN es importante para el silenciamiento de genes, la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento de los retrotransposones. También es un proceso crítico para la diferenciación celular mediante el silenciamiento de la expresión de genes específicos durante el desarrollo y la diferenciación de tejidos. Sin embargo, una metilación aberrante se relaciona con la enfermedad (Li E et al, 1993; Daniels T et al, 1997; Waterland RA and Jirtle RL, 2003).

La metilación ocurre típicamente en los dinucleótidos citosina-guanina (CpG), donde la p indica la intervención del grupo fosfato. La unión del grupo metilo se produce en la posición 5' de una citosina por la acción de una familia enzimática de metiltransferasas (DNMT) para formar 5-metilcitosina (5mC). Las DNMT utilizan S-adenosil metionina como donador del grupo metilo para metilar el cabono en la posición 5 de los residuos de citosina del dinucleótido CpG (de Mello

VD et al, 2013). El grupo metilo suplementario para la metilación es determinado por dos factores, la ingesta y la utilización de grupo metilo. Los mayores donadores de grupo metilo que provienen de la dieta son metionina, colina, betaína y S-adenosil metionina. Y los factores dietéticos que influyen en la disponibilidad de esta última incluyen el folato, la vitamina B12, la vitamina B6 y la vitamina B2 (Ross SA, 2003; Stead LM et al 2006).

La obesidad es una enfermedad poligénica en la que diferentes variaciones genéticas, junto con la interacción con factores ambientales, dan lugar al aumento del peso. Con los recientes avances en las técnicas moleculares se ha podido observar que la regulación epigenética de la expresión genética es un factor que contribuye a la herencia de la obesidad (Campión J et al, 2009). Los principales mecanismos de modificación epigenética son la modificación de histonas, los miR y la metilación del ADN. Actualmente existe un gran auge en las investigaciones de estos tres mecanismos y su relación con el aumento de riesgo de obesidad (Godfrey M et al, 2011; Rönn et al, 2013). La DMT2 es una enfermedad heterogénea con un fuerte componente genético y herencia familiar donde la interacción de estos factores genéticos con factores ambientales induce la resistencia a la insulina y la deficiencia de insulina (Brunetti A et al, 2014). Sin embargo, los loci identificados asociados a DMT2 sólo explican menos del 15% de la herencia de la enfermedad (Groop L and Pociot F, 2013). Recientemente se ha observado que las regulaciones epigenéticas pueden tener un papel importante en la progresión de la enfermedad a través de la inducción de glucotoxicidad en los islotes pancreáticos y predisponiendo a complicaciones diabéticas (Kato M and Natarajan R, 2014). La metilación del ADN se ha relacionado con el riesgo de enfermedad (Kong et al, 2009) ya que puede afectar a la función de los genes. La metilación en las regiones promotoras se asocian con una regulación de su transcripción mientras que la metilación en otras regiones del gen modifican promotores alternativos y los eventos de *splicing* (Ma Y and Ordovas JM, 2016).

Para el estudio realizado se seleccionaron regiones que cubrían dos polimorfismo de interés en el estudio, uno relacionado con obesidad y otro con DMT2. El polimorfismo rs9939609 del gen FTO fue el primer polimorfismo seleccionado. Dentro de los genes relacionados con el desarrollo de la obesidad, el gen FTO (Fat Mass and Obesity) es el gen más ampliamente relacionado con el fenotipo de obesidad. Está situado en el primer intrón del gen (Frayling TM et al, 2007) y el alelo menor del polimorfismo se asocia con mayor riesgo de obesidad, mostrando

a su vez una fuerte influencia sobre el IMC (Hinney A et al, 2007; Li H et al, 2012; Marcadenti A et al, 2013). Diversos estudios en diferentes variantes del gen han mostrado que existe una diferencia en los patrones de metilación de los alelos de riesgo, pudiendo afectar y/o reducir la eficiencia de la expresión del gen (Bell CG et al, 2010; Almén MS et al, 2012).

El segundo polimorfismo seleccionado fue el rs7903146 (C>T) del gen TCF7L2. Este gen, situado en el cromosoma 10q25, está ampliamente asociado con mayor riesgo de DMT2 (Grant SF et al, 2006; Peng S et al, 2013; Jia HY et al, 2016). Se ha observado que el alelo menor T del polimorfismo rs7903146 (C>T) está ampliamente asociado con mayor riesgo de DMT2 (Cauchi S et al, 2007; Liu XH et al, 2015). Se ha observado que este polimorfismo se asocia con el efecto sobre la capacidad de secreción de insulina por parte de las células β (Saxena R et al, 2006, Florez JC et al, 2006). Recientemente, se ha sugerido que cambios epigenéticos pueden tener un efecto importante en el gen ya que se ha visto que existe un patrón de metilación diferente en individuos diabéticos y no diabéticos (Canivell S et al, 2014). Un estudio reciente observó que, mientras que el promotor del gen TCF7L2 está hipermetilado, la expresión del ARNm aumentaba y, sorprendentemente, la expresión de la proteína disminuía en las células β (Hu Y et al, 2014).

En el presente estudio se realizó un estudio epigenético en una submuestra de 195 participantes del estudio (50% hombre y 50% mujeres), teniendo en cuenta diversos factores como el grupo de intervención, el genotipo de los polimorfismo de interés, así como la obesidad y la DMT2 para que todas estas variables estuvieran presentes de forma equitativa para evitar sesgos.

Inicialmente se analizó si había diferencias de metilación entre individuos obesos y no obesos y entre individuos diabéticos y no diabéticos en las diferentes islas CpG de los amplicones analizados a nivel basal. En el caso de la obesidad, se encontraron diferencias de porcentaje de metilación en el amplicón del gen TCF7L2. En la isla CpG 3 del amplicón A, los individuos obesos presentaban menor porcentaje de metilación. En la isla CpG 1, ocurría lo mismo que en el caso anterior, donde los individuos obesos también presentaban menor metilación. En cambio, en la isla CpG 2 del amplicón B, los individuos obesos mostraban mayor metilación. Varios estudios han mostrado regiones genómicas donde los niveles de metilación son diferentes en individuos obesos (Milagro FI et al, 2011; Almen MS et al, 2012). Aunque el polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 se ha asociado

con riesgo de DMT2, diversos estudios han sugerido la posibilidad de la modulación de esta asociación por obesidad debido a que la asociación entre la prevalencia del polimorfismo y el riesgo de DMT2 es más fuerte en individuos no obesos. Este resultado se ha observado en diferentes poblaciones (Cauchi S et al, 2008c; Bouhaha R et al, 2010; Kalnina I et al, 2012; Corella D et al, 2016b). Por tanto nuestros resultados muestran diferencias de metilación en tres islas CpG del gen TCF7L2 en función de la obesidad.

En el caso de la DMT2, también se encontraron diferencias en el porcentaje de metilación en alguna de las regiones relacionadas con el gen FTO. En la isla CpG 9-10 del amplicón A, los individuos diabéticos mostraron mayor porcentaje de metilación que los no diabéticos. Además, en la isla CpG 6 del amplicón B se observó el mismo resultado, quedándose esta diferencia al límite de la significación. Existen diferentes estudios en la literatura científica que mostraron diferencias de metilación en genes candidatos relacionados con la DMT2 (Toperoff G et al, 2012; Canivell S et al, 2014). Dayeh y colaboradores identificaron 17 genes candidatos de DMT2 con diferencias en la metilación, varios de los cuales afectaban a la función de los islotes pancreáticos y a la secreción de la insulina (Dayeh T et al, 2014). Diversas variantes genéticas del gen FTO han mostrado diferencias en los patrones de metilación que pueden afectar a la expresión del gen (Bell CG et al, 2010; Almén MS et al, 2012; Toperoff G et al, 2012; Elliott HR et al, 2013). Otros trabajos en el polimorfismo rs9939609 del gen FTO han detectado diferencias de metilación en función de las diferencias étnicas y geográficas que podrían explicar las variaciones de la incidencia de la DMT2 (Elliott HR et al, 2013).

Ejemplos en la bibliografía mostraron diferencias en la metilación entre individuos diabéticos y no diabéticos en el gen TCF7L2 (Canivell S et al, 2014) y entre individuos obesos y no obesos en el gen FTO (Almén MS et al, 2014). En el gen FTO se han identificado al menos 20 regiones que están metiladas de manera diferentes en individuos obesos (Almén MS et al, 2012). No hemos encontrado estas diferencias en la población estudiada. Esto podría ser debido a que las regiones estudiadas dentro del gen fueron diferentes o a las características de la población de estudio. Con la edad, los niveles de metilación global del genoma van disminuyendo, lo que conduce a una hipometilación global (Almén MS et al, 2014). Nuestra población de estudio tenía edad avanzada mientras que el estudio llevado a cabo por Almén y colaboradores (2012) se realizó en preadolescentes.

A continuación se analizó las diferencias de metilación en función del genotipo de cada polimorfismo a nivel basal. Los portadores del alelo A, considerado el alelo de riesgo, del polimorfismo rs9939609 del gen FTO mostraron menor metilación que el resto de genotipos en la isla CpG 8 del amplicón A. No se encontraron referencias en la literatura científica de la metilación concreta de este polimorfismo pero sí de otras variantes situadas en el mismo intrón. Estas variantes del gen situadas también en el intrón 1 han mostrado resultados diferentes al obtenido en el presente estudio. El polimorfismo rs1121980 del gen FTO mostró que los portadores del alelo de riesgo A estaban significativamente hipermetilados que los portadores del alelo G (Toperoff G et al, 2012). El polimorfismo rs8050136 del gen también presentaba mayor metilación en los portadores del alelo de riesgo A (Bell CG et al, 2010). Por lo que son necesarios futuros estudios que analicen estas variaciones en el nivel de metilación según el genotipo.

Los portadores del alelo T, considerado el alelo de riesgo, del polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 presentaban mayor metilación que el genotipo CC en la isla CpG del amplicón B. Canivell y colaboradores hallaron que cuando el promotor del gen TCF7L2 estaba hipermetilado, la expresión mARNs se incrementa e, inesperadamente, la expresión de la proteína disminuía en las células β , lo que coincidía con los resultados de otros estudios (Canivell S et al, 2014; Hu Y et al, 2014). Dayeh y colaboradores realizaron un estudio de metilación de genoma completo para identificar genes que pudieran influir en la secreción de la insulina (Dayeh T et al, 2014). Analizaron alrededor de 480000 islas CpG e identificaron 44 regiones en 17 genes candidatos relacionados con la DMT2. De ello, 10 de los genes mostraban diferencias de metilación muy significativas entre los participantes diabéticos y no diabéticos. Uno de esos 10 genes fue el TCF7L2, aunque las cuatro regiones estudiadas no coinciden con las seleccionadas para nuestro estudio. Por tanto, hemos detectado una asociación entre el polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 y la metilación en una isla CpG aunque serían necesarios estudios adicionales para explicar dicha asociación.

La metilación del ADN es considerada un mecanismo regulatorio de la transcripción génica y es esencial para la diferenciación celular así como la diferenciación y la integridad tisular. (Almén MS et al, 2014). La evidencia científica ha mostrado que se producen cambios en la metilación en respuesta a diferentes factores ambientales. Estudios en gemelos homocigotos sugirieron el papel potencial de los factores ambientales en la regulación de la metilación del ADN (Fraga MF et al, 2005; Ma Y and Ordovas JM, 2016). Factores como la dieta

o la ingesta de nutrientes afecta al estado de metilación así como la inflamación, el estrés oxidativo y la hipoxia (Campion J et al, 2009). El posible papel de la dieta en la modificación de los mecanismos epigenéticos ha sido estudiado en numerosos estudios (Alegría-Torres JA et al, 2011). Por ejemplo, una dieta rica en AGP puede generar radicales libres y estrés oxidativo, lo que directamente se asocia con alteraciones epigenéticas (Lawless MW et al, 2009). Debido a que el estudio PREDIMED se basa en una intervención dietética de DM, se analizó si esta intervención podía influir en el patrón de metilación. Para ello se seleccionó una submuestra de 28 participantes, 18 del grupo de AOV y 10 del grupo control. Se analizaron todas las regiones seleccionadas aunque sólo se encontraron diferencias en el porcentaje de metilación en la isla CpG 5 del Amplicón B del gen FTO. Tras un año de intervención, el porcentaje de metilación disminuía en ambos grupo, siendo la diferencia más significativa la del grupo de AOV, donde la metilación disminuía un 6,4%. En el grupo control el descenso de metilación fue de un 3%, sin llegar a ser una diferencia significativa. Al compara entre los grupos no hubo diferencias significativas a nivel basal ni al año de intervención.

No existen estudios que muestren la relación entre el cambio de metilación y la intervención dietética para el polimorfismo rs9939609 del gen FTO. En cambio, diversos trabajos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado la relación entre la metilación y la dieta, concretamente los ácidos grasos, en otros genes. Un estudio realizado en cultivos celulares de músculo esquelético humanos mostraron que, tras 48 horas de tratamiento con ácidos grasos libres, especialmente ácido palmítico, aumentaba la metilación de la región promotora del gen PPAR γ conduciendo a la supresión de su expresión (Barres R et al, 2009). El gen PPAR γ es un factor de transcripción que actúa como sensor de nutriente que regula diversas funciones homeostáticas. Alteraciones en el gen pueden conducir a patologías vasculares, alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos/lípidos y resistencia a la insulina (Kvandová M et al, 2016). Otro estudio *in vivo* con ratas mostraron que una dieta rica en AGP puede disminuir los niveles globales de metilación (Kulkarni A et al, 2011). En nuestro estudio, el grupo de intervención de DM siguió unas recomendaciones dietéticas rica en AGM, mientras en el grupo control se recomendó una dieta baja en grasas. Por tanto, nuestros resultados son similares a los obtenidos en estudios realizados con AGP, donde se veía también un descenso del nivel de metilación. Es necesario puntualizar que las diferencias fueron significativas sólo en el grupo de AOV, que es un AGM.

Futuros estudios serían necesarios para confirmar dichas asociación y para conocer cómo influye este descenso de la metilación en una región próxima al polimorfismo rs9939609 del gen FTO.

El estudio realizado por Dayeh y colaboradores donde realizaron un análisis de la metilación de genoma completo en relación a la DMT2 mostró que factores de riesgo de esta patología como la hiperglucemia, la edad o el IMC estaban asociados con diferencias en la metilación entre individuos diabéticos y no diabéticos. Esto podía sugerir que cambios en la metilación pueden predisponer al desarrollo de la enfermedad (Dayeh T et al, 2014). Para conocer si las diferencias de metilación encontradas en las regiones estudiadas en el presente estudio podrían estar relacionadas con factores de riesgo de la obesidad o la DMT2, a continuación se analizó la metilación basal o las diferencias de metilación obtenidas al año de la intervención y su posible asociación con algún parámetro antropométrico o bioquímico relacionado con ambas patologías. Para ello se analizaron las islas CpG en las que previamente habíamos obtenido diferencias en la metilación. Para el gen FTO se seleccionó la isla CpG 8 del amplicón A y para el gen TCF7L2 la isla CpG 7 del amplicón B. A nivel basal, no se encontraron ninguna correlación significativa entre la metilación de ambas regiones y estos parámetros. Al analizar la correlación de estas variables con la diferencia de metilación obtenida tras un año de intervención dietética, tampoco se obtuvieron resultados significativos.

En el caso del gen FTO, estudios en diversas poblaciones, como europea e India, no mostraron una asociación robusta entre la metilación del gen y parámetros como el IMC, la glucosa, los niveles de insulina, c-LDL, c-HDL, CT y TG (Elliott HR et al, 2013), como ocurría en nuestro estudio. Sin embargo, otros estudios sí que han mostrado relación entre los niveles de metilación y estos parámetros para el caso del gen TCF7L2. En el estudio realizado por Carnivell y colaboradores donde analizaban las diferencias en la metilación del promotor del gen TCF7L2 en pacientes con DMT2, observaron que la metilación de islas CpG específicas en el promotor se relacionaban con los niveles de glucosa, de CT y de c-LDL, aumentando o disminuyendo en función de la isla CpG analizada (Carnivell S et al, 2014). Esta hipermetilación del promotor aumentaba la expresión del mRNA, lo que producía un descenso de la expresión de la proteína en las células β . No se conoce el mecanismo por el cual se produce esta regulación negativa pero se sugirió que la metilación del ADN podría afectar al *splicing* del TCF7L2. Por tanto, el incremento de los niveles de mRNA podría representar transcritos que

codifican para una isoforma menos activa. Es necesario destacar que el estudio de metilación se realizó en el promotor del gen y nuestras regiones de estudio no abarcan esa zona, lo que podría explicar las diferencias en el resultado. La mayor parte de los efectos en la regulación transcripcional relacionados con la metilación del ADN dentro de las regiones promotoras se asocian directamente bloqueando la unión de los activadores transcripcionales y la metilación de regiones intragénicas que podrían conducir a un *splicing* irregular o alternativo (Ma Y and Ordovas JM, 2016).

Estudios preclínicos y clínicos han demostrado que la exposición a factores ambientales como pueden ser la dieta, el consumo de tabaco o la polución, modifican las marcas epigenéticas. La mayoría de estos estudios se centran en la metilación del ADN y menos en la modificación de histonas o alteraciones en los microARNs (Ordovas JM and Smith CE, 2010). Múltiples investigaciones han intentado aclarar el papel de la nutrición en la modificación de los mecanismos epigenéticos. Los ácidos grasos, el ácido fólico y la vitamina B12 o los polifenoles han sido relacionados con cambios en la metilación (Alegría-Torres JA et al, 2011). Otros componentes nutricionales derivados de las verduras con alto contenido en antioxidantes tienen efecto en otros mecanismos epigenéticos como la acetilación de histonas (Chen J and Xu X, 2010).

En el presente estudio se analizó si una posible asociación entre la adherencia a la DM a nivel basal y la obesidad o la DMT2 podría influir en la diferencia de metilación tras un año de intervención. El análisis se realizó en las mismas islas CpG seleccionadas en el anterior resultado. En las diferencias de metilación de la isla CpG8 del amplicón A del gen FTO se vio una interacción entre la obesidad y la adherencia a la dieta significativa (p interacción=0,035). En los individuos obesos con alta adherencia la metilación aumentaba un 4,4% mientras que cuando presentaban baja adherencia a la dieta, la metilación disminuía un 11,5%, sin ser estas diferencias significativas. En el caso de los individuos no obesos, con alta adherencia su metilación disminuía un 1,2% mientras que los individuos con baja adherencia aumentaban la metilación un 2,5%. Por tanto, el patrón de metilación varía según el grado de obesidad y de adherencia a la DM en la población estudiada.

Como ya se ha comentado, el polimorfismo rs9939609 del gen FTO se ha relacionado con la obesidad y parámetros relacionados con la obesidad, como son la grasa corporal, el IMC, el perímetro de cintura y cadera y peso corporal (Scuteri A et al, 2007; Willer CJ et al, 2009; Peng S et al, 2011). Diversos trabajos han mostrado que esta relación puede ser modulada por la dieta. Por ejemplo, en el estudio realizado por Sonestedt y colaboradores, los resultados mostraban que dietas altas en componente graso acentuaban la susceptibilidad a la obesidad por las variantes del gen FTO (Sonestedt E et al, 2009). También se ha encontrado previamente una interacción del polimorfismo con la DM. En un estudio del polimorfismo con el riesgo de DM2 se observó que, para los polimorfismos rs9939609 de FTO y rs17782313 de MC4R, una baja adherencia a la dieta en los portadores de las variantes alélicas presentaban mayor riesgo de DM2 mientras que si la adherencia era alta la asociación no se producía. Por tanto, la adherencia a la dieta interactúa con la predisposición genética en la asociación de estos polimorfismos con la DM2 (Ortega-Azorín C et al, 2012).

Los resultados obtenidos han mostrado que la DM puede modular los patrones de metilación en individuos obesos y no obesos. Estudios adicionales serían necesarios para confirmar esta interacción y para conocer cómo influye esta diferencia de metilación, debido a que una baja adherencia a la DM produce un aumento de metilación en individuos no obesos mientras que produce un descenso en individuos obesos.

Por último analizamos la diferencia de metilación del la isla CpG 7 del amplicón B del gen TCF7L2. En los resultados se encontró una interacción entre la DM2 y la adherencia a la DM (p interacción=0,002). En los individuos diabéticos, una alta adherencia presentaba un aumento de la metilación (19,6%) mientras que una baja adherencia la disminuía significativamente. En el caso de los individuos no diabéticos mostraban la tendencia opuesta, ya que una alta adherencia mostraba un descenso de la metilación y una baja adherencia mostraba un aumento de la metilación.

La interacción entre la DM2 y la dieta ha sido previamente descrita en la literatura científica (Harrington J and Phillips CM, 2014). También se ha descrito la interacción entre el gen TCF7L2 y el patrón dietético, donde se ha observado que la interacción entre el gen y la dieta modulaba el riesgo de DM2 (Fisher E et al, 2008). En el caso del polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2, Corella y

colaboradores analizó la posible interacción entre la DM y el polimorfismo (Corella D et al, 2013). Cuando la adherencia a la DM era baja, el genotipo TT presentaba concentraciones más elevada de glucosa que los portadores del alelo C. En cambio, si la adherencia era alta, este aumento no se mostraba. Además, esta modulación también se mostró en los niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos, así como la incidencia de riesgo de enfermedad cardiovascular en los portadores TT. Por tanto, la DM reducía el aumento de glucosa y lípidos en los individuos TT, así como factores de riesgo cardiovascular. Estudios previos mostraron diferencias de metilación entre individuos diabéticos y controles no diabéticos (Dayeh T et al, 2014). Hemos encontrado estas diferencias también en nuestros resultados pero en nuestro caso, están moduladas por la DM.

En conclusión, hemos encontrado diferencias de metilación en función de la obesidad y DMT2 para diferentes regiones cerca del polimorfismo rs9939609 del gen FTO y del polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2. También se han observado diferencias de metilación según el genotipo de ambos polimorfismos. Tras una intervención dietética de un año, observamos una disminución de la metilación en el gen FTO. No hemos encontrado relación entre la metilación y parámetros antropométricos y bioquímicos relacionados con la obesidad y la DMT2 ni a nivel basal ni tras un año de intervención. Por último, los resultados mostraron diferencias en la metilación tras un año de intervención en individuos obesos y no obesos en una de las islas CpG próximas al gen FTO, y entre individuos diabéticos y no diabéticos para una isal CpG próxima al gen TCF7L2. Estas diferencias encontradas estaban moduladas por la adherencia a la DM.

Estos resultados muestran diversas diferencias en la metilación en función de distintos parámetros relacionados con la obesidad y la DMT2. Serían necesarios estudios adicionales que confirmaran las diferentes asociaciones encontradas así como para conocer los mecanismos por los cuales se producen estas interacciones. También se podrían analizar otras islas CpG de ambos genes así como la metilación en las regiones del promotor de los genes, ya que han mostrado que la metilación de estas regiones es la que más fuertemente está implicada en la regulación de la transcripción de los genes.

5.5.- Estudio de la puntuación de riesgo genético (GRS) en polimorfismos relacionados con la obesidad y la DMT2

La puntuación de riesgo genético (GRS) es el estudio combinado de múltiples loci, cada uno de ellos con efecto modesto en un genotipo concreto de manera individual, para conocer si la combinación de los distintos alelos relacionados produce una variación en el resultado fenotípico. Esto permitirá mejorar la identificación de la población de mayor riesgo para las patologías estudiadas y desarrollar un asesoramiento individual frente a la enfermedad. El riesgo genético acumulado ha emergido en la actualidad como un método para el estudio de la correlación entre SNPs y fenotipos clínicos de enfermedades complejas, integrando efectos débiles de múltiples SNPs y aumenta la predicción de enfermedades complejas por la presencia de las variantes alélicas en polimorfismos genéticos. Este método se ha aplicado en estudios genéticos de muchas enfermedades complejas (Dayan N and Weili Y, 2015). El GRS se ha utilizado, por ejemplo, como marcadores de riesgo para la ECV (Christiansen MK et al, 2017; Paquette M et al, 2017; Pereira A et al, 2017). También se ha utilizado para analizar el riesgo de DMT2 (Chikowore T et al, 2016; Kong X et al, 2016; Läll K et al, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C se asociaba con la concentración de glucosa. Concretamente, el genotipo CC presentaba mayores niveles de glucosa plasmática. Esta relación entre el gen CLOCK y la DMT2 se ha descrito previamente, debido a un bloqueo de la exocitosis de la insulina (Perelis M et al, 2015; Saini C et al, 2016). En el caso del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1, los resultados mostraron una relación con la DMT2, donde el genotipo CC también presentaba un mayor nivel de glucosa. Estudios previos relacionaron el alelo C de este polimorfismo a un aumento de riesgo de DMT2 así como una aumento de los niveles de glucosa plasmática debido a un alteración de la fosforilación en el receptor de la insulina que provocará la incapacidad de incorporar la glucosa al interior de la célula (Rung J et al, 2009; Yiannakouris N et al, 2011).

Se estudió el riesgo conjunto de ambos polimorfismos mediante el cálculo de las puntuaciones de riesgo genético. Los resultados mostraron que la puntuación agregada de ambos polimorfismos se asociaba con mayores niveles de glucosa plasmática. El análisis del riesgo de desarrollar DMT2 presentó un aumento del riesgo conforme el número de alelos de riesgo iban aumentando. Aunque los

resultados obtenidos mostraban una tendencia ascendente del riesgo, no llegaron a la significación estadística. Debido a que el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C mostró una modulación por la dieta, futuros estudios para analizar esta relación, así como la posible modulación por otros factores ambientales, serían necesarios para conocer mejor el riesgo conjunto de ambos polimorfismos, ya que existen estudios previos que mostraron la interacción de un GRS de 9 loci relacionados con la DMT2 y la ingesta de ácidos grasos (Zheng JS et al, 2017).

También se analizó la relación entre dos polimorfismos marcadores de ancestro genético con el metabolismo lipídico, ya que en nuestros resultados mostraron una asociación con las concentraciones de c-LDL. El alelo A del polimorfismo rs2014303 del gen CLNK y el alelo T del polimorfismo rs822759 mostraban mayores niveles de c-LDL. Al realizar el estudio GRS, el aumento de alelos de riesgo se asociaba con un aumento de c-LDL, aunque los datos ajustados mostraban que el efecto de estos polimorfismos no era independiente, sino que estaba influido por factores como la dieta debido a que la significación de la asociación se perdió tras ajustar por adherencia a la DM. Como se ha comentado previamente, la estimación del ancestro genético permite descubrir la contribución genética a las enfermedades reduciendo el sesgo debido a los distintos orígenes genéticos (Yu J-H et al, 2012) debido a que variantes genéticas asociadas a diferentes enfermedades varían según el grupo poblacional estudiada (Smart A et al, 2017). Los resultados hallados en este estudio muestran la importancia de considerar tanto el GRS como los marcadores de ancestro genético para caracterizar el riesgo de desarrollar estas patologías

5.6.- Estudio piloto de GWAs para la selección de nuevos polimorfismos candidatos relacionados con obesidad y DMT2

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAs) son una herramienta muy poderosa para el estudio genético de las enfermedades humanas debido a que no es necesario un conocimiento previo de la estructura genómica y de los rasgos etiológicos de la enfermedad. También permiten la identificación de variantes de genes que previamente no se relacionaban con la enfermedad. Con este objetivo se realizó un estudio piloto de GWAs en la población del estudio PREDIMED PLUS.

El estudio PREDIMED PLUS es un ensayo de campo aleatorizado y multicéntrico cuya población se caracteriza por presentar alto riesgo cardiovascular debido a que su IMC se encuentra entre ≥ 27 y < 40 kg/m² y cumplen con al menos 3 criterios de síndrome metabólico. Un elevado IMC es un factor de riesgo para la mortalidad por ECV (Berrington de González A et al, 2010). Los hombres del estudio presentan más perímetro de cintura, más peso y más PAD mientras que las mujeres tienen una edad más avanzada y mayores niveles de CT y de c-HDL. Como se ha comentado previamente, en población española, la concentración de CT aumenta con la edad especialmente en mujeres que, además, presentan mayor concentración de c-HDL (Gabriel R et al, 2008). La población también presenta un alto número de individuos obesos, hipertensos e hipercolesterolémicos, sin encontrar diferencias entre sexos. Todos estos factores confieren a la población un elevado riesgo cardiovascular (Cordero A and Fácila L, 2015; Mozaffarian D et al, 2015).

Se realizó un estudio piloto de GWAs en esta población con el objetivo de identificar nuevas variantes genéticas relacionadas con la obesidad, la DMT2 y parámetros relacionados. En el caso de la obesidad, se escogieron el IMC y el perímetro de cintura como variables de estudio. En el caso del IMC, se detectaron 25 polimorfismos con un nivel de significación por encima de $p < 1 \times 10^{-5}$. De ellos, 5 se encuentran en regiones intrónicas no caracterizadas actualmente. En el análisis del perímetro de cintura también se seleccionaron 25 polimorfismos, muchos de ellos en regiones intergénicas o en regiones no caracterizadas previamente. Para el análisis de la DMT2, se seleccionó la concentración de glucosa como variable de estudio. Con el mismo nivel de significación de los dos análisis anteriores, en el caso de la glucemia se pudieron seleccionar más de 80 polimorfismos, 26 de los cuales superaban el nivel de significación de GWAs tras corrección por comparaciones múltiples ($p < 5 \times 10^{-8}$). Además, se realizó un análisis del riesgo de DMT2. Se escogieron 25 polimorfismos que presentaban unos valores significativos, tanto de riesgo como variantes protectoras frente a la DMT2. Estos resultados identifican nuevos polimorfismos asociados con los parámetros estudiados. Sin embargo, al realizar el estudio con fines exploratorios, el valor de P utilizado, denominado nivel sugestivo de significación, indican asociaciones sugerentes que deben ser confirmadas en otros estudios y con mayor tamaño muestral. Para ellos se seleccionaron las variantes genéticas más relevantes para parámetro analizado y se estudió si la asociación encontrada en el estudio PREDIMED PLUS también se producía en la población del estudio PREDIMED.

Para el IMC, el polimorfismo más significativamente asociado en la muestra de participantes PREDIMED PLUS ha sido el rs6777331, situado en el cromosoma tres en un lugar que codifica para un ARN largo no codificante (LCRNA 1991). Actualmente se sabe que los ARNs largos no codificantes tienen también una importante función epigenética reguladora de la expresión de genes similar a la más reconocida para los ARNs no codificantes de muy pequeño tamaño denominados microRNAs (Bhadra U et al, 2017; Mazidi M et al, 2017; Tian H et al, 2017). Aunque trabajos previos han encontrado asociaciones entre polimorfismos en genes que dan lugar a RNAs largos no codificantes implicados en enfermedades cardiometabólicas y obesidad (Wei S et al, 2016; Dechamethakun S and Muramatsu M, 2017) ninguno de ellos se ha analizado el SNP rs6777331 para el que nosotros hemos encontrado asociación en el GWAs. Por ello, sería interesante considerarlo en futuras investigaciones.

Los siguientes dos polimorfismos asociados a IMC en el estudio piloto de GWAs no mostraron esta asociación en el estudio PREDIMED. También se analizó el polimorfismo rs4801988 situado en el gen ZNF331 (zinc fingerprotein 331) que sí que mostró una asociación en el límite de la significación con el IMC. Este gen (anteriormente denominado RITA) ha sido caracterizado como un supresor tumoral (Yu J et al, 2013). Se ha visto que su grado de metilación puede ser utilizado como un indicador de determinados tipos de cánceres digestivos (Vedeld HM et al, 2015). Sin embargo, no se ha asociado previamente con obesidad. En el caso del perímetro de cintura, los dos polimorfismos más significativamente asociados en el GWAs realizado en los participantes PREDIMED PLUS, el rs2077759 y el rs13228919, también mostraron su asociación con la cintura en pacientes PREDIMED. Ambos están situados en el cromosoma 7 y cuya localización funcional y asignación a algún gen todavía no está bien definida. También mostró asociación con el perímetro de cintura, sobre todo en mujeres, fue el polimorfismo rs13239478. Se encuentra localizado en el gen MUC17 (mucin 17, cell surface associated) situado en el cromosoma 7. Codifica para una glicoproteína transmembrana altamente expresada en el tracto digestivo asociada a la mucina. Se ha asociado estas proteínas con cáncer y otras enfermedades por lo que ha aumentado el interés en estas proteínas como dianas terapéuticas (Gum JR Jr et al, 2002; Moniaux N et al, 2006; Kitamoto S et al, 2011). No hemos encontrado estudios previos en la literatura científica que asocien este gen con la obesidad. En el análisis de la glucemia, el polimorfismo rs9524784 fue el más significativamente asociado. Este polimorfismo es una variante intrónica del gen

ABCC4, anteriormente denominado Multidrug Resistance-associated Protein 4 (MRP4). Supone un cambio C>T y la frecuencia del alelo menor global en la base dbSNP es relativamente baja (T=0,0114). Aunque asociaciones de este SNPs con diabetes no han sido previamente reportadas, el gen ABCC4 sí que ha sido implicado previamente en diabetes en varios estudios (Anger GJ et al, 2009; Marumo T et al, 2015; Sajja RK and Cucullo L, 2015). El gen ABCC4 también ha sido relacionado con cirrosis (More VR et al, 2013) y otras enfermedades como cáncer (Zhang X et al, 2015; Yu DM et al, 2015). Esto lo convierte en un gen con gran pleiotropía. Además, este gen está surgiendo como una posible diana farmacológica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, despertando un gran interés (Belleville-Rolland T et al, 2016).

El segundo polimorfismo más asociado con glucemia en el PREDIMED PLUS fue el rs8191439 del gen GSTP1 (glutathione S-transferase pi 1). Este gen ha sido asociado previamente con diabetes en varios estudios (Mergani A et al, 2016; Qiu YH et al, 2016; Yako YY et al, 2016) aunque este polimorfismo concretamente ha sido poco estudiado quizá por su baja prevalencia o porque sea más específico de la población mediterránea. Otro polimorfismo que replicó la asociación en el estudio PREDIMED fue polimorfismo rs3745816 del gen EML2 (echinoderm microtubule associated protein like 2) localizado en el cromosoma 19. La familia de genes EML codifican para proteínas con función en el citoesqueleto, y se ha relacionado con cánceres como el de pulmón (Richards MW et al, 2014). No se han encontrado estudios previos que asocien el gen EML2 con la con DMT2, como hemos observado en los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran la importancia del estudio conjunto tanto de las variantes genéticas como de los factores ambientales que pueden estar implicados en la regulación de las mismas. También son necesarios estudio epigenéticos para conocer e identificar los cambios en la regulación génica. El estudio combinado de todo ello permite mejorar y aumentar el conocimiento de los factores que influyen en el desarrollo de patologías complejas como son la obesidad y la DMT2 así como determinar su modulación. Todo ello con el objetivo final de mejorar la prevención y tratamiento de estas enfermedades. Además, los estudios de GWAs se han convertido en una herramienta muy importante para alcanzar este objetivo ya que nos permiten conocer nuevos polimorfismos asociados a estas enfermedades no descritos previamente.

6

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Un nivel bajo de estudios y edad avanzadase asocian a una mayor prevalencia de obesidad y diabetes en esta población mediterránea de alto riesgo cardiovascular. En cambio, la realización de actividad física y la alta adherencia a la Dieta Mediterránea se asocian con una menor la prevalencia de ambas patologías.
2. En el análisis genético de genes seleccionados hemos encontrado varias asociaciones de los mismos con obesidad y fenotipos relacionados. Entre ellas destacamos el polimorfismo rs3217986 del gen CDKN2B asociado con el metabolismo lipídico y el polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 asociado con parámetros antropométricos. Con diabetes se relacionaron el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C, los polimorfismos rs2943641 y rs2943634 cerca del gen IRS1 y el polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B. Cabe resaltar el polimorfismo rs4731702 del gen KLF14 debido a que su relación con la obesidad de ve modulada por la presencia de diabetes así como el polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B cuya relación con los valores de glucosa está modulada por la presencia de la obesidad. Todo ello muestra la estrecha relación genético-ambiental entre ambas patologías y la necesidad de considerarla en la nueva medicina de precisión. Además, las variantes genéticas pueden tener efectos aditivos sobre un mismo fenotipo y resulta más informativo el cálculo de los GRS. Así, el polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK y del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 presentaron un efecto aditivo sobre la concentración de glucosa y el aumento del riesgo de DMT2, mostrando la importancia del estudio de riesgo genético combinando múltiples loci.

3. Diversos polimorfismos clasificados como marcadores de ancestro genético mostraron relación con la obesidad a través del metabolismo lipídico como el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK o relacionados con parámetros antropométricos, como el polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16 y el polimorfismo rs10509954. El polimorfismo rs293553 se asoció con la diabetes pero modulado por la presencia de obesidad poniendo de manifiesto la relación de ambas patologías. Los resultados muestran la importancia del estudio de los marcadores de ancestro genético en relación a estas patologías para conocer la predisposición genética ancestral a estas enfermedades.
4. Además de los efectos aditivos, podemos observar efectos interactivos. En este sentido, encontramos una interacción gen*gen de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK C y el polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 sobre el metabolismo lipídico. Ambos polimorfismos pertenecen al sistema circadiano y su asociación se ha descrito previamente. Esta interacción muestran cómo la influencia una variante genética puede depender de la presencia de otra variante mostrando una relación entre ellas. También encontramos diferentes interacciones gen*ambiente muy interesantes. Entre ellas, podemos destacar las interacciones con la actividad física del polimorfismo rs10883463 del gen SCD1 y del polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16 sobre los niveles de c-HDL, además de los polimorfismos rs1052133 del gen OGG1 y rs1063192 del gen CDKN2B sobre concentración de glucosa. También se hallaron las interacciones con la dieta del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C y el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK sobre la concentración de c-HDL. Los resultados obtenidos indican la necesidad del estudio de los factores ambientales para la caracterización de enfermedades multifactoriales como son la obesidad y la diabetes.
5. El polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK se asoció con incidencia de DMT2 en la población PREDIMED total. Además, se observó que esta asociación podía estar modulada por la dieta, donde un aumento de la adherencia a la DM aumentaba el efecto protector del alelo G frente a la DMT2. Los resultados también mostraron una nueva asociación entre el alelo G y la protección frente al ictus en participantes diabéticos.

6. El estudio de metilación mostró diferencias en el porcentaje de metilación en función de la obesidad y la diabetes, además de diferencias en función del genotipo del polimorfismo rs9939609 del gen FTO y el polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2. Tras una intervención dietética de un año, se encontraron diferencias entre los grupos de intervención. Estas diferencias de metilación mostraron una interacción entre la obesidad, la diabetes y la dieta. Todos estos resultados destacan la importancia del estudio de los mecanismos epigenéticos junto con las variantes genéticas y los factores ambientales para el estudio global de patologías como la obesidad y la diabetes.
7. El estudio piloto de GWAs mostró nuevas variantes genéticas asociadas a parámetros relacionados con la obesidad y la DMT2 en el estudio PREDIMED PLUS, superando algunas de ellas el nivel de significación de GWAs tras corrección por comparaciones múltiples. Además en el estudio de replicación, varios polimorfismos mostraron la misma asociación en el estudio PREDIMED, destacando el polimorfismo rs4801988 con el IMC, los polimorfismos rs2077759, rs13228919 y rs13239478 con perímetro de cintura y los polimorfismos rs8191439 y rs3745819 con glucemia. Entre estos hallazgos cabe resaltar el efecto pleiotrópico de algunos polimorfismos asociados a varios fenotipos, entre ellos, el polimorfismo rs9524784 ya que en el GWAs piloto se asoció con glucemia mientras que en el estudio PREDIMED mostró una fuerte relación con mortalidad total.



BIBLIOGRAFÍA

En este Capítulo se han incluido todas las referencias manejadas a lo largo de esta tesis según el orden alfabético:

Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG. Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med.* 2017 Apr; 5(7): 161.

Aberle J, Hopfer I, Beil FU, Seedorf U. Association of peroxisome proliferator-activated receptor delta +294T/C with body mass index and interaction with peroxisome proliferator-activated receptor alpha L162V. *Int J Obes (Lond).* 2006 Dec; 30(12): 1709-13.

Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med.* 2006; 355: 763-78.

Ackerman SE, Blackburn OA, Marchildon F, Cohen P. Insights into the link between obesity and cancer. *Curr Obes Rep.* 2017 Apr 22; doi: 10.1007/s13679-017-0263-x.

Agardh E, Allebeck P, Hallqvist J, Moradi T, Sidorchuk A. Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2011 Jun; 40(3): 804-18.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr, International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute, American Heart Association, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society, International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009 Oct 20; 120(16): 1640-5.

Albuquerque D, Stice E, Rodríguez-López R, Manco L, Nóbrega C. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Mol Genet Genomics.* 2015 Aug; 290(4): 1191-221.

Alegría-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics.* 2011 Jun; 3(3): 267-77.

Almén MS, Jacobsson JA, Moschonis G, Benedict C, Chrousos GP, Fredriksson R, Schiöth HB. Genome wide analysis reveals association of a FTO gene variant with epigenetic changes. *Genomics*. 2012 Mar; 99(3): 132-7.

Almendros SS, Obrador B, Bach-Faig A, Serra-Majem L. Environmental foot-prints of Mediterranean versus western dietary patterns: beyond the health benefits of the Mediterranean diet. *Environ Health*. 2013; 12(1): 118.

Almgren T, Wilhelmsen L, Samuelsson O, Himmelmann A, Rosengren A, Andersson OK. Diabetes in treated hypertension is common and carries a high cardiovascular risk: results from a 28-year follow-up. *J Hypertens*. 2007 Jun; 25(6): 1311-7.

Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, Yu F, Peltonen L, Dermitzakis E, Bonnen PE, Altshuler DM, Gibbs RA, de Bakker PI, Deloukas P, Gabriel SB, Gwilliam R, Hunt S, Inouye M, Jia X, Palotie A, Parkin M, Whittaker P, Yu F, Chang K, Hawes A, Lewis LR, Ren Y, Wheeler D, Gibbs RA, Muzny DM, Barnes C, Darvishi K, Hurler M, Korn JM, Kristiansson K, Lee C, McCarroll SA, Nemesh J, Dermitzakis E, Keinan A, Montgomery SB, Pollack S, Price AL, Soranzo N, Bonnen PE, Gibbs RA, Gonzaga-Jauregui C, Keinan A, Price AL, Yu F, Anttila V, Brodeur W, Daly MJ, Leslie S, McVean G, Moutsianas L, Nguyen H, Schaffner SF, Zhang Q, Ghorri MJ, McGinnis R, McLaren W, Pollack S, Price AL, Schaffner SF, Takeuchi F, Grossman SR, Shlyakhter I, Hostetter EB, Sabeti PC, Adebamowo CA, Foster MW, Gordon DR, Licinio J, Manca MC, Marshall PA, Matsuda I, Ngare D, Wang VO, Reddy D, Rotimi CN, Royal CD, Sharp RR, Zeng C, Brooks LD, McEwen JE. International HapMap 3 Consortium. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010 Sep 2; 467(7311):52-8.

Amarenco P, Goldstein LB, Szarek M, Sillesen H, Rudolph AE, Callahan A 3rd, Hennerici M, Simunovic L, Zivin JA, Welch KM, SPARCL Investigators. Effects of intense low-density lipoprotein cholesterol reduction in patients with stroke or transient ischemic attack: the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) trial. *Stroke*. 2007 Dec; 38(12): 3198-204.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Jan; 37Suppl 1: S81-90.

Amiano P, Chamosa S, Etxezarreta N, Arriola L, Sánchez MJ, Ardanaz E, Molina-Montes E, Chirlaque MD, Moreno-Iribas C, Huerta JM, Egües N, Navarro C, Requena M, Quirós JR, Fonseca-Nunes A, Jakszyn P, González CA, Dorronsoro M. Unprocessed red meat and processed meat consumption and risk of stroke in the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Eur J Clin Nutr*. 2015 Sep 30; doi: 10.1038/ejcn.2015.150.

Amirkhizi F, Siassi F, Djalali M, Foroushani AR. Evaluation of oxidative stress and total antioxidant capacity in women with general and abdominal adiposity. *Obes Res Clin Pract*. 2010 Jul-Sep; 4(3): e163-246.

Andersen JD, Johansen P, Harder S, Christoffersen SR, Delgado MC, Henriksen ST, Nielsen MM, Sørensen E, Ullum H, Hansen T, Dahl AL, Paulsen RR, Børsting C, Morling N. Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Sep; 7(5): 508-15.

Andersen MK, Sandholt CH. Recent progress in the understanding of obesity: contributions of genome-wide association studies. *Curr Obes Rep.* 2015 Dec; 4(4): 401-10.

Andersson EA, Holst B, Sparsø T, Grarup N, Banasik K, Holmkvist J, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Egerod KL, Lauritzen T, Sørensen TI, Bonnefond A, Meyre D, Froguel P, Schwartz TW, Pedersen O, Hansen T. MTNR1B G24E variant associates with BMI and fasting plasma glucose in the general population in studies of 22,142 europeans. *Diabetes.* 2010 Jun; 59(6): 1539-48.

Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torekov SS, Wegner L, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Rasmussen SS, Clausen JO, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen L, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes.* 2008 Jan; 57(1): 95-101.

Andreason NC, Black DW (eds). Mood disorders. En: *Introductory textbook of psychiatry.* 2nd ed. Washington, DC: American Psychiatric Press; 1995. p. 247–88.

Anger GJ, Magomedova L, Piquette-Miller M. Impact of acute streptozotocin-induced diabetes on ABC transporter expression in rats. *Chem Biodivers.* 2009 Nov; 6(11): 1943-59.

Apalasy YD, Mohamed Z. Obesity and genomics: role of technology in unraveling the complex genetic architecture of obesity. *Hum Genet.* 2015 Apr; 134(4): 361-74.

Aranceta J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Vioque J, Tur Mari JA, MataixVerdu J. Estudio DORICA: dislipemia, obesidad y riesgo cardiovascular. En: Aranceta J, Foz M, Gil B, Jover E, Mantilla T, Millan J, Monereo S, Moreno B, editores. *Obesidad y riesgo cardiovascular. Estudio DORICA.* Madrid: Panamericana; 2004. p.125-56.

Arena R, Sagner M, Byrne NM, Williams AD, McNeil A, Street SJ, Hills AP. Novel approaches for the promotion of physical activity and exercise for prevention and management of type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2017 Apr 26; doi: 10.1038.

Armstrong MJ, Sigal RJ. Exercise as medicine: key concepts in discussing physical activity with patients who have type 2 diabetes. *Can J Diabetes.* 2015 Oct 22; pii: S1499-2671(15)00747-9.

Arregui M, Buijsse B, Stefan N, Corella D, Fisher E, di Giuseppe R, Coltell O, Knüppel S, Aleksandrova K, Joost HG, Boeing H, Weikert C. Heterogeneity of the Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) gene and metabolic risk factors in the EPIC-Potsdam Study. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48338 b.

Arregui M, Fisher E, Knüppel S, Buijsse B, di Giuseppe R, Fritsche A, Corella D, Willich SN, Boeing H, Weikert C. Significant associations of the rs2943634 (2q36.3) genetic polymorphism with adiponectin, high density lipoprotein cholesterol and ischemic stroke. *Gene*. 2012 Feb 25; 494(2): 190-5 a.

Artero A, Artero A, Tarín JJ, Cano A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*. 2015 Jan; 80(1): 3-13.

Audrain-McGovern J, Benowitz NL. Cigarette smoking, nicotine, and body weight. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Jul; 90(1): 164-8.

Aulinas A, Ramírez MJ, Barahona MJ, Valassi E, Resmini E, Mato E, Santos A, Crespo I, Bell O, Surrallés J, Webb SM. Dyslipidemia and chronic inflammation markers are correlated with telomere length shortening in Cushing's syndrome. *PLoS One*. 2015 Mar 23; 10(3): e0120185.

Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990 Aug; 82(2): 495-506.

Austin MA, Talmud PJ, Farin FM, Nickerson DA, Edwards KL, Leonetti D, McNeely MJ, Viernes HM, Humphries SE, Fujimoto WY. Association of apolipoprotein A5 variants with LDL particle size and triglyceride in Japanese Americans. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jan 20; 1688(1): 1-9.

Avery L, Flynn D, van Wersch A, Sniehotta FF, Trenell MI. Changing physical activity behavior in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of behavioral interventions. *Diabetes Care*. 2012 Dec; 35(12): 2681-9.

Awad F, Contreras-Duarte S, Molina P, Quiñones V, Serrano V, Abbott E, Maiz A, Busso D, Rigotti A. Disfuncionalidad antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en pacientes diabéticos descompensados. *Nutr Hosp*. 2015 Sep 1; 32(3): 1131-8.

Azzi A, Dallmann R, Casserly A, Rehrauer H, Patrignani A, Maier B et al. Circadian behavior is light-reprogrammed by plastic DNA methylation. *Nat Neurosci*. 2014 Mar; 17(3): 377-82.

Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, Medina FX, Battino M, Belahsen R, Miranda G, Serra-Majem L, Mediterranean Diet Foundation Expert Group. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr*. 2011 Dec; 14(12A): 2274-84.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2; 101(44): 15718-23.

Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*. 2006; 7: 781-791.

Bann D, Wu FC, Keevil B, Lashen H, Adams J, Hardy R, Muniz G, Kuh D, Ben-Shlomo Y, Ong KK. Changes in testosterone related to body composition in late midlife: findings from the 1946 British Birth Cohort Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Jul; 23(7): 1486-92.

Bao XY, Xie C, Yang MS. Association between type 2 diabetes and CDKN2A/B: a meta-analysis study. *Mol Biol Rep*. 2012 Feb; 39(2): 1609-16.

Barrès R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K, Krook A, Zierath JR. Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab*. 2009 Sep; 10(3): 189-98.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21: 263-5.

Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*. 2010 Dec 3; 330(6009): 1349-54.

Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014 Jan-Feb; 56(4): 369-81.

Bauchet M, McEvoy B, Pearson LN, Quillen EE, Sarkisian T, Hovhannesian K et al. Measuring european population stratification with microarray genotype data. *Am J Hum Genet*. 2007 May; 80(5): 948-56.

Bays H, Abate N, Chandalia M. Adiposopathy: sick fat causes high blood sugar, high blood pressure and dyslipidemia. *Future Cardiol*. 2005; 1: 39-59.

Beckers S, Zegers D, Van Gaal LF, Van Hul W. The role of the leptin-melanocortin signaling pathway in the control of food intake. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009; 19: 267-287.

Been LF, Hatfield JL, Shankar A, Aston CE, Ralhan S, Wander GS, Mehra NK, Singh JR, Mulvihill JJ, Sanghera DK. A low frequency variant within the GWAS locus of MTNR1B affects fasting glucose concentrations: genetic risk is modulated by obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012 Nov; 22(11): 944-51.

Bell CG, Finer S, Lindgren CM, Wilson GA, Rakyan VK, Teschendorff AE, Akan P, Stupka E, Down TA, Prokopenko I, Morison IM, Mill J, Pidsley R, International Type 2 Diabetes 1q Consortium, Deloukas P, Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy MI, Beck S, Hitman GA. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. *PLoS One*. 2010 Nov 18; 5(11): e14040.

Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*. 2005 Mar; 6(3): 221-34.

Belleville-Rolland T, Sassi Y, Decouture B, Dreano E, Hulot JS, Gaussem P, Bachelot-Loza C. MRP4 (ABCC4) as a potential pharmacologic target for cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. 2016 May; 107: 381-9.

Ben-Shlomo A, Flaseriu M. Updates in the genetics of endocrine disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017 Jun; 46(2): xiii-xiv. doi: 10.1016/j.ecl.2017.03.002.

Berndt SI, Gustafsson S, Mägi R, Ganna A, Wheeler E, Feitosa MF, Justice AE, Monda KL, Croteau-Chonka DC, Day FR, Esko T, Fall T, Ferreira T, Gentilini D, Jackson AU, Luan J, Randall JC, Vedantam S, Willer CJ, Winkler TW, Wood AR, Workalemahu T, Hu YJ, Lee SH, Liang L, Lin DY, Min JL, Neale BM, Thorleifsson G, Yang J, Albrecht E, Amin N, Bragg-Gresham JL, Cadby G, den Heijer M, Eklund N, Fischer K, Goel A, Hottenga JJ, Huffman JE, Jarick I, Johansson Å, Johnson T, Kanoni S, Kleber ME, König IR, Kristiansson K, Kutalik Z, Lamina C, Lecoeur C, Li G, Mangino M, McArdle WL, Medina-Gomez C, Müller-Nurasyid M, Ngwa JS, Nolte IM, Paternoster L, Pechlivanis S, Perola M, Peters MJ, Preuss M, Rose LM, Shi J, Shungin D, Smith AV, Strawbridge RJ, Surakka I, Teumer A, Trip MD, Tyrer J, Van Vliet-Ostaptchouk JV, Vandenput L, Waite LL, Zhao JH, Absher D, Asselbergs FW, Atalay M, Attwood AP, Balmforth AJ, Basart H, Beilby J, Bonnycastle LL, Brambilla P, Bruinenberg M, Campbell H, Chasman DI, Chines PS, Collins FS, Connell JM, Cookson WO, de Faire U, de Vegt F, Dei M, Dimitriou M, Edkins S, Estrada K, Evans DM, Farrall M, Ferrario MM, Ferrières J, Franke L, Frau F, Gejman PV, Grallert H, Grönberg H, Gudnason V, Hall AS, Hall P, Hartikainen AL, Hayward C, Heard-Costa NL, Heath AC, Hebebrand J, Homuth G, Hu FB, Hunt SE, Hyppönen E, Iribarr en C, Jacobs KB, Jansson JO, Jula A, Kähönen M, Kathiresan S, Kee F, Khaw KT, Kivimäki M, Koenig W, Kraja AT, Kumari M, Kuulasmaa K, Kuusisto J, Laitinen JH, Lakka TA, Langenberg C, Launer LJ, Lind L, Lindström J, Liu J, Liuzzi A, Lokki ML, Lorentzon M, Madden PA, Magnusson PK, Manunta P, Marek D, März W, Mateo Leach I, McKnight B, Medland SE, Mihailov E, Milani L, Montgomery GW, Mooser V, Mühleisen TW, Munroe PB, Musk AW, Narisu N, Navis G, Nicholson G, Nohr EA, Ong KK, Oostra BA, Palmer CN, Palotie A, Peden JF, Pedersen N, Peters A, Polasek O, Pouta A, Pramstaller PP, Prokopenko I, Pütter C, Radhakrishnan A, Raitakari O, Rendon A, Rivadeneira F, Rudan I, Saaristo TE, Sambrook JG, Sanders AR, Sanna S, Saramies J, Schipf S, Schreiber S, Schunkert H, Shin SY, Signorini S, Sinisalo J, Skrobek B, Soranzo N, Stancáková A, Stark K, Stephens JC, Stirrups K, Stolk RP, Stumvoll M, Swift AJ, Theodoraki EV, Thorand B, Tregouet DA, Tremoli E, Van der Klauw MM, van Meurs JB, Vermeulen SH, Viikari J, Virtamo J, Vitart V, Waeber G, Wang Z, Widén E, Wild SH, Willemsen G, Winkelmann BR, Witteman JC, Wolffenbuttel BH, Wong A, Wright AF, Zillikens MC, Amouyel P, Boehm BO, Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Chanoock SJ, Cupples LA, Cusi D, Dedoussis GV, Erdmann J, Eriksson JG, Franks PW, Froguel P, Gieger C, Gyllensten U, Hamsten A, Harris TB, Hengstenberg C, Hicks AA, Hingorani A, Hinney A, Hofman A, Hovingh KG, Hveem K, Illig T, Jarvelin MR, Jöckel KH, Keinänen-Kiukaanniemi SM, Kiemeny LA, Kuh D, Laakso M, Lehtimäki T, Levinson DF, Martin NG, Metspalu A, Morris AD, Nieminen MS, Njølstad I, Ohlsson C, Oldehinkel AJ, Ouwehand WH, Palmer LJ, Penninx B, Power C, Province MA, Psaty BM, Qi L, Rauramaa R, Ridker PM, Ripatti S, Salomaa V, Samani NJ, Snieder H, Sørensen TI, Spector TD, Stefansson K, Tönjes A, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Uusitupa M, van der Harst P, Vollenweider P, Wallaschofski H, Wareham NJ, Watkins H, Wichmann HE, Wilson JF, Abecasis GR, Assimes TL, Barroso I, Boehnke M, Borecki IB, Deloukas P, Fox CS, Frayling T, Groop LC, Haritunian T, Heid IM, Hunter D, Kaplan RC, Karpe F, Moffatt MF, Mohlke KL, O'Connell JR, Pawitan Y, Schadt EE,

Schlessinger D, Steinthorsdottir V, Strachan DP, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Visscher PM, Di Blasio AM, Hirschhorn JN, Lindgren CM, Morris AP, Meyre D, Scherag A, McCarthy MI, Speliotes EK, North KE, Loos RJ, Ingelsson E. Genome-wide meta-analysis identifies 11 new loci for anthropometric traits and provides insights into genetic architecture. *Nat Genet.* 2013; 45(5): 501–512.

Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB, Beeson WL, Clipp SL, English DR, Folsom AR, Freedman DM, Giles G, Hakansson N, Henderson KD, Hoffman-Bolton J, Hoppin JA, Koenig KL, Lee IM, Linet MS, Park Y, Pocobelli G, Schatzkin A, Sesso HD, Weiderpass E, Willcox BJ, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Willett WC, Thun MJ. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med* 2010; 363: 2211-9.

Bertoluci MC, Rocha VZ. Cardiovascular risk assessment in patients with diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2017 Apr 20; 9: 25.

Bertomeu V, Castillo-Castillo. Situación de la enfermedad cardiovascular en España. Del riesgo a la enfermedad. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2008; 8: 2E-9E.

Bhadra U, Patra P, Pal-Bhadra M. Cardinal epigenetic role of non-coding regulatory RNAs in circadian rhythm. *Mol Neurobiol.* 2017 May 17; doi: 10.1007/s12035-017-0573-8.

Bhupathiraju SN, Hu FB. Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. *Circ Res.* 2016 May 27; 118(11): 1723-35.

Biernacka JM, Chung SJ, Armasu SM, Anderson KS, Lill CM, Bertram L, Ahlskog JE, Brighina L, Frigerio R, Maraganore DM. Genome-wide gene-environment interaction analysis of pesticide exposure and risk of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016 Nov; 32: 25-30.

Bischoff SC, Boirie Y, Cederholm T, Chourdakis M, Cuerda C, Delzenne NM, Deutz NE, Fouque D, Genton L, Gil C, Koletzko B, Leon-Sanz M, Shamir R, Singer J, Singer P, Stroebele-Benschop N, Thorell A, Weimann A, Barazzoni R. Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases. *Clin Nutr.* 2016 Nov 16; pii: S0261-5614(16)31323-1.

Blaut M. Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc Nutr Soc.* 2015 Aug; 74(3): 227-34.

Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; (209): 251-73.

Blomster JI, Zoungas S, Woodward M, Neal B, Harrap S, Poulter N, Marre M, Williams B, Chalmers J, Hillis GS. The impact of level of education on vascular events and mortality in patients with type 2 diabetes mellitus: results from the ADVANCE Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017 May; 127: 212-217.

Bloomfield HE, Koeller E, Greer N, MacDonald R, Kane R, Wilt TJ. Effects on health outcomes of a Mediterranean diet with no restriction on fat intake: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2016 Oct 4; 165(7): 491-500.

Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, Mora S, Pedersen TR, Larosa JC, Welch KM, Amarencu P, Demicco DA, Tonkin AM, Sullivan DR, Kirby A, Colhoun HM, Hitman GA, Betteridge DJ, Durrington PN, Clearfield MB, Downs JR, Gotto AM Jr, Ridker PM, Kastelein JJ. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation.* 2013 Oct 1; 128(14): 1504-12.

Boles A, Kandimalla R, Reddy PH. Dynamics of diabetes and obesity: epidemiological perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2017 May; 1863(5): 1026-1036.

Bomberg E, Birch L, Endenburg N, German AJ, Neilson J, Seligman H, Takashima G, Day MJ. The financial costs, behaviour and psychology of obesity: a one health analysis. *J Comp Pathol.* 2017 Apr 28; pii: S0021-9975(17)30123-8.

Borah S, Barrodia P, Swain RK.. Nucleolar protein 4-like has a complex expression pattern in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol.* 2016; 60(1-3): 53-6.

Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C, Sparsø T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chèvre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruokonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jørgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Lévy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2009 Jan; 41(1): 89-94.

Bouchard C. Genetic determinants of regional fat distribution. *Hum Reprod.* 1997; 12: 1-5.

Bouchard C, Ordovas JM. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012; 108: 1-15.

Bouhaha R, Choquet H, Meyre D, Abid Kamoun H, Ennafaa H, Baroudi T, Sassi R, Vaxillaire M, Elgaaied A, Froguel P, Cauchi S. TCF7L2 is associated with type 2 diabetes in nonobese individuals from Tunisia. *Pathol Biol (Paris).* 2010 Dec; 58(6): 426-9.

Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Apr; 296(4): E581-91.

Bower A, Marquez S, De Mejia EG. The health benefits of selected culinary herbs and spices found in the traditional Mediterranean diet. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016 Dec 9; 56(16): 2728-46. doi: 10.1080/10408398.2013.805713.

Branca F, Nikogosian H, Lobstein T (eds). The challenge of obesity in the WHO european region and the strategies for response: summary. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2007.

Brand FN, Abbott RD, Kannel WB. Diabetes, intermittent claudication, and risk of cardiovascular events. The Framingham Study. *Diabetes*. 1989 Apr; 38(4): 504-9.

Brands A, Yach D. NMH Reader Issue no. 1: women and the rapid rise of non-communicable diseases. Ginebra: World Health Organization; 2002.

Branicki W, Brudnik U, Draus-Barini J, Kupiec T, Wojas-Pelc A. Association of the SLC45A2 gene with physiological human hair colour variation. *J Hum Genet*. 2008; 53(11-12): 966-71.

Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, Balcerzyk A, George P, Baker EK, Calkin AC, Brownlee M, Cooper ME, El-Osta A. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*. 2009 May; 58(5): 1229-36.

Brennan RO. Nutrigenetics: new concepts for relieving hypoglycemia. New York: Evans & Co; 1975.

Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, Karanickolas PJ, Akl EA, Wu P, Blechacz B, Bassler D, Wei X, Sharman A, Whitt I, Alves da Silva S, Khalid Z, Nordmann AJ, Zhou Q, Walter SD, Vale N, Bhatnagar N, O'Regan C, Mills EJ, Bucher HC, Montori VM, Guyatt GH. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ*. 2009 Feb 16; 338: b92.

Brito EC, Lyssenko V, Renström F, Berglund G, Nilsson PM, Groop L, Franks PW. Previously associated type 2 diabetes variants may interact with physical activity to modify the risk of impaired glucose regulation and type 2 diabetes: a study of 16,003 Swedish adults. *Diabetes*. 2009 Jun; 58(6): 1411-8.

Brøns C, Jacobsen S, Nilsson E, Rönn T, Jensen CB, Storgaard H, Poulsen P, Groop L, Ling C, Astrup A, Vaag A. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun; 95(6): 3048-56.

Brookes E, Shi Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease. *Annu Rev Genet*. 2014; 48: 237-68.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun; 54(6): 1615-25.

Brum MC, Filho FF, Schnorr CC, Bottega GB, Rodrigues TC. Shift work and its association with metabolic disorders. *Diabetol Metab Syndr*. 2015 May 17; 7: 45.

Brunetti A, Chiefari E, Foti D. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2014 Apr 15; 5(2): 128-40.

Bu S, Ruan D, Yang Z, Xing X, Zhao W, Wang N, Xie L, Yang W. Sex-specific prevalence of diabetes and cardiovascular risk factors in the middle-aged population of China: a subgroup analysis of the 2007-2008 China National Diabetes and Metabolic Disorders Study. *PLoS One*. 2015 Sep 25; 10(9): e0139039.

Buckland G, Bach A, Serra-Majem L. Obesity and the Mediterranean diet: a systematic review of observational and intervention studies. *Obes Rev*. 2008; 9: 582-93.

Budnik A, Henneberg M. Worldwide Increase of obesity is related to the reduced opportunity for natural selection. *PLoS One*. 2017 Jan 20; 12(1): e0170098. doi: 10.1371/journal.pone.0170098. eCollection 2017.

Buford TW. Hypertension and aging. *Ageing Res Rev*. 2016 Mar; 26: 96-111.

Bugge A, Feng D, Everett LJ, Briggs ER, Mullican SE, Wang F, Jager J, Lazar MA. Rev-erb α and Rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev*. 2012 Apr 1; 26(7): 657-67.

Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005 Sep 10-16; 366(9489): 941-51.

Bush T, Lovejoy JC, Deprey M, Carpenter KM. The effect of tobacco cessation on weight gain, obesity and diabetes risk. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Sep; 24(9): 1834-41.

Bush WS, Moore JH. Chapter 11: genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol*. 2012; 8(12): e1002822.

Cailotto C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Wortel J, Kalsbeek A, Feenstra M, Pévet P, Buijs RM. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci*. 2005 Nov; 22(10): 2531-40.

Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jönsson LS, Kolb H, Lansink M, Marcos A, Margioris A, Matusheski N, Nordmann H, O'Brien J, Pugliese G, Rizkalla S, Schalkwijk C, Tuomilehto J, Wärnberg J, Watzl B, Winklhofer-Roob BM. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr*. 2011 Dec; 106 Suppl 3: S5-78.

Campión J, Milagro FI, Martínez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev*. 2009 Jul; 10(4): 383-92.

- Canivell S, Ruano EG, Sisó-Almirall A, Kostov B, González-de Paz L, Fernandez-Rebollo E, Hanzu FA, Párrizas M, Novials A, Gomis R. Differential methylation of TCF7L2 promoter in peripheral blood DNA in newly diagnosed, drug-naïve patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2014 Jun 10; 9(6): e99310.
- Cao L, Choi EY, Liu X, Martin A, Wang C, Xu X, During MJ. White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab*. 2011 Sep 7; 14(3): 324-38.
- Cao MY, Davidson D, Yu J, Latour S, Veillette A. Clnk, a novel SLP-76-related adaptor molecule expressed in cytokine-stimulated hemopoietic cells. *J Exp Med*. 1999 Nov 15; 190(10): 1527-34.
- Carbajal A, Cuadrado C, Nunez C, Beltran B, Toledano G, Moreiras O. Estudio TRANSFAIR (II) Ingesta de ácidos grasos cis y trans con la dieta total en España. *Clin Invest Arterioscler*. 2000; 12: 256-262.
- Caricasole A, Sala C, Roncarati R, Formenti E, Terstappen GC. Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLC beta 1). *Biochim Biophys Acta*. 2000 Dec 15; 1517(1): 63-72.
- Carr MC, Hokanson JE, Zambon A, Deeb SS, Barrett PH, Purnell JQ, Brunzell JD. The contribution of intraabdominal fat to gender differences in hepatic lipase activity and low/high density lipoprotein heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2831-2837.
- Carvalho FM, Tinoco EM, Deeley K, Duarte PM, Faveri M, Marques MR, Mendonça AC, Wang X, Cuenco K, Menezes R, Garlet GP, Vieira AR. FAM5C contributes to aggressive periodontitis. *PLoS One*. 2010 Apr 7; 5(4): e10053.
- Castillo-Fernandez JE, Spector TD, Bell JT. Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Med*. 2014 Jul 31; 6(7): 60.
- Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, Dina C, Kremler F, Weitgasser R, Nejjari C, Patsch W, Chikri M, Meyre D, Froguel P. TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Jul; 85(7): 777-82.
- Cauchi S, Choquet H, Gutiérrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proença C, Dina C, Duval A, Balkau B, Marre M, Potoczna N, Langin D, Horber F, Sørensen TI, Charpentier G, Meyre D, Froguel P. Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Feb; 16(2): 476-82a.
- Cauchi S, Meyre D, Durand E, Proença C, Marre M, Hadjadj S, Choquet H, De Graeve F, Gaget S, Allegaert F, Delplanque J, Permutt MA, Wasson J, Blech I, Charpentier G, Balkau B, Vergnaud AC, Czernichow S, Patsch W, Chikri M, Glaser B, Sladek R, Froguel P. Post genome-wide association studies of novel genes associated with type 2 diabetes show gene-gene interaction and high predictive value. *PLoS One*. 2008 May 7; 3(5): e2031b.

Cauchi S, Nead KT, Choquet H, Horber F, Potoczna N, Balkau B, Marre M, Charpentier G, Froguel P, Meyre D. The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies. *BMC Med Genet*. 2008 May 22; 9: 45c.

Ceccato F, Bernkopf E, Scaroni C. Sleep apnea syndrome in endocrine clinics. *J Endocrinol Invest*. 2015 Aug; 38(8): 827-34.

Centro de Investigación Biomédica en Red: diabetes y enfermedades metabólicas asociadas (CIBERdem). Estudio di@bet.es [en línea]. Octubre 2012. [Consultado 10 de Julio de 2015]. Disponible en: < <http://www.ciberdem.org/programas-de-investigacion/proyectos/estudio-di-betes> >

Chambers JC, Zhang W, Zabaneh D, Sehmi J, Jain P, McCarthy MI, Froguel P, Ruokonen A, Balding D, Jarvelin MR, Scott J, Elliott P, Kooner JS. Common genetic variation near melatonin receptor MTNR1B contributes to raised plasma glucose and increased risk of type 2 diabetes among Indian Asians and European Caucasians. *Diabetes*. 2009 Nov; 58(11): 2703-8.

Chandak GR, Ward KJ, Yajnik CS, Pandit AN, Bavdekar A, Joglekar CV, Fall CH, Mohankrishna P, Wilkin TJ, Metcalf BS, Weedon MN, Frayling TM, Hattersley AT. Triglyceride associated polymorphisms of the APOA5 gene have very different allele frequencies in Pune, India compared to Europeans. *BMC Med Genet*. 2006 Oct 10; 7: 76.

Chasman DI, Paré G, Mora S, Hopewell JC, Peloso G, Clarke R, Cupples LA, Hamsten A, Kathiresan S, Mälarstig A, Ordovas JM, Ripatti S, Parker AN, Miletich JP, Ridker PM. Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis. *PLoS Genet*. 2009 Nov; 5(11): e1000730.

Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017 Feb 10; pii: S0140-6736(17)30058-2.

Chen G, Doumatey AP, Zhou J, Lei L, Bentley AR, Tekola-Ayele F, Adebamowo SN, Baker JL, Fasanmade O, Okafor G, Eghan B Jr, Agyenim-Boateng K, Amoah A, Adebamowo C, Acheampong J, Johnson T, Oli J, Shriner D, Adeyemo AA, Rotimi CN. Genome-wide analysis identifies an african-specific variant in SEMA4D associated with body mass index. *Obesity (Silver Spring)*. 2017 Apr; 25(4): 794-80.

Chen G, McAlister FA, Walker RL, Hemmelgarn BR, Campbell NR. Cardiovascular outcomes in framingham participants with diabetes: the importance of blood pressure. *Hypertension*. 2011 May; 57(5): 891-7.

Chen GB, Lee SH, Robinson MR, Trzaskowski M, Zhu ZX, Winkler TW, Day FR, Croteau-Chonka DC, Wood AR, Locke AE, Kutalik Z, Loos RJ, Frayling TM, Hirschhorn JN, Yang J, Wray NR; Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT) Consortium., Visscher PM. Across-cohort QC analyses of GWAS summary statistics from complex traits. *Eur J Hum Genet*. 2016 Jan; 25(1): 137-146.

- Chen J, Xu X. Diet, epigenetic, and cancer prevention. *Adv Genet.* 2010; 71: 237-55.
- Chen L, Su L, Li J, Zheng Y, Yu B, Yu Y, Yan M, Gu Q, Zhu Z, Liu B. Hypermethylated FAM5C and MYLK in serum as diagnosis and pre-warning markers for gastric cancer. *Dis Markers.* 2012; 32(3): 195-202.
- Chen X, Li S, Yang Y, Yang X, Liu Y, Liu Y, Hu W, Jin L, Wang X. Genome-wide association study validation identifies novel loci for atherosclerotic cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2012 Aug; 10(8): 1508-14.
- Cheung BM, Li C. Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? *Curr Atheroscler Rep.* 2012 Apr; 14(2): 160-6.
- Chikowore T, van Zyl T, Feskens EJ, Conradie KR. Predictive utility of a genetic risk score of common variants associated with type 2 diabetes in a black South African population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016 Dec; 122: 1-8.
- Chinn S, Jarvis D, Melotti R, Luczynska C, Ackermann-Liebrich U, Antó JM, Cerveri I, de Marco R, Gislason T, Heinrich J, Janson C, Künzli N, Leynaert B, Neukirch F, Schouten J, Sunyer J, Svanes C, Vermeire P, Wjst M, Burney P. Smoking cessation, lung function, and weight gain: a follow-up study. *Lancet.* 2005 May 7-13; 365(9471): 1629-35.
- Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr.* 2008 Apr; 87(4): 801-9.
- Chiolero A, Wietlisbach V, Ruffieux C, Paccaud F, Cornuz J. Clustering of risk behaviors with cigarette consumption: a population-based survey. *Prev Med.* 2006; 42: 348–53.
- Chiu M, Maclagan LC, Tu JV, Shah BR. Temporal trends in cardiovascular disease risk factors among white, South Asian, Chinese and black groups in Ontario, Canada, 2001 to 2012: a population-based study. *BMJ Open.* 2015; 5: e007232.
- Chiva-Blanch G, Arranz S, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol Alcohol.* 2013 May-Jun; 48(3): 270-7.
- Chiva-Blanch G, Badimon L, Estruch R. Latest evidence of the effects of the Mediterranean diet in prevention of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2014 Oct; 16(10): 446.
- Cho YS, Chen CH, Hu C, Long J, Ong RT, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yamauchi T, Chang YC, Kwak SH, Ma RC, Yamamoto K, Adair LS, Aung T, Cai Q, Chang LC, Chen YT, Gao Y, Hu FB, Kim HL, Kim S, Kim YJ, Lee JJ, Lee NR, Li Y, Liu JJ, Lu W, Nakamura J, Nakashima E, Ng DP, Tay WT, Tsai FJ, Wong TY, Yokota M, Zheng W, Zhang R, Wang C, So WY, Ohnaka K, Ikegami H, Hara K, Cho YM, Cho NH, Chang TJ, Bao Y, Hedman ÅK, Morris AP, McCarthy MI; DIAGRAM Consortium; MuTHER Consortium, Takayanagi R, Park KS, Jia W, Chuang LM, Chan JC, Maeda S, Kadowaki T, Lee JY, Wu JY, Teo YY, Tai ES, Shu XO, Mohlke KL, Kato N, Han BG,

Seielstad M. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in East Asians. *Nat Genet.* 2012; 44: 67-72.

Choudhry S, Burchard EG, Borrell LN, Tang H, Gomez I, Naqvi M, Nazario S, Torres A, Casal J, Martinez-Cruzado JC, Ziv E, Avila PC, Rodriguez-Cintron W, Risch NJ. Ancestry-environment interactions and asthma risk among Puerto Ricans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Nov 15; 174(10): 1088-93.

Christiansen MK, Nyegaard M, Larsen SB, Grove EL, Würtz M, Neergaard-Petersen S, Hvas AM, Jensen HK, Kristensen SD. A genetic risk score predicts cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2017 Apr 19; pii: S0167-5273(16)34293-0.

Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Goumelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998; 392: 398-401.

Cline JL, Beckie TM. The relationships between FAM5C SNP (rs10920501) variability and metabolic syndrome and inflammation in women with coronary heart disease. *Biol Res Nurs.* 2013 Apr; 15(2): 160-6.

Cohen AK, Rai M, Rehkopf DH, Abrams B. Educational attainment and obesity: a systematic review. *Obes Rev.* 2013 Dec; 14(12): 989-1005.

Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, Lo JC, Zeng X, Ye L, Khandekar MJ, Wu J, Gunawardana SC, Banks AS, Camporez JP, Jurczak MJ, Kajimura S, Piston DW, Mathis D, Cinti S, Shulman GI, Seale P, Spiegelman BM. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell.* 2014 Jan 16; 156(1-2): 304-16.

Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, Chasan-Taber L, Albright AL, Braun B, American College of Sports Medicine, American Diabetes Association. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary. *Diabetes Care.* 2010 Dec; 33(12): 2692-6.

Collins FS. Genetics: an explosion of knowledge is transforming clinical practice. *Geriatrics.* 1999 Jan; 54(1): 41-7; quiz 48.

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research.* *Genome Res.* 1998 Dec; 8(12): 1229-31.

Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science.* 2003; 300: 286-290.

Compere SJ, Palmiter RD. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell.* 1981; 25(1): 233-40.

Connelly JJ, Shah SH, Doss JF, Gadson S, Nelson S, Crosslin DR, Hale AB, Lou X, Wang T, Haynes C, Seo D, Crossman DC, Mooser V, Granger CB, Jones CJ, Kraus WE, Hauser ER, Gregory SG. Genetic and functional association of FAM5C with myocardial infarction. *BMC Med Genet*. 2008 Apr 22; 9: 33.

Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana. Encuesta de Salud de la Comunidad Valenciana 2010. Dirección General de Investigación, Desarrollo e Innovación Sanitaria. Valencia: Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat; 2010.

Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet*. 2009 Jun; 10(6): 392-404.

Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet*. 2005; 366: 1121-31.

Cordero A, Fácila L. Situación actual de la dislipemia en España: la visión del cardiólogo. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2015; 15(A): 2-7.

Cordero A, Sirera D, Bertomeu-Martínez V. Parámetros lipídicos y objetivos terapéuticos. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2012; 12(C): 12-8 - Vol. 12 Núm. Supl. C.

Corella D, Arnett DK, Tucker KL, Kabagambe EK, Tsai M, Parnell LD, Lai CQ, Lee YC, Warodomwicht D, Hopkins PN, Ordovas JM. A high intake of saturated fatty acids strengthens the association between the fat mass and obesity-associated gene and BMI. *J Nutr*. 2011 Dec; 141(12): 2219-25.

Corella D, Asensio EM, Coltell O, Sorlí JV, Estruch R, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Castañer O, Arós F, Lapetra J, Serra-Majem L, Gómez-Gracia E, Ortega-Azorín C, Fiol M, Espino JD, Díaz-López A, Fitó M, Ros E, Ordovas JM. CLOCK gene variation is associated with incidence of type-2 diabetes and cardiovascular diseases in type-2 diabetic subjects: dietary modulation in the PREDIMED randomized trial. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Jan 7;15: 4a.

Corella D, Coltell O, Sorlí JV, Estruch R, Quiles L, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Castañer O, Arós F, Ortega-Calvo M, Serra-Majem L, Gómez-Gracia E, Portolés O, Fiol M, Díez Espino J, Basora J, Fitó M, Ros E, Ordovas JM. Polymorphism of the transcription factor 7-Like 2 Gene (TCF7L2) interacts with obesity on type-2 diabetes in the PREDIMED study emphasizing the heterogeneity of genetic variants in type-2 diabetes risk prediction: time for obesity-specific genetic risk scores. *Nutrients*. 2016 Dec 6; 8(12). pii: E793b.

Corella D, Guillén M, Sáiz C, Portolés O, Sabater A, Folch J, Ordovas JM. Associations of LPL and APOC3 gene polymorphisms on plasma lipids in a Mediterranean population: interaction with tobacco smoking and the APOE locus. *J Lipid Res*. 2002 Mar; 43(3): 416-27.

Corella D, Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Manning AK, Tucker KL, Ordovas JM. APOA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Feb; 85(2): 119-28.

Corella D, Ordovás JM. Nutrigenomics in cardiovascular medicine. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009 December; 2(6): 637–651.

Corella D, Ordovás JM. How does the Mediterranean diet promote cardiovascular health? Current progress toward molecular mechanisms: gene-diet interactions at the genomic, transcriptomic, and epigenomic levels provide novel insights into new mechanisms. *Bioessays*. 2014 May; 36(5): 526-37 (a).

Corella D, Ordovás JM. Aging and cardiovascular diseases: the role of gene-diet interactions. *Ageing Res Rev*. 2014 Nov; 18: 53-73 (b).

Corella D, Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Covas MI, Carrasco P, Salas-Salvadó J, Martínez-González MÁ, Arós F, Lapetra J, Serra-Majem L, Lamuela-Raventos R, Gómez-Gracia E, Fiol M, Pintó X, Ros E, Martí A, Coltell O, Ordovás JM, Estruch R. Statistical and biological gene-lifestyle interactions of MC4R and FTO with diet and physical activity on obesity: new effects on alcohol consumption. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52344.

Corella D, Peloso G, Arnett DK, Demissie S, Cupples LA, Tucker K, Lai CQ, Parnell LD, Coltell O, Lee YC, Ordovas JM. APOA2, dietary fat, and body mass index: replication of a gene-diet interaction in 3 independent populations. *Arch Intern Med*. 2009 Nov 9; 169(20): 1897-906.

Cornelis MC, Hu FB. Gene-environment interactions in the development of type 2 diabetes: recent progress and continuing challenges. *Annu Rev Nutr*. 2012 Aug 21; 32: 245-59.

Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäumler H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J, Marrugat J, EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 Sep 5; 145(5): 333-41.

Covas MI, de la Torre R, Fitó M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *Br J Nutr*. 2015 Apr; 113 Suppl 2: S19-28.

Crumbley C, Burriss TP. Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PLoS One*. 2011 Mar 29; 6(3): e17290.

Cruz KJ, de Oliveira AR, Morais JB, Severo JS, Marreiro PhD DD. Role of microRNAs on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. *Nutrition*. 2017 Mar; 35: 28-35. doi: 10.1016/j.nut.2016.10.003.

Culverhouse R, Suarez BK, Lin J, Reich T. A perspective on epistasis: limits of models displaying no main effect. *Am J Hum Genet*. 2002 Feb; 70(2): 461-71.

Curtis GL, Chughtai M, Khlopas A, Newman JM, Khan R, Shaffiy S, Nadhim A, Bhave A, Mont MA. Impact of physical activity in cardiovascular and musculoskeletal health: can motion be medicine? *J Clin Med Res*. 2017 May; 9(5): 375-381.

da Silva R, Bach-Faig A, Raidó Quintana B, Buckland G, Vaz de Almeida MD, Serra-Majem L. Worldwide variation of adherence to the Mediterranean diet, in 1961-1965 and 2000-2003. *Public Health Nutr.* 2009 Sep; 12(9A): 1676-84.

Dalsgaard EM, Skriver MV, Sandbaek A, Vestergaard M. Socioeconomic position, type 2 diabetes and long-term risk of death. *PLoS One.* 2015 May 5; 10(5): e0124829.

Damasceno NR, Sala-Vila A, Cofán M, Pérez-Heras AM, Fitó M, Ruiz-Gutiérrez V, Martínez-González MÁ, Corella D, Aró F, Estruch R, Ros E. Mediterranean diet supplemented with nuts reduces waist circumference and shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in subjects at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2013 Oct; 230(2): 347-53.

Dambha-Miller H, Cooper AJ, Kinmonth AL, Griffin SJ. Effect on cardiovascular disease risk factors of interventions to alter consultations between practitioners and patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of trials in primary care. *Health Expect.* 2017 Feb 28; doi: 10.1111/hex.12546.

Daniels R, Lowell S, Bolton V, Monk M. Transcription of tissue-specific genes in human preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 1997 Oct; 12(10): 2251-6.

Danielsson A, Fagerholm S, Ost A, Franck N, Kjolhede P, Nystrom FH, Strålfors P. Short-term overeating induces insulin resistance in fat cells in lean human subjects. *Mol Med.* 2009 Jul-Aug; 15(7-8): 228-34.

Das Bhowmik A, Gupta N, Dalal A, Kabra M. Whole exome sequencing identifies a homozygous nonsense variation in *ALMS1* gene in a patient with syndromic obesity. *Obes Res Clin Pract.* 2017 Mar-Apr; 11(2): 241-246.

Dashti HS, Follis JL, Smith CE, Tanaka T, Garaulet M, Gottlieb DJ, Hruby A, Jacques PF, Kieft-de Jong JC, Lamon-Fava S, Scheer FA, Bartz TM, Kovanen L, Wojczynski MK, Frazier-Wood AC, Ahluwalia TS, Perälä MM, Jonsson A, Muka T, Kalafati IP, Mikkilä V, Ordovás JM, CHARGE Nutrition Study Group. Gene-environment interactions of circadian-related genes for cardiometabolic traits. *Diabetes Care.* 2015 Aug; 38(8): 1456-66.

Dayan N, Weili Y. The application of genetic risk score in genetic studies of complex human diseases. *Yi Chuan.* 2015 Dec; 37(12): 1204-10.

Dayeh T, Volkov P, Salö S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, Kirkpatrick CL, Wollheim CB, Eliasson L, Rönn T, Bacos K, Ling C. Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet.* 2014 Mar 6; 10(3): e1004160.

De R, Hu T, Moore JH, Gilbert-Diamond D. Characterizing gene-gene interactions in a statistical epistasis network of twelve candidate genes for obesity. *Bio Data Min.* 2015 Dec 29; 8: 45.

De Boer MP, Meijer RI, Wijnstok NJ, Jonk AM, Houben AJ, Stehouwer CD, Smulders YM, Eringa EC, Serné EH. Microvascular dysfunction: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Microcirculation*. 2012 Jan; 19(1): 5-18.

De Caterina R, Talmud PJ, Merlini PA, Foco L, Pastorino R, Altshuler D, Mauri F, Peyvandi F, Lina D, Kathiresan S, Bernardinelli L, Ardissino D, Gruppo Italiano Aterosclerosi. Strong association of the APOA5-1131T>C gene variant and early-onset acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2011 Feb; 214(2): 397-403.

D'Errico M, Parlanti E, Dogliotti E. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug; 659(1-2): 4-14.

de Koning L, Chiuve SE, Fung TT, Willett WC, Rimm EB, Hu FB. Diet-quality scores and the risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*. 2011 May; 34(5): 1150-6.

de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*. 1994; 343: 1454-9.

de Lorgeril M, Salen P, Martin JL. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. *Arch Intern Med*. 2006; 166: 411-17.

de Mello VD, Pulkkinen L, Lalli M, Kolehmainen M, Pihlajamäki J, Uusitupa M. DNA methylation in obesity and type 2 diabetes. *Ann Med*. 2014 May; 46(3): 103-13.

de Simone G, Wang W, Best LG, Yeh F, Izzo R, Mancusi C, Roman MJ, Lee ET, Howard BV, Devereux RB. Target organ damage and incident type 2 diabetes mellitus: the Strong Heart Study. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 May 12; 16(1): 64.

Dechamethakun S, Muramatsu M. Long noncoding RNA variations in cardiometabolic diseases. *J Hum Genet*. 2017 Jan; 62(1): 97-104. doi: 10.1038/jhg.2016.70.

Deepa M, Anjana RM, Mohan V. Role of lifestyle factors in the epidemic of diabetes: lessons learnt from India. *Eur J Clin Nutr*. 2017 Apr 19. doi: 10.1038/ejcn.2017.19.

Dehghan A, Bis JC, White CC, Smith AV, Morrison AC, Cupples LA, Trompet S, Chasman DI, Lumley T, Völker U, Buckley BM, Ding J, Jensen MK, Folsom AR, Kritchevsky SB, Girman CJ, Ford I, Dörr M, Salomaa V, Uitterlinden AG, Eiriksdottir G, Vasan RS, Franceschini N, Carty CL, Virtamo J, Demissie S, Amouyel P, Arveiler D, Heckbert SR, Ferrières J, Ducimetière P, Smith NL8, Wang YA, Siscovick DS, Rice KM, Wiklund PG, Taylor KD, Evans A, Kee F, Rotter JI, Karvanen J, Kuulasmaa K, Heiss G, Kraft P, Launer LJ, Hofman A, Markus MR, Rose LM, Silander K, Wagner P, Benjamin EJ, Lohman K, Stott DJ, Rivadeneira F, Harris TB, Levy D, Liu Y, Rimm EB, Jukema JW, Völzke H, Ridker PM, Blankenberg S, Franco OH, Gudnason V, Psaty BM, Boerwinkle E, O'Donnell CJ. Genome-wide association study for incident myocardial infarction and coronary heart disease in prospective cohort studies: The CHARGE Consortium. *PLoS One*. 2016 Mar 7; 11(3): e0144997.

DellaPenna D. Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science*. 1999; 285: 375-9.

Demerath EW, Lutsey PL, Monda KL, Linda Kao WH, Bressler J, Pankow JS, North KE, Folsom AR. Interaction of FTO and physical activity level on adiposity in African-American and European-American adults: the ARIC Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Sep; 19(9): 1866-72.

Departamento de Agricultura de EEUU/United States Department of Agriculture (USDA). Guía dietética para americanos [en línea]. 1995. [Consultado 29 de Octubre de 2015]. Disponible en: <http://origin.www.cnpp.usda.gov/Publications/DietaryGuidelines/1995/1995DGConsumerBrochure.pdf>.

Departamento de Agricultura de EEUU/United States Department of Agriculture (USDA). Guía dietética para americanos [en línea]. Enero 2005. [Consultado 29 de Octubre de 2015]. Disponible en: http://health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/pdf/dga_2005.pdf.

Dernini S, Berry EM. Mediterranean diet: from a healthy diet to a sustainable dietary pattern. *Front Nutr*. 2015 May 7; 2: 15.

Dernini S, Berry EM, Serra-Majem L, La Vecchia C, Capone R, Medina FX, Aranceta-Bartrina J, Belahsen R, Burlingame B, Calabrese G, Corella D, Donini LM, Lairon D, Meybeck A, Pekcan AG, Piscopo S, Yngve A, Trichopoulou A. Med Diet 4.0: the Mediterranean diet with four sustainable benefits. *Public Health Nutr*. 2017 May; 20(7): 1322-1330.

Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Beguinot F, Raciti GA. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. *J Endocrinol Invest*. 2016 Oct; 39(10): 1095-103.

Di Daniele N, Noce A, Vidiri MF, Moriconi E, Marrone G, Annicchiarico-Petruzzelli M, D'Urso G, Tesauro M, Rovella V, De Lorenzo A. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget*. 2017 Jan 31; 8(5): 8947-8979.

Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*. 2001; 31: 1106-21.

Dietz WH, Robinson TN. Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents. *J Pediatr*. 1998; 132: 191-3.

Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug; 93 Suppl 1: S52-9.

Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoq C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 2007 Jun; 39(6): 724-6.

Ding Y, Guo ZR, Wu M, Chen Q, Yu H, Luo WS. Gene-gene interaction between PPAR δ and PPAR γ is associated with abdominal obesity in a Chinese population. *J Genet Genomics*. 2012 Dec 20; 39(12): 625-31.

Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *Eur J Clin Nutr*. 2017 May 10; doi: 10.1038/ejcn.2017.58.

Dlouha D, Pitha J, Lanska V, Hubacek JA. Association between FTO 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. *Clin Chim Acta*. 2012 Aug 16; 413(15-16): 1222-5.

Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho MD, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications*. 2015 Dec 18; pii: S1056-8727(15)00507-3.

Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(2): 98-107.

Donini LM, Dernini S, Lairon D, Serra-Majem L, Amiot MJ, Del Balzo V, Giusti AM, Burlingame B, Belahsen R, Maiani G, Polito A, Turrini A, Intorre F, Trichopoulou A, Berry EM. A consensus proposal for nutritional indicators to assess the sustainability of a healthy diet: the Mediterranean diet as a case study. *Front Nutr*. 2016 Aug 29; 3: 37.

Doo M, Kim Y. Obesity: interactions of genome and nutrients intake. *Prev Nutr Food Sci*. 2015 Mar; 20(1): 1-7.

Dorresteyn JA, Visseren FL, Spiering W. Mechanisms linking obesity to hypertension. *Obes Rev*. 2012 Jan; 13(1): 17-26.

Dresner AI, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999 Jan; 103(2): 253-9.

Drineas P, Lewis J, Paschou P. Inferring geographic coordinates of origin for Europeans using small panels of ancestry informative markers. *PLoS One*. 2010 Aug 18; 5(8): e11892.

Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Dec; 92(6): 707-15.

Droyvold WB, Midthjell K, Nilsen TI, Holmen J. Change in body mass index and its impact on blood pressure: a prospective population study. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Jun; 29(6): 650-5.

Dubern B, Clément K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie*. 2012; 94: 2111–2115.

Duvivier BM, Schaper NC, Bremers MA, van Crombrugge G, Menheere PP, Kars M, Savelberg HH. Minimal intensity physical activity (standing and walking) of longer duration improves insulin action and plasma lipids more than shorter periods of moderate to vigorous exercise (cycling) in sedentary subjects when energy expenditure is comparable. *PLoS One*. 2013; 8(2): e55542.

Dyson P. Low carbohydrate diets and type 2 diabetes: what is the latest evidence? *Diabetes Ther*. 2015 Dec; 6(4): 411-424.

Eaton CB, Nafziger AN, Strogatz DS, Pearson TA. Self reported physical activity in a rural county: A New York County health census. *Am J Public Health*. 1994; 84: 29-32.

Eckel RH, Depner CM, Perreault L, Markwald RR, Smith MR, McHill AW, Higgins J, Melanson EL, Wright KP Jr. Morning circadian misalignment during short sleep duration impacts insulin sensitivity. *Curr Biol*. 2015 Nov 16; 25(22): 3004-10.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-28.

Eckel RH, Kahn R, Robertson RM, Rizza RA. Preventing cardiovascular disease and diabetes: a call to action from the American Diabetes Association and the American Heart Association. *Diabetes Care*. 2006; 29: 1697-9.

Eckel RH, Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *AHA Nutrition Committee. Circulation*. 1998; 97: 2099-100.

Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005; 308: 421-424.

Edwards TL, Velez Edwards DR, Villegas R, Cohen SS, Buchowski MS, Fowke JH, Schlundt D, Long J, Cai Q, Zheng W, Shu XO, Hargreaves MK, Smith J, Williams SM, Signorello LB, Blot WJ, Matthews CE. HTR1B, ADIPOR1, PPARGC1A, and CYP19A1 and obesity in a cohort of Caucasians and African Americans: an evaluation of gene-environment interactions and candidate genes. *Am J Epidemiol*. 2012 Jan 1; 175(1): 11-21.

Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, Nadeau JH. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet*. 2010 Jun; 11(6): 446-50.

Elbers CC, Guo Y, Tragante V, van Iperen EP, Lanktree MB, Castillo BA, Chen F, Yanek LR, Wojczynski MK, Li YR, Ferwerda B, Ballantyne CM, Buxbaum SG, Chen YD, Chen WM, Cupples LA, Cushman M, Duan Y, Duggan D, Evans MK, Fernandes JK, Fornage M, Garcia M, Garvey WT, Glazer N, Gomez F, Harris TB, Halder I, Howard VJ, Keller MF, Kamboh MI, Kooperberg C, Kritchevsky SB, LaCroix A, Liu K, Liu Y, Musunuru K, Newman AB, Onland-Moret NC, Ordovas J, Peter I, Post W, Redline S, Reis SE, Saxena R, Schreiner PJ, Volcik KA, Wang X, Yusuf S, Zonderland AB, Anand SS, Becker DM, Psaty B, Rader DJ, Reiner AP, Rich SS, Rotter JI, Sale MM, Tsai MY, Borecki IB, Hegele RA, Kathiresan S, Nalls MA, Taylor HA Jr, Hakonarson H,

Sivapalaratnam S, Asselbergs FW, Drenos F, Wilson JG, Keating BJ. Gene-centric meta-analysis of lipid traits in African, East Asian and Hispanic populations. *PLoS One*. 2012; 7(12): e50198.

Elizondo-Armendáriz JJ, Guillén Grima F, Aguinaga Ontoso I. Prevalencia de actividad física y su relación con variables sociodemográficas y estilos de vida en la población de 18 a 65 años de Pamplona. *Rev Esp Salud Publica*. 2005; 79: 559-67.

Elliott HR, Walia GK, Duggirala A, Groom A, Reddy SU, Chandak GR, Gupta V, Laakso M, Dekker JM; RISC Consortium, Walker M, Ebrahim S, Smith GD, Relton CL. Migration and DNA methylation: a comparison of methylation patterns in type 2 diabetes susceptibility genes between indians and europeans. *J Diabetes Res Clin Metab*. 2013; 2: 6.

Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish men. The MARATHOM investigators. *Am J Epidemiol*. 1994; 139: 1197-209.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*. 2000 May 26; 275(21): 15985-91.

Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa-Kobayashi K, Tomura S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum Genet*. 2002 Dec; 111(6): 570-2.

Engeland A, Bjorge T, Sogaard AJ, Tverdal A. Body mass index in adolescence in relation to total mortality: 32-year follow-up of 227,000 Norwegian boys and girls. *Am J Epidemiol*. 2003; 157: 517-23.

Enoch MA, Shen PH, Xu K, Hodgkinson C, Goldman D. Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification. *J Psychopharmacol*. 2006 Jul; 20(4 Suppl): 19-26.

Escribano García S, Vega Alonso AT, Lozano Alonso J, Alamo Sanz R, Lleras Muñoz S, Castrodeza Sanz J, Gil Costa M; Study of cardiovascular risk in Castile and Leon, Spain. Obesity in Castile and Leon, Spain: epidemiology and association with other cardiovascular risk factors. *Rev Esp Cardiol*. 2011; 64: 63-6.

Espelt A, Borrell C, Palència L, Goday A, Spadea T, Gnani R, Font-Ribera L, Kunst AE. Socioeconomic inequalities in the incidence and prevalence of type 2 diabetes mellitus in Europe. *Gac Sanit*. 2013 Nov-Dec; 27(6): 494-501.

Esposito K, Giugliano D. Mediterranean diet and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014 Mar; 30 Suppl 1: 34-40.

Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Fitó M, Chiva-Blanch G, Fiol M, Gómez-Gracia E, Arós F, Lapetra J, Serra-Majem L, Pintó X, Buil-Cosiales P, Sorlí JV, Muñoz MA, Basora-Gallisá J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Mir M, Ros E, PREDIMED Study Investigators. Effect of a high-fat Mediterranean diet on bodyweight and waist circumference: a prespecified secondary outcomes analysis of the PREDIMED randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016 Aug; 4(8): 666-76.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA, PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med.* 2013; 368(14) :1279–90.

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Ensembl genome browser 88. Hinxton: The Ensembl project; 2009- [actualizada marzo 2017; acceso diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.ensembl.org/index.html>.

Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013 Feb; 27(1): 73-83.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-97.

Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res.* 2002 Dec 15; 62(24): 7213-8.

Falconer CL, Page AS, Andrews R, Cooper AR. The potential impact of displacing sedentary time in adults with type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 2015 Oct; 47(10): 2070-5.

Fändriks L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. *J Intern Med.* 2017 Apr; 281(4): 319-336.

Farooqi IS, O'Rahilly S. New advances in the genetics of early onset obesity. *Int J Obes (Lond).* 2005 Oct; 29(10): 1149-52. (a)

Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med.* 2005; 56: 443-458. (b)

Federación internacional de diabetes/The International Diabetes Federation (IDF). *Diabetes Atlas* [en línea]. 2014. [Consultado 10 de Julio 2015]. Disponible en: <www.idf.org/diabetesatlas> (a)

Federación internacional de diabetes/The International Diabetes Federation (IDF). *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome* [en línea]. 2014. [Consultado el 20 de agosto 2015]. Disponible en: <http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Metasyndrome_definition.pdf> (b)

Federación internacional de obesidad/International Obesity Task Force (IOTF). Mapa mundial de obesidad [en línea]. 10 de Octubre de 2015. [Consultado el 15 de Julio 2015]. Disponible en: <<http://www.worldobesity.org/resources/world-map-obesity/>>

Feero WG. Introducing "Genomics and precision health". *JAMA*. 2017 May 9; 317(18): 1842-1843.

Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res*. 2006 Aug 30; 600(1-2): 46-57.

Fejerman L, Romieu I, John EM, Lazcano-Ponce E, Huntsman S, Beckman KB, Pérez-Stable EJ, González Burchard E, Ziv E, Torres-Mejía G. European ancestry is positively associated with breast cancer risk in Mexican women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Apr; 19(4): 1074-82.

Fernández JM, Rosado-Álvarez D, Da Silva Grigoletto ME, Rangel-Zúñiga OA, Landaeta-Díaz LL, Caballero-Villarraso J, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Fuentes-Jiménez F. Moderate-to-high-intensity training and a hypocaloric Mediterranean diet enhance endothelial progenitor cells and fitness in subjects with the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123: 361-73.

Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, Perez-Bauer M, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Martín-Moreno JM. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br J Nutr*. 2010; 103: 1808-16.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(5): 3117-32.

Fernandez-Valverde SL, Taft RJ, Mattick JS. MicroRNAs in β -cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes*. 2011 Jul; 60(7): 1825-31.

Ferrannini E, Cushman WC. Diabetes and hypertension: the bad companions. *Lancet*. 2012 Aug 11; 380(9841): 601-10.

Ferro-Luzzi A, James WP, Kafatos A. The high-fat Greek diet: a recipe for all? *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56: 796-809.

Field AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, Dietz WH, Rimm E, Colditz GA. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med*. 2001; 161: 1581-6.

Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogon JG, Pan L, Sherry B, Dietz W. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med*. 2012 Jun; 42(6): 563-70.

Fisher E, Boeing H, Fritsche A, Doering F, Joost HG, Schulze MB. Whole-grain consumption and transcription factor-7-like 2 (TCF7L2) rs7903146: gene-diet interaction in modulating type 2 diabetes risk. *Br J Nutr*. 2009 Feb; 101(4): 478-81.

Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G, Estruch R, de la Torre R, Francés F, Cabezas C, López-Sabater Mdel C, Marrugat J, García-Arellano A, Arós F, Ruiz-Gutierrez V, Ros E, Salas-Salvado J, Fiol M, Solá R, Covas MI, PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med.* 2007 Jun 11; 167(11): 1195-203.

Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2013; 309: 71-82.

Flores C, Ma SF, Pino-Yanes M, Wade MS, Pérez-Méndez L, Kittles RA, Wang D, Papaiahgari S, Ford JG, Kumar R, Garcia JG. African ancestry is associated with asthma risk in African Americans. *PLoS One.* 2012; 7(1): e26807.

Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D, Diabetes Prevention Program Research Group. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 2006; 355: 241–50.

Flowers MT, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2008 Jun; 19(3): 248-56.

Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Dec; 28Suppl 4: 59-63.

Forouhi NG1, Wareham NJ1 Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon).* 2014 Dec; 42(12): 698-702.

Fox CS. Cardiovascular disease risk factors, type 2 diabetes mellitus, and the Framingham Heart Study. *Trends Cardiovasc Med.* 2010 Apr; 20(3): 90-5.

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 26; 102(30): 10604-9.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005 Apr; 37(4): 391-400.

Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* 2007 Aug; 23(8): 413-8.

Franks PW. Gene × environment interactions in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2011 Dec; 11(6): 552-61.

Franks PW, Pearson E, Florez JC. Gene-environment and gene-treatment interactions in type 2 diabetes: progress, pitfalls, and prospects. *Diabetes Care*. 2013 May; 36(5): 1413-21.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007; 316: 889-894.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan; 19(1): 92-105.

Frühbeck G, Sesma P, Burrell MA. PRDM16: the interconvertible adipo-myocyte switch. *Trends Cell Biol*. 2009 Apr; 19(4): 141-6.

Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J*. 2006 Nov; 70(11): 1437-42.

Funakoshi M, Azami Y, Matsumoto H, Ikota A, Ito K, Okimoto H, Shimizu N, Tsujimura F, Fukuda H, Miyagi C, Osawa S, Osawa R, Miura J. Socioeconomic status and type 2 diabetes complications among young adult patients in Japan. *PLoS One*. 2017 Apr 24; 12(4): e0176087.

Fundación Dieta Mediterránea. La pirámide de la dieta mediterránea [en línea]. 2010. [Consultado 2 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://dietamediterranea.com/nutricion-saludable-ejercicio-fisico/#piramide>.

Funtikova AN, Benítez-Arciniega AA, Gomez SF, Fitó M, Elosua R, Schröder H. Mediterranean diet impact on changes in abdominal fat and 10-year incidence of abdominal obesity in a Spanish population. *Br J Nutr*. 2014 Apr 28; 111(8): 1481-7.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 Dec; 114(12): 1752-61.

Füzéki E, Engeroff T, Banzer W. Health benefits of light-intensity physical activity: a systematic review of accelerometer data of the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Sports Med*. 2017 Apr 10; doi: 10.1007/s40279-017-0724-0.

Gabriel R, Alonso M, Segura A, Tormo MJ, Artigao LM, Banegas JR, Brotons C, Elosua R, Fernández-Cruz A, Muñoz J, Reviriego B, Rigo F, ERICE Cooperative Group. Prevalence, geographic distribution and geographic variability of major cardiovascular risk factors in Spain. Pooled analysis of data from population-based epidemiological studies: the ERICE Study. *Rev Esp Cardiol*. 2008 Oct; 61(10): 1030-40.

Gale EA, Gillespie KM. Diabetes and gender. *Diabetologia*. 2001 Jan; 44(1): 3-15.

Galve E, Guijarro-Herraiz C, Masana-Marin L, Cordero-Fort A. Consenso sobre los objetivos y pautas de actuación en el control del colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad en pacientes de muy alto riesgo cardiovascular. *Clin Investig Arterioscler*. 2016 Jan-Feb; 28(1): 31-42.

Garasia S, Samaan Z, Gerstein HC, Engert JC, Mohan V, Diaz R, Anand SS, Meyre D. Influence of depression on genetic predisposition to type 2 diabetes in a multiethnic longitudinal study. *Sci Rep*. 2017 May 9; 7(1): 1629.

Garaulet M, Gómez-Abellán P, Rubio-Sastre P, Madrid JA, Saxena R, Scheer FA. Common type 2 diabetes risk variant in MTNR1B worsens the deleterious effect of melatonin on glucose tolerance in humans. *Metabolism*. 2015 Dec; 64(12): 1650-7.

Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, Lai CQ, Ordovas JM. CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 2009 Dec; 90(6): 1466-75.

Garaulet M, Ordovas JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Dec; 34(12): 1667-83.

Garelnabi M, Lor K, Jin J, Chai F, Santanam N. The paradox of ApoA5 modulation of triglycerides: evidence from clinical and basic research. *Clin Biochem*. 2013 Jan; 46(1-2): 12-9.

Gasevic D, Ross ES, Lear SA. Ethnic Differences in Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review of North American Evidence. *Can J Cardiol*. 2015 Jun 25; pii: S0828-282X(15)00473-0.

Gaulton KJ, Ferreira T, Lee Y, Raimondo A, Mägi R, Reschen ME, Mahajan A, Locke A, Rayner NW, Robertson N, Scott RA, Prokopenko I, Scott LJ, Green T, Sparso T, Thuillier D, Yengo L, Grallert H, Wahl S, Frånberg M, Strawbridge RJ, Kestler H, Chheda H, Eisele L, Gustafsson S, Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Qi L, Karssen LC, van Leeuwen EM, Willems SM, Li M, Chen H, Fuchsberger C, Kwan P, Ma C, Linderman M, Lu Y, Thomsen SK, Rundle JK, Beer NL, van de Bunt M, Chalisey A, Kang HM, Voight BF, Abecasis GR, Almgren P, Baldassarre D, Balkau B, Benediktsson R, Blüher M, Boeing H, Bonnycastle LL, Bottinger EP, Burtt NP, Carey J, Charpentier G, Chines PS, Cornelis MC, Couper DJ, Crenshaw AT, van Dam RM, Doney AS, Dorkhan M, Edkins S, Eriksson JG, Esko T, Eury E, Fadista J, Flannick J, Fontanillas P, Fox C, Franks PW, Gertow K, Gieger C, Gigante B, Gottesman O, Grant GB, Grarup N, Groves CJ, Hassinen M, Have CT, Herder C, Holmen OL, Hreidarsson AB, Humphries SE, Hunter DJ, Jackson AU, Jonsson A,

Jørgensen ME, Jørgensen T, Kao WH, Kerrison ND, Kinnunen L, Klopp N, Kong A, Kovacs P, Kraft P, Kravic J, Langford C, Leander K, Liang L, Lichtner P, Lindgren CM, Lindholm E, Linneberg A, Liu CT, Lobbens S, Luan J, Lyssenko V, Männistö S, McLeod O, Meyer J, Mihailov E, Mirza G, Mühleisen TW, Müller-Nurasyid M, Navarro C, Nöthen MM, Oskolkov NN, Owen KR, Palli D, Pechlivanis S, Peltonen L, Perry JR, Platou CG, Roden M, Ruderfer D, Rybin D, van der Schouw YT, Sennblad B, Sigurdsson G, Stančáková A, Steinbach G, Storm P, Strauch K, Stringham HM, Sun Q, Thorand B, Tikkanen E, Tonjes A, Trakalo J, Tremoli E, Tuomi T, Wennauer R, Wiltshire S, Wood AR, Zeggini E, Dunham I, Birney E, Pasquali L, Ferrer J, Loos RJ, Dupuis J, Florez JC, Boerwinkle E, Pankow JS, van Duijn C, Sijbrands E, Meigs JB, Hu FB, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Lakka TA, Rauramaa R, Stumvoll M, Pedersen NL, Lind L, Keinanen-Kiukkaanniemi SM, Korpi-Hyövälti E, Saaristo TE, Saltevo J, Kuusisto J, Laakso M, Metspalu A, Erbel R, Jöcke KH, Moebus S, Ripatti S, Salomaa V, Ingelsson E, Boehm BO, Bergman RN, Collins FS, Mohlke KL, Koistinen H, Tuomilehto J, Hveem K, Njølstad I, Deloukas P, Donnelly PJ, Frayling TM, Hattersley AT, de Faire U, Hamsten A, Illig T, Peters A, Cauchi S, Sladek R, Froguel P, Hansen T, Pedersen O, Morris AD, Palmer CN, Kathiresan S, Melander O, Nilsson PM, Groop LC, Barroso I, Langenberg C, Wareham NJ, O'Callaghan CA, Gloyn AL, Altshuler D, Boehnke M, Teslovich TM, McCarthy MI, Morris AP, DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet.* 2015 Dec; 47(12): 1415-25.

Gaziano JM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Breslow JL, Buring JE. Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circulation.* 1997 Oct 21; 96(8): 2520-5.

Gémes K, Janszky I, Laugsand LE, László KD, Ahnve S, Vatten LJ, Mukamal KJ. Alcohol consumption is associated with a lower incidence of acute myocardial infarction: results from a large prospective population-based study in Norway. *J Intern Med.* 2015 Sep 14; doi: 10.1111/joim.12428.

Gendered Innovations Project. Nutrigenomics: analyzing factors intersecting with sex and gender [en línea]. Stanford University (EEUU), 2003. [Consultado el 13 de Mayo 2017]. Disponible en: <http://genderedinnovations.stanford.edu>.

Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P, Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160–3167.

Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O'Rahilly S, Schofield CJ. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science.* 2007 Nov 30; 318(5855): 1469-72.

Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Faliva MA, Gerbi V, La Vecchia C, Negri E, Opizzi A, Perna S, Pezzotti M, Rondanelli M. Mediterranean way of drinking and longevity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014 Sep 10. [Epub previa publicación].

- Gimble JM, Floyd ZE. Fat circadian biology. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Nov; 107(5): 1629-37.
- Gimenes C, Gimenes R, Rosa CM, Xavier NP, Campos DH, Fernandes AA, Cezar MD, Guirado GN, Cicogna AC, Takamoto AH, Okoshi MP, Okoshi K. Low intensity physical exercise attenuates cardiac remodeling and myocardial oxidative stress and dysfunction in diabetic rats. *J Diabetes Res*. 2015; 2015: 457848.
- Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration (BMI Mediated Effects), Lu Y, Hajifathalian K, Ezzati M, Woodward M, Rimm EB, Danaei G. Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants. *Lancet* 2014 Mar 15; 383(9921): 970-83.
- Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD, Lillycrop KA, Burdge GC, McLean C, Rodford J, Slater-Jefferies JL, Garratt E, Crozier SR, Emerald BS, Gale CR, Inskip HM, Cooper C, Hanson MA. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes*. 2011 May; 60(5): 1528-34.
- González-Albarrán O, García-Robles R. Obesidad como factor de riesgo cardiovascular. Obesidad, la epidemia del siglo XXI. Madrid: internacional de ediciones y publicaciones. 1999; 12: 191-209.
- González-Gross M, Meléndez A. Sedentarism, active lifestyle and sport: impact on health and obesity prevention. *Nutr Hosp*. 2013 Sep; 28 Suppl 5: 89-98.
- González-Jiménez E, Aguilar Cordero MJ, Padilla López CA, García García I. Monogenic human obesity: role of the leptin-melanocortin system in the regulation of food intake and body weight in humans. *An Sist Sanit Navar*. 2012 May-Aug; 35(2): 285-93.
- González-Sánchez JL, Zabena C, Martínez-Larrad MT, Martínez-Calatrava MJ, Pérez-Barba M, Serrano-Ríos M. Variant rs9939609 in the FTO gene is associated with obesity in an adult population from Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Mar; 70(3): 390-3.
- Goodman-Gruen D, Barrett-Connor E. Sex differences in the association of endogenous sex hormone levels and glucose tolerance status in older men and women. *Diabetes Care*. 2000 Jul; 23(7): 912-8.
- Gore MO, McGuire DK, Lingvay I, Rosenstock J. Predicting cardiovascular risk in type 2 diabetes: the heterogeneity challenges. *Curr Cardiol Rep*. 2015 Jul; 17(7): 607.
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdóttir E, Jonsdóttir T, Gudmundsdóttir T, Gylfason A, Saemundsdóttir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdóttir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006; 38: 320–323.

Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Clausen JO, Rasmussen SS, Jørgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Schmitz O, Hansen T, Pedersen O. Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies. *Diabetes*. 2007 Dec; 56(12): 3105-11.

Graves P, Zeng Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012 Oct; 10(5): 239-45.

Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam ALR, Keogh JM. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 2006; 55: 3366-3371.

Greenberg JA. Obesity and early mortality in the United States. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Feb; 21(2): 405-12.

Gregersen I, Holm S, Dahl TB, Halvorsen B, Aukrust P. A focus on inflammation as a major risk factor for atherosclerotic cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016 Mar; 14(3): 391-403.

Groop L, Pociot F. Genetics of diabetes—are we missing the genes or the disease? *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jan 25; 382(1): 726-39.

Grotenfelt NE, Wasenius NS, Rönö K, Laivuori H, Stach-Lempinen B, Orho-Melander M, Schulz CA, Kautiainen H, Koivusalo SB, Eriksson JG. Interaction between rs10830963 polymorphism in MTNR1B and lifestyle intervention on occurrence of gestational diabetes. *Diabetologia*. 2016 Aug; 59(8): 1655-8.

Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Fernando Costa. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: executive summary. *Crit Pathw Cardiol*. 2005 Dec; 4(4): 198-203.

Guallar-Castillón P, Pérez RF, López García E, León-Muñoz LM, Aguilera MT, Graciani A, Gutiérrez-Fisac JL, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Magnitude and management of metabolic syndrome in Spain in 2008-2010: the ENRICA Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2014 May; 67(5): 367-73.

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Feb; 103(2): 137-49.

Guasch-Ferré M, Hu FB, Martínez-González MA, Fitó M, Bulló M, Estruch R, Ros E, Corella D, Recondo J, Gómez-Gracia E, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Muñoz MA, Pintó X, Lamuela-Raventós RM, Basora J, Buil-Cosiales P, Sorlí JV, Ruiz-Gutiérrez V, Martínez JA, Salas-Salvadó J.

Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.* 2014 May 13; 12: 78.

Guastadisegni MC, Lonoce A, Impera L, Di Terlizzi F, Fugazza G, Aliano S, Grasso R, Cluzeau T, Raynaud S, Rocchi M, Storlazzi CT. CBFA2T2 and C20orf112: two novel fusion partners of RUNX1 in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2010 Aug; 24(8): 1516-9.

Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms.* 2005 Oct; 20(5): 391-403.

Gum JR Jr, Crawley SC, Hicks JW, Szymkowski DE, Kim YS. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 1; 291(3): 466-75.

Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Nov; 27(11): 2276-83.

Gutiérrez-Fisac JL, Rodríguez Artalejo F, Guallar-Castillón P, BanegasBanegas JR, del Rey Calero J. Determinants of geographical variations in body mass index (BMI) and obesity in Spain. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 342-347.

Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA Study. *Obes Rev.* 2012 Apr; 13(4): 388-92.

Hadjivassiliou V, Green MH, James RF, Swift SM, Clayton HA, Green IC. Insulin secretion, DNA damage, and apoptosis in human and rat islets of Langerhans following exposure to nitric oxide, peroxy nitrite, and cytokines. *Nitric Oxide.* 1998; 2(6): 429-41.

Hafiane A, Genest J. High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clin.* 2015 Jan 31; 3: 175-88.

Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Noureddine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increase the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308: 419-421.

Hajek A, Lehnert T, Ernst A, Lange C, Wiese B, Prokein J, Weyerer S, Werle J, Pentzek M, Fuchs A, Luck T, Bickel H, Mösch E, Hesel K, Wagner M, Maier W, Scherer M, Riedel-Heller SG, Königfor HH theAgeCoDe Study Group. Prevalence and determinants of overweight and obesity in old age in Germany. *BMC Geriatrics.* 2015 Jul 14; 15: 83.

Hall KD, Sacks G, Chandramohan D, Chow CC, Wang YC, Gortmaker SL, Swinburn BA. Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight. *Lancet.* 2011 Aug 27; 378(9793): 826-37.

Halter JB, Musi N, McFarland Horne F, Crandall JP, Goldberg A, Harkless L, Hazzard WR, Huang ES, Kirkman MS, Plutzky J, Schmader KE, Ziemann S, High KP. Diabetes and cardiovascular disease in older adults: current status and future directions. *Diabetes*. 2014 Aug; 63(8): 2578-89.

Hannou SA, Wouters K, Paumelle R, Staels B. Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Apr; 26(4): 176-84.

HapMap. Recurso retirado el 16 de junio de 2016 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/news/NCBI_retiring_HapMap/). Disponible en: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/hapmap/>.

Hara K, Kadowaki T, Odawara M. Genes associated with diabetes: potential for novel therapeutic targets? *Expert Opin Ther Targets*. 2015 Oct 12: 1-13.

Hara M, Nakamura K, Nanri H, Nishida Y, Hishida A, Kawai S, Hamajima N, Kita Y, Suzuki S, Mantjoro EM, Ohnaka K, Uemura H, Matsui D, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H, Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Associations between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and increased body mass index and fasting glucose level in the Japanese general population. *J Epidemiol*. 2014; 24(5): 379-84.

Hara K, Shojima N, Hosoe J, Kadowaki T. Genetic architecture of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 19; 452(2): 213-20.

Harper CR, Jacobson TA. Beyond the Mediterranean diet: the role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Prev Cardiol*. 2003 Summer; 6(3): 136-46.

Harrington JM, Phillips CM. Nutrigenetics: bridging two worlds to understand type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2014 Apr; 14(4): 477.

Hartley T, Brumell J, Volchuk A. Emerging roles for the ubiquitin-proteasome system and autophagy in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jan; 296(1): E1-10.

Harvard University. El plato para comer saludable. [en línea] 2016. [Consultado 16 de Mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-eating-plate/>.

Hassapidou M, Tzotzas T, Makri E, Pagkalos I, Kaklamanos I, Kapantais E, Abrahamian A, Polymeris A, Tziomalos K. Prevalence and geographic variation of abdominal obesity in 7 and 9-year-old children in Greece; World Health Organization Childhood Obesity Surveillance Initiative 2010. *BMC Public Health*. 2017 Jan 28; 17(1): 126.

Hawley JA, Gibala MJ. What's new since Hippocrates? Preventing type 2 diabetes by physical exercise and diet. *Diabetologia*. 2012 Mar; 55(3): 535-9.

Hazelett DJ, Conti DV, Han Y, Al Olama AA, Easton D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Haiman CA, Coetzee GA. Reducing GWAS Complexity. *Cell Cycle*. 2016; 15(1): 22-4.

He F, Zuo L. Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci*. 2015 Nov 20; 16(11): 27770-80.

Heber D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr* 2010; 91 (1): 280S-283S.

Heidemann C, Hoffmann K, Spranger J, Klipstein-Grobusch K, Möhlig M, Pfeiffer AF, Boeing H, European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study cohort. A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study cohort. *Diabetologia*. 2005 Jun; 48(6): 1126-34.

Heijmans BT, Kremer D, Tobi EW, Boomsma DI, Slagboom PE. Heritable rather than age-related environmental and stochastic factors dominate variation in DNA methylation of the human IGF2/H19 locus. *Hum Mol Genet*. 2007 Mar 1; 16(5): 547-54.

Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 4; 105(44): 17046-9.

Heltberg A, Andersen JS, Kragstrup J, Siersma V, Sandholdt H, Ellervik C. Social disparities in diabetes care: a general population study in Denmark. *Scand J Prim Health Care*. 2017 Mar; 35(1): 54-63

Henson J, Dunstan DW, Davies MJ, Yates T. Sedentary behaviour as a new behavioural target in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016 Jan; 32 Suppl 1: 213-20.

Hernández Á, Castañer O, Elosua R, Pintó X, Estruch R, Salas-Salvadó J, Corella D, Arós F, Serra-Majem L, Fiol M, Ortega-Calvo M, Ros E, Martínez-González MÁ, de la Torre R, López-Sabater MC, Fitó M. Mediterranean diet improves high-density lipoprotein function in high-cardiovascular-risk individuals: a randomized controlled trial. *Circulation*. 2017 Feb 14; 135(7): 633-643.

Hession M, Rolland C, Kulkarni U, Wise A, Broom J. Systematic review of randomized controlled trials of low-carbohydrate vs. low-fat/low-calorie diets in the management of obesity and its comorbidities. *Obes Rev*. 2009; 10: 36-50.

Heymsfield SB, Allison DB, Wang ZM, Baumgartner RN, Ross R. Evaluation of total and regional body composition. En: Bray GA, Bouchard C, James WPT, editores. *Handbook of obesity*. Nueva York: Macel Dekker; 1998. p. 41-78. 43.

Hicke L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*. 1999 Mar; 9(3): 107-12.

Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A, Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami K, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metabolism*. 2015 Apr; 64(4): 489-97.

Hilawe EH, Yatsuya H, Li Y, Uemura M, Wang C, Chiang C, Toyoshima H, Tamakoshi K, Zhang Y, Kawazoe N, Aoyama A. Smoking and diabetes: is the association mediated by adiponectin, leptin, or C-reactive protein? *J Epidemiol.* 2015; 25(2): 99-109.

Hill SE, Bell C, Bowie JV, Kelley E, Furr-Holden D, LaVeist TA, Thorpe RJ Jr. Differences in obesity among men of diverse racial and ethnic background. *Am J Mens Health.* 2015; 1-6.

Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brönnner G, Müller TD, Grallert H, Illig T, Wichmann HE, Rief W, Schäfer H, Hebebrand J. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One.* 2007 Dec 26; 2(12): e1361.

Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Mar; 19(3): 297-310.

Holder Jr JL, Butte NF, Zinn AR. Profoundobesity associated with a balanced translocationthat disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 101-108.

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975 Jan 24; 187(4173): 226-32.

Horswell SD, Fryer LG, Hutchison CE, Zindrou D, Speedy HE, Town MM, Duncan EJ, Sivapackianathan R, Patel HN, Jones EL, Braithwaite A, Salm MP, Neuwirth CK, Potter E, Anderson JR, Taylor KM, Seed M, Betteridge DJ, Crook MA, Wierzbicki AS, Scott J, Naoumova RP, Shoulders CC. CDKN2B expression in adipose tissue of familial combined hyperlipidemia patients. *J Lipid Res.* 2013 Dec; 54(12): 3491-505.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14; 444(7121): 860-7.

Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Masuzaki H, Yoneda M, Nakajima A, Miyazaki S, Tokunaga K, Kawamoto M, Funahashi T, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Nakao K, Sakata T, Matsuzawa Y, Tanaka K, Kamatani N, Nakamura Y. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet.* 2008; 53(6): 546-53.

Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 2006 Nov; 17(9): 365-71.

Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care.* 2011 Jun; 34(6): 1249-57.

Hu GX, Chen GR, Xu H, Ge RS, Lin J. Activation of the AMP activated protein kinase by short-chain fatty acids is the main mechanism underlying the beneficial effect of a high fiber diet on the metabolic syndrome. *Med Hypotheses.* 2010 Jan; 74(1): 123-6.

Hu H, He ML, Tao R, Sun HY, Hu R, Zang WJ, Yuan BX, Lau CP, Tse HF, Li GR. Characterization of ion channels in human preadipocytes. *J Cell Physiol.* 2009 Feb; 218(2): 427-35.

Hu H, Huff CD, Yamamura Y, Wu X, Strom SS. The relationship between Native American ancestry, body mass index and diabetes risk among Mexican-Americans. *PLoS One.* 2015 Oct 26; 10(10): e0141260.

Hu WL, Li SJ, Liu DT, Wang Y, Niu SQ, Yang XC, Zhang Q, Yu SZ, Jin L, Wang XF. Genetic variants on chromosome 9p21 and ischemic stroke in Chinese. *Brain Res Bull.* 2009 Aug 14; 79(6): 431-5.

Hu Y, Xu XH, He K, Zhang LL, Wang SK, Pan YQ, He BS, Feng TT, Mao XM. Genome-wide analysis of DNA methylation variations caused by chronic glucolipotoxicity in beta-cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 Feb; 122(2): 71-8.

Huang P, Yin RX, Huang KK, Zeng XN, Guo T, Lin QZ, Wu J, Wu DF, Li H, Pan SL. Association of the KLF14 rs4731702 SNP and serum lipid levels in the Guangxi Mulao and Han populations. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 231515.

Hubacek JA, Lánská V, Skodová Z, Adámková V, Poledne R. Sex-specific interaction between APOE and APOA5 variants and determination of plasma lipid levels. *Eur J Hum Genet.* 2008 Jan; 16(1): 135-8.

Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983; 67(5): 968-977.

Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP, Thyfault JP, Stevens R, Dohm GL, Houmard JA, Muoio DM. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab.* 2005 Oct; 2(4): 251-61.

Imamura M, Maeda S. Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives. *Endocr J.* 2011; 58(9): 723-39.

Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, Grarup N, Zhao W, Wang X, Huerta-Chagoya A, Hu C, Moon S, Long J, Kwak SH, Rasheed A, Saxena R, Ma RC, Okada Y, Iwata M, Hosoe J, Shojima N, Iwasaki M, Fujita H, Suzuki K, Danesh J, Jørgensen T, Jørgensen ME, Witte DR, Brandslund I, Christensen C, Hansen T, Mercader JM, Flannick J, Moreno-Macías H, Burtt NP, Zhang R, Kim YJ, Zheng W, Singh JR, Tam CH, Hirose H, Maegawa H, Ito C, Kaku K, Watada H, Tanaka Y, Tobe K, Kawamori R, Kubo M, Cho YS, Chan JC, Sanghera D, Frossard P, Park KS, Shu XO, Kim BJ, Florez JC, Tusié-Luna T, Jia W, Tai ES, Pedersen O, Saleheen D, Maeda S, Kadowaki T. Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes. *Nat Commun.* 2016 Jan 28; 7: 10531.

Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 2005; 19: 333-41.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000 Nov; 49(11): 1939-45.

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct 27; 437(7063): 1299-320.

Instituto Nacional de Estadística. Instituto Nacional de Estadística (Spanish Statistical Office) [sede web]. Madrid: INE; 1998- [actualizada en 2017]. Disponible en <http://www.ine.es>.

InterAct Consortium, Romaguera D, Guevara M, Norat T, Langenberg C, Forouhi NG, Sharp S, Slimani N, Schulze MB, Buijsse B, Buckland G, Molina-Montes E, Sánchez MJ, Moreno-Iribas MC, Bendinelli B, Grioni S, van der Schouw YT, Arriola L, Beulens JW, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Cottet V, Crowe FL, de Lauzon-Guillan B, Franks PW, Gonzalez C, Hallmans G, Kaaks R, Key TJ, Khaw K, Nilsson P, Overvad K, Palla L, Palli D, Panico S, Quirós JR, Rolandsson O, Romieu I, Sacerdote C, Spijkerman AM, Teucher B, Tjonneland A, Tormo MJ, Tumino R, van der AD, Feskens EJ, Riboli E, Wareham NJ. Mediterranean diet and type 2 diabetes risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study: the InterAct project. *Diabetes Care*. 2011 Sep; 34(9): 1913-8.

Isensee J, Ruiz Noppinger P. Sexually dimorphic gene expression in mammalian somatic tissue. *Gend Med*. 2007; 4 Suppl B: S75-95.

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*. 1997; 16: 303-6.

Jacobsson JA, Risérus U, Axelsson T, Lannfelt L, Schiöth HB, Fredriksson R. The common FTO variant rs9939609 is not associated with BMI in a longitudinal study on a cohort of Swedish men born 1920-1924. *BMC Med Genet*. 2009 Dec 9; 10: 131.

James WPT. WHO recognition of the global obesity epidemic. *International Journal of Obesity* (2008) 32: 120-126.

Jang Y, Koh SJ, Kim OY, Kim BK, Choi D, Hyun YJ, Kim HJ, Chae JS, Lee JH. Effect of the 252A>G polymorphism of the lymphotoxin-alpha gene on inflammatory markers of response to cigarette smoking in Korean healthy men. *Clin Chim Acta*. 2007 Feb; 377(1-2): 221-7.

Janzon E, Hedblad B, Berglund G, Engström G. Changes in blood pressure and body weight following smoking cessation in women. *J. Intern. Med*. 2004; 255: 266-272.

Jee SH, Sull JW, Park J, Lee SY, Ohrr H, Guallar E, et al. Bodymass index and mortality in Korean men and women. *N Engl J Med.* 2006; 355: 779-87.

Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, Grunberger G, Guerin CK, Bell DSH, Mechanick JI, Pessah-Pollack R, Wyne K, Smith D, Brinton EA, Fazio S, Davidson M. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology guidelines for management of dyslipemia and prevention of cardiovascular disease. *Endocr Pract.* 2017 Apr; 23(Suppl 2): 1-87.

Jensen A, Løhr M, Eriksen L, Grønbaek M, Dorry E, Loft S, Møller P. Influence of the OGG1 Ser326Cys polymorphism on oxidatively damaged DNA and repair activity. *Free Radic Biol Med.* 2012 Jan 1; 52(1): 118-25.

Jia HY, Li QZ, Lv LF. Association between transcription factor 7-like 2 genetic polymorphisms and development of type 2 diabetes in a Chinese population. *Genet Mol Res.* 2016 Jun 10; 15(2).

Jiao H, Arner P, Hoffstedt J, Brodin D, Dubern B, Czernichow S, van't Hooft F, Axelsson T, Pedersen O, Hansen T, Sørensen TI, Hebebrand J, Kere J, Dahlman-Wright K, Hamsten A, Clement K, Dahlman I. Genome wide association study identifies KCNMA1 contributing to human obesity. *BMC Med Genomics.* 2011 Jun 28; 4: 51.

Jin TB, Ren Y, Shi X, Jiri M, He N, Feng T, Yuan D, Kang L. Genetic variations in the CLNK gene and ZNF518B gene are associated with gout in case-control sample sets. *Rheumatol Int.* 2015 Jul; 35(7): 1141-7.

Joseph AM, Adhietty PJ, Leeuwenburgh C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *J Physiol.* 2016 Sep 15; 594(18): 5105-23.

Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IM. Expression of Gq alpha and PLC-beta in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation.* 1998 Mar 10; 97(9): 892-9.

Jung CH, Choi KM. Impact of high-carbohydrate diet on metabolic parameters in patients with type 2 diabetes. *Nutrients.* 2017 Mar 24; 9(4). pii: E322. doi: 10.3390/nu9040322.

Kaburagi Y, Yamauchi T, Yamamoto-Honda R, Ueki K, Tobe K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. The mechanism of insulin-induced signal transduction mediated by the insulin receptor substrate family. *Endocr J.* 1999 Mar; 46 Suppl: S25-34.

Kagan A, Kannel WB, Dawber TR, Revotskie N. The coronary profile. *Ann N Y Acad Sci.* 1963; 97: 883-94.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000 Aug; 106(4): 473-81.

Kalmbach DA, Schneider LD, Cheung J, Bertrand SJ, Kariharan T, Pack AI, Gehrman PR. Genetic basis of chronotype in humans: insights from three landmark GWAS. *Sleep*. 2017 Feb 1; 40(2).

Kalnina I, Geldnere K, Tarasova L, Nikitina-Zake L, Peculis R, Fridmanis D, Pirags V, Klovins J. Stronger association of common variants in TCF7L2 gene with nonobese type 2 diabetes in the Latvian population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 Sep; 120(8): 466-8.

Kang JI, Park CI, Namkoong K, Kim SJ. Associations between polymorphisms in the NR1D1 gene encoding for nuclear receptor REV-ERB α and circadian typologies. *Chronobiol Int*. 2015 May; 32(4): 568-72.

Kang YS. Obesity associated hypertension: new insights into mechanism. *Electrolyte Blood Press*. 2013 Dec; 11(2): 46-52.

Kannel WB, Garrison RJ, Dannenberg AL. Secular blood pressure trends in normotensive persons. *Am Heart J*. 1993; 125: 1154-8.

Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. 1974 Jul; 34(1): 29-34.

Kannel WB, LeBauer EJ, Dawber TR, McNamara PM. Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham Study. *Circulation*. 1967; 35: 734-44.

Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979 May 11; 241(19): 2035-8.

Kaprio J. Science, medicine, and the future. Genetic epidemiology. *BMJ*. 2000 May 6; 320(7244): 1257-9.

Kar D, Gillies C, Zaccardi F, Webb D, Seidu S, Tesfaye S, Davies M, Khunti K. Relationship of cardiometabolic parameters in non-smokers, current smokers, and quitters in diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Nov 24; 15(1): 158.

Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J*. 2009 Oct; 276(20): 5747-54.

Karasawa S, Daimon M, Sasaki S, Toriyama S, Oizumi T, Susa S, Kameda W, Wada K, Muramatsu M, Fukao A, Kubota I, Kawata S, Kayama T, Kato T. Association of the common fat mass and obesity associated (FTO) gene polymorphism with obesity in a Japanese population. *Endocr J*. 2010; 57(4): 293-301.

Karmali KN, Persell SD, Perel P, Lloyd-Jones DM, Berendsen MA, Huffman MD. Risk scoring for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Mar 14; 3: CD006887.

Karstoft K, Pedersen BK. Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2016 Feb; 94(2): 146-50.

Karvanen J, Silander K, Kee F, Tiret L, Salomaa V, Kuulasmaa K, Wiklund PG, Virtamo J, Saarela O, Perret C, Perola M, Peltonen L, Cambien F, Erdmann J, Samani NJ, Schunkert H, Evans A, MORGAM Project. The impact of newly identified loci on coronary heart disease, stroke and total mortality in the MORGAM prospective cohorts. *Genet Epidemiol.* 2009 Apr; 33(3): 237-46.

Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Mar 15; 57(11): 1299-313.

Kaur Y, de Souza RJ, Gibson WT, Meyre D. A systematic review of genetic syndromes with obesity. *Obes Rev.* 2017 Jun; 18(6): 603-634.

Kawamata N, Pennella MA, Woo JL, Berk AJ, Koeffler HP. Dominant-negative mechanism of leukemogenic PAX5 fusions. *Oncogene.* 2012 Feb 23; 31(8): 966-77.

Kawano H, Nakatani T, Mori T, Ueno S, Fukaya M, Abe A, Kobayashi M, Toda F, Watanabe M, Matsuoka I. Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins, BRINP family. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Jun 18; 125(1-2): 60-75.

Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM, Tsao PS. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 23; 16(10): 25234-63.

Kazakova EV, Wu Y, Zhou Z, Chen M, Wang T, Tong H, Zhuang T, Sun L, Qiao H. Association between UBE2E2 variant rs7612463 and type 2 diabetes mellitus in a Chinese Han population. *Acta Biochim Pol.* 2015; 62(2): 241-5.

Keane KN, Calton EK, Carlessi R, Hart PH, Newsholme P. The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2017 Apr 12. doi: 10.1038/ejcn.2017.45.

Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ, Framingham Study. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 434-9.

Kearney PM, Blackwell L, Collins R, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet.* 2008; 371(9607): 117-125.

Keys A, Aravanis C, Blackburn HW, Van Buchem FS, Buzina R, Djordjević BD, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Lekos D, Monti M, Puudu V, Taylor HL. Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. *Acta Med Scand Suppl.* 1966; 460: 1-392.

Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis.* 1972; 25: 329-43.

Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol.* 1986 Dec; 124(6): 903-15.

Khazrai YM, Defeudis G, Pozzilli P. Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014 Mar; 30 Suppl 1: 24-33.

Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. Scope and strategies of genetic epidemiology: analysis of articles published in genetic epidemiology, 1984-1991. *Genet Epidemiol.* 1993; 10(5): 321-9.

Kikkawa T, Obayashi T, Takahashi M, Fukuzaki-Dohi U, Numayama-Tsuruta K, Osumi N. Dmrt1 regulates proneural gene expression downstream of Pax6 in the mammalian telencephalon. *Genes Cells.* 2013 Aug; 18(8): 636-49.

Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci.* 2002 May; 27(5): 235-41.

Kile BT, Viney EM, Willson TA, Brodnicki TC, Cancilla MR, Herlihy AS, Croker BA, Baca M, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Cloning and characterization of the genes encoding the ankyrin repeat and SOCS box-containing proteins Asb-1, Asb-2, Asb-3 and Asb-4. *Gene.* 2000 Nov 27; 258(1-2): 31-41.

Kilic ID, Dodurga Y, Uludag B, Alihanoglu YI, Yildiz BS, Enli Y, Secme M, Bostancı HE. MicroRNA -143 and -223 in obesity. *Gene.* 2015 Apr 15; 560(2): 140-2.

Kilpeläinen TO, Lakka TA, Laaksonen DE, Laukkanen O, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Aunola S, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M, Finnish Diabetes Prevention Study Group. Physical activity modifies the effect of SNPs in the SLC2A2 (GLUT2) and ABCC8 (SUR1) genes on the risk of developing type 2 diabetes. *Physiol Genomics.* 2007 Oct 22; 31(2): 264-72.

Kilpeläinen TO, Zillikens MC, Stančáková A, Finucane FM, Ried JS, Langenberg C, Zhang W, Beckmann JS, Luan J, Vandenput L, Styrkarsdóttir U, Zhou Y, Smith AV, Zhao JH, Amin N, Vedantam S, Shin SY, Haritunians T, Fu M, Feitosa MF, Kumari M, Halldorsson BV, Tikkanen E, Mangino M, Hayward C, Song C, Arnold AM, Aulchenko YS, Oostra BA, Campbell H, Cupples LA, Davis KE, Döring A, Eiriksdóttir G, Estrada K, Fernández-Real JM, Garcia M, Gieger C, Glazer NL, Guiducci C, Hofman A, Humphries SE, Isomaa B, Jacobs LC, Jula A, Karasik D, Karlsson MK, Khaw KT, Kim LJ, Kivimäki M, Klopp N, Kühnel B, Kuusisto J, Liu Y, Ljunggren O, Lorentzon M, Luben RN, McKnight B, Mellström D, Mitchell BD, Mooser V, Moreno JM, Männistö S, O'Connell JR, Pascoe L, Peltonen L, Peral B, Perola M, Psaty BM, Salomaa V, Savage DB, Semple RK, Skaric-Juric T, Sigurdsson G, Song KS, Spector TD, Syvänen AC, Talmud PJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Vidal-Puig A, Wild SH, Wright AF, Clegg DJ,

Schadt E, Wilson JF, Rudan I, Ripatti S, Borecki IB, Shuldiner AR, Ingelsson E, Jansson JO, Kaplan RC, Gudnason V, Harris TB, Groop L, Kiel DP, Rivadeneira F, Walker M, Barroso I, Vollenweider P, Waeber G, Chambers JC, Kooner JS, Soranzo N, Hirschhorn JN, Stefansson K, Wichmann HE, Ohlsson C, O'Rahilly S, Wareham NJ, Speliotes EK, Fox CS, Laakso M, Loos RJ. Genetic variation near IRS1 associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile. *Nat Genet.* 2011 Jun 26; 43(8): 753-60 (a).

Kilpeläinen TO, Qi L, Brage S, Sharp SJ, Sonestedt E, Demerath E, Ahmad T, Mora S, Kaakinen M, Sandholt CH, Holzapfel C, Autenrieth CS, Hyppönen E, Cauchi S, He M, Kutalik Z, Kumari M, Stančáková A, Meidtner K, Balkau B, Tan JT, Mangino M, Timpson NJ, Song Y, Zillikens MC, Jablonski KA, Garcia ME, Johansson S, Bragg-Gresham JL, Wu Y, van Vliet-Ostaptchouk JV, Onland-Moret NC, Zimmermann E, Rivera NV, Tanaka T, Stringham HM, Silbernagel G, Kanoni S, Feitosa MF, Snitker S, Ruiz JR, Metter J, Larrad MT, Atalay M, Hakanen M, Amin N, Cavalcanti-Proença C, Grøntved A, Hallmans G, Jansson JO, Kuusisto J, Kähönen M, Lutsey PL, Nolan JJ, Palla L, Pedersen O, Pérusse L, Renström F, Scott RA, Shungin D, Sovio U, Tammelin TH, Rönnemaa T, Lakka TA, Uusitupa M, Rios MS, Ferrucci L, Boucharde C, Meirhaeghe A, Fu M, Walker M, Borecki IB, Dedoussis GV, Fritsche A, Ohlsson C, Boehnke M, Bandinelli S, van Duijn CM, Ebrahim S, Lawlor DA, Gudnason V, Harris TB, Sørensen TI, Mohlke KL, Hofman A, Uitterlinden AG, Tuomilehto J, Lehtimäki T, Raitakari O, Isomaa B, Njølstad PR, Florez JC, Liu S, Ness A, Spector TD, Tai ES, Froguel P, Boeing H, Laakso M, Marmot M, Bergmann S, Power C, Khaw KT, Chasman D, Ridker P, Hansen T, Monda KL, Illig T, Jarvelin MR, Wareham NJ, Hu FB, Groop LC, Orholm-Melander M, Ekelund U, Franks PW, Loos RJ. Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesity risk: a meta-analysis of 218,166 adults and 19,268 children. *PLoS Med.* 2011 Nov; 8(11): e1001116 (b).

Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Feb; 66(4): 596-612.

Kim SH, Després JP, Koh KK. Obesity and cardiovascular disease: friend or foe? *Eur Heart J.* 2015 Dec 18; pii: ehv509.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006 Mar; 22(3): 165-73.

Kirkman MS, Briscoe VJ, Clark N, Florez H, Haas LB, Halter JB, Huang ES, Korytkowski MT, Munshi MN, Odegard PS, Pratley RE, Swift CS. Diabetes in older adults. *Diabetes Care.* 2012 Dec; 35(12): 2650-64.

Kitamoto S, Yamada N, Yokoyama S, Houjou I, Higashi M, Goto M, Batra SK, Yonezawa S. DNA methylation and histone H3-K9 modifications contribute to MUC17 expression. *Glycobiology.* 2011 Feb; 21(2): 247-56. doi: 10.1093/glycob/cwq155.

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308: 385-389.

Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006 Feb; 31(2): 89-97.

Klünder-Klünder M, Mejía-Benitez MA, Flores-Huerta S, Burguete-García AI, García-Mena J, Cruz M. rs12255372 variant of TCF7L2 gene is protective for obesity in Mexican children. *Arch Med Res.* 2011 Aug; 42(6): 495-501.

Knopp RH. Risk factors for coronary artery disease in women. *Am J Cardiol.* 2002 Jun 20; 89(12A): 28E-34E.

Knudson JD, Dincer UD, Zhang C, Swafford AN Jr, Koshida R, Picchi A, Focardi M, Dick GM, and Tune JD. Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289: 48–56.

Kobberling J, Tillil H. Empirical risk figures for the first-degree relatives of noninsulin-dependent diabetics. En: Kobberling J, Tattersall R, editores. *The genetics of diabetes mellitus.* London: Academic Press; 1982: 201-209

Kodama S, Tanaka S, Saito K, Shu M, Sone Y, Onitake F, Suzuki E, Shimano H, Yamamoto S, Kondo K, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007 May 28; 167(10): 999-1008.

Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 Jan-Feb; 18(1): 4-11.

Kong X, Xing X, Hong J, Zhang X, Yang W. Association of a type 2 diabetes genetic risk score with insulin secretion modulated by insulin sensitivity among Chinese Hans. *Clin Genet.* 2016 Jun 9; doi: 10.1111/cge.12817.

Kong Y, Sharma RB, Nwosu BU, Alonso LC. Islet biology, the CDKN2A/B locus and type 2 diabetes risk. *Diabetologia.* 2016 Aug; 59(8): 1579-93.

Kooner JS, Saleheen D, Sim X, Sehmi J, Zhang W, Frossard P, Been LF, Chia KS, Dimas AS, Hassanali N, Jafar T, Jowett JB, Li X, Radha V, Rees SD, Takeuchi F, Young R, Aung T, Basit A, Chidambaram M, Das D, Grundberg E, Hedman AK, Hydrie ZI, Islam M, Khor CC, Kowlessur S, Kristensen MM, Liju S, Lim WY, Matthews DR, Liu J, Morris AP, Nica AC, Pinidiyapathirage JM, Prokopenko I, Rasheed A, Samuel M, Shah N, Shera AS, Small KS, Suo C, Wickremasinghe AR, Wong TY, Yang M, Zhang F, DIAGRAM, MuTHER, Abecasis GR, Barnett AH, Caulfield M, Deloukas P, Frayling TM, Froguel P, Kato N, Katulanda P, Kelly MA, Liang J, Mohan V, Sanghera DK, Scott J, Seielstad M, Zimmet PZ, Elliott P, Teo YY, McCarthy MI, Danesh J, Tai ES, Chambers JC. Genome-wide association study in individuals of south Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat. Genet.* 2011; 43: 984-989.

Kong A, Steinthorsdottir V, Masson G, Thorleifsson G, Sulem P, Besenbacher S, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Kristinsson KT, Jonasdottir A, Frigge ML, Gylfason A, Olason PI, Gudjonsson SA, Sverrisson S, Stacey SN, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR, Sigurdsson H, Jonsson T, Benediktsson R, Olafsson JH, Johannsson OT, Hreidarsson AB, Sigurdsson G, DIAGRAM Consortium, Ferguson-Smith AC, Gudbjartsson DF, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature*. 2009 Dec 17; 462(7275): 868-74.

Kong X, Zhang X, Xing X, Zhang B, Hong J, Yang W. The association of type 2 diabetes loci identified in genome-wide association studies with metabolic syndrome and its components in a Chinese population with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2015 Nov 24; 10(11): e0143607.

Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, Erdman JW Jr, Kris-Etherton P, Goldberg IJ, Kotchen TA, Lichtenstein AH, Mitch WE, Mullis R, Robinson K, Wylie-Rosett J, St Jeor S, Suttie J, Tribble DL, Bazzarre TL. AHA Dietary guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000; 102: 2284-99.

Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenalin sufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 1998 ;9: 55-7.

Kulkarni A, Dangat K, Kale A, Sable P, Chavan-Gautam P, Joshi S. Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One*. 2011 Mar 10; 6(3): e17706.

Kumar N, Solt LA, Wang Y, Rogers PM, Bhattacharyya G, Kamenecka TM, Stayrook KR, Crumbley C, Floyd ZE, Gimble JM, Griffin PR, Burris TP. Regulation of adipogenesis by natural and synthetic REV-ERB ligands. *Endocrinology*. 2010 Jul; 151(7): 3015-25.

Kuntz B, Lampert T. Socioeconomic factors and obesity. *Dtsch Arztebl Int*. 2010 Jul; 107(30): 517-22.

Kuroiwa T, Yamamoto N, Onda T, Shibahara T. Expression of the FAM5C in tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2009 Nov; 22(5): 1005-11.

Kvandová M, Majzúnová M, Dovinová I. The role of PPARgamma in cardiovascular diseases. *Physiol Res*. 2016 Oct 24; 65(Supplementum 3): S343-S363.

La Fleur SE. Daily rhythms in glucose metabolism: suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *J Neuroendocrinol*. 2003 Mar; 15(3): 315-22.

Laber S, Cox RD. Mouse models of human GWAS hits for obesity and diabetes in the post genomic era: time for reevaluation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Feb 7; 8: 11.

Lahoz C, Mostaza JM. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60: 184- 95.

Lai CQ, Tai ES, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu YP, Adiconis X, Ordovas JM. The APOA5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res.* 2003 Dec; 44(12): 2365-73.

Laitinen S, Fontaine C, Fruchart JC, Staels B. The role of the orphan nuclear receptor Rev-Erb alpha in adipocyte differentiation and function. *Biochimie.* 2005 Jan; 87(1): 21-5.

Läll K, Mägi R, Morris A, Metspalu A, Fischer K. Personalized risk prediction for type 2 diabetes: the potential of genetic risk scores. *Genet Med.* 2017 Mar; 19(3): 322-329.

Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, Sowers J. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment—a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. *Obesity (Silver Spring).* 2013 Jan; 21(1): 8-24.

Lane JM, Chang AM, Bjonnes AC, Aeschbach D, Anderson C, Cade BE, Cain SW, Czeisler CA, Gharib SA, Gooley JJ, Gottlieb DJ, Grant SF, Klerman EB, Lauderdale DS, Lockley SW, Munch M, Patel S, Punjabi NM, Rajaratnam SM, Rueger M, St Hilaire MA, Santhi N, Scheuermaier K, Van Reen E, Zee PC, Shea SA, Duffy JF, Buxton OM, Redline S, Scheer FA, Saxena R. Impact of common diabetes risk variant in MTNR1B on sleep, circadian, and melatonin physiology. *Diabetes.* 2016 Jun; 65(6): 1741-51.

Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One.* 2010 Feb 5; 5(2): e9085.

Lasa A, Miranda J, Bulló M, Casas R, Salas-Salvadó J, Larretxi I, Estruch R, Ruiz-Gutiérrez V, Portillo MP. Comparative effect of two Mediterranean diets versus a low-fat diet on glycaemic control in individuals with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2014 Jul; 68(7): 767-72.

Lawless MW, O'Byrne KJ, Gray SG. Oxidative stress induced lung cancer and COPD: opportunities for epigenetic therapy. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep; 13(9A): 2800-21.

Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol.* 2007; 88: 85-94.

Le A, Judd SE, Allison DB, Oza-Frank R, Affuso O, Safford MM, Howard VJ, Howard G. The geographic distribution of obesity in the US and the potential regional differences in misreporting of obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2014 Jan; 22(1): 300-6.

Leavens KF, Birnbaum MJ. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2011 Jun; 46(3): 200-15.

Lee CG, Boyko EJ, Nielson CM, Stefanick ML, Bauer DC, Hoffman AR, Dam TL, Lapidus JA, MannenCawthon P, Ensrud KE, and Orwoll ES, for the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Group. Mortality risk in older men associated with changes in weight, lean mass and fat mass. *Am Geriatr Soc.* 2011 February ; 59(2): 233-240.

Lee CM, Huxley RR, Wildman RP, Woodward M. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol.* 2008 Jul; 61(7): 646-53.

Lee H, Ash GI, Angelopoulos TJ, Gordon PM, Moyna NM, Visich PS, Zoeller RF, Gordish-Dressman H, Deshpande V, Chen MH, Thompson PD, Hoffman EP, Devaney JM, Pescatello LS. Obesity-related genetic variants and their associations with physical activity. *Sports Med Open.* 2015; 1(1): 34.

Lee KW, Ayyobi AF, Frohlich JJ, Hill JS. APOA5 gene polymorphism modulates levels of triglyceride, HDL cholesterol and FERHDL but is not a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2004 Sep; 176(1): 165-72.

Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* 2013 Feb; 34(1): 1-11.

Lee YC, Lai CQ, Ordovas JM, Parnell LD. A database of gene-environment interactions pertaining to blood lipid traits, cardiovascular disease and type 2 diabetes. *J Data Mining Genomics Proteomics.* 2011 Jan 1; 2(1).

Lenard NR, Berthoud HR. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring).* 2008 Dec; 16 Suppl 3: S11-22.

Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes.* 2015 Oct 10; 6(13): 1246-58.

Leon AS, Sanchez O. Meta-analysis of the effects of aerobic exercise training on blood lipids. *Circulation.* 2001; 104: II-414–II-415.

León-Muñoz LM, Guallar-Castillón P, Graciani A, López-García E, Mesas AE, Aguilera MT, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Adherence to the Mediterranean diet pattern has declined in Spanish adults. *J Nutr.* 2012 Oct; 142(10): 1843-50.

Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Sep; 1790(9): 863-8.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a metaanalysis of individual datafor one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360: 1903–1913.

Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993 Nov 25; 366(6453): 362-5.

Li H, Kilpeläinen TO, Liu C, Zhu J, Liu Y, Hu C, Yang Z, Zhang W, Bao W, Cha S, Wu Y, Yang T, Sekine A, Choi BY, Yajnik CS, Zhou D, Takeuchi F, Yamamoto K, Chan JC, Mani KR, Been LF, Imamura M, Nakashima E, Lee N, Fujisawa T, Karasawa S, Wen W, Joglekar CV, Lu W, Chang Y, Xiang Y, Gao Y, Liu S, Song Y, Kwak SH, Shin HD, Park KS, Fall CH, Kim JY, Sham PC, Lam KS, Zheng W, Shu X, Deng H, Ikegami H, Krishnaveni GV, Sanghera DK, Chuang L, Liu L, Hu R, Kim Y, Daimon M, Hotta K, Jia W, Kooner JS, Chambers JC, Chandak GR, Ma RC, Maeda S, Dorajoo R, Yokota M, Takayanagi R, Kato N, Lin X, Loos RJ. Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. *Diabetologia*. 2012 Apr; 55(4): 981-95.

Li XH, Yu FF, Zhou YH, He J. Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2016 Mar; 103(3): 818-29.

Li JY, Chai B, Zhang W, Wu X, Zhang C, Fritze D, Xia Z, Patterson C, Mulholland MW. Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 4 (Asb-4) colocalizes with insulin receptor substrate 4 (IRS4) in the hypothalamic neurons and mediates IRS4 degradation. *BMC Neurosci*. 2011 Sep 28; 12: 95.

Lian JX, McGhee SM, Chau J, Wong CKH, Lam CLK, Wong WCW. Systematic review on the cost-effectiveness of self-management education programme for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017 May; 127: 21-34.

Lim S, Hong J, Liu CT, Hivert MF, White CC, Murabito JM, O'Donnell CJ, Dupuis J, Florez JC, Meigs JB. Common variants in and near IRS1 and subclinical cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2013 Jul; 229(1): 149-54.

Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2224-60.

Limongi F, Noale M, Gesmundo A, Crepaldi G, Maggi S. Adherence to the Mediterranean diet and all-cause mortality risk in an elderly Italian population: data from the ILSA study. *J Nutr Health Aging*. 2017; 21(5): 505-513.

Ling Y, Li X, Gu Q, Chen H, Lu D, Gao X. A common polymorphism rs3781637 in MTNR1B is associated with type 2 diabetes and lipids levels in Han Chinese individuals. *Cardiovasc Diabetol*. 2011 Apr 6; 10: 27.

Liu C, Wu Y, Li H, Qi Q, Langenberg C, Loos RJ, Lin X. MTNR1B rs10830963 is associated with fasting plasma glucose, HbA1C and impaired beta-cell function in Chinese Hans from Shanghai. *BMC Med Genet*. 2010 Apr 14; 11: 59.

Liu CT, Raghavan S, Maruthur N, Kabagambe EK, Hong J, Ng MC, Hivert MF, Lu Y, An P, Bentley AR, Drolet AM, Gaulton KJ, Guo X, Armstrong LL, Irvin MR, Li M, Lipovich L, Rybin DV, Taylor KD, Agyemang C, Palmer ND, Cade BE, Chen WM, Dauriz M, Delaney JA, Edwards TL, Evans DS, Evans MK, Lange LA, Leong A, Liu J, Liu Y, Nayak U, Patel SR, Porneala BC, Rasmussen-Torvik LJ, Snijder MB, Stallings SC, Tanaka T, Yanek LR, Zhao W, Becker DM, Bielak LF, Biggs ML, Bottinger EP, Bowden DW, Chen G, Correa A, Couper DJ, Crawford DC, Cushman M, Eicher JD, Fornage M, Franceschini N, Fu YP, Goodarzi MO, Gottesman O, Hara K, Harris TB, Jensen RA, Johnson AD, Jhun MA, Karter AJ, Keller MF, Kho AN, Kizer JR, Krauss RM, Langefeld CD, Li X, Liang J, Liu S, Lowe WL Jr, Mosley TH, North KE, Pacheco JA, Peyser PA, Patrick AL, Rice KM, Selvin E, Sims M, Smith JA, Tajuddin SM, Vaidya D, Wren MP, Yao J, Zhu X, Ziegler JT, Zmuda JM, Zonderman AB, Zwinderman AH, AAAG Consortium, CARE Consortium, COGENT-BP Consortium, eMERGE Consortium, MEDIA Consortium, Adeyemo A, Boerwinkle E, Ferrucci L, Hayes MG, Kardia SL, Miljkovic I, Pankow JS, Rotimi CN, Sale MM, Wagenknecht LE, Arnett DK, Chen YD, Nalls MA, MAGIC Consortium, Province MA, Kao WH, Siscovick DS, Psaty BM, Wilson JG, Loos RJ, Dupuis J, Rich SS, Florez JC, Rotter JI, Morris AP, Meigs JB. Trans-ethnic meta-analysis and functional annotation illuminates the genetic architecture of fasting glucose and insulin. *Am J Hum Genet.* 2016 Jul 7; 99(1): 56-75.

Liu X, Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Zhao M, Chu K, Paton CM, Joo DS, Ntambi JM. Loss of Stearoyl-CoA desaturase-1 attenuates adipocyte inflammation: effects of adipocyte-derived oleate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jan; 30(1): 31-8.

Liu XH, Xie CG, An Y, Zhang XX, Wu WB. Meta-analysis of the association between the rs7903146 polymorphism at the TCF7L2 locus and type 2 diabetes mellitus susceptibility. *Genet Mol Res.* 2015 Dec 14; 14(4): 16856-62.

Livingstone KM, Celis-Morales C, Navas-Carretero S, San-Cristobal R, Forster H, O'Donovan CB, Woolhead C, Marsaux CF, Macready AL, Fallaize R, Kolossa S, Tsigirioti L, Lambrinou CP, Moschonis G, Godlewska M, Surwiłło A, Drevon CA, Manios Y, Traczyk I, Gibney ER, Brennan L, Walsh MC, Lovegrove JA, Martinez JA, Saris WH, Daniel H, Gibney M, Mathers JC; Food4Me study. Fat mass- and obesity-associated genotype, dietary intakes and anthropometric measures in European adults: the Food4Me study. *Br J Nutr.* 2016 Feb 14; 115(3):440-8.

Logue J, Walker JJ, Colhoun HM, Leese GP, Lindsay RS, McKnight JA, Morris AD, Pearson DW, Petrie JR, Philip S, Wild SH, Sattar N, Scottish Diabetes Research Network Epidemiology Group. Do men develop type 2 diabetes at lower body mass indices than women? *Diabetologia.* 2011 Dec; 54(12): 3003-6.

Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. Harrison. Principios de medicina interna. 18ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2012.

Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I, Inouye M, Freathy RM, Attwood AP, Beckmann JS, Berndt SI, Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial, Jacobs KB, Chanock SJ, Hayes RB, Bergmann S, Bennett AJ, Bingham SA, Bochud M, Brown

M, Cauchi S, Connell JM, Cooper C, Smith GD, Day I, Dina C, De S, Dermizakis ET, Doney AS, Elliott KS, Elliott P, Evans DM, Sadaf Farooqi I, Froguel P, Ghorji J, Groves CJ, Gwilliam R, Hadley D, Hall AS, Hattersley AT, Hebebrand J, KORA, Heid IM, Lamina C, Gieger C, Illig T, Meitinger T, Wichmann HE, Herrera B, Hinney A, Hunt SE, Jarvelin MR, Johnson T, Jolley JD, Karpe F, Keniry A, Khaw KT, Luben RN, Mangino M, Marchini J, McArdle WL, McGinnis R, Meyre D, Munroe PB, Morris AD, Ness AR, Neville MJ, Nica AC, Ong KK, O'Rahilly S, Owen KR, Palmer CN, Papadakis K, Potter S, Pouta A, Qi L, Nurses' Health Study, Randall JC, Rayner NW, Ring SM, Sandhu MS, Scherag A, Sims MA, Song K, Soranzo N, Speliotes EK, Diabetes Genetics Initiative, Syddall HE, Teichmann SA, Timpson NJ, Tobias JH, Uda M, SardiNIA Study, Vogel CI, Wallace C, Waterworth DM, Weedon MN, Welcome Trust Case Control Consortium, Willer CJ, FUSION, Wraight, Yuan X, Zeggini E, Hirschhorn JN, Strachan DP, Ouwehand WH, Caulfield MJ, Samani NJ, Frayling TM, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, Deloukas P, McCarthy MI, Wareham NJ, Barroso I, Jacobs KB, Chanock SJ, Hayes RB, Lamina C, Gieger C, Illig T, Meitinger T, Wichmann HE, Kraft P, Hankinson SE, Hunter DJ, Hu FB, Lyon HN, Voight BF, Ridderstrale M, Groop L, Scheet P, Sanna S, Abecasis GR, Albai G, Nagaraja R, Schlessinger D, Jackson AU, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M, Mohlke KL. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* 2008; 40(6): 768–775.

Lopez JM, Bailey RA, Rupnow MF, Annunziata K. Characterization of type 2 diabetes mellitus burden by age and ethnic groups based on a nationwide survey. *ClinTher.* 2014 Apr 1; 36(4): 494-506.

López-Miranda J, Cruz G, Gómez P, Marín C, Paz E, Pérez-Martínez P, Fuentes FJ, Ordovas JM, Pérez-Jiménez F. The influence of lipoprotein lipase gene variation on postprandial lipoprotein metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Sep; 89(9): 4721-8.

López-Mojares LM. Obesidad y ejercicio físico. En: LópezChicharro J, Fernández Vaquero A. *Fisiología del ejercicio.* 3ª ed. Madrid: Panamericana; 2006. p. 291-938.

López Suárez A, Elvira González J, Beltrán Robles M, Alwakil M, Saucedo JM, Bascañana Quirell A, Barón Ramos MA, Fernández Palacín F. Prevalence of obesity, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia and metabolic syndrome in over 50-year-olds in Sanlúcar de Barrameda, Spain. *Rev Esp Cardiol.* 2008; 61: 1150-8.

Loprinzi PD, Addoh O. The association of physical activity and cholesterol concentrations across different combinations of central adiposity and body mass index. *Health Promot Perspect.* 2016 Aug 10; 6(3): 128-36.

Lorber D. Importance of cardiovascular disease risk management in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014 May 23; 7: 169-83.

Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham NJ. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARgamma locus. *Diabetes.* 2001 Mar; 50(3): 686-9.

Lundgren CH, Brown SL, Nordt TK, Sobel BE, Fujii S. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation*. 1996; 93: 106-10.

Luo J, Rossouw J, Tong E, Giovino GA, Lee CC, Chen C, Ockene JK, Qi L, Margolis KL. Smoking and diabetes: does the increased risk ever go away? *Am J Epidemiol*. 2013 Sep 15; 178(6): 937-45.

Lupski JR, Belmont JW, Boerwinkle E, Gibbs RA. Clan genomics and the complex architecture of human disease. *Cell*. 2011; 147: 32-43.

Luu Y, Junker W, Rachagani S, Das S, Batra SK, Heinrichson RL, Shekels LL, Ho SB. Human intestinal MUC17 mucin augments intestinal cell restitution and enhances healing of experimental colitis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Jun; 42(6): 996-1006.

Lynch CP, Gebregziabher M, Axon RN, Hunt KE, Payne E, Egede LE. Geographic and racial/ethnic variations in patterns of multimorbidity burden in patients with type 2 diabetes. *J Gen Intern Med*. 2015 Jan; 30(1): 25-32.

Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjögren M, Ling C, Eriksson KF, Lethagen AL, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, Del Prato S, Groop L. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007 Aug; 117(8): 2155-63.

Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet*. 2009 Jan; 41(1): 82-8.

Ma L, Brautbar A, Boerwinkle E, Sing CF, Clark AG, Keinan A. Knowledge-driven analysis identifies a gene-gene interaction affecting high-density lipoprotein cholesterol levels in multi-ethnic populations. *PLoS Genet*. 2012; 8(5): e1002714.

Ma Y, Tucker KL, Smith CE, Lee YC, Huang T, Richardson K, Parnell LD, Lai CQ, Young KL, Justice AE, Shao Y, North KE, Ordovás JM. Lipoprotein lipase variants interact with polyunsaturated fatty acids for obesity traits in women: replication in two populations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Dec; 24(12): 1323-9.

Ma Y, Ordovás JM. The integration of epigenetics and genetics in nutrition research for CVD risk factors. *Proc Nutr Soc*. 2016 Dec 6: 1-14.

Macho T, Martí A, Martínez JA. Estudios genéticos de la obesidad en humanos. *Med Clin (Barc)*. 2000; 115: 103-9.

MacNeil DJ, Howard AD, Guan X, Fong TM, Nargund RP, Bednarek MA, Goulet MT, Weinberg DH, Strack AM, Marsh DJ, Chen HY, Shen CP, Chen AS, Rosenblum CI, MacNeil T, Tota M, MacIntyre ED, Van der Ploeg LH. The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002 Aug 16; 450(1): 93-109.

Maddatu J, Anderson-Baucum E, Evans-Molina C. Smoking and the risk of type 2 diabetes. *Transl Res.* 2017 Jun; 184: 101-107.

Maes HH1, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet.* 1997 Jul; 27(4): 325-51.

Mahajan A, Go MJ, Zhang W, Below JE, Gaulton KJ, Ferreira T, Horikoshi M, Johnson AD, Ng MC, Prokopenko I, Saleheen D, Wang X, Zeggini E, Abecasis GR, Adair LS, Almgren P, Atalay M, Aung T, Baldassarre D, Balkau B, Bao Y, Barnett AH, Barroso I, Basit A, Been LF, Beilby J, Bell GI, Benediktsson R, Bergman RN, Boehm BO, Boerwinkle E, Bonnycastle LL, Burt N, Cai Q, Campbell H, Carey J, Cauchi S, Caulfield M, Chan JC, Chang LC, Chang TJ, Chang YC, Charpentier G, Chen CH, Chen H, Chen YT, Chia KS, Chidambaram M, Chines PS, Cho NH, Cho YM, Chuang LM, Collins FS, Cornelis MC, Couper DJ, Crenshaw AT, van Dam RM, Danesh J, Das D, de Faire U, Dedoussis G, Deloukas P, Dimas AS, Dina C, Doney AS, Donnelly PJ, Dorkhan M, van Duijn C, Dupuis J, Edkins S, Elliott P, Emilsson V, Erbel R, Eriksson JG, Escobedo J, Esko T, Eury E, Florez JC, Fontanillas P, Forouhi NG, Forsen T, Fox C, Fraser RM, Frayling TM, Froguel P, Frossard P, Gao Y, Gertow K, Gieger C, Gigante B, Grallert H, Grant GB, Grrop LC, Groves CJ, Grundberg E, Guiducci C, Hamsten A, Han BG, Hara K, Hassanali N, Hattersley AT, Hayward C, Hedman AK, Herder C, Hofman A, Holmen OL, Hovingh K, Hreidarsson AB, Hu C, Hu FB, Hui J, Humphries SE, Hunt SE, Hunter DJ, Hveem K, Hydrie ZI, Ikegami H, Illig T, Ingelsson E, Islam M, Isomaa B, Jackson AU, Jafar T, James A, Jia W, Jöckel KH, Jonsson A, Jowett JB, Kadowaki T, Kang HM, Kanoni S, Kao WH, Kathiresan S, Kato N, Katulanda P, Keinanen-Kiukkaanniemi KM, Kelly AM, Khan H, Khaw KT, Khor CC, Kim HL, Kim S, Kim YJ, Kinnunen L, Klopp N, Kong A, Korpi-Hyövälti E, Kowlessur S, Kraft P, Kravic J, Kristensen MM, Krithika S, Kumar A, Kumate J, Kuusisto J, Kwak SH, Laakso M, Lagou V, Lakka TA, Langenberg C, Langford C, Lawrence R, Leander K, Lee JM, Lee NR, Li M, Li X, Li Y, Liang J, Liju S, Lim WY, Lind L, Lindgren CM, Lindholm E, Liu CT, Liu JJ, Lobbens S, Long J, Loos RJ, Lu W, Luan J, Lyssenko V, Ma RC, Maeda S, Mägi R, Männistö S, Matthews DR, Meigs JB, Melander O, Metspalu A, Meyer J, Mirza G, Mihailov E, Moebus S, Mohan V, Mohlke KL, Morris AD, Mühleisen TW, Müller-Nurasyid M, Musk B, Nakamura J, Nakashima E, Navarro P, Ng PK, Nica AC, Nilsson PM, Njølstad I, Nöthen MM, Ohnaka K, Ong TH, Owen KR, Palmer CN, Pankow JS, Park KS, Parkin M, Pechlivanis S, Pedersen NL, Peltonen L, Perry JR, Peters A, Pinidiyapathirage JM, Platou CG, Potter S, Price JF, Qi L, Radha V, Rallidis L, Rasheed A, Rathman W, Rauramaa R, Raychaudhuri S, Rayner NW, Rees SD, Rehnberg E, Ripatti S, Robertson N, Roden M, Rossin EJ, Rudan I, Rybin D, Saaristo TE, Salomaa V, Saltevo J, Samuel M, Sanghera DK, Saramies J, Scott J, Scott LJ, Scott RA, Segrè AV, Sehmi J, Sennblad B, Shah N, Shah S, Shera AS, Shu XO, Shuldiner AR, Sigurdsson G, Sijbrands E, Silveira A, Sim X, Sivapalaratnam S, Small KS, So WY, Stančáková A, Stefansson K, Steinbach G, Steinthorsdottir V, Stirrups K, Strawbridge RJ, Stringham HM, Sun Q, Suo C, Syvänen AC, Takayanagi R, Takeuchi F, Tay WT, Teslovich TM, Thorand B, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Tikkanen E, Trakalo J, Tremoli E, Trip MD, Tsai FJ, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG,

Valladares-Salgado A, Vedantam S, Veglia F, Voight BF, Wang C, Wareham NJ, Wennauer R, Wickremasinghe AR, Wilsgaard T, Wilson JF, Wiltshire S, Winckler W, Wong TY, Wood AR, Wu JY, Wu Y, Yamamoto K, Yamauchi T, Yang M, Yengo L, Yokota M, Young R, Zabaneh D, Zhang F, Zhang R, Zheng W, Zimmet PZ, Altshuler D, Bowden DW, Cho YS, Cox NJ, Cruz M, Hanis CL, Kooner J, Lee JY, Seielstad M, Teo YY, Boehnke M, Parra EJ, Chambers JC, Tai ES, McCarthy MI, Morris AP. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet.* 2014; 46: 1092-1097.

Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redán J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F. 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC task force for the management of arterial hypertension. *J Hypertens.* 2013 Oct; 31(10): 1925-38.

Manfredi S, Calvi D, del Fiandra M, Botto N, Biagini A, Andreassi MG. Glutathione S-transferase T1- and M1-null genotypes and coronary artery disease risk in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Pharmacogenomics.* 2009 Jan; 10(1): 29-34.

Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med.* 2010 Jul 8; 363(2): 166-76.

Manolio TA. Bringing genome-wide association findings into clinical use. *Nat Rev Genet.* 2013 Aug; 14(8): 549-58.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009 Oct 8; 461(7265): 747-53.

Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1990; 322: 882-9.

Marcadenti A, Fuchs FD, Matte U, Sperb F, Moreira LB, Fuchs SC. Effects of FTO RS9939906 and MC4R RS17782313 on obesity, type 2 diabetes mellitus and blood pressure in patients with hypertension. *Cardiovasc Diabetol.* 2013 Jul 12; 12: 103.

Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature.* 2010 Jul 29; 466(7306): 627-31.

Marcheva B, Ramsey KM, Peek CB, Affinati A, Maury E, Bass J. Circadian clocks and metabolism. *Handb Exp Pharmacol*. 2013; (217): 127-55.

Marian AJ. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res*. 2012 Feb; 159(2): 64-79.

Marie Ng, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, Abraham JP, Abu-Rmeileh NM, Achoki T, AlBuhairan FS, Alemu ZA, Alfonso R, Ali MK, Ali R, Guzman NA, Ammar W, Anvari P, Banerjee A, Barquera S, Basu S, Bennett DA, Bhutta Z, Blore J, Cabral N, Nonato IC, Chang JC, Chowdhury R, Courville KJ, Criqui MH, Cundiff DK, Dabhadkar KC, Dandona L, Davis A, Dayama A, Dharmaratne SD, Ding EL, Durrani AM, Esteghamati A, Farzadfar F, Fay DF, Feigin VL, Flaxman A, Forouzanfar MH, Goto A, Green MA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Hankey GJ, Harewood HC, Havmoeller R, Hay S, Hernandez L, Husseini A, Idrisov BT, Ikeda N, Islami F, Jahangir E, Jassal SK, Jee SH, Jeffreys M, Jonas JB, Kabagambe EK, Khalifa SE, Kengne AP, Khader YS, Khang YH, Kim D, Kimokoti RW, Kinge JM, Kokubo Y, Kosen S, Kwan G, Lai T, Leinsalu M, Li Y, Liang X, Liu S, Logroscino G, Lotufo PA, Lu Y, Ma J, Mainoo NK, Mensah GA, Merriman TR, Mokdad AH, Moschandreas J, Naghavi M, Naheed A, Nand D, Narayan KM, Nelson EL, Neuhouser ML, Nisar MI, Ohkubo T, Oti SO, Pedroza A, Prabhakaran D, Roy N, Sampson U, Seo H, Sepanlou SG, Shibuya K, Shiri R, Shiue I, Singh GM, Singh JA, Skirbekk V, Stapelberg NJ, Sturua L, Sykes BL, Tobias M, Tran BX, Trasande L, Toyoshima H, van de Vijver S, Vasankari TJ, Veerman JL, Velasquez-Melendez G, Vlassov VV, Vollset SE, Vos T, Wang C, Wang X, Weiderpass E, Werdecker A, Wright JL, Yang YC, Yatsuya H, Yoon J, Yoon SJ, Zhao Y, Zhou M, Zhu S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2013. *Lancet*. 2014 Aug 30; 384(9945): 746.

Marín-Guerrero AC, Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, BanegasBanegas JR, Regidor E, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of obesity in immigrants in Madrid, Spain. *Med Clin (Barc)*. 2010 Apr 17; 134(11): 483-5.

Márquez-Sandoval F, Bullo M, Vizmanos B, Casas-Agustench P, Salas-Salvadó J. Un patrón de alimentación saludable: la dieta mediterránea tradicional. *Antropo*. 2008; 16: 11-22.

Marsh EE 3rd, Biller J, Adams HP Jr, Marler JR, Hulbert JR, Love BB, Gordon DL. Circadian variation in onset of acute ischemic stroke. *Arch Neurol*. 1990 Nov; 47(11): 1178-80.

Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, Aluigi M, Peruzzi D, Bareggi R, Narducci P, Cocco L. Re-examination of the mechanisms regulating nuclear inositol lipid metabolism. *FEBS Lett*. 2001 Sep 7; 505(1) :1-6.

Martelli AM, Fiume R, Faenza I, Tabellini G, Evangelista C, Bortul R, Follo MY, Falà F, Cocco L. Nuclear phosphoinositide specific phospholipase C (PI-PLC)-beta 1: a central intermediary in nuclear lipid-dependent signal transduction. *Histol Histopathol*. 2005 Oct; 20(4): 1251-60.

Martin S, Nicaud V, Humphries SE, Talmud PJ; EARS group. Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Apr 17; 1637(3): 217-25.

Martínez JA, Milagro FI, Claycombe KJ, Schalinske KL. Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. *Adv Nutr*. 2014 Jan 1; 5(1): 71-81.

Martínez-González MA, Estruch R, Corella D, Ros E, Salas-Salvadó J. Prevention of diabetes with mediterranean diets. *Ann Intern Med*. 2014 Jul 15; 161(2): 157-8.

Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 26; 16(1): 378-400.

Martí A, Ochoa MC, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Aspectos genéticos de la obesidad infantil. *Hormona y factores de crecimiento*. 2003; 6: 10-26.

Martín AR, Nieto JM, Ruiz JP, Jiménez LE. Overweight and obesity: the role of education, employment and income in Spanish adults. *Appetite*. 2008 Sep; 51(2): 266-72.

Martin S, Nicaud V, Humphries SE, Talmud PJ, EARS group. Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Apr 17; 1637(3): 217-25.

Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, Willett WC. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol*. 1993; 22: 512-9.

Martín-Núñez GM, Cabrera-Mulero R, Rojo-Martínez G, Gómez-Zumaquero JM, Chaves FJ, de Marco G, Soriguer F, Castaño L, Morcillo S. Polymorphisms in the SCD1 gene are associated with indices of stearoyl CoA desaturase activity and obesity: a prospective study. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Dec; 57(12): 2177-84.

Martínez JA, Frühbeck G. Regulation of energy balance and adiposity: a model with new approaches. *J Physiol Biochem*. 1996; 52: 255-8.

Martínez JA, Milagro FI, Claycombe KJ, Schalinske KL. Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. *Adv Nutr*. 2014 Jan 1; 5(1): 71-81.

Martínez-González MA, de la Fuente-Arrillaga C, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Vazquez Z, Benito S, Tortosa A, Bes-Rastrollo M. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *BMJ*. 2008 Jun 14; 336(7657): 1348-51.

Martínez-Sámamo J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza, MA. Los ácidos grasos y la lipotoxicidad: implicaciones metabólicas. *Rev. Fac. Med. (Méx.) [online]*. 2013; 56(1): 5-18.

Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, Ueda K, Hirahashi J, Hishikawa K, Sakurai H, Shiota K, Fujita T. Diabetes induces aberrant DNA methylation in the proximal tubules of the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Oct; 26(10): 2388-97.

Mathur R, Hull SA, Badrick E, Robson J. Cardiovascular multimorbidity: the effect of ethnicity on prevalence and risk factor management. *Br J Gen Pract*. 2011 May; 61(586): e262-70.

Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*. 2013 Sep-Oct; 7(5): e330-41.

Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJ, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*. 2010 Jul 8; 466(7303): 253-7.

Mauvais-Jarvis F. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes and obesity. *Biology of sex differences*. 2015; 6: 14.

Mayer-Davis EJ, D'Agostino R Jr, Karter AJ, Haffner SM, Rewers MJ, Saad M, Bergman RN. Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA*. 1998; 279(9): 669-74.

Mazidi M, Penson P, Gluba-Brzozka A, Rysz J, Banach M. Relationship between long noncoding RNAs and physiological risk factors of cardiovascular disease. *J Clin Lipidol*. 2017 May-Jun; 11(3): 617-623.

Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci*. 2003 Feb; 28(2): 91-8.

McConnell BB, Yang VW. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev*. 2010 Oct; 90(4): 1337-81.

McLeod DL, Buscemi J, Bohnert AM. Becoming American, becoming obese? A systematic **review** of acculturation and weight among Latino youth. *Obes Rev*. 2016 Nov; 17(11): 1040-1049.

Medici F, Hawa M, Ianari A, Pyke DA, Leslie RD. Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. *Diabetologia* 1999; 42: 146-150.

Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham offspring study. *Diabetes* 2000; 49: 2201-2207.

Meigs JB, Grant RW, Piccolo R, López L, Florez JC, Porneala B, Marceau L, McKinlay JB. Association of African genetic ancestry with fasting glucose and HbA1c levels in non-diabetic individuals: the Boston Area Community Health (BACH) Prediabetes Study. *Diabetologia*. 2014 Sep; 57(9): 1850-8.

Mejia de Grubb MC, Levine RS, Zoorob RJ. Diet and obesity issues in the undeserved. *Prim Care*. 2017 Mar; 44(1): 127-140.

Mellen PB, Walsh TF, Herrington DM. Whole grain intake and cardiovascular disease: a meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 May; 18(4): 283-90.

Melo LC, Dativo-Medeiros J, Menezes-Silva CE, Barbosa FT, de Sousa-Rodrigues CF, Rabelo LA. Physical exercise on inflammatory markers in type 2 diabetes patients: a systematic review of randomized controlled trials. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 8523728.

Mendez MA, Popkin BM, Jakszyn P, Berenguer A, Tormo MJ, Sánchez MJ, Quirós JR, Pera G, Navarro C, Martínez C, Larrañaga N, Dorransoro M, Chirlaque MD, Barricarte A, Ardanaz E, Amiano P, Agudo A, González CA. Adherence to a Mediterranean diet is associated with reduced 3-year incidence of obesity. *J Nutr*. 2006; 136: 2934-8.

Menke A, Rust KF, Fradkin J, Cheng YJ, Cowie CC. Associations between trends in race/ethnicity, aging, and body mass index with diabetes prevalence in the United States: a series of cross-sectional studies. *Ann Intern Med*. 2014 Sep 2; 161(5): 328-35.

Mensink R, Zock P, Kester A, Katan M. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 77 (5): 1146-1155.

Mergani A, Mansour AA, Askar T, Zahran RN, Mustafa AM, Mohammed MA, Saleh OM. Glutathione S-Transferase Pi-Ile 105 Val polymorphism and susceptibility to T2DM in population from Turabah region of Saudi Arabia. *Biochem Genet*. 2016 Aug; 54(4): 544-51.

Merino DM, Ma DW, Mutch DM. Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease. *Lipids Health Dis*. 2010 Jun 18; 9: 63.

Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3; 280(22): 21553-60.

Mertens E, Mullie P, Deforche B, Lefevre J, Charlier R, Huybrechts I, Clarys P. Cross-sectional study on the relationship between the Mediterranean diet score and blood lipids. *Nutr J*. 2014 Sep 4; 13: 88.

Messerli FH, Nunez BD, Ventura HO, Snyder DW. Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch Intern Med*. 1987; 147(10): 1725-1728.

Micha R, Michas G, Mozaffarian D. Unprocessed red and processed meats and risk of coronary artery disease and type 2 diabetes--an updated review of the evidence. *Curr Atheroscler Rep.* 2012 Dec; 14(6): 515-24.

Micó V, Díez-Ricote L, Daimiel L. Nutrigenetics and nutrimiromics of the circadian system: the time for human health. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 26; 17(3): 299.

Milagro FI, Campión J, Cordero P, Goyenechea E, Gómez-Uriz AM, Abete I, Zulet MA, Martínez JA. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J.* 2011 Apr; 25(4): 1378-89.

Milagro FI, Gómez-Abellán P, Campión J, Martínez JA, Ordovás JM, Garaulet M. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiol Int.* 2012 Nov; 29(9): 1180-94.

Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martínez JA. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Mol Aspects Med.* 2013 Jul-Aug; 34(4): 782-812.

Milán T, Verkasalo PK, Kaprio J, Koskenvuo M. Lifestyle differences in twin pairs discordant for basal cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2003 Jul;149(1):115-23.

Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S, American Heart Association Clinical Lipidology, Thrombosis, and Prevention Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Nursing, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011 May 24; 123(20): 2292-333.

Mitrou PN, Kipnis V, Thiébaud AC, Reedy J, Subar AF, Wirfält E, Flood A, Mouw T, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Arch Intern Med.* 2007 Dec 10; 167(22): 2461-8.

Molarius A, Seidell JC, Sans S, Tuomilehto J, Kuulasmaa K. Educational level, relative body weight, and changes in their association over 10 years: an international perspective from the WHO MONICA Project. *Am J Public Health* 2000; 90: 1260-68.

Moniaux N, Junker WM, Singh AP, Jones AM, Batra SK. Characterization of human mucin MUC17. Complete coding sequence and organization. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18; 281(33): 23676-85. Epub 2006 May 31.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-8.

Moon S, Hwang MY, Jang HB, Han S, Kim YJ, Hwang JY, Lee HJ, Park SI, Song J, Kim BJ. Whole-exome sequencing study reveals common copy number variants in protocadherin genes associated with childhood obesity in Koreans. *Int J Obes (Lond)*. 2017 Apr; 41(4): 660-663.

Moore JH, Williams SM. Epistasis and its implications for personal genetics. *Am J Hum Genet*. 2009 Sep; 85(3): 309-20.

More VR, Cheng Q, Donepudi AC, Buckley DB, Lu ZJ, Cherrington NJ, Slitt AL. Alcohol cirrhosis alters nuclear receptor and drug transporter expression in human liver. *Drug Metab Dispos*. 2013 May; 41(5): 1148-55.

Moreno-Indias I, Tinahones FJ. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J Diabetes Res*. 2015; 2015: 970375.

Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Moreno M, Xifra G, Ricart W, Fernández-Real JM. PRDM16 sustains white fat gene expression profile in human adipocytes in direct relation with insulin action. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Apr 15; 405: 84-93.

Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segre AV, Steinthorsdottir V, Strawbridge RJ, Khan H, Grallert H, Mahajan A, Prokopenko I, Kang HM, Dina C, Esko T, Fraser RM, Kanoni S, Kumar A, Lagou V, Langenberg C, Luan J, Lindgren CM, Müller-Nurasyid M, Pechlivanis S, Rayner NW, Scott LJ, Wiltshire S, Yengo L, Kinnunen L, Rossin EJ, Raychaudhuri S, Johnson AD, Dimas AS, Loos RJ, Vedantam S, Chen H, Florez JC, Fox C, Liu CT, Rybin D, Couper DJ, Kao WH, Li M, Cornelis MC, Kraft P, Sun Q, van Dam RM, Stringham HM, Chines PS, Fischer K, Fontanillas P, Holmen OL, Hunt SE, Jackson AU, Kong A, Lawrence R, Meyer J, Perry JR, Platou CG, Potter S, Rehnberg E, Robertson N, Sivapalaratnam S, Stančáková A, Stirrups K, Thorleifsson G, Tikkanen E, Wood AR, Almgren P, Atalay M, Benediktsson R, Bonnycastle LL, Burt N, Carey J, Charpentier G, Crenshaw AT, Doney AS, Dorkhan M, Edkins S, Emilsson V, Eury E, Forsen T, Gertow K, Gigante B, Grant GB, Groves CJ, Guiducci C, Herder C, Hreidarsson AB, Hui J, James A, Jonsson A, Rathmann W, Klopp N, Kravic J, Krjutškov K, Langford C, Leander K, Lindholm E, Lobbens S, Männistö S, Mirza G, Mühleisen TW, Musk B, Parkin M, Rallidis L, Saramies J, Sennblad B, Shah S, Sigurðsson G, Silveira A, Steinbach G, Thorand B, Trakalo J, Veglia F, Wennauer R, Winckler W, Zabaneh D, Campbell H, van Duijn C, Uitterlinden AG, Hofman A, Sijbrands E, Abecasis GR, Owen KR, Zeggini E, Trip MD, Forouhi NG, Syvänen AC, Eriksson JG, Peltonen L, Nöthen MM, Balkau B, Palmer CN, Lyssenko V, Tuomi T, Isomaa B, Hunter DJ, Qi L; Wellcome Trust Case Control Consortium.; Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium (MAGIC) Investigators.; Genetic Investigation of ANthropometric Traits (GIANT) Consortium.; Asian Genetic Epidemiology Network–Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium.; South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium., Shuldiner AR, Roden M, Barroso I, Wilsgaard T, Beilby J, Hovingh K, Price JF, Wilson JF, Rauramaa R, Lakka TA, Lind L, Dedoussis G, Njølstad I, Pedersen NL, Khaw KT, Wareham NJ, Keinanen-Kiukkaanniemi SM, Saaristo TE, Korpi-Hyövälti E, Saltevo J, Laakso M, Kuusisto J, Metspalu A, Collins FS, Mohlke KL, Bergman RN, Tuomilehto J, Boehm BO, Gieger C, Hveem K, Cauchi S, Froguel P, Baldassarre D, Tremoli E, Humphries SE, Saleheen D, Danesh J, Ingelsson E, Ripatti S, Salomaa V, Erbel R, Jöckel KH, Moebus S, Peters A, Illig T, de Faire U, Hamsten A, Morris AD, Donnelly PJ, Frayling TM, Hattersley AT, Boerwinkle E, Melander O,

Kathiresan S, Nilsson PM, Deloukas P, Thorsteinsdottir U, Groop LC, Stefansson K, Hu F, Pankow JS, Dupuis J, Meigs JB, Altshuler D, Boehnke M, McCarthy MI; DIABetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 2012; 44: 981-990.

Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Jun; 15(6): 367-78.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2015 Jan 27; 131(4): e29-322.

Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia.* 2009 Jul; 52(7): 1240-9.

Murcay CE, Lewinger JP, Gauderman WJ. Gene-environment interaction in genome-wide association studies. *Am J Epidemiol.* 2009 Jan 15; 169(2): 219-26.

Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2008, 4, 200–213.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med.* 2011;62:361-80.

Musunuru K, Romaine SP, Lettre G, Wilson JG, Volcik KA, Tsai MY, Taylor HA Jr, Schreiner PJ, Rotter JI, Rich SS, Redline S, Psaty BM, Papanicolaou GJ, Ordovas JM, Liu K, Krauss RM, Glazer NL, Gabriel SB, Fornage M, Cupples LA, Buxbaum SG, Boerwinkle E, Ballantyne CM, Kathiresan S, Rader DJ. Multi-ethnic analysis of lipid-associated loci: the NHLBI CARE project. *PLoS One.* 2012; 7(5): e36473.

Muoio DM. Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar; 1801(3): 281-8.

Murk W, Bracken MB, DeWan AT. Confronting the missing epistasis problem: on the reproducibility of gene-gene interactions. *Hum Genet.* 2015 Aug; 134(8): 837-49.

Narain A, Kwok CS, Mamas MA. Soft drink intake and the risk of metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Pract.* 2017 Feb; 71(2). doi: 10.1111/ijcp.12927.

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Understanding adult obesity. 2006; Publication No. 01-3680. Disponible en: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-topics/weight-control/understanding/Pages/understanding-adult-overweight-and-obesity.aspx>.

Neel JV. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am J Hum Genet.* 1962; 14: 353-362.

Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, Macera CA, Castaneda-Sceppa C. Physical activity and public health in older adults. Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation.* 2007; 116: 1094-105.

Nelson TL, Fingerlin TE, Moss LK, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. Association of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene with type 2 diabetes mellitus varies by physical activity among non-Hispanic whites from Colorado. *Metabolism.* 2007 Mar; 56(3): 388-93.

Nemr R, Almawi AW, Echtay A, Sater MS, Daher HS, Almawi WY. Replication study of common variants in CDKAL1 and CDKN2A/2B genes associated with type 2 diabetes in Lebanese Arab population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Feb; 95(2): e37-40.

Neuman RJ, Wasson J, Atzmon G, Wainstein J, Yerushalmi Y, Cohen J, Barzilai N, Blech I, Glaser B, Permutt MA. Gene-gene interactions lead to higher risk for development of type 2 diabetes in an Ashkenazi Jewish population. *PLoS One.* 2010 Mar 26; 5(3): e9903.

Newton-Cheh C, Guo CY, Wang TJ, O'donnell CJ, Levy D, Larson MG. Genome-wide association study of electrocardiographic and heart rate variability traits: the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007 Sep 19; 8 Suppl 1: S7.

Ng MCY, Graff M, Lu Y, Justice AE, Mudgal P, Liu CT, Young K, Yanek LR, Feitosa MF, Wojczynski MK, Rand K, Brody JA, Cade BE, Dimitrov L, Duan Q, Guo X, Lange LA, Nalls MA, Okut H, Tajuddin SM, Tayo BO, Vedantam S, Bradfield JP, Chen G, Chen WM, Chesi A, Irvin MR, Padhukasahasram B, Smith JA, Zheng W, Allison MA, Ambrosone CB, Bandera EV, Bartz TM, Berndt SI, Bernstein L, Blot WJ, Bottinger EP, Carpten J, Chanock SJ, Chen YI, Conti DV, Cooper RS, Fornage M, Freedman BI, Garcia M, Goodman PJ, Hsu YH, Hu J, Huff CD, Ingles SA, John EM, Kittles R, Klein E, Li J, McKnight B, Nayak U, Nemesure B, Ogunniyi A, Olshan A, Press MF, Rohde R, Rybicki BA, Salako B, Sanderson M, Shao Y, Siscovick DS, Stanford JL, Stevens VL, Stram A, Strom SS, Vaidya D, Witte JS, Yao J, Zhu X, Ziegler RG, Zonderman AB, Adeyemo A, Ambs S, Cushman M, Faul JD, Hakonarson H, Levin AM, Nathanson KL, Ware EB, Weir DR, Zhao W, Zhi D; Bone Mineral Density in Childhood Study (BMDCS) Group., Arnett DK, Grant SFA, Kardia SLR, Oloapde OI, Rao DC, Rotimi CN, Sale MM, Williams LK, Zemel BS, Becker DM, Borecki IB, Evans MK, Harris TB, Hirschhorn JN, Li Y, Patel SR, Psaty BM, Rotter JI, Wilson JG, Bowden DW, Cupples LA, Haiman CA, Loos RJF, North KE. Discovery and fine-mapping of adiposity loci using high density imputation of genome-wide association studies in individuals of African ancestry: African Ancestry Anthropometry Genetics Consortium. *PLoS Genet.* 2017 Apr 21; 13(4): e1006719.

Ngwa EN, Sobngwi E, Atogho-Tiedeu B, Noubiap JJ, Donfack OS, Guewo-Fokeng M, Mofu EP, Fosso PP, Djahmeni E, Djokam-Dadjeu R, Evehe MS, Aminkeng F, Mbacham WF, Mbanya JC. Association between the rs12255372 variant of the TCF7L2 gene and obesity in a Cameroonian population. *BMC Res Notes*. 2015 Nov 25; 8: 717.

Nieman LK. Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening. *Eur J Endocrinol*. 2015 Oct; 173(4): M33-8.

Nigg CR, Burbank PM, Padula C, Dufresne R, Rossi JS, Velicer WF, Laforge RG, Prochaska JO. Stages of change across ten health risk behaviors for older adults. *Gerontologist*. 1999 Aug; 39(4): 473-82.

Noma K, Goto C, Nishioka K, Hara K, Kimura M, Umemura T, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y. Smoking, endothelial function, and Rho-kinase in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec; 25(12): 2630-5.

Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014 Aug 16; 384(9943): 626-35.

Nordmann AJ, Suter-Zimmermann K, Bucher HC, Shai I, Tuttle KR, Estruch R, Briel M. Meta-analysis comparing Mediterranean to low-fat diets for modification of cardiovascular risk factors. *Am J Med*. 2011 Sep; 124(9): 841-51.

Novials A. Diabetes y ejercicio. Grupo de trabajo de diabetes y ejercicio de la Sociedad Española de Diabetes. Madrid: Mayo; 2010.

Nurmohamed MT, Heslinga M, Kitas GD. Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Dec; 11(12): 693-704.

O'Connor L, Imamura F, Lentjes MA, Khaw KT, Wareham NJ, Forouhi NG. Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages. *Diabetologia*. 2015 Jul; 58(7): 1474-83.

O'Donnell CJ, Elosua R. Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol*. 2008 Mar; 61(3): 299-310.

Olano-Martin E, Abraham EC, Gill-Garrison R, Valdes AM, Grimaldi K, Tang F, Jackson KG, Williams CM, Minihane AM. Influence of apoA-V gene variants on postprandial triglyceride metabolism: impact of gender. *J Lipid Res*. 2008 May; 49(5): 945-53.

Ollila HM, Kronholm E, Kettunen J, Silander K, Perola M, Porkka-Heiskanen T, Salomaa V, Paunio T. Insomnia does not mediate or modify the association between MTNR1B risk variant rs10830963 and glucose levels. *Diabetologia*. 2016 May; 59(5): 1070-2.

Ordovás JM. Interacciones entre genes y entorno y factores de riesgo cardiovascular. Rev Esp Cardiol Supl. 2009; 9(B): 39-51.

Ordovás JM, Carmena R, Corella D. Nutrigenómica. Monografías Humanitas nº 9. Barcelona: Fundación Medicina y Humanidades Médicas; 2004. Disponible en: http://www.fundacionmhm.org/fondo_editorial.html

Ordovás JM, Peterson JP, Santaniello P, Cohn JS, Wilson PW, Schaefer EJ. Enzyme linked immunosorbent assay for human apolipoprotein B. J Lipid Res 1987; 28: 1216-1224.

Ordovás JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol. 2010 Sep; 7(9): 510-9.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Ginebra: World Health Organization; 1995.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Programme of nutrition, family and reproductive health. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Ginebra, 3-5 junio 1997. Ginebra: WHO; 1998.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organization (WHO). Guidelines Subcommittee. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. Hypertension. 1999; 17: 151-83.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Ginebra: World Health Organization; 2000.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO) WHO expert consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. The Lancet, 2004; 157-163.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Ginebra: World Health Organization; 2006.

Organización Mundial de la Salud OMS/World Health Organisation (WHO). Global recommendations on physical activity for health [en línea]. 2010. [Consultado el 25 de Octubre de 2010]. Disponible en: http://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_recommendations/en/.

Organización Mundial de la Salud OMS/World Health Organisation (WHO). Global strategy on diet, physical activity and health [en línea]. 2011. [Consultado el 16 de Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/pa/en/>.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Non communicable diseases country profiles [en línea]. 2014. [Consultado el 13 de Mayo de 2017]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128038/1/9789241507509_eng.pdf.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles [en línea]. 2014. [Consultado 25 de Agosto 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/es/>.

Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Nota descriptiva sobre la diabetes [en línea]. Enero 2015. [Consultado 19 de Julio de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>.

Ortega FB, Lavie CJ, Blair SN. Obesity and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2016 May 27; 118(11): 1752-70.

Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Asensio EM, Coltell O, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Covas MI, Arós F, Lapetra J, Serra-Majem L, Gómez-Gracia E, Fiol M, Sáez-Tormo G, Pintó X, Muñoz MA, Ros E, Ordovás JM, Estruch R, Corella D. Associations of the FTO rs9939609 and the MC4R rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low. *Cardiovasc Diabetol*. 2012 Nov 6; 11: 137.

Pácal L, Varvařovská J, Rušavý Z, Lacigová S, Stětina R, Racek J, Pomahačová R, Tanhäuserová V, Kaňková K. Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Arch Physiol Biochem*. 2011 Oct; 117(4): 222-30.

Palme BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 402: 113-9.

Palou A, Serra F, Bonet ML, Picó C. Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr*. 2000 Aug; 39(4): 127-44.

Pamidi S, Tasali E. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there a link? *Front Neurol*. 2012 Aug 13; 3: 126.

Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Stefanadis C. Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study. *Nutrition*. 2006; 22: 449-56.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Stefanadis C. The epidemiology of type 2 diabetes mellitus in greek adults: the Attica study. *Diabetes Med*. 2005; 22: 1581-1588.

Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Role of oxidative stress in endothelial insulin resistance. *World J Diabetes*. 2015 Mar 15; 6(2): 326-32.

- Paquette M, Chong M, Thériault S, Dufour R, Paré G, Baass A. Polygenic risk score predicts prevalence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2017 May-Jun; 11(3): 725-732.e5.
- Park JH, Shin C. MicroRNA-directed cleavage of targets: mechanism and experimental approaches. *BMB Rep*. 2014 Aug; 47(8): 417-23.
- Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CH, Lee CW, Lee CH, Song CH, Lee J. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999 Aug; 26(8): 1701-4.
- Park YS, Jin MY, Kim YJ, Yook JH, Kim BS, Jang SJ. The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2008 Jul; 15(7): 1968-76.
- Parkinson L, Cicerale S. The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds. *Molecules*. 2016 Dec 16; 21(12). pii: E1734.
- Pascot A, Lemieux I, Bergeron J, Tremblay A, Nadeau A, Prud'homme D, Couillard C, Lamarche B, Després JP. HDL particle size: a marker of the gender difference in the metabolic risk profile. *Atherosclerosis*. 2002 Feb; 160(2): 399-406.
- Pate RR, McIver KL, Colabianchi N, Troiano RP, Reis JP, Carroll DD, Fulton JE. Physical activity measures in the healthy communities study. *Am J Prev Med*. 2015 Oct; 49(4): 653-9.
- Patel TP, Rawal K, Bagchi AK, Akolkar G, Bernardes N, Dias Dda S, Gupta S, Singal PK. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail Rev*. 2016 Jan; 21(1): 11-23.
- Peng F, Hu D, Gu C, Li X, Li Y, Jia N, Chu S, Lin J, Niu W. The relationship between five widely-evaluated variants in CDKN2A/B and CDKAL1 genes and the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *Gene*. 2013 Dec 1; 531(2): 435-43.
- Peng S, Zhu Y, Lü B, Xu F, Li X, Lai M. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes risk: a comprehensive and updated meta-analysis involving 121,174 subjects. *Mutagenesis*. 2013 Jan; 28(1): 25-37.
- Peng S, Zhu Y, Xu F, Ren X, Li X, Lai M. FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. *BMC Med*. 2011 Jun 8; 9: 71.
- Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, Jiang S. MicroRNAs: emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cell Signal*. 2014 Sep; 26(9): 1888-96.
- Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 2001 Oct 5; 294(5540): 169-73.

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet.* 2002 Nov 15; 11(24): 3031-8.

Pereira A, Mendonca MI, Sousa AC, Borges S, Freitas S, Henriques E, Rodrigues M, Freitas AI, Guerra G, Ornelas I, Pereira D, Brehm A, Palma Dos Reis R. Genetic risk score and cardiovascular mortality in a southern European population with coronary artery disease. *Int J Clin Pract.* 2017 May 15; doi: 10.1111/ijcp.12956.

Perelis M, Marcheiva B, Ramsey KM, Schipma MJ, Hutchison AL, Taguchi A, Peek CB, Hong H, Huang W, Omura C, Allred AL, Bradfield CA, Dinner AR, Barish GD, Bass J. Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science.* 2015 Nov 6; 350(6261): aac4250.

Peruzzi D, Aluigi M, Manzoli L, Billi AM, Di Giorgio FP, Morleo M, Martelli AM, Cocco L. Molecular characterization of the human PLC beta1 gene. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 5; 1584(1): 46-54.

Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One.* 2013 Oct 15; 8(10): e77251.

Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med.* 2006 May; 119(5 Suppl 1): S10-6.

Petronis A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature.* 2010 Jun 10; 465(7299): 721-7.

Phillips CM, Goumidi L, Bertrais S, Field MR, McManus R, Hercberg S, Lairon D, Planells R, Roche HM. Gene-nutrient interactions and gender may modulate the association between ApoA1 and ApoB gene polymorphisms and metabolic syndrome risk. *Atherosclerosis.* 2011 Feb; 214(2): 408-14.

Piaggi P, Masindova I, Muller YL, Mercader J, Wiessner GB, Chen P; SIGMA Type 2 Diabetes Consortium., Kobes S, Hsueh WC, Mongalo M, Knowler WC, Krakoff J, Hanson RL, Bogardus C, Baier LJ. A Genome-Wide Association Study using a custom genotyping array identifies variants in GPR158 associated with reduced energy expenditure in American Indians. *Diabetes.* 2017 May 5; pii: db161565.

Pino-Yanes M, Corrales A, Basaldúa S, Hernández A, Guerra L, Villar J, Flores C. North African influences and potential bias in case-control association studies in the Spanish population. *PLoS One.* 2011 Mar 30; 6(3): e18389.

Pirim D, Wang X, Radwan ZH, Niemsiri V, Bunker CH, Barmada MM, Kamboh MI, Demirci FY. Resequencing of LPL in African Blacks and associations with lipoprotein-lipid levels. *Eur J Hum Genet.* 2015 Sep; 23(9): 1244-53.

- Plomin R, Haworth CM, Davis OS. Common disorders are quantitative traits. *Nat. Rev. Genet.* 2009; 10: 872–878.
- Poirier P, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2002; 4(6): 448-453.
- Poirier P, Martín J, Marceau P, Biron S, Marceau S. Impact of bariatric surgery on cardiac structure, function and clinical manifestations in morbid obesity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2004; 2(2): 193-201.
- Polimanti R, Kaufman J, Zhao H, Kranzler HR, Ursano RJ, Kessler RC, Gelernter J, Stein MB. A genome-wide gene-by-trauma interaction study of alcohol misuse in two independent cohorts identifies PRKG1 as a risk locus. *Mol Psychiatry.* 2017 Mar 7; doi: 10.1038/mp.2017.24.
- Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev.* 2012 Jan; 70(1): 3-21.
- Pouliot MC, Després JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter. Best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 1994; 73: 460-468.
- Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type ii (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance. A population-based twin study. *Diabetologia* 1999; 42: 139–145.
- Poveda A, Ibáñez ME, Rebato E. Common variants in BDNF, FAIM2, FTO, MC4R, NEGR1, and SH2B1 show association with obesity-related variables in Spanish Roma population. *Am J Hum Biol.* 2014 Sep-Oct; 26(5): 660-9.
- Pradhan AD. Sex differences in the metabolic syndrome: implications for cardiovascular health in women. *Clin Chem.* 2014 Jan; 60(1): 44-52.
- Prasad RB, Groop L. Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes (Basel).* 2015 Mar 12; 6(1): 87-123.
- Preis SR, Pencina MJ, Hwang SJ, D'Agostino RB Sr, Savage PJ, Levy D, Fox CS. Trends in cardiovascular disease risk factors in individuals with and without diabetes mellitus in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2009 Jul 21; 120(3): 212-20.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell.* 2002 Jul 26; 110(2): 251-60.
- Prentice AM. The emerging epidemic of obesity in developing countries. *Int J Epidemiol.* 2006; 35: 93-9.

Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem*. 2000 Dec 15; 275(50): 38990-4.

Price NL, Ramírez CM, Fernández-Hernando C. Relevance of microRNA in metabolic diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014 Dec; 51(6): 305-20.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007 Sep; 81(3): 559-75.

Pyorala K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care*. 1997; 20(4): 614-620.

Qi L, van Dam RM, Asselbergs FW, Hu FB. Gene-gene interactions between HNF4A and KCNJ11 in predicting type 2 diabetes in women. *Diabet Med*. 2007 Nov; 24(11): 1187-91a.

Qi L, Kang K, Zhang C, van Dam RM, Kraft P, Hunter D, Lee CH, Hu FB. Fat mass-and obesity-associated (FTO) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes*. 2008 Nov; 57(11): 3145-51.

Qi L, Liang J. Interactions between genetic factors that predict diabetes and dietary factors that ultimately impact on risk of diabetes. *Curr Opin Lipidol*. 2010 Feb; 21(1): 31-7.

Qi L, Liu S, Rifai N, Hunter D, Hu FB. Associations of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride and HDL cholesterol levels in women with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2007 May; 192(1): 204-10b.

Qi Q, Gogarten SM, Emery LS, Louie T, Stilp A, Cai J, Schneiderman N, Avilés-Santa ML, Kaplan RC, North KE, Laurie CC, Loos RJ, Isasi CR. Genetic variation near IRS1 is associated with adiposity and a favorable metabolic profile in U.S. Hispanics/Latinos. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Nov; 24(11): 2407-2413.

Qi Q, Hu FB. Genetics of type 2 diabetes in European populations. *J Diabetes*. 2012 Sep; 4(3): 203-12.

Qiu YH, Xu YL, Zhang WH. Effect of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Ile105Val polymorphisms on susceptibility to gestational diabetes mellitus. *Genet Mol Res*. 2016 Jun 3; 15(2). doi: 10.4238/gmr.15027711.

Quílez Llopiz P, Reig García-Galbis M. Control glucémico a través del ejercicio físico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2: revisión sistemática. *Nutr Hosp*. 2015 Apr 1; 31(4): 1465-72.

Rahilly-Tierney CR, Lawler EV, Scranton RE, Michael Gaziano J. Low-density lipoprotein reduction and magnitude of cardiovascular risk reduction. *Prev Cardiol.* 2009 Spring; 12(2): 80-7.

Rahman MM, Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol.* 2007; 5: 276-92.

Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet.* 1999 May; 22(1): 44-52.

Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016 Feb 3; pii: S0024-3205(16)30052-2.

Rankinen T, Perusse L, Weisnagel SJ, Snyder EE, Chagnon YC, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2001 update. *Obes Res.* 2002; 10: 196-243.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring).* 2006; 14: 529-644.

Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPAR γ . Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Jan; 55(1): 136-49.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988 Dec; 37(12): 1595-607.

Reaven GM. Relationships among insulin resistance, type 2 diabetes, essential hypertension, and cardiovascular disease: similarities and differences. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011 Apr; 13(4): 238-43.

Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J.* 2011 Jul; 32(14): 1769-818.

Reiner Ž, De Bacquer D, Kotseva K, Prugger C, De Backer G, Wood D, EUROASPIRE III Study Group. Treatment potential for dyslipidaemia management in patients with coronary heart disease across Europe: findings from the EUROASPIRE III survey. *Atherosclerosis.* 2013 Dec; 231(2): 300-7.

Remely M, Stefanska B, Lovrecic L, Magnet U, Haslberger AG. Nutriepigenomics: the role of nutrition in epigenetic control of human diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015 Jul; 18(4): 328-33.

Resnick H, Valsania P, Halter J, Lin X. Relation of weight gain and weight loss on subsequent diabetes risk in overweight adults. *J Epidemiol Community Health*. 2000; 54: 596-602.

Resta-Lenert S, Das S, Batra SK, Ho SB. Muc17 protects intestinal epithelial cells from enteroinvasive *E. coli* infection by promoting epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Jun; 300(6): G1144-55.

Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 1998; 280: 1843-48.

Ribas-Latre A, Eckel-Mahan K. Interdependence of nutrient metabolism and the circadian clock system: importance for metabolic health. *Mol Metab*. 2016 Jan 14; 5(3): 133-52.

Richards MW1, Law EW, Rennalls LP, Busacca S, O'Regan L, Fry AM, Fennell DA, Bayliss R. Crystal structure of EML1 reveals the basis for Hsp90 dependence of oncogenic EML4-ALK by disruption of an atypical β -propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 8; 111(14): 5195-200.

Richardson K, Nettleton JA, Rotllan N, Tanaka T, Smith CE, Lai CQ, Parnell LD, Lee YC, Lahti J, Lemaitre RN, Manichaikul A, Keller M, Mikkilä V, Ngwa J, van Rooij FJ, Ballentyne CM, Borecki IB, Cupples LA, Garcia M, Hofman A, Ferrucci L, Mozaffarian D, Perälä MM, Raitakari O, Tracy RP, Arnett DK, Bandinelli S, Boerwinkle E, Eriksson JG, Franco OH, Kähönen M, Nalls M, Siscovick DS, Houston DK, Psaty BM, Viikari J, Witteman JC, Goodarzi MO, Lehtimäki T, Liu Y, Zillikens MC, Chen YD, Uitterlinden AG, Rotter JJ, Fernandez-Hernando C, Ordovas JM. Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702 modulates lipid traits through disruption of a microRNA-410 seed site. *Am J Hum Genet*. 2013 Jan 10; 92(1): 5-14.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997; 336: 973-9.

Riobó P. Obesity and diabetes. *Nutr Hosp* 2013; 28(Supl. 5): 138-143.

Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996 Sep 13; 273(5281): 1516-7.

Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009; 6(6): 399-409.

Romaguera D, Norat T, Mouw T, May AM, Bamia C, Slimani N, Travier N, Besson H, Luan J, Wareham N, Rinaldi S, Couto E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Cottet V, Palli D, Agnoli C, Panico S, Tumino R, Vineis P, Agudo A, Rodriguez L, Sanchez MJ, Amiano P, Barricarte A, Huerta JM, Key TJ, Spencer EA, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Orfanos P, Naska A, Trichopoulou A, Rohrmann S, Kaaks R, Bergmann M, Boeing H, Johansson I, Hellstrom V, Manjer J, Wirfält E, Uhre Jacobsen M, Overvad K, Tjønneland A, Halkjaer J, Lund E, Braaten T, Engeset D,

Odysseos A, Riboli E, Peeters PH. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower abdominal adiposity in European men and women. *J Nutr.* 2009; 139: 1728-37.

Rönn T, Poulsen P, Hansson O, Holmkvist J, Almgren P, Nilsson P, Tuomi T, Isomaa B, Groop L, Vaag A, Ling C. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 2008 Jul; 51(7): 1159-68.

Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, Nilsson E, Tornberg A, Dekker Nitert M, Eriksson KF, Jones HA, Groop L, Ling C. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet.* 2013 Jun; 9(6): e1003572.

Ros E. Nuts and CVD. *Br J Nutr.* 2015 Apr; 113 Suppl 2: S111-20.

Ros E, Martínez-González MA, Estruch R, Salas-Salvadó J, Fitó M, Martínez JA, Corella D. Mediterranean diet and cardiovascular health: teachings of the PREDIMED study. *Adv Nutr.* 2014 May 14; 5(3): 330S-6S.

Ros E, Mataix J. Fatty acid composition of nuts--implications for cardiovascular health. *Br J Nutr.* 2006 Nov; 96 Suppl 2: S29-35.

Roskam AJ, Kunst AE, Van Oyen H, Demarest S, Klumbiene J, Regidor E, Helmert U, Jusot F, Dzurova D, Mackenbach JP; for additional participants to the study. Comparative appraisal of educational inequalities in overweight and obesity among adults in 19 European countries. *Int J Epidemiol.* 2010 Apr; 39(2): 392-404.

Ross SA. Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 983: 197-207.

Rossi M, Turati F, Lagiou P, Trichopoulos D, Augustin LS, La Vecchia C, Trichopoulou A. Mediterranean diet and glycaemic load in relation to incidence of type 2 diabetes: results from the Greek cohort of the population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Diabetologia.* 2013 Nov; 56(11): 2405-13.

Royal CD, Novembre J, Fullerton SM, Goldstein DB, Long JC, Bamshad MJ, Clark AG. Inferring genetic ancestry: opportunities, challenges, and implications. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14; 86(5): 661-73.

Ruano EG, Canivell S, Vieira E. REV-ERB ALPHA polymorphism is associated with obesity in the Spanish obese male population. *PLoS One.* 2014 Aug 4; 9(8): e104065.

Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* 2004 Nov; 2(11): e377. Epub 2004 Nov 02.

Ruiz JR, Labayen I, Ortega FB, Legry V, Moreno LA, Dallongeville J, Martínez-Gómez D, Bokor S, Manios Y, Ciarapica D, Gottrand F, De Henauw S, Molnár D, Sjöström M, Meirhaeghe A, HELENA Study Group. Attenuation of the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on total and central body fat by physical activity in adolescents: the HELENA study. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2010 Apr; 164(4): 328-33.

Rumawas ME, Meigs JB, Dwyer JT, McKeown NM, Jacques PF. Mediterranean-style dietary pattern, reduced risk of metabolic syndrometraits, and incidence in the Framingham Offspring Cohort. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90: 1608-14.

Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proença C, Bacot F, Balkau B, Belisle A, Borch-Johnsen K, Charpentier G, Dina C, Durand E, Elliott P, Hadjadj S, Järvelin MR, Laitinen J, Lauritzen T, Marre M, Mazur A, Meyre D, Montpetit A, Pisinger C, Posner B, Poulsen P, Pouta A, Prentki M, Ribel-Madsen R, Ruokonen A, Sandbaek A, Serre D, Tichet J, Vaxillaire M, Wojtaszewski JF, Vaag A, Hansen T, Polychronakos C, Pedersen O, Froguel P, Sladek R. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 2009 Oct; 41(10): 1110-5.

Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol.* 2009 Mar 15; 77(6): 937-46.

Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic mechanism of gene regulation. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1996.

Sacerdote C, Ricceri F, Rolandsson O, Baldi I, Chirilaque MD, Feskens E, Bendinelli B, Ardanaz E, Arriola L, Balkau B, Bergmann M, Beulens JW, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Crowe F, de Lauzon-Guillain B, Forouhi N, Franks PW, Gallo V, Gonzalez C, Halkjær J, Illner AK, Kaaks R, Key T, Khaw KT, Navarro C, Nilsson PM, Dal Ton SO, Overvad K, Pala V, Palli D, Panico S, Polidoro S, Quirós JR, Romieu I, Sánchez MJ, Slimani N, Sluijs I, Spijkerman A, Teucher B, Tjønneland A, Tumino R, van der A D, Vergnaud AC, Wennberg P, Sharp S, Langenberg C, Riboli E, Vineis P, Wareham N. Lower educational level is a predictor of incident type 2 diabetes in European countries: the EPIC-InterAct study. *Int J Epidemiol.* 2012 Aug; 41(4): 1162-73.

Sackner-Bernstein J, Kanter D, Kaul S. Dietary intervention for overweight and obese adults: comparison of low-carbohydrate and low-fat diets. A meta-analysis. *PLoS One.* 2015 Oct 20; 10(10): e0139817.

Saini C, Petrenko V, Pulimeno P, Giovannoni L, Berney T, Hebrok M, Howald C, Dermitzakis ET, Dibner C. A functional circadian clock is required for proper insulin secretion by human pancreatic islet cells. *Diabetes Obes Metab.* 2016 Apr; 18(4): 355-65.

Sajja RK, Cucullo L. Altered glycaemia differentially modulates efflux transporter expression and activity in hCMEC/D3 cell line. *Neurosci Lett*. 2015 Jun 26; 598: 59-65.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, Estruch R, Covas MI, Corella D, Arós F, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E, PREDIMED Study Investigators. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care*. 2011 Jan; 34(1): 14-9.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, et al. Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Ann Intern Med* 2014; 160: 1-10 b.

Salas-Salvadó J, Fernández-Ballart J, Ros E, Martínez-González MA, Fitó M, Estruch R, Corella D, Fiol M, Gómez-Gracia E, Arós F, Flores G, Lapetra J, Lamuela-Raventós R, Ruiz-Gutiérrez V, Bulló M, Basora J, Covas MI, PREDIMED Study Investigators. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med* 2008; 168: 2449-58.

Salas-Salvadó J, Guasch-Ferré M, Bulló M, Sabaté J. Nuts in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2014 Jul; 100 Suppl 1: 399S-407S a.

Salman M, Dasgupta S, Cholendra A, Venugopal PN, Lakshmi GL, Xaviour D, Rao J, D'Souza CJ. MTNR1B gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes: a pilot study in South Indians. *Gene*. 2015 Jul 25; 566(2): 189-93.

Salud. Portal estadístico del SNS. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad ; 2012 [acceso 2016]. Encuesta Nacional de Salud de España 2011/12. Disponible en: www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2011.htm.

Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H; WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2007 Aug 2; 357(5): 443-53.

Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010 Jun 26; 375(9733): 2267-77.

Samson R, Qi A, Jaiswal A, Le Jemtel TH, Oparil S. Obesity-associated hypertension: the upcoming phenotype in African-American women. *Curr Hypertens Rep*. 2017 May; 19(5): 41

Sánchez de Madariaga I, Ruiz Cantero MT. Opportunity for the integration of the gender perspective in health research and innovation in Europe: COST Network genderSTE. *Gac Sanit*. 2014 Sep-Oct; 28(5): 401-4.

Sánchez-Moreno C, Ordovás JM, Smith CE, Baraza JC, Lee YC, Garaulet M. APOA5 gene variation interacts with dietary fat intake to modulate obesity and circulating triglycerides in a Mediterranean population. *J Nutr.* 2011 Mar; 141(3): 380-5.

Sánchez-Recalde A, Kaski JC. Diabetes mellitus, inflammation and coronary atherosclerosis: current and future perspectives. *Rev Esp Cardiol.* 2001 Jun; 54(6): 751-63.

Sandholt CH, Grarup N, Pedersen O, Hansen T. Genome-wide association studies of human adiposity: Zooming in on synapses. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Dec 15; 418 Pt 2: 90-100.

Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O. Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr Diabetes.* 2012; 2: e37.

Sarkar J, Lix LM, Bruce S, Young TK. Ethnic and regional differences in prevalence and correlates of chronic diseases and risk factors in northern Canada. *Prev Chronic Dis* 2010; 7(1).

Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007 Jan 30; 115(4): 450-8.

Sato J, Kinugasa M, Satomi-Kobayashi S, Hatakeyama K, Knox AJ, Asada Y, Wierman ME, Hirata K, Rikitake Y. Family with sequence similarity 5, member C (FAM5C) increases leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells: implication in vascular inflammation. *PLoS One.* 2014 Sep 24; 9(9): e107236.

Sax K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in PHASEOLUS VULGARIS. *Genetics.* 1923 Nov; 8(6): 552-60.

Saxena M, Srivastava N, Banerjee M. Association of IL-6, TNF- α and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep.* 2013 Nov; 40(11): 6271-9.

Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjögren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, Lindblad U, Daly MJ, Tuomi T, Hirschhorn JN, Ardlie KG, Groop LC, Altshuler D. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 2006; 55: 2890-5.

Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Boström K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Råstam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjögren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chim GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Rieke D,

- Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007; 316: 1331-6.
- Scarborough P, Allender S. The North-South gap in overweight and obesity in England. *Br J Nutr*. 2008 Sep; 100(3): 677-84.
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vriens C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2; 279(27): 27941-7.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*. 2003 Jun; 14(3): 281-7.
- Scheele C, Nielsen S, Pedersen BK. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Apr; 20(3): 95-9.
- Schillinger D, Tran J, Mangurian C, Kearns C. Do sugar-sweetened beverages cause obesity and diabetes? Industry and the manufacture of scientific controversy. *Ann Intern Med*. 2016 Dec 20; 165(12): 895-7.
- Schober AK, Neurath MF, Harsch IA. Prevalence of sleep apnoea in diabetic patients. *Clin Respir J*. 2011 Jul; 5(3): 165-72.
- Schröder H, Marrugat J, Vila J, Covas MI, Elosua R. Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *J Nutr*. 2004; 134: 3355-61.
- Schröder H, Fitó M, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Lamuela-Raventós R, Ros E, Salaverría I, Fiol M, Lapetra J, Vinyoles E, Gómez-Gracia E, Lahoz C, Serra-Majem L, Pintó X, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI. A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *J Nutr*. 2011 Jun; 141(6): 1140-5.
- Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015 Jan 15; 517(7534): 321-6. doi: 10.1038/nature14192.
- Schulze MB, Hu FB. Primary prevention of diabetes: what can be done and how much can be prevented? *Annu Rev Public Health*. 2005; 26: 445-67.
- Schütten MT, Houben AJ, de Leeuw PW, Stehouwer CD. The link between adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system signaling and obesity-associated hypertension. *Physiology (Bethesda)*. 2017 May; 32(3): 197-209.
- Schwenk RW, Vogel H, Schürmann A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Mol Metab*. 2013 Sep 25; 2(4): 337-47.

Scoditti E, Capurso C, Capurso A, Massaro M. Vascular effects of the Mediterranean diet-part II: role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascul Pharmacol*. 2014 Dec; 63(3): 127-34.

Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Apr; 32(4): 658-62.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007; 316: 1341-5.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*. 2007 Jul; 3(7): e115.

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008 Aug 21; 454(7207): 961-7.

Seamans MJ, Robinson WR, Thorpe RJ Jr, Cole SR, LaVeist TA. Exploring racial differences in the obesity gender gap. *Ann Epidemiol*. 2015 Jun; 25(6): 420-5.

Sedentary Behaviour Research Network. Letter to the editor: standardized use of the terms "sedentary" and "sedentary behaviours". *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012 Jun; 37(3): 540-2. doi: 10.1139/h2012-024.

Senapati S, Ho SB, Sharma P, Das S, Chakraborty S, Kaur S, Niehans G, Batra SK. Expression of intestinal MUC17 membrane-bound mucin in inflammatory and neoplastic diseases of the colon. *J Clin Pathol*. 2010 Aug; 63(8): 702-7.

Seo DC, Choe S, Torabi MR. Is waist circumference $\geq 102/88$ cm better than body mass index ≥ 30 to predict hypertension and diabetes development regardless of gender, age group, and race/ethnicity? Meta-analysis. *Prev Med*. 2017 Apr; 97: 100-8. doi: 10.1016/j.ypmed.2017.

Serra-Majem L, Bautista-Castaño I. Etiology of obesity: two "key issues" and other emerging factors. *Nutr. Hosp*. 2013; 28(Supl. 5): 32-43.

Serra-Majem L, Santana-Armas JF, Salmona E. Dietary habits and nutritional status in Spain. *World Rev Nutr Diet* 2000; 87: 127-59.

Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, Hatzigeorgiou AG, Antonarakis SE. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2007 Aug; 81(2): 405-13.

Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet.* 2008 Oct; 24(10): 489-97.

Seyhan AA. MicroRNAs with different functions and roles in disease development and as potential biomarkers of diabetes: progress and challenges. *Mol Biosyst.* 2015 May; 11(5): 1217-34.

Sharma R, Prudente S, Andreozzi F, Powers C, Mannino G, Bacci S, Gervino EV, Hauser TH, Succurro E, Mercuri L, Goheen EH, Shah H, Trischitta V, Sesti G, Doria A. The type 2 diabetes and insulin-resistance locus near IRS1 is a determinant of HDL cholesterol and triglycerides levels among diabetic subjects. *Atherosclerosis.* 2011 May; 216(1): 157-60.

Shea KL, Gavin KM, Melanson EL, Gibbons E, Stavros A, Wolfe P, Kittelson JM, Vondracek SF, Schwartz RS, Wierman ME, Kohrt WM. Body composition and bone mineral density after ovarian hormone suppression with or without estradiol treatment. *Menopause.* 2015 Oct; 22(10): 1045-52.

Shen J, Wilmot KA, Ghasemzadeh N, Molloy DL, Burkman G, Mekonnen G, Gongora MC, Quyyumi AA, Sperling LS. Mediterranean dietary patterns and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr.* 2015; 35: 425-49.

Shirazian T, Faris BS, Fox NS, Friedman F Jr, Rebarber A. The lifestyle modification project: limiting pregnancy weight gain in obese women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 29(1): 80-4.

Siegel LC, Sesso HD, Bowman TS, Lee IM, Manson JE, Gaziano JM. Physical activity, body mass index, and diabetes risk in men: a prospective study. *Am J Med.* 2009 Dec; 122(12): 1115-21.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997 Mar; 82(2): 291-5.

Silander K, Alanne M, Kristiansson K, Saarela O, Ripatti S, Auro K, Karvanen J, Kulathinal S, Niemelä M, Ellonen P, Vartiainen E, Jousilahti P, Saarela J, Kuulasmaa K, Evans A, Perola M, Salomaa V, Peltonen L. Gender differences in genetic risk profiles for cardiovascular disease. *PLoS One.* 2008; 3(10): e3615.

Simonelli V, Camerini S, Mazzei F, Van Loon B, Allione A, D'Errico M, Barone F, Minoprio A, Ricceri F, Guarrera S, Russo A, Dalhus B, Crescenzi M, Hübscher U, Bjørås M, Matullo G, Dogliotti E. Genotype-phenotype analysis of S326C OGG1 polymorphism: a risk factor for oxidative pathologies. *Free Radic Biol Med.* 2013 Oct; 63: 401-9.

Singh RK, Kumar P, Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: a comprehensive review. *C R Biol.* 2017 Feb; 340(2): 87-108.

Siu PM, Pei XM, Teng BT, Benzie IF, Ying M, Wong SH. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol*. 2011 Sep; 96(9): 889-906.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007; 445: 881-885.

Sleiman D, Al-Badri MR, Azar ST. Effect of Mediterranean diet in diabetes control and cardiovascular risk modification: a systematic review. *Front Public Health*. 2015 Apr 28; 3: 69.

Small KS, Hedman AK, Grundberg E, Nica AC, Thorleifsson G, Kong A, Thorsteindottir U, Shin SY, Richards HB, GIANT Consortium, MAGIC Investigators, DIAGRAM Consortium, Soranzo N, Ahmadi KR, Lindgren CM, Stefansson K, Dermitzakis ET, Deloukas P, Spector TD, McCarthy MI, MuTHER Consortium. Identification of an imprinted master trans regulator at the KLF14 locus related to multiple metabolic phenotypes. *Nat Genet*. 2011 Jun; 43(6): 561-4.

Smart A, Bolnick DA, Tutton R. Health and genetic ancestry testing: time to bridge the gap. *BMC Med Genomics*. 2017 Jan 9; 10(1): 3.

Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NF, Lee JH, Puvindran 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.

Smith BT, Lynch JW, Fox CS, Harper S, Abrahamowicz M, Almeida ND, Loucks EB. Life-course socioeconomic position and type 2 diabetes mellitus: the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol*. 2011 Feb 15; 173(4): 438-47.

Smith CE, Tucker KL, Lai CQ, Parnell LD, Lee YC, Ordovás JM. Apolipoprotein A5 and lipoprotein lipase interact to modulate anthropometric measures in Hispanics of Caribbean origin. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Feb; 18(2): 327-32.

Smith CJ, Ryckman KK. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015 Jun 29; 8: 295-302.

Soares JP, Silva AI, Silva AM, Almeida V, Teixeira JP, Matos M, Gaivão I, Mota MP. Effects of physical exercise training in DNA damage and repair activity in humans with different genetic polymorphisms of hOGG1 (Ser326Cys). *Cell Biochem Funct*. 2015 Dec; 33(8): 519-24.

Sociedad Española de nutrición comunitaria (SENC). Guía de la alimentación comunitaria [en línea]. 2004. [Consultado 30 de octubre de 2015]. Disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/nutricion/guia_alimentacion.pdf.

Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Pirámide de la alimentación saludable SENC 2015 [en línea]. 2015. [Consultado 30 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.nutricioncomunitaria.org/es/noticia/piramide-de-la-alimentacion-saludable-senc-2015>.

Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Guías alimentarias para la población española (SENC, diciembre 2016): la nueva pirámide de la alimentación saludable. *Nutr Hosp*. 2016; 33Suppl 8: 1-48.

Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso español 1995 para la evaluación de la obesidad y para la realización de estudios epidemiológicos. *MedClin (Barc)* 1996; 107: 782-7.

Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO 2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2000; 115: 587-97.

Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes* 2007; 7-48.

Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefitsof adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematicreview and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92: 1189-96.

Solocinski K, Gumz ML. The circadian Clock in the regulation of renal rhythms. *J Biol Rhythms*. 2015 Dec; 30(6): 470-86.

Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, Shin Y, Liu J, Cameron MD, Noel R, Yoo SH, Takahashi JS, Butler AA, Kamenecka TM, Burris TP. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature*. 2012 Mar 29; 485(7396): 62-8.

Sonestedt E, Roos C, Gullberg B, Ericson U, Wirfält E, Orho-Melander M. Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the FTO genotype and obesity. *Am J Clin Nutr*. 2009 Nov; 90(5): 1418-25.

Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueño A, Castaño G, Pirola CJ. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr*. 2008 Jun; 87(6): 1606-15.

Soriguer F1, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, Castaño L, Castell C, Catalá M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbés J, Gomis R, Gutiérrez G, López-Alba A, Martínez-Larrad MT, Menéndez E, Mora-Peces I, Ortega E, Pascual-Manich G, Rojo-Martínez G, Serrano-Rios M, Valdés S, Vázquez JA, Vendrell J. Prevalence of diabetes mellitus and impairedglucoseregulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012 Jan; 55(1): 88-93.

Sorisky A. Effect of high glucose levels on white adipose cells and adipokines-fuel for the fire. *Int J Mol Sci.* 2017 Apr 29; 18(5). pii: E944. doi: 10.3390/ijms18050944.

Sotos-Prieto M, Francés F, Corella D. Impact of apolipoprotein A5 on cardiovascular risk. genetic and environmental modulation. *Rev Med Chil.* 2010 Jul; 138(7): 868-80.

Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 May; 286(5): H1597-602.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008 Jun 5; 453(7196): 783-7.

Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr.* 2004 Aug; 134(8 Suppl): 2090S-2105S.

Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, Lango Allen H, Lindgren CM, Luan J, Mägi R, Randall JC, Vedantam S, Winkler TW, Qi L, Workalemahu T, Heid IM, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Weedon MN, Wheeler E, Wood AR, Ferreira T, Weyant RJ, Segrè AV, Estrada K, Liang L, Nemesh J, Park JH, Gustafsson S, Kilpeläinen TO, Yang J, Bouatia-Naji N, Esko T, Feitosa MF, Kutalik Z, Mangino M, Raychaudhuri S, Scherag A, Smith AV, Welch R, Zhao JH, Aben KK, Absher DM, Amin N, Dixon AL, Fisher E, Glazer NL, Goddard ME, Heard-Costa NL, Hoesel V, Hottenga JJ, Johansson A, Johnson T, Ketkar S, Lamina C, Li S, Moffatt MF, Myers RH, Narisu N, Perry JR, Peters MJ, Preuss M, Ripatti S, Rivadeneira F, Sandholt C, Scott LJ, Timpson NJ, Tyrer JP, van Wingerden S, Watanabe RM, White CC, Wiklund F, Barlassina C, Chasman DI, Cooper MN, Jansson JO, Lawrence RW, Pellikka N, Prokopenko I, Shi J, Thiering E, Alavere H, Alibrandi MT, Almgren P, Arnold AM, Aspelund T, Atwood LD, Balkau B, Balmforth AJ, Bennett AJ, Ben-Shlomo Y, Bergman RN, Bergmann S, Biebermann H, Blakemore AI, Boes T, Bonnycastle LL, Bornstein SR, Brown MJ, Buchanan TA, Busonero F, Campbell H, Cappuccio FP, Cavalcanti-Proença C, Chen YD, Chen CM, Chines PS, Clarke R, Coin L, Connell J, Day IN, den Heijer M, Duan J, Ebrahim S, Elliott P, Elosua R, Eiriksdottir G, Erdos MR, Eriksson JG, Facheris MF, Felix SB, Fischer-Posovszky P, Folsom AR, Friedrich N, Freimer NB, Fu M, Gaget S, Gejman PV, Geus EJ, Gieger C, Gjesing AP, Goel A, Goyette P, Grallert H, Grässler J, Greenawalt DM, Groves CJ, Gudnason V, Guiducci C, Hartikainen AL, Hassanali N, Hall AS, Havulinna AS, Hayward C, Heath AC, Hengstenberg C, Hicks AA, Hinney A, Hofman A, Homuth G, Hui J, Igl W, Iribarren C, Isomaa B, Jacobs KB, Jarick I, Jewell E, John U, Jørgensen T, Jousilahti P, Jula A, Kaakinen M, Kajantie E, Kaplan LM, Kathiresan S, Kettunen J, Kinnunen L, Knowles JW, Kolcic I, König IR, Koskinen S, Kovacs P, Kuusisto J, Kraft P, Kvaløy K, Laitinen J, Lantieri O, Lanzani C, Launer LJ, Lecoeur C, Lehtimäki T, Lettre G, Liu J, Lokki ML, Lorentzon M, Luben RN, Ludwig B, MAGIC, Manunta P, Marek D, Marre M, Martin NG, McArdle WL, McCarthy A, McKnight B, Meitinger T, Melander O, Meyre D, Midthjell K, Montgomery GW, Morken MA, Morris AP, Mulic R, Ngwa JS, Nelis M, Neville MJ, Nyholt DR, O'Donnell CJ, O'Rahilly S, Ong KK, Oostra B, Paré G, Parker AN, Perola M, Pichler I, Pietiläinen KH, Platou CG, Polasek O, Pouta A, Rafelt S, Raitakari O, Rayner NW, Ridderstråle M, Rief W, Ruokonen A, Robertson NR, Rzehak P, Salomaa V, Sanders AR, Sandhu MS, Sanna S, Saramies J, Savolainen MJ, Scherag S, Schipf S, Schreiber S,

Schunkert H, Silander K, Sinisalo J, Siscovick DS, Smit JH, Soranzo N, Sovio U, Stephens J, Surakka I, Swift AJ, Tammesoo ML, Tardif JC, Teder-Laving M, Teslovich TM, Thompson JR, Thomson B, Tönjes A, Tuomi T, van Meurs JB, van Ommen GJ, Vatin V, Viikari J, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogel CI, Voight BF, Waite LL, Wallaschofski H, Walters GB, Widen E, Wiegand S, Wild SH, Willemsen G, Witte DR, Wittman JC, Xu J, Zhang Q, Zgaga L, Ziegler A, Zitting P, Beilby JP, Farooqi IS, Hebebrand J, Huikuri HV, James AL, Kähönen M, Levinson DF, Macciardi F, Nieminen MS, Ohlsson C, Palmer LJ, Ridker PM, Stumvoll M, Beckmann JS, Boeing H, Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Chanock SJ, Collins FS, Cupples LA, Smith GD, Erdmann J, Froguel P, Grönberg H, Gyllensten U, Hall P, Hansen T, Harris TB, Hattersley AT, Hayes RB, Heinrich J, Hu FB, Hveem K, Illig T, Jarvelin MR, Kaprio J, Karpe F, Khaw KT, Kiemeny LA, Krude H, Laakso M, Lawlor DA, Metspalu A, Munroe PB, Ouwehand WH, Pedersen O, Penninx BW, Peters A, Pramstaller PP, Quertermous T, Reinehr T, Rissanen A, Rudan I, Samani NJ, Schwarz PE, Shuldiner AR, Spector TD, Tuomilehto J, Uda M, Uitterlinden A, Valle TT, Wabitsch M, Waeber G, Wareham NJ, Watkins H, Procardis Consortium, Wilson JF, Wright AF, Zillikens MC, Chatterjee N, McCarroll SA, Purcell S, Schadt EE, Visscher PM, Assimes TL, Borecki IB, Deloukas P, Fox CS, Groop LC, Haritunians T, Hunter DJ, Kaplan RC, Mohlke KL, O'Connell JR, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, van Duijn CM, Wichmann HE, Frayling TM, Thorsteinsdottir U, Abecasis GR, Barroso I, Boehnke M, Stefansson K, North KE, McCarthy MI, Hirschhorn JN, Ingelsson E, Loos RJ. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet.* 2010; 42(11): 937–48.

Stamler R, Stamler J, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Weight and blood pressure: findings in hypertension screening of 1 million Americans. *JAMA.* 1978; 240: 1607-10.

Stead LM, Brosnan JT, Brosnan ME, Vance DE, Jacobs RL. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr.* 2006 Jan; 83(1): 5-10.

Stefanovic A, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Bogavac-Stanojevic N, Bujisic N. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 79: 156-63.

Stein JH, Asthana A, Smith SS, Piper ME, Loh WY, Fiore MC, Baker TB. Smoking cessation and the risk of diabetes mellitus and impaired fasting glucose: three-year outcomes after a quit attempt. *PLoS One.* 2014 Jun 3; 9(6): e98278.

Stein Y, Stein O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003 Sep; 170(1): 1-9.

Stephens JW, Dhamrait SS, Mani AR, Acharya J, Moore K, Hurel SJ, Humphries SE. Interaction between the uncoupling protein 2 -866G>A gene variant and cigarette smoking to increase oxidative stress in subjects with diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008 Jan; 18(1): 7-14.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000 Jan 6; 403(6765): 41-5.

Stranger BE, Stahl EA, Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics*. 2011 Feb; 187(2): 367-83.

Stratakis CA. Genetics and the new (precision) medicine and endocrinology: in medias res or ab initio? *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017 Jun; 46(2): xv-xvi. doi: 10.1016/.

Street SJ, Wells JC, Hills AP. Windows of opportunity for physical activity in the prevention of obesity. *Obes Rev*. 2015 Oct; 16(10): 857-70.

Stryjecki C, Roke K, Clarke S, Nielsen D, Badawi A, El-Sohemy A, Ma DW, Mutch DM. Enzymatic activity and genetic variation in SCD1 modulate the relationship between fatty acids and inflammation. *Mol Genet Metab*. 2012 Mar; 105(3): 421-7.

Sulander TT, Uutela AK. Obesity and education: recent trends and disparities among 65- to 84-year-old men and women in Finland. *Prev Med*. 2007 Aug-Sep; 45(2-3): 153-6.

Sun Y, You W, Almeida F, Estabrooks P, Davy B. The effectiveness and cost of lifestyle interventions including nutrition education for diabetes prevention: a systematic review and meta-analysis. *J Acad Nutr Diet*. 2017 Mar; 117(3): 404-421.e36.

Tabassum R, Chauhan G, Dwivedi OP, Mahajan A, Jaiswal A, Kaur I, Bandesh K, Singh T, Mathai BJ, Pandey Y, Chidambaram M, Sharma A, Chavali S, Sengupta S, Ramakrishnan L, Venkatesh P, Aggarwal SK, Ghosh S, Prabhakaran D, Srinath RK, Saxena M, Banerjee M, Mathur S, Bhansali A, Shah VN, Madhu SV, Marwaha RK, Basu A, Scaria V, McCarthy MI, DIAGRAM, INDICO, Venkatesan R, Mohan V, Tandon N, Bharadwaj D. Genome-wide association study for type 2 diabetes in Indians identifies a new susceptibility locus at 2q21. *Diabetes*. 2013; 62: 977-86.

Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet*. 2008; 9: 764-75.

Takeda N, Maemura K. The role of clock genes and circadian rhythm in the development of cardiovascular diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Sep; 72(17): 3225-34.

Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol Aspects Med*. 2013 Jul-Aug; 34(4): 753-64.

Tan CY, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans*. 2008 Oct; 36(Pt 5): 935-40.

Tang W, Apostol G, Schreiner PJ, Jacobs DR Jr, Boerwinkle E, Fornage M. Associations of lipoprotein lipase gene polymorphisms with longitudinal plasma lipid trends in young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Apr; 3(2): 179-86.

- Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ Res*. 2017 Mar 31; 120(7): 1183-96.
- Tang Y, Han X, Sun X, Lv C, Zhang X, Guo W, Ren Q, Luo Y, Zhang X, Zhou X, Ji L. Association study of a common variant near IRS1 with type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population. *Endocrine*. 2013 Feb; 43(1): 84-91.
- Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015 Apr 15; 6(3): 456-80.
- Tare A, Lane JM, Cade BE, Grant SF, Chen TH, Punjabi NM, Lauderdale DS, Zee PC, Gharib SA, Gottlieb DJ, Scheer FA, Redline S, Saxena R. Sleep duration does not mediate or modify association of common genetic variants with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2014 Feb; 57(2): 339-46.
- Tattersall RB. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med*. 1974; 43(170): 339-57.
- Teare MD, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet*. 2005 Sep 17-23; 366(9490): 1036-44.
- Teare MD, Koref MF. Terminology, concepts, and models in genetic epidemiology. *Methods Mol Biol*. 2011; 713: 13-25.
- Temelkova-Kurktschiev T, Stefanov T. Lifestyle and genetics in obesity and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 Jan; 120(1): 1-6.
- Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, Pirruccello JP, Ripatti S, Chasman DI, Willer CJ, Johansen CT, Fouchier SW, Isaacs A, Peloso GM, Barbalic M, Ricketts SL, Bis JC, Aulchenko YS, Thorleifsson G, Feitosa MF, Chambers J, Orho-Melander M, Melander O, Johnson T, Li X, Guo X, Li M, Shin Cho Y, Jin Go M, Jin Kim Y, Lee JY, Park T, Kim K, Sim X, Twee-Hee Ong R, Croteau-Chonka DC, Lange LA, Smith JD, Song K, Hua Zhao J, Yuan X, Luan J, Lamina C, Ziegler A, Zhang W, Zee RY, Wright AF, Wittteman JC, Wilson JF, Willemssen G, Wichmann HE, Whitfield JB, Waterworth DM, Wareham NJ, Waeber G, Vollenweider P, Voight BF, Vitart V, Uitterlinden AG, Uda M, Tuomilehto J, Thompson JR, Tanaka T, Surakka I, Stringham HM, Spector TD, Soranzo N, Smit JH, Sinisalo J, Silander K, Sijbrands EJ, Scuteri A, Scott J, Schlessinger D, Sanna S, Salomaa V, Saharinen J, Sabatti C, Ruukonen A, Rudan I, Rose LM, Roberts R, Rieder M, Psaty BM, Pramstaller PP, Pichler I, Perola M, Penninx BW, Pedersen NL, Pattaro C, Parker AN, Pare G, Oostra BA, O'Donnell CJ, Nieminen MS, Nickerson DA, Montgomery GW, Meitinger T, McPherson R, McCarthy MI, McArdle W, Masson D, Martin NG, Marroni F, Mangino M, Magnusson PK, Lucas G, Luben R, Loos RJ, Lokki ML, Lettre G, Langenberg C, Launer LJ, Lakatta EG, Laaksonen R, Kyvik KO, Kronenberg F, König IR, Khaw KT, Kaprio J, Kaplan LM, Johansson A, Jarvelin MR, Janssens AC, Ingelsson E, Igl W, Kees Hovingh G, Hottenga JJ, Hofman A, Hicks AA, Hengstenberg C, Heid IM, Hayward C, Havulinna AS, Hastie ND, Harris TB, Haritunians T, Hall AS, Gyllenstein U, Guiducci C, Groop LC, Gonzalez E, Gieger C, Freimer NB, Ferrucci L, Erdmann J, Elliott P, Ejebe KG, Döring A, Dominiczak AF, Demissie S, Deloukas P, de Geus EJ, de Faire U, Crawford G, Collins FS, Chen YD, Caulfield MJ, Campbell H, Burtt NP, Bonnycastle LL, Boomsma DI, Boekholdt SM, Bergman RN, Barroso I, Bandinelli S, Ballantyne

CM, Assimes TL, Quertermous T, Altshuler D, Seielstad M, Wong TY, Tai ES, Feranil AB, Kuzawa CW, Adair LS, Taylor HA Jr, Borecki IB, Gabriel SB, Wilson JG, Holm H, Thorsteinsdottir U, Gudnason V, Krauss RM, Mohlke KL, Ordovas JM, Munroe PB, Kooner JS, Tall AR, Hegele RA, Kastelein JJ, Schadt EE, Rotter JI, Boerwinkle E, Strachan DP, Mooser V, Stefansson K, Reilly MP, Samani NJ, Schunkert H, Cupples LA, Sandhu MS, Ridker PM, Rader DJ, van Duijn CM, Peltonen L, Abecasis GR, Boehnke M, Kathiresan S. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010 Aug 5; 466(7307): 707-13.

Thameem F, Puppala S, Lehman DM, Stern MP, Blangero J, Abboud HE, Duggirala R, Habib SL. The Ser(326)Cys polymorphism of 8-oxoguanine glycosylase 1 (OGG1) is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Hum Hered*. 2010; 70(2): 97-101.

Thibault V, Bélanger M, LeBlanc E, Babin L, Halpine S, Greene B, Mancuso M. Factors that could explain the increasing prevalence of type 2 diabetes among adults in a Canadian province: a critical review and analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2016 Nov 9; 8: 71. eCollection 2016.

Thompson PD, Crouse SF, Goodpaster B, Kelley D, Moyna N, Pescatello L. The acute versus the chronic response to exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2001; 33: S438–S445.

Thorleifsson TE, Gudbjartsson DF, Sulem P, Besenbacher S, Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Walters GB, TAG Consortium, Oxford-GSK Consortium, ENGAGE Consortium, Furberg H, Sullivan PF, Marchini J, McCarthy MI, Steinthorsdottir V, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. A common biological basis of obesity and nicotine addiction. *Transl Psychiatry*. 2013 Oct 1; 3: e308.

1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010; 467(7319): 1061-73.

Tiainen S, Luoto R, Ahotupa M, Raitanen J, Vasankari T. 6-mo aerobic exercise intervention enhances the lipid peroxide transport function of HDL. *Free Radic Res*. 2016; 50(11): 1279-85.

Tian C, Gregersen PK, Seldin MF. Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 15; 17(R2): R143-50.

Tian C, Hinds DA, Shigeta R, Adler SG, Lee A, Pahl MV, Silva G, Belmont JW, Hanson RL, Knowler WC, Gregersen PK, Ballinger DG, Seldin MF. A genomewide single-nucleotide-polymorphism panel for Mexican American admixture mapping. *Am J Hum Genet*. 2007 Jun; 80(6): 1014-23.

Tian H, Zhou C, Yang J, Li J, Gong Z. Long and short noncoding RNAs in lung cancer precision medicine: Opportunities and challenges. *Tumour Biol*. 2017 Apr; 39(4): 1010428317697578.

Tobias DK, Hu FB, Chavarro J, Rosner B, Mozaffarian D, Zhang C. Healthful dietary patterns and type 2 diabetes mellitus risk among women with a history of gestational diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2012 Nov 12; 172(20): 1566-72.

Tomás M, Vázquez E, Fernández-Fernández JM, Subirana I, Plata C, Heras M, Vila J, Marrugat J, Valverde MA, Sentí M. Genetic variation in the KCNMA1 potassium channel alpha subunit as risk factor for severe essential hypertension and myocardial infarction. *J Hypertens*. 2008 Nov; 26(11): 2147-53.

Tong TY, Wareham NJ, Khaw KT, Imamura F, Forouhi NG. Prospective association of the Mediterranean diet with cardiovascular disease incidence and mortality and its population impact in a non-Mediterranean population: the EPIC-Norfolk study. *BMC Med*. 2016 Sep 29; 14(1): 135.

Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, Wainstein J, Friedlander Y, Levy-Lahad E, Glaser B, Hellman A. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet*. 2012 Jan 15; 21(2): 371-83.

Tortosa A, Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, Basterra-Gortari FJ, Nuñez-Cordoba JM, Martinez-Gonzalez MA. Mediterranean diet inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: the SUNprospective cohort. *Diabetes Care*. 2007; 30: 2957-9.

Tresserra-Rimbau A, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Bulló M, Salas-Salvadó J, Corella D, Fitó M, Gea A, Gómez-Gracia E, Lapetra J, Arós F, Fiol M, Ros E, Serra-Majem L, Pintó X, Muñoz MA, Estruch R, PREDIMED Study Investigators. Moderate red wine consumption is associated with a lower prevalence of the metabolic syndrome in the PREDIMED population. *Br J Nutr*. 2015 Apr; 113 Suppl 2: S121-30.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2599-608.

Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev*. 1997; 55(11 Pt 1): 383-9.

Trichopoulou A, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D. Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am J Clin Nutr*. 2005 Nov; 82(5): 935-40.

Trikkalinou A, Papazafiropoulou AK, Melidonis A. Type 2 diabetes and quality of life. *World J Diabetes*. 2017 Apr 15; 8(4): 120-9.

Tufano A, Di Capua M, Coppola A, Conca P, Cimino E, Cerbone AM, Di Minno G. The infectious burden in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost*. 2012 Jul; 38(5): 515-23.

Turak O, Afşar B, Özcan F, Öksüz F, Mendi MA, Yayla Ç, Covic A, Bertelsen N, Kanbay M. The role of plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio to predict new cardiovascular events in essential hypertensive patients. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2016 Aug; 18(8): 772-7.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005 May 13; 308(5724): 1043-5.

Turner BM. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci*. 1998 Jan; 54(1): 21-31.

Tyrovolas S, Psaltopoulou T, Pounis G, Papairakleous N, Bountziouka V, Zeimbekis A, Gotsis E, Antonopoulou M, Metallinos G, Polychronopoulos E, Lionis C, Panagiotakos DB. Nutrient intake in relation to central and overall obesity status among elderly people living in the Mediterranean islands: The MEDIS study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011; 21: 438-45.

Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*. 2002 Aug 1; 418(6897): 534-9.

Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2004 Jun; 24(12): 5434-46.

Uemura H, Katsuura-Kamano S, Yamaguchi M, Arisawa K, Hamajima N, Hishida A, Kawai S, Oze I, Shinchu K, Takashima N, Suzuki S, Nakahata N, Mikami H, Ohnaka K, Kuriyama N, Kubo M, Tanaka H, Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Variant of the clock circadian regulator (CLOCK) gene and related haplotypes are associated with the prevalence of type 2 diabetes in the Japanese population. *J Diabetes*. 2016 Sep; 8(5): 667-76.

Uma Jyothi K, Reddy BM. Gene-gene and gene-environment interactions in the etiology of type 2 diabetes mellitus in the population of Hyderabad, India. *Meta Gene*. 2015 May 21; 5: 9-20.

UNESCO. Representative list of the Intangible Cultural Heritage of Humanity. [en línea] Paris (2010). [Consultado el 2 de noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.unesco.org/culture/ich/RL/00884>.

Urano T, Shiraki M, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S. Large-scale analysis reveals a functional single-nucleotide polymorphism in the 5'-flanking region of PRDM16 gene associated with lean body mass. *Aging Cell*. 2014 Aug; 13(4): 739-43.

Vague J. La différenciation sexuelle, facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Médicale* 1947; 30: 339-40.

Vakalis K, Bechlioulis A, Naka KK, Chatzikiyriakidou A, Gartzonika K, Vezyraki P, Kolios G, Pappas K, Katsouras CS, Georgiou I, Michalis LK. Role of 9p21 and 2q36 variants and arterial stiffness in the prediction of coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2014 Aug; 44(8): 784-94.

Valdés S, García-Torres F, Maldonado-Araque C, Goday A, Calle-Pascual A, Soriguer F, Castaño L, Catalá M, Gomis R y Rojo-Martínez G, en nombre del grupo de estudio Di@bet.es. Prevalencia de obesidad, diabetes mellitus y otros factores de riesgo cardiovascular en Andalucía. Comparación con datos de prevalencia nacionales. Estudio Di@bet.es. *Rev Esp Cardiol*. 2014; 67(6): 442–8.

Valenzuela FJ, Vera J, Venegas C, Muñoz S, Oyarce S, Muñoz K, Lagunas C. Evidences of polymorphism associated with circadian system and risk of pathologies: a review of the literature. *Int J Endocrinol*. 2016; 2016: 2746909.

Van Cauter E. Putative roles of melatonin in glucose regulation. *Therapie*. 1998 Sep-Oct; 53(5): 467-72.

Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev*. 1997 Oct; 18(5): 716-38.

Van der Klaauw AA, Farooqi IS. The hunger genes: pathways to obesity. *Cell*. (2015) Mar 26; 161(1): 119-32.

van Diepen JA, Berbée JF, Havekes LM, Rensen PC. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013 Jun; 228(2): 306-15.

van Ommen B, Stierum R. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Curr Opin Biotechnol*. 2002 Oct; 13(5): 517-21.

van Vliet-Ostapchouk JV, Nuotio ML, Slagter SN, Doiron D, Fischer K, Foco L, Gaye A, Gögele M, Heier M, Hiekkalinna T, Joensuu A, Newby C, Pang C, Partinen E, Reischl E, Schwienbacher C, Tammesoo ML, Swertz MA, Burton P, Ferretti V, Fortier I, Giepmans L, Harris JR, Hillege HL, Holmen J, Jula A, Kootstra-Ros JE, Kvaløy K, Holmen TL, Männistö S, Metspalu A, Midthjell K, Murtagh MJ, Peters A, Pramstaller PP, Saaristo T, Salomaa V, Stolk RP, Uusitupa M, van der Harst P, van der Klauw MM, Waldenberger M, Perola M, Wolfenbutter BH. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr Disord*. 2014 Feb 1; 14: 9.

van Vliet-Ostapchouk JV, Snieder H, Lagou V. Gene-lifestyle interactions in obesity. *Curr Nutr Rep*. 2012 Jun 26; 1: 184-96.

Varela-Moreiras G, Alguacil Merino LF, Alonso Aperte E, ArancetaBartrina J, Avila Torres JM, Aznar Laín S, Belmonte Cortés S, Cabrerizo García L, Dal Re Saavedra MÁ, Delgado Rubio A, Garaulet Aza M, García Luna PP, Gil Hernández A, González-Gross M, López Díaz-Ufano ML, Marcos Sánchez A, Martínez de Victoria Muñoz E, Martínez Vizcaino V, Moreno Aznar L, Murillo Ramos JJ, Ordovás Muñoz JM, Ortega Anta RM, Palacios Gil-Antuñano N, Palou Oliver A, Pérez Rodrigo C, RiobóServán P, Serra Majem L, Tur Mari J, Urrialde de Andrés R, Zamora Navarro S. Obesidad y sedentarismo en el siglo XXI: ¿qué se puede y se debe hacer? *Nutr Hosp*. 2013 Sep; 28Suppl 5: 1-12.

Varela-Moreiras G, Avila JM, Cuadrado C, del Pozo S, Ruiz E, Moreiras O. Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64(Suppl 3): S37-43.

Vats MG, Mahboub BH, Al Hariri H, Al Zaabi A, Vats D. Obesity and sleep-related breathing disorders in Middle East and UAE. *Can Respir J.* 2016; 2016: 9673054.

Vedeld HM, Andresen K, Eilertsen IA, Nesbakken A, Seruca R, Gladhaug IP, Thiis-Evensen E, Rognum TO, Boberg KM, Lind GE. The novel colorectal cancer biomarkers CDO1, ZSCAN18 and ZNF331 are frequently methylated across gastrointestinal cancers. *Int J Cancer.* 2015 Feb 15; 136(4): 844-53.

Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, Medic S, Sabale M, Rowles J, Wijesekara N, Martins RN, Fraser PE4, Newsholme P. Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity between insulin resistance, obesity, and Alzheimer's disease. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 105828.

Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients.* 2014 Jun 2; 6(6): 2165-78.

Vieira E, Burris TP, Quesada I. Clock genes, pancreatic function, and diabetes. *Trends Mol Med.* 2014 Dec; 20(12): 685-93.

Vislovukh A, Vargas TR, Poleskaya A, Groisman I. Role of 3'-untranslated region translational control in cancer development, diagnostics and treatment. *World J Biol Chem.* 2014 Feb 26; 5(1): 40-57.

Vitseva OI, Tanriverdi K, Tehkonina TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, Freedman J, Gokce N. Inducible toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring).* 2008 May; 16(5): 932-7.

Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G, Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segrè AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B, Benediktsson R, Bennett AJ, Blagieva R, Boerwinkle E, Bonnycastle LL, Bengtsson Boström K, Bravenboer B, Bumpstead S, Burt NP, Charpentier G, Chines PS, Cornelis M, Couper DJ, Crawford G, Doney AS, Elliott KS, Elliott AL, Erdos MR, Fox CS, Franklin CS, Ganser M, Gieger C, Grarup N, Green T, Griffin S, Groves CJ, Guiducci C, Hadjadj S, Hassanali N, Herder C, Isomaa B, Jackson AU, Johnson PR, Jørgensen T, Kao WH, Klopp N, Kong A, Kraft P, Kuusisto J, Lauritzen T, Li M, Lieveise A, Lindgren CM, Lyssenko V, Marre M, Meitinger T, Midhjelld K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proença C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shriver P, Sigurdsson G, Sparsø T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van Dam RM, van Haeften TW, van Herpt T, van Vliet-Ostapchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllenstein U, Hansen T, Hide WA, Hitman GA, Hofman A,

Hunter DJ, Hveem K, Laakso M, Mohlke KL, Morris AD, Palmer CN, Pramstaller PP, Rudan I, Sijbrands E, Stein LD, Tuomilehto J, Uitterlinden A, Walker M, Wareham NJ, Watanabe RM, Abecasis GR, Boehm BO, Campbell H, Daly MJ, Hattersley AT, Hu FB, Meigs JB, Pankow JS, Pedersen O, Wichmann HE, Barroso I, Florez JC, Frayling TM, Groop L, Sladek R, Thorsteinsdottir U, Wilson JF, Illig T, Froguel P, van Duijn CM, Stefansson K, Altshuler D, Boehnke M, McCarthy MI, MAGIC investigators, GIANT Consortium. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat. Genet.* 2010; 42(7): 579-89.

Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, Calonne E, Volkmar U, Igoillo-Esteve M, Naamane N, Del Guerra S, Masini M, Bugliani M, Marchetti P, Cnop M, Eizirik DL, Fuks F. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J.* 2012 Mar 21; 31(6): 1405-26.

Volpe SL, Sukumar D, Milliron BJ. Obesity prevention in older adults. *Curr Obes Rep.* 2016 Jun; 5(2): 166-75.

Waddington CH. *Organisers and Genes.* Cambridge: Cambridge University; 1940.

Waddington CH. *The strategy of the genes.* London: Allen & Unwin; 1957.

Wahi G, Anand S. Race/ethnicity, obesity, and related cardio-metabolic risk factors: a life-course perspective. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* 2013; 7: 326-35.

Wändell PE, Carlsson AC. Gender differences and time trends in incidence and prevalence of type 2 diabetes in Sweden—a model explaining the diabetes epidemic worldwide today?. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Dec; 106(3): e90-2.

Wang C, Wan S, Yang T, Niu D, Zhang A, Yang C, Cai J, Wu J, Song J, Zhang CY, Zhang C, Wang J. Increased serum microRNAs are closely associated with the presence of microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep.* 2016 Feb 1; 6: 20032.

Wang MH, Li J, Yeung VS, Zee BC, Yu RH, Ho S, Waye MM. Four pairs of gene-gene interactions associated with increased risk for type 2 diabetes (CDKN2BAS-KCNJ11), obesity (SLC2A9-IGF2BP2, FTO-APOA5), and hypertension (MC4R-IGF2BP2) in Chinese women. *Meta Gene.* 2014 May 21; 2: 384-91.

Wang X, Li W, Ma L, Gao J, Liu J, Ping F, Nie M. Association study of the miRNA-binding site polymorphisms of CDKN2A/B genes with gestational diabetes mellitus susceptibility. *Acta Diabetol.* 2015 Oct; 52(5): 951-8.

Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension. *Hypertension.* 2008 Jan; 51(1): 8-14.

Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N. Impact of diabetes on cardiovascular disease risk and all-cause mortality in older men: influence of age at onset, diabetes duration, and established and novel risk factors. *Arch Intern Med.* 2011 Mar 14; 171(5): 404-10.

Warensjö E, Ingelsson E, Lundmark P, Lannfelt L, Syvänen AC, Vessby B, Risérus U. Polymorphisms in the SCD1 gene: associations with body fat distribution and insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Jul; 15(7): 1732-40.

Warodomwicht D, Shen J, Arnett DK, Tsai MY, Kabagambe EK, Peacock JM, Hixson JE, Straka RJ, Province M, An P, Lai CQ, Parnell LD, Borecki I, Ordovas JM. The monounsaturated fatty acid intake modulates the effect of ADIPOQ polymorphisms on obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2009 Mar; 17(3): 510-17.

Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug; 23(15): 5293-300.

Węgielska I, Suliburska J. The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of metabolic diseases. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2016 Apr-Jun; 15(2): 201-11.

Wei F, Cai C, Feng S, Lv J, Li S, Chang B, Zhang H, Shi W, Han H, Ling C, Yu P, Chen Y, Sun N, Tian J, Jiao H, Yang F, Li M, Wang Y, Zou L, Su L, Li J, Li R, Qiu H, Shi J, Liu S, Chang M, Lin J, Chen L, Li WD. TOX and CDKN2A/B gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Han Chinese. *Sci Rep.* 2015 Jul 3; 5: 11900.

Wei S, Du M, Jiang Z, Hausman GJ, Zhang L, Dodson MV. Long noncoding RNAs in regulating adipogenesis: new RNAs shed lights on obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2016 May; 73(10): 2079-87.

Weiss J, Kerfoot A, Freeman M, Motu'apuaka M, Fu R, Low A, Paynter R, Kondo K, Kansagara D. Benefits and harms of treating blood pressure in older adults: a systematic review and meta-analysis [Internet]. Washington (DC): Department of Veterans Affairs (US); 2016 Apr.

Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the zapping of complex human traits. *Trends Genet* 2002; 18: 19-24.

Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res.* 2010 Aug; 51(8): 2032-57.

Weizmann Institute of Science, LifeMap Sciences. Genecards: Human Gene Database [sede web]. Rehovot (Israel), Alameda (EEUU): Weizmann Institute of Science, LifeMap Sciences; 1996- [actualizada 2017; acceso 2016]. Disponible en: <http://www.genecards.org>.

Welberg L. Circadian rhythms: methylation mediates clock plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Apr; 15(4): 206.

Wellcome Trust Case Control Consortium, Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, Kwiatkowski DP, McCarthy MI, Ouwehand WH, Samani NJ, Todd JA, Donnelly P, Barrett JC, Burton PR, Davison D, Donnelly P, Easton D, Evans D, Leung HT, Marchini JL, Morris AP, Spencer CC, Tobin MD, Cardon LR, Clayton DG, Attwood AP, Boorman JP, Cant B, Everson U, Hussey JM, Jolley JD, Knight AS, Koch K, Meech E, Nutland S, Prowse CV, Stevens HE, Taylor NC, Walters GR, Walker NM, Watkins NA, Winzer T, Todd JA, Ouwehand WH, Jones RW, McArdle WL, Ring SM, Strachan DP, Pembrey M, Breen G, St Clair D, Caesar S, Gordon-Smith K, Jones L, Fraser C, Green EK, Grozeva D, Hamshere ML, Holmans PA, Jones IR, Kirov G, Moskvina V, Nikolov I, O'Donovan MC, Owen MJ, Craddock N, Collier DA, Elkin A, Farmer A, Williamson R, McGuffin P, Young AH, Ferrier IN, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett JH, Bishop DT, Iles MM, Maqbool A, Yuldasheva N, Hall AS, Braund PS, Burton PR, Dixon RJ, Mangino M, Suzanne S, Tobin MD, Thompson JR, Samani NJ, Bredin F, Tremelling M, Parkes M, Drummond H, Lees CW, Nimmo ER, Satsangi J, Fisher SA, Forbes A, Lewis CM, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Mathew CG, Barbour J, Mohiuddin MK, Todhunter CE, Mansfield JC, Ahmad T, Cummings FR, Jewell DP, Webster J, Brown MJ, Clayton DG, Lathrop GM, Connell J, Dominczak A, Samani NJ, Marcano CA, Burke B, Dobson R, Gungadoo J, Lee KL, Munroe PB, Newhouse SJ, Onipinla A, Wallace C, Xue M, Caulfield M, Farrall M, Barton A, Bruce IN, Donovan H, Eyre S, Gilbert PD, Hider SL, Hinks AM, John SL, Potter C, Silman AJ, Symmmons DP, Thomson W, Worthington J, Clayton DG, Dunger DB, Nutland S, Stevens HE, Walker NM, Widmer B, Todd JA, Frayling TA, Freathy RM, Lango H, Perry JR, Shields BM, Weedon MN, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Elliott KS, Groves CJ, Lindgren CM, Rayner NW, Timpson NJ, Zeggini E, McCarthy MI, Newport M, Sirugo G, Lyons E, Vannberg F, Hill AV, Bradbury LA, Farrar C, Pointon JJ, Wordsworth P, Brown MA, Franklyn JA, Heward JM, Simmonds MJ, Gough SC, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Ban M, Goris A, Sawcer SJ, Compston A, Conway D, Jallow M, Newport M, Sirugo G, Rockett KA, Kwiatowski DP, Bumpstead SJ, Chaney A, Downes K, Ghorji MJ, Gwilliam R, Hunt SE, Inouye M, Keniry A, King E, McGinnis R, Potter S, Ravindrarajah R, Whittaker P, Widdon C, Withers D, Deloukas P, Leung HT, Nutland S, Stevens HE, Walker NM, Todd JA, Easton D, Clayton DG, Burton PR, Tobin MD, Barrett JC, Evans D, Morris AP, Cardon LR, Cardin NJ, Davison D, Ferreira T, Pereira-Gale J, Hallgrimsdottir IB, Howie BN, Marchini JL, Spencer CC, Su Z, Teo YY, Vukcevic D, Donnelly P, Bentley D, Brown MA, Gordon LR, Caulfield M, Clayton DG, Compston A, Craddock N, Deloukas P, Donnelly P, Farrall M, Gough SC, Hall AS, Hattersley AT, Hill AV, Kwiatkowski DP, Mathew C, McCarthy MI, Ouwehand WH, Parkes M, Pembrey M, Rahman N, Samani NJ, Stratton MR, Todd JA, Worthington J. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7; 447(7145): 661-78.

Wells JC. Body composition and susceptibility to type 2 diabetes: an evolutionary perspective. *Eur J Clin Nutr*. 2017 Mar 29; doi: 10.1038/ejcn.2017.31.

Welter D, MacArthur J, Morales J, Burdett T, Hall P, Junkins H, Klemm A, Flicek P, Manolio T, Hindorf L, Parkinson H. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan; 42(Database issue): D1001-6.

Wewege M, van den Berg R, Ward RE, Keech A. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2017 Jun; 18(6): 635-46.

Widmer RJ, Flammer AJ, Lerman LO, Lerman A. The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *Am J Med.* 2015 Mar; 128(3): 229-38.

Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, Berndt SI, Elliott AL, Jackson AU, Lamina C, Lettre G, Lim N, Lyon HN, McCarroll SA, Papadakis K, Qi L, Randall JC, Roccascella RM, Sanna S, Scheet P, Weedon MN, Wheeler E, Zhao JH, Jacobs LC, Prokopenko I, Soranzo N, Tanaka T, Timpson NJ, Almgren P, Bennett A, Bergman RN, Bingham SA, Bonnycastle LL, Brown M, Burt NP, Chines P, Coin L, Collins FS, Connell JM, Cooper C, Smith GD, Dennison EM, Deodhar P, Elliott P, Erdos MR, Estrada K, Evans DM, Gianniny L, Gieger C, Gillson CJ, Guiducci C, Hackett R, Hadley D, Hall AS, Havulinna AS, Hebebrand J, Hofman A, Isomaa B, Jacobs KB, Johnson T, Jousilahti P, Jovanovic Z, Khaw KT, Kraft P, Kuokkanen M, Kuusisto J, Laitinen J, Lakatta EG, Luan J, Luben RN, Mangino M, McArdle WL, Meitinger T, Mulas A, Munroe PB, Narisu N, Ness AR, Northstone K, O'Rahilly S, Purmann C, Rees MG, Ridderstråle M, Ring SM, Rivadeneira F, Ruukonen A, Sandhu MS, Saramies J, Scott LJ, Scuteri A, Silander K, Sims MA, Song K, Stephens J, Stevens S, Stringham HM, Tung YC, Valle TT, Van Duijn CM, Vimalaswaran KS, Vollenweider P, Waeber G, Wallace C, Watanabe RM, Waterworth DM, Watkins N, Wellcome Trust Case Control Consortium, Wittman JC, Zeggini E, Zhai G, Zillikens MC, Altshuler D, Caulfield MJ, Chanock SJ, Farooqi IS, Ferrucci L, Guralnik JM, Hattersley AT, Hu FB, Jarvelin MR, Laakso M, Mooser V, Ong KK, Ouwehand WH, Salomaa V, Samani NJ, Spector TD, Tuomi T, Tuomilehto J, Uda M, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Deloukas P, Frayling TM, Groop LC, Hayes RB, Hunter DJ, Mohlke KL, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, Wichmann HE, McCarthy MI, Boehnke M, Barroso I, Abecasis GR, Hirschhorn JN, Genetic Investigation of Anthropometric Traits Consortium. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet.* 2009; 41: 25-34.

Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61: 1402S-1406S.

Williamson DF, Madans J, Anda RF, Kleinman JC, Giovino GA, Byers T. Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort. *N. Engl. J. Med.* 1991; (324): 739-45.

Wilson ME, Scheel D, German MS. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev.* 2003 Jan; 120(1): 65-80.

Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2005 Nov 15; 112(20): 3066-72.

Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med.* 2002; 162: 1867-72.

Wing RR, Hill JO. Successful weight loss maintenance. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21: 323-41.

Wollenweider P, von Eckardstein A, Widmann C. HDLs, diabetes, and metabolic syndrome. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 224: 405-21.

Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, Thompson A, Sarwar N, Kizer JR, Lawlor DA, Nordestgaard BG, Ridker P, Salomaa V, Stevens J, Woodward M, Sattar N, Collins R, Thompson SG, Whitlock G, Danesh J, Emerging Risk Factors Collaboration. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet* 2011; 377: 1085-95.

Wong ND, Patao C, Wong K, Malik S, Franklin SS, Iloeje U. Trends in control of cardiovascular risk factors among US adults with type 2 diabetes from 1999 to 2010: comparison by prevalent cardiovascular disease status. *Diab Vasc Dis Res*. 2013; 10(6): 505-13.

Wood AC, Glasser S, Garvey WT, Kabagambe EK, Borecki IB, Tiwari HK, Tsai MY, Hopkins PN, Ordovas JM, Arnett DK. Lipoprotein lipase S447X variant associated with VLDL, LDL and HDL diameter clustering in the MetS. *Lipids Health Dis*. 2011 Aug 19; 10: 143.

Wood AR, Jonsson A, Jackson AU, Wang N, van Leewen N, Palmer ND, Kobes S, Deelen J, Boquete-Vilarino L, Paananen J, Stančáková A, Boomsma DI, de Geus EJ, Eckhoff EM, Fritsche A, Kramer M, Nijpels G, Simonis-Bik A, van Haefen TW, Mahajan A, Boehnke M, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Mohlke KL, Banasik K, Groves CJ, McCarthy MI Direct, Pearson ER, Natali A, Mari A, Buchanan TA, Taylor KD, Xiang AH, Gjesing AP, Grarup N, Eiberg H, Pedersen O, Chen YD, Laakso M, Norris JM, Smith U, Wagenknecht LE, Baier L, Bowden DW, Hansen T, Walker M, Watanabe RM, 't Hart LM, Hanson RL, Frayling TM. A Genome-Wide Association Study of IVGTT-based measures of first phase insulin secretion refines the underlying physiology of type 2 diabetes variants. *Diabetes*. 2017 May 10. pii: db161452.

Wu L, Dai X, Zhan J, Zhang Y, Zhang H, Zhang H, Zeng S, Xi W. Profiling peripheral microRNAs in obesity and type 2 diabetes mellitus. *APMIS*. 2015 Jul; 123(7): 580-5.

Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, Serna Ide L, Chin KV. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Oct 22; 401(3): 390-5.

Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*. 2014 Sep 6; 11(11): 1185-200.

Wu Y, Yu Y, Zhao T, Wang S, Fu Y, Qi Y, Yang G, Yao W, Su Y, Ma Y, Shi J, Jiang J, Kou C. Interactions of Environmental Factors and APOA1-APOC3-APOA4-APOA5 gene cluster gene polymorphisms with metabolic syndrome. *PLoS One*. 2016 Jan 29; 11(1): e0147946.

Xi B, Shen Y, Zhang M, Liu X, Zhao X, Wu L, Cheng H, Hou D, Lindpaintner K, Liu L, Mi J, Wang X. The common rs9939609 variant of the fat mass and obesity-associated gene is associated with obesity risk in children and adolescents of Beijing, China. *BMC Med Genet*. 2010 Jul 5; 11: 107.

Xi B, Wang C, Wu L, Zhang M, Shen Y, Zhao X, Wang X, Mi J. Influence of physical inactivity on associations between single nucleotide polymorphisms and genetic predisposition to childhood obesity. *Am J Epidemiol.* 2011 Jun 1; 173(11): 1256-62.

Xiao S, Zeng X, Fan Y, Su Y, Ma Q, Zhu J, Yao H. Gene polymorphism association with type 2 diabetes and related gene-gene and gene-environment interactions in a Uyghur population. *Med Sci Monit.* 2016 Feb 13; 22: 474-87.

Xu E, Pereira MMA, Karakasilioti I, Theurich S, Al-Maarri M, Rappl G, Waisman A, Wunderlich FT, Brüning JC. Temporal and tissue-specific requirements for T-lymphocyte IL-6 signalling in obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Nat Commun.* 2017 May 3; 8: 14803.

Xu K, Jiang L, Zhang M, Zheng X, Gu Y, Wang Z, Cai Y, Dai H, Shi Y, Zheng S, Chen Y, Ji L, Xu X, Chen H, Sun M, Yang T. Type 2 diabetes risk allele UBE2E2 is associated with decreased glucose-stimulated insulin release in elderly Chinese Han individuals. *Medicine (Baltimore).* 2016 May; 95(19): e3604.

Xu W, Wang F, Yu Z, Xin F. Epigenetics and cellular metabolism. *Genet Epigenet.* 2016 Sep 25; 8: 43-51.

Yako YY, Guewo-Fokeng M, Balti EV, Bouatia-Naji N, Matsha TE, Sobngwi E, Erasmus RT, Echouffo-Tcheugui JB, Kengne AP. Genetic risk of type 2 diabetes in populations of the African continent: a systematic review and meta-analyses. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016 Apr; 114: 136-50.

Yang BT, Dayeh TA, Kirkpatrick CL, Taneera J, Kumar R, Groop L, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets. *Diabetologia.* 2011 Feb; 54(2): 360-7.

Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, Renström E, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol.* 2012 Jul; 26(7): 1203-12.

Yang J, Farioli A, Korre M, Kales SN. Modified Mediterranean diet score and cardiovascular risk in a North American working population. *PLoS One.* 2014 Feb 4; 9(2): e87539.

Yang L, Li Y, Cheng M, Huang D, Zheng J, Liu B, Ling X, Li Q, Zhang X, Ji W, Zhou Y, Lu J. A functional polymorphism at microRNA-629-binding site in the 3'-untranslated region of NBS1 gene confers an increased risk of lung cancer in Southern and Eastern Chinese population. *Carcinogenesis.* 2012 Feb; 33(2): 338-47.

Yannakoulia M, Panagiotakos D, Pitsavos C, Lentzas Y, Chrysohoou C, Skoumas I, Stefanadis C. Five-year incidence of obesity and its determinants: the ATTICA Study. *Public Health Nutr.* 2009; 12: 36-43.

Yao F, Zhang M, Chen L. Adipose Tissue-Specialized Immunologic Features Might Be the Potential Therapeutic Target of Prospective Medicines for Obesity. *J Diabetes Res.* 2017; 2017: 4504612.

Ye H, Zhou A, Hong Q, Tang L, Xu X, Xin Y, Jiang D, Dai D, Li Y, Wang DW, Duan S. Positive association between APOA5 rs662799 polymorphism and coronary heart disease: a case-control study and meta-analysis. *PLoS One.* 2015 Aug 26; 10(8): e0135683.

Yen CY, Huang HW, Shu CW, Hou MF, Yuan SS, Wang HR, Chang YT, Farooqi AA, Tang JY, Chang HW. DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. *Cancer Lett.* 2016 Apr 10; 373(2): 185-92.

Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet.* 1998; 20: 111-2.

Yiannakouris N, Cooper JA, Shah S, Drenos F, Ireland HA, Stephens JW, Li KW, Elkeles R, Godsland IF, Kivimaki M, Hingorani AD, Kumari M, Talmud PJ, Humphries SE. IRS1 gene variants, dysglycaemic metabolic changes and type-2 diabetes risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012 Dec; 22(12): 1024-30.

Yin L, Lazar MA. The orphan nuclear receptor Rev-erb α recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian *Bmal1* gene. *Mol Endocrinol.* 2005 Jun; 19(6): 1452-9.

Yin RX, Li YY, Liu WY, Zhang L, Wu JZ. Interactions of the apolipoprotein A5 gene polymorphisms and alcohol consumption on serum lipid levels. *PLoS One.* 2011 Mar 14; 6(3): e17954.

Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Okamatsu-Ogura Y, Kameya T, Kawai Y, Miyagawa M, Tsujisaki M, Saito M. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity (Silver Spring).* 2011 Sep; 19(9): 1755-60.

Yoshino J, Klein S. A novel link between circadian clocks and adipose tissue energy metabolism. *Diabetes.* 2013 Jul; 62(7): 2175-7.

Yu DM, Huynh T, Truong AM, Haber M, Norris MD. ABC transporters and neuroblastoma. *Adv Cancer Res.* 2015; 125: 139-70.

Yu J, Liang QY, Wang J, Cheng Y, Wang S, Poon TC, Go MY, Tao Q, Chang Z, Sung JJ. Zinc-fingerprotein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer. *Oncogene.* 2013 Jan 17; 32(3): 307-17.

Yu JH, Taylor JS, Edwards KL, Fullerton SM. What are our AIMS? Interdisciplinary perspectives on the use of ancestry estimation in disease research. *AJOB Prim Res.* 2012; 3(4): 87-97.

Yue H, He JW, Ke YH, Zhang H, Wang C, Hu WW, Gu JM, Fu WZ, Hu YQ, Li M, Liu YJ, Zhang ZL. Association of single nucleotide polymorphism Rs2236518 in PRDM16 gene with BMI in Chinese males. *Acta Pharmacol Sin.* 2013 May; 34(5): 710-6.

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai P Jr, Razak F, Sharma AM, Anand SS, INTERHEART Study Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 2005; 366: 1640-49.

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanus F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L, INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004 Sep 11-17; 364(9438): 937-52.

Zaina S, Lund G. Epigenetics: a tool to understand diet-related cardiovascular risk? *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2011; 4(5): 261-74.

Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, de Bakker PI, Abecasis GR, Almgren P, Andersen G, Ardlie K, Bostrom KB, Bergman RN, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Burtt NP, Chen H, Chines PS, Daly MJ, Deodhar P, Ding CJ, Doney AS, Duren WL, Elliott KS, Erdos MR, Frayling TM, Freathy RM, Gianniny L, Grallert H, Grarup N, Groves CJ, Guiducci C, Hansen T, Herder C, Hitman GA, Hughes TE, Isomaa B, Jackson AU, Jorgensen T, Kong A, Kubalanza K, Kuruvilla FG, Kuusisto J, Langenberg C, Lango H, Lauritzen T, Li Y, Lindgren CM, Lyssenko V, Marville AF, Meisinger C, Midthjell K, Mohlke KL, Morken MA, Morris AD, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Palmer CN, Payne F, Perry JR, Pettersen E, Platou C, Prokopenko I, Qi L, Qin L, Rayner NW, Rees M, Roix JJ, Sandbaek A, Shields B, Sjogren M, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Swift AJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Timpson NJ, Tuomi T, Tuomilehto J, Walker M, Watanabe RM, Weedon MN, Willer CJ, Illig T, Hveem K, Hu FB, Laakso M, Stefansson K, Pedersen O, Wareham NJ, Barroso I, Hattersley AT, Collins FS, Groop L, McCarthy MI, Boehnke M, Altshuler D. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 2008; 40: 638-45.

Zhang D, Li Z, Wang H, Yang M, Liang L, Fu J, Wang C, Ling J, Zhang Y, Zhang S, Xu Y, Zhu Y, Lai M. Interactions between obesity-related copy number variants and dietary behaviors in childhood obesity. *Nutrients.* 2015 Apr 22; 7(4): 3054-66.

Zhang G, Hamaker BR. The nutritional property of endosperm starch and its contribution to the health benefits of whole grain foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016 Feb 6: 0.

Zhang H, Sairam MR. Sex hormone imbalances and adipose tissue dysfunction impacting on metabolic syndrome; a paradigm for the discovery of novel adipokines. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014 Feb; 17(2): 89-97.

Zhang L, Ptáček LJ, Fu YH. Diversity of human clock genotypes and consequences. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013; 119: 51-81.

Zhang X, Zhao L, Li X, Wang X, Li L, Fu X, Sun Z, Li Z, Nan F, Chang Y, Zhang M. ATP-binding cassette sub-family C member 4 (ABCC4) is overexpressed in human NK/T-cell lymphoma and regulates chemotherapy sensitivity: Potential as a functional therapeutic target. *Leuk Res.* 2015 Dec; 39(12): 1448-54.

Zhang Y, Liu J, Yao J, Ji G, Qian L, Wang J, Zhang G, Tian J, Nie Y, Zhang YE, Gold MS, Liu Y. Obesity: pathophysiology and intervention. *Nutrients.* 2014 Nov 18; 6(11): 5153-83.

Zhao J, Goldberg J, Bremner JD, Vaccarino V. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. *Diabetes.* 2012 Feb; 61(2): 542-6.

Zheng C, Dalla Man C, Cobelli C, Groop L, Zhao H, Bale AE, Shaw M, Duran E, Pierpont B, Caprio S, Santoro N. A common variant in the MTNR1b gene is associated with increased risk of impaired fasting glucose (IFG) in youth with obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2015 May; 23(5): 1022-9.

Zheng JS, Arnett DK, Parnell LD, Smith CE, Li D, Borecki IB, Tucker KL, Ordovás JM, Lai CQ. Modulation by dietary fat and carbohydrate of IRS1 association with type 2 diabetes traits in two populations of different ancestries. *Diabetes Care.* 2013 Sep; 36(9): 2621-7.

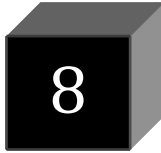
Zheng JS, Li K, Huang T, Chen Y, Xie H, Xu D, Sun J, Li D. Genetic risk score of nine type 2 diabetes risk variants that interact with erythrocyte phospholipid alpha-linolenic acid for type 2 diabetes in Chinese Hans: a case-control study. *Nutrients.* 2017 Apr 11; 9(4). pii: E376.

Zheng JS, Parnell LD, Smith CE, Lee YC, Jamal-Allial A, Ma Y, Li D, Tucker KL, Ordovás JM, Lai CQ. Circulating 25-hydroxyvitamin D, IRS1 variant rs2943641, and insulin resistance: replication of a gene-nutrient interaction in 4 populations of different ancestries. *Clin Chem.* 2014 Jan; 60(1): 186-96.

Zhu M, Zhao S. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci* 2007; 3(7): 420-7.

Zondervan KT, Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Mat Rev Genet* 2004; 5: 89-100.

Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Liu CY, Merola AJ, Berliner LJ, Clanton TL. Intra and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Oct; 279(4): C1058-66.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.- Contribución de los factores genéticos y ambientales a la ganancia de peso. Figura modificada de (Van der Klaauw AA and Farooqi IS, 2015).....	22
Figura 1.2.- Prevalencia de la obesidad en adultos desde 1960 a 1990 (A) y desde 2000 hasta la actualidad (B). Figura modificada de los mapas de la Federación Internacional de Obesidad.....	28
Figura 1.3.-Mapas de prevalencia de la obesidad en Europa entre 2000-2005 de hombres (izquierda) y mujeres (derecha). Figura modificada de los mapas de prevalencia de la Federación Internacional de Obesidad.....	29
Figura 1.4.- Prevalencia de la obesidad por comunidades autónomas, Estudio ENRICA (Gutiérrez-Fisac JL et al, 2012)	30
Figura 1.5.- Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes, actualización de 2014 (IDF, 2014 (a)).....	37
Figura 1.6.- Prevalencia de la diabetes en España: distribución por sexos y grupos de edad en % Gráfica Estudio Di@betes.es (CIBERdem, 2012)	39
Figura 1.7.- Mecanismo por el cual el consumo de tabaco reduce el peso corporal. Fumar reduce el peso aumentando el gasto energético e inhibiendo el aumento compensatorio de ingesta calórica. La nicotina aumenta el gasto energético por efecto directo en los tejidos periféricos mediado por catecolaminas, y por efecto en los circuitos neuroendocrinos del SNC. Esto conducen a la supresión del apetito y fumar puede servir como comportamiento alternativo a comer. Figura modificada de Audrain-McGovern J and Benowitz NL, 2011	47
Figura 1.8.- Pirámide de actividad física en adultos (SEEDO, 2007)	49
Figura 1.9.- El plato para comer saludable (Harvard, 2016)	51
Figura 1.10.- Pirámide de la Alimentación Saludable SENC del 2004(A) y del 2015 (B).....	52
Figura 1.11.- Pirámide de DM Tradicional Óptima (A) (Willett W et al, 1995) y Pirámide de la DM (B) (Bach-Faig A et al, 2011).....	55
Figura 1.12.- Mecanismo de la resistencia a la insulina inducida por los ácidos grasos en el músculo (A) y en el hígado (B). GLUT 4: transportador de la glucosa 4; IRS: receptor de la insulina; PI 3-quinasa: fosfatidilinositol 3 quinasa; nPKC: nueva proteína quinasa C. Figura modificada de Petersen KF and Shulman GI, 2006.....	63

Figura 1.13.- Loci asociados con fenotipos relacionados con obesidad. Figura modificada de Alburquerque D et al, 2015.....	66
Figura 1.14.- Variantes genéticas asociadas a DMT2. El círculo negro representa la DMT2 y los nombres de genes en negro representan las variantes asociadas sólo con DMT2. La superposición de círculos indica asociaciones adicionales. Figura modificada de Prasad RB and Groop L, 2015.....	69
Figura 1.15.- La programación epigenética durante el desarrollo puede inducir predisposición a la enfermedad. Figura modificada de Brookes E and Shi Y, 2014.....	102
Figura 1.16.- Estructura genética del gen TCF7L2 e interacción gen-dieta. A) Localización del polimorfismo rs7903146 (C>T) en el intrón 4 del gen TCF7L2. B) Asociación entre el alelo de riesgo (T) y fenotipos cardiovasculares dependiendo de la determinación genética o de la interacción gen-dieta. Figura modificada de Corella D and Ordovás JM, 2014(a).....	113
Figura 1.17.- Factores de riesgo acumulados en el curso de la vida para el desarrollo de enfermedades no transmisibles en relación al género y sexo. Figura modificada Gendered innovations Project, 2009.....	115
Figura 3.1.- MagNa Pure Compact de Roche.....	141
Figura 3.2.- En la figura de muestra el funcionamiento de las sondas Taqman. La sonda con la secuencia complementaria se une al DNA molde y durante la elongación, hay una actividad exonucleasa por parte de la polimerasa. Reporter y quencher se separan y hay un incremento de la fluorescencia. Modificado de Taqman SNP Genotyping Assay Protocol.....	143
Figura 3.3.-Plataforma de 7900HT Fast Real-Time PCR (A). Gráfico proporcionado por el programa SDS 2.3 para la detección cuantitativa en la PCR (B) y para la detección cuaitatica de la discriminación alélica (C).....	143
Figura 3.4.- iScan Microarray Scanner perteneciente a la plataforma de Infinium para la lectura de los arrays (A). <i>HumanOmniExpress-24 Beads Chips</i> de Illumina (B) y el esquema del formato del Illumina multi-sample array (C).....	146
Figura 3.5.- Imágenes del proceso de carga y preparación de los chips <i>HumanOmni Express-24 Beads</i>	147
Figura 3.6.- Plataforma de análisis SEQUENOM.....	147
Figura 3.7.- Localización del gen FTO en el cromosoma 16 y posición de las islas CpG de los amplicones seleccionados del polimorfismo rs9939609 del mismo gen (A) y localización del gen TCF7L2 en el cromosoma 10 y posición de las islas CpG de los amplicones seleccionados del polimorfismo rs7903146 del mismo gen (B).....	151

Figura 3.8.- Criterios de selección de las muestras para el análisis epigenético.....	152
Figura 4.1.- Prevalencia de la obesidad y la DMT2 en función del sexo	167
Figura 4.2.- Representación del riesgo de obesidad (OR) asociado a la adherencia a la DM en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad.....	176
Figura 4.3.- Representación del riesgo de DMT2 (OR) asociado a la adherencia a la DM en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad.....	176
Figura 4.4.- Media de concentración de triglicéridos (izquierda) y del peso (derecha) en hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs3135506 en la población estudiada. P= p valor de comparación de medias según el genotipo entre sexo mediante la prueba de t-Student	185
Figura 4.5.- Medida de la concentración de c-HDL (A) y TG (B) en diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4731702 del gen KLF14 (c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; P interac: p interacción; P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).....	188
Figura 4.6.- Medida de la concentración de triglicéridos (izquierda) y del perímetro de cintura (derecha) en obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....	192
Figura 4.7.- Medida del perímetro de cintura en obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs10883463 del gen SCD1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)	194
Figura 4.8.- Medida de la concentración de triglicéridos entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).....	197
Figura 4.9.- Medida del índice de masa corporal entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).....	198
Figura 4.10.- Medida de la concentración de glucosa según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en individuos no diabéticos de la población PREDIMED (P ¹ : p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; P ² : p-valor obtenido tras ajustar por sexo, edad e IMC).....	200
Figura 4.11.- Medida de la concentración de glucosa según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 y del polimorfismo rs2943634 (P ¹ : p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student; P ² :p-valor tras ajustar por factores de confusión).....	203

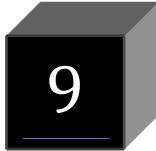
Figura 4.12.- Medida de la concentración de glucosa entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....	204
Figura 4.13.- Medida de la concentración de glucosa entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs2943634 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)	204
Figura 4.14.- Gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs2943634 y rs2943641 del gen IRS1 y tabla con los parámetros medidos para el desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r ² : coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci.....	206
Figura 4.15.- Medida de la concentración de c-HDL entre hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs6086473 del gen PLBC1 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)	214
Figura 4.16.- Medida del peso entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs1180062 del gen PRDM16 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....	215
Figura 4.17.- Representación del riesgo de obesidad (OR) asociado al polimorfismo rs10509954 en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad.....	217
Figura 4.18.- Representación del riesgo de DMT2 (OR) asociado al polimorfismo rs10509954 en la muestra estudiada tras ajustar por sexo y edad, y según el sexo tras ajustar por edad.....	218
Figura 4.19.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs293553 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....	219
Figura 4.20.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs4671327 del gen ASB3 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)	226
Figura 4.21.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs11892385 del gen ASB3 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)	226

- Figura 4.22.- Gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs11892385 y rs4671327 del gen ASB3 y tabla con los parámetros medidos para el desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r^2 : coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci228
- Figura 4.23.- Medida de la concentración de glucosa entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....231
- Figura 4.24.- Medida de la concentración de c-HDL entre diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo rs3217986 del gen CDKN2B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....231
- Figura 4.25.- Gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1063192 y rs3217986 del gen CDKN2B y tabla con los parámetros medidos para el desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r^2 : coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci232
- Figura 4.26.- Medida de la concentración de c-HDL entre diabéticos y no diabéticos según los haplotipos de los polimorfismo rs1063192 y rs3217986 del gen CDKN2B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)234
- Figura 4.27.- Gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs693370 y rs6554976 del gen DMRTA1 y tabla con los parámetros medidos para el desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos. P: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r^2 : coeficiente de correlación entre los dos loci; Dist: distancia medida entre pares de bases entre los loci237
- Figura 4.28.- Medida de la concentración de glucosa entre obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo rs10830963 del gen MTNR1B (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....239
- Figura 4.29.- Medida del perímetro de la cintura (izquierda) y del IMC (derecha) entre individuos fumadores y no fumadores según el genotipo del polimorfismo rs662799 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student.....241

Figura 4.30.- Perímetro de la cintura (A) e IMC (B) en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs99396309 del gen de la FTO en la población estudiada (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA)	242
Figura 4.31.- Medida del IMC entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs10883463 del gen SCD1 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student.....	243
Figura 4.32.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs1052133 del gen OGG1 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student	244
Figura 4.33.- Concentración de c-HDL en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C en la población estudiada (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)	246
Figura 4.34.- Concentración de c-HDL (izquierda) y medida del IMC (derecha) en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs11807062 del gen PRDM16 en la población estudiada (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)	247
Figura 4.35.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student	248
Figura 4.36.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs1063192 del gen CDKN2B en la población estudiada en función de la DMT2. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student.....	249
Figura 4.37.- Medida de la concentración de glucosa entre individuos sedentarios y no sedentarios según el genotipo del polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 en la población estudiada. P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student	250
Figura 4.38.- Interacción entre el polimorfismo rs662799 del gen ApoA5 promotor y la adherencia a la DM sobre los TG en la población estudiada (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student).....	251
Figura 4.39.- Supervivencia sin DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en participantes no diabéticos dependiendo del grupo de intervención. A: grupo DM (n=2477), B: grupo Control (n=1194).....	254

Figura 4.40.- Concentración de c-HDL en individuos con alta o baja adherencia a la DM según el genotipo del polimorfismo rs2943634 en la población estudiada. DM: dieta mediterránea. P: p valor de comparación de medias mediante una t-Student.....	255
Figura 4.41.- Interacción entre el polimorfismo rs2014303 del gen CLNK y la adherencia a la DM sobre la concentración de c-HDL en la población estudiada (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student).....	256
Figura 4.42.- Interacción del polimorfismo rs2014303 del gen CLNK , el uso de AOV como principal grasa para cocinar sobre los niveles de c-HDL en la población estudiada.....	257
Figura 4.43.- Interacción entre el polimorfismo rs2116830 del gen KCNMA1 y la adherencia a la DM sobre el peso en la población estudiada (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student).....	258
Figura 4.44.- Niveles de triglicéridos según el genotipo de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK C y rs2314339 del gen NR1D1 en la población estudiada (p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student).....	260
Figura 4.45.- Diferencias del porcentaje de metilación en diferentes amplicones del polimorfismo rs9939609 del gen FTO (A) y del polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 (B) (p tend: p de tendencia; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba ANOVA).....	263
Figura 4.46.- Porcentaje de metilación a nivel basal y tras un año de intervención de la isla CpG 5 del amplicón B del polimorfismo rs9939609 del gen FTO según el grupo de intervención (AOV: aceite de oliva. P ¹ : p-valor comparación del porcentaje de metilación tras la intervención obtenido mediante una prueba t-Student de muestras emparejadas. P ² : p-valor comparación de las diferencias de metilación mediante una prueba t-Student de muestras).....	264
Figura 4.47.- Interacción entre la obesidad y la adherencia a la DM sobre la diferencia de metilación de la isla CpG 7del amplicón B del polimorfismo rs9939609 del gen FTO (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student).....	266
Figura 4.48.- Interacción entre la DMT2 y la adherencia a la DM sobre la diferencia de metilación de la isla CpG 7del amplicón B del polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2 (DM: dieta mediterránea; p: p-valor de comparación de medias entre genotipos mediante una t-Student).....	267

- Figura 4.49.- Asociación entre las puntuaciones de riesgo genético (GRS) de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK y rs2943641 del gen IRS1 y la concentración de glucosa. Barras de error: error estándar. 0 puntos (no alelos de riesgo), 1 punto (1 alelo de riesgo de CLOCK o IRS1); 2 puntos (2 alelos de riesgo); 3 puntos (3 alelos de riesgo); 4 puntos (4 alelos de riesgo). P¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA; P²: p-valor ajustado por sexo, edad, DMT2, obesidad, actividad física, adherencia a la DM.....269
- Figura 4.50.- Asociación entre las puntuaciones de riesgo genético (GRS) de los polimorfismos rs2014303 del gen CLNK y rs822759 y la concentración de c-LDL. Barras de error: error estándar. 0 puntos (no alelos de riesgo), 1 punto (1 alelo de riesgo de CLNK o rs822759); 2 puntos (2 alelos de riesgo); 3 puntos (3 alelos de riesgo); 4 puntos (4 alelos de riesgo). P¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA; P²: p-valor ajustado por sexo, edad, DMT2, obesidad, actividad física, adherencia a la DM.....271
- Figura 4.51.- Gráfica Manhattan Plot para el estudio de asociaciones de polimorfismos con IMC en el estudio PREDIMED PLUS. Línea indicada: $p=1 \times 10^{-5}$275
- Figura 4.52.- Gráfica Manhattan Plot para el estudio de asociaciones de polimorfismos con perímetro de cintura en el estudio PREDIMED PLUS. Línea superior: $p=5 \times 10^{-8}$; línea inferior: $p=1 \times 10^{-5}$ 276
- Figura 4.53.- Gráfica Manhattan Plot para el estudio de asociaciones de polimorfismos con niveles de glucosa plasmática en el estudio PREDIMED PLUS. Línea superior: $p=5 \times 10^{-8}$; línea inferior: $p=1 \times 10^{-5}$ 277
- Figura 4.54.- Medida del perímetro de cintura según el genotipo del polimorfismo rs13228919 (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student)286
- Figura 4.55.- Supervivencia según el genotipo del polimorfismo rs9524784 del gen ABCC4 en participantes del estudio PREDIMED288
- Figura 4.56.- Niveles de glucosa en función del polimorfismo rs8191439 del gen GSTP1 en mujeres del estudio PREDIMED (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba t-Student).....289



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.- Clasificación obesidad de la OMS adaptada de (OMS 1995, OMS 2000, OMS 2014).....	23
Tabla 1.2.- Criterios de la SEEDO para definir la obesidad en grados según el IMC en adultos (SEEDO, 2007).....	24
Tabla 1.3.- Valores de riesgo según la distribución de la grasa corporal (datos antropométricos) SEEDO 2000.....	26
Tabla 1.4.- Prevalencia de la diabetes (%) en Europa en 2013 y estimación para el 2035. Figura modificada de (Guariguata L et al, 2014).....	38
Tabla 3.1.- Centros de campo (CC) participantes en el estudio PREDIMED.....	123
Tabla 3.2.- Referencias de los ensayos de Applied Biosystems para cada polimorfismo genotipado.....	144
Tabla 3.3.- Condiciones para la amplificación estándar en la plataforma Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR.....	145
Tabla 3.4.- Condiciones para la amplificación en la plataforma Sequenom Mass ARRAY.....	149
Tabla 3.5.- Características y localización de las regiones seleccionadas para el análisis epigenético.....	150
Tabla 3.6.- Cebadores utilizados para cada amplicón de los polimorfismos seleccionados.....	150
Tabla 4.1.- Características antropométricas y bioquímicas de la población estudiada y comparación por sexos.....	162
Tabla 4.2.- Características clínicas de la población estudiada y comparación por sexos...	164
Tabla 4.3.- Características antropométricas y bioquímicas de la población estudiada en relación a la obesidad y a la DMT2.....	165
Tabla 4.4.- Porcentaje de individuos según el nivel de estudios en la población estudiada y en función del sexo.....	168
Tabla 4.5.- Porcentaje de individuos según el nivel de estudios en función de la obesidad y la DMT2.....	168

Tabla 4.6.- Valores de porcentajes de individuos según su consumo de tabaco en la población estudiada y en función del sexo	169
Tabla 4.7.- Valores de porcentajes de individuos según su consumo de tabaco en la población estudiada en función de la obesidad y la DMT2	170
Tabla 4.8.- Diferencias en las características antropométricas y bioquímicas entre fumadores y no fumadores en la población estudiada	170
Tabla 4.9.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre sedentarios y no sedentarios dentro de la población estudiada.....	172
Tabla 4.10.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre sedentarios y no sedentarios dentro de la población estudiada comparando entre individuos obesos y no obesos.....	173
Tabla 4.11.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre sedentarios y no sedentarios dentro de la población estudiada comparando entre individuos diabéticos y no diabéticos	174
Tabla 4.12.- Diferencias en parámetros antropométricos y bioquímicos entre individuos con alta o baja adherencia a la DM dentro de la población estudiada	178
Tabla 4.13.- Diferencias en el cuestionario de 14 puntos de adherencia a la DM en población total y en función del sexo	179
Tabla 4.14.- Diferencias en el cuestionario de 14 puntos de adherencia a la DM en función de la obesidad y la DMT2	180
Tabla 4.15.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con la obesidad en la población estudiada y en función de sexo	182
Tabla 4.16.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs3135506 del gen ApoA5 en la población estudiada	184
Tabla 4.17.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4731702 del gen KLF14 en la población estudiada	187
Tabla 4.18.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs13702 del gen LPL en la población estudiada	190
Tabla 4.19.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 en la población estudiada	191
Tabla 4.20.- Análisis del riesgo de obesidad y de DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs2314339 del gen NR1D1 en la población estudiada	193
Tabla 4.21.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con laDMT2 en la población estudiada y en función de sexo ...	195

Tabla 4.22.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en la población estudiada.....	196
Tabla 4.23.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C en la población PREDIMED	199
Tabla 4.24.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 en la población estudiada.....	201
Tabla 4.25.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2943634 en la población estudiada	202
Tabla 4.26.- Análisis del riesgo de DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs2943641 del gen IRS1 y del polimorfismo rs2943634 en la población estudiada.....	205
Tabla 4.27.- Valores medios de concentración de glucosa según el haplotipo de los polimorfismos rs2943641 y rs2943634 del gen IRS1 en la población estudiada y análisis del riesgo de DMT2 según estos haplotipos	207
Tabla 4.28.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con el ancestro genético en la población estudiada y en función de sexo.....	209
Tabla 4.29.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2014303 del gen CLNK en la población estudiada.....	210
Tabla 4.30.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs2419063 del gen FAM5C en la población estudiada	211
Tabla 4.31.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs6086473 del gen PLBC1 en la población estudiada.....	213
Tabla 4.32.- Variables antropométricas y niveles plasmáticos de glucosa según el genotipo del polimorfismo rs10509954 en la población estudiada.....	216
Tabla 4.33.- Análisis del riesgo de DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs10509954 en la población estudiada	216
Tabla 4.34.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs822759 en la población estudiada	220
Tabla 4.35.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs16891982 del gen SLC45A2 en la población estudiada.....	221

Tabla 4.36.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de genes relacionados con la obesidad y DMT2 en la población estudiada y en función de sexo.....	223
Tabla 4.37.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs4671327 (izquierda) y rs11892385 (derecha) del gen ASB3 en la población estudiada.....	225
Tabla 4.38.- Valores medios de concentración de glucosa según el haplotipo de los polimorfismos rs4671327 y rs11892385 del gen ASB3 en la población estudiada y análisis del riesgo de DMT2 según estos haplotipos	229
Tabla 4.39. - Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs1063192 (izquierda) y rs3217986 (derecha) del gen CDKN2B en la población estudiada	230
Tabla 4.40.- Valores medios de concentración de glucosa y c-HDL según el haplotipo de los polimorfismos rs1063192 y rs3217986 del gen CDKN2B en la población estudiada y análisis del riesgo de DMT2 según estos haplotipos...	233
Tabla 4.41. - Variables antropométricas, niveles plasmáticos de, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs655497 (izquierda) y rs693370 (derecha) del gen DMRTA1 en la población estudiada	235
Tabla 4.42.- Análisis del riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo del polimorfismo rs655497 del gen DMRTA1 en la población estudiada	236
Tabla 4.43.- Análisis de la prevalencia y el riesgo de obesidad y DMT2 según los haplotipos de los polimorfismos rs693370 y rs655497 del gen DMRTA1 en la población estudiada	237
Tabla 4.44.- Variables antropométricas, niveles plasmáticos de lípidos, glucosa y de presión arterial según el genotipo del polimorfismo rs961090 del gen INAFM2 en la población estudiada.....	238
Tabla 4.45.- Riesgo de DMT2 asociado al polimorfismo rs105213 del gen OGG1 en individuos sedentarios y no sedentarios en la población estudiada	245
Tabla 4.46.- Interacción del polimorfismo rs4580704 del gen CLOCK C, el uso de AOV como principal grasa para cocinar y la frecuencia de consumo de FS sobre los niveles de c-HDL en la población estudiada	253
Tabla 4.47.- Porcentaje de metilación de las diferentes islas de metilación estudiadas en el polimorfismo rs9939609 del gen FTO y el polimorfismo rs7903146 del gen TCF7L2	262
Tabla 4.48.- Estudio de correlación de variables antropométricas y bioquímicas con la metilación basal y la diferencia de metilación de la isla CpG 8 del amplicón A del gen FTO y de la isla CpG7 del amplicón B del gen TCF7L2	265
Tabla 4.49.- Análisis del riesgo de DMT2 según la puntuación de riesgo de los polimorfismos rs4580704 del gen CLOCK y rs2943641 del gen IRS1	270

Tabla 4.50.- Características antropométricas y bioquímicas de la población estudiada y comparación por sexos	272
Tabla 4.51.- Características clínicas de la población estudiada y comparación por sexos .	273
Tabla 4.52.- Relación de polimorfismos identificados por estudio de GWAS asociados más significativamente con IMC en la población PREDIMED PLUS.....	278
Tabla 4.53.- Relación de polimorfismos identificados por estudio de GWAS asociados más significativamente con perímetro de cintura en la población PREDIMED PLUS.....	279
Tabla 4.54.- Relación de polimorfismos identificados por estudio de GWAS asociados más significativamente con niveles de glucosa plasmática en la población PREDIMED PLUS.....	280
Tabla 4.55.- Análisis del riesgo de DMT2 en polimorfismos identificados mediante GWAs en el estudio PREDIMED PLUS.....	283
Tabla 4.56.- Variables antropométricas (IMC y perímetro de cintura) según el genotipo del polimorfismo rs4801988 del gen ZNF331 en la población PREDIMED .	284
Tabla 4.57.- Perímetro de cintura en función del polimorfismo rs2077759.....	285
Tabla 4.58.- Variables antropométricas (IMC y perímetro de cintura) según el genotipo del polimorfismo rs13239478 del gen MUC17 en mujeres de la población PREDIMED.....	286