

DEPARTAMENT DE MEDICINA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA 3139



**TESIS DOCTORAL**

**Lipemia postprandial y regulación génica en la obesidad mórbida**

Ana Artero Fullana

Dirigida por: Prof. Juan Francisco Ascaso Gimilio  
Prof. José Tomás Real Collado

Valencia, Septiembre 2018



FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE MEDICINA



## **TESIS DOCTORAL**

### **Lipemia postprandial y regulación génica en la obesidad mórbida**

Ana Artero Fullana

Licenciada en Medicina – Especialista en Endocrinología y Nutrición

Dirigida por:

Prof. D. Juan Francisco Ascaso Gimilio

Catedrático de Medicina. Departament de Medicina. Universitat de València

Prof. D. José Tomás Real Collado

Profesor Titular de Medicina. Departament de Medicina. Universitat de València

Valencia, Septiembre 2018





## DEPARTAMENT DE MEDICINA

**D. JUAN FRANCISCO ASCASO GIMILIO**, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Universidad del Departament de Medicina de la Facultat de Medicina y Odontologia de la Universitat de València.

**D. JOSÉ TOMÁS REAL COLLADO**, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor titular de Universidad del Departament de Medicina de la Facultat de Medicina y Odontologia de la Universitat de València.

Informan:

Que el trabajo titulado “Lipemia postprandial y regulación génica en la obesidad mórbida” presentado por D<sup>a</sup> Ana Artero Fullana para optar al grado de Doctor por la Universitat de València, ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y lectura.

Y para que conste, firman la presente en Valencia, 10 de Septiembre de 2018.

Firma de codirector de la tesis

Dr. Juan F. Ascaso Gimilio

Firma de codirector de la tesis

Dr. José T. Real Collado



*“Fue el tiempo que pasaste con tu rosa lo que la hizo tan importante”*

*Antoine de Saint-Exúpery*





## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchos los agradecimientos que esta tesis doctoral merece.

Al profesor D. Juan F. Ascaso, director de esta tesis, por su disponibilidad y apoyo. Por transmitir su rigor y excelencia.

Al Dr. José T. Real por su serenidad y generosidad. Porque su consejo, orientación y ayuda me han guiado en los distintos trabajos de investigación.

A Geles, a Pilar y todo el personal de laboratorio, por su disposición, dedicación y amabilidad.

A todos los adjuntos, residentes y personal de enfermería del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico, por su estímulo y apoyo todos estos años.

Y por supuesto, a mi familia. A mis padres y hermanas, por animarme, ayudarme y confiar en mí. A mi madre por ser ejemplo y luz. A mi padre por transmitirme sus ganas de hacer las cosas bien.

A Salva, por su paciencia y apoyo. Por no permitirme desistir pese a las dificultades. A mis hijos, por ser fuente de inspiración para mejorar cada día.



# ÍNDICE

Abreviaturas .....	13
Lista de tablas.....	14
Lista de figuras.....	15
I. Introducción.....	17
2. Obesidad mórbida .....	20
2.1 Introducción.....	20
2.2 Criterios diagnósticos .....	21
2.3 Obesidad mórbida, resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular .....	22
2.4 Patogenia .....	26
3. Lipemia postprandial.....	32
3.1 Lipemia postprandial y obesidad mórbida.....	35
4.1 Epigenética y metilación del ADN.....	39
4.2 Metilación del ADN y obesidad.....	42
II. Hipótesis y objetivos.....	47
III. Sujetos y métodos .....	53
1. Sujetos .....	56
2. Métodos.....	57
3. Diseño del estudio .....	59
4. Análisis del patrón de metilación del ADN .....	61
5. Análisis estadístico .....	66
IV. Resultados.....	69
1. Comparación de los parámetros analizados en ayunas.....	71
2. Comparación de los parámetros analizados a nivel postprandial .....	75
3. Comparación del patrón de metilación del ADN de adipocitos y linfomonocitos según el grado de RI basal.....	87
4. Comparación del patrón de metilación del ADN de adipocitos y linfomonocitos según la respuesta lipídica tras la SOG .....	98
V. Discusión.....	99
1. Discusión de la metodología .....	102
2. Discusión de resultados .....	106
3. Limitaciones.....	115

4. Perspectivas de futuro.....	116
VI. Conclusiones.....	119
VII. Bibliografía.....	123

# Abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AE: Arteriosclerosis
- AGL: Ácidos grasos libres
- ApoB: Apolipoproteína B
- ARN: Ácido ribonucleico
- CDMs: Sitios CpGs diferentemente metilados
- DNMT (*DNA methyltransferases*): ADN-metiltransferasas
- DMRs: Regiones diferentemente metiladas
- DM tipo 2: Diabetes mellitus tipo 2
- ECV: Enfermedad cardiovascular
- EWAS (*epigenome wide association study*): Estudio de asociación del epigenoma completo
- GWAS (*genome wide association study*): Estudio de asociación del genoma completo
- HDL-c (*high density lipoprotein - cholesterol*): Lipoproteína de alta densidad
- HOMA-IR (homeostasis model assessment): Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
- IDL (*intermediate density lipoproteína*): Lipoproteína de densidad intermedia
- IMC: Índice de masa corporal
- LDL-c (*low density lipoprotein - cholesterol*): Lipoproteína de baja densidad
- LPL: Lipoproteína lipasa
- LPP: Lipemia postprandial
- MUFA (*monounsaturated fatty acids*): Ácidos grasos monoinsaturados
- NGS (*next generation sequencing*): Secuenciación de nueva generación
- OMS (*metabolically healthy obese*): Obesos metabólicamente sanos
- PCR-us: Proteína C reactiva ultrasensible
- PUFA (*polyunsaturated fatty acids*): Ácidos grasos poliinsaturados
- QM: Quilomicrones
- RCP: Reacción en cadena de la polimerasa
- RI: Resistencia a la insulina
- SNP (*single-nucleotide polymorphism*): Polimorfismos de nucleótido sencillo
- SOG: Sobrecarga oral grasa
- TG: Triglicéridos
- VLDL (*very low-density lipoprotein*): Lipoproteína de muy baja densidad

## Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de los adultos según IMC .....	21
Tabla 2. Definición de fenotipos de tamaño corporal .....	25
Tabla 3. Composición módulo nutricional lipídico en emulsión (Supracal®) .....	60
Tabla 4. Determinación de parámetros basales y postprandiales .....	60
Tabla 5. Selección de 11 regiones diferentemente metiladas con mayor asociación con DM tipo 2 .....	61
Tabla 6. Características clínicas de la población de estudio .....	71
Tabla 7. Características clínicas en función del fenotipo corporal .....	72
Tabla 8. Características bioquímicas de la población de estudio .....	73
Tabla 9. Correlación de Spearman entre los parámetros del metabolismo lipídico basales y las variables antropométricas del grupo completo .....	74
Tabla 10. Correlación de Spearman entre los parámetros basales del metabolismo hidrocarbonado y las variables antropométricas del grupo completo .....	74
Tabla 11. Parámetros lipídicos basales y a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG entre obesos con menor y mayor grado de insulinoresistencia .....	76
Tabla 12. Parámetros del metabolismo hidrocarbonado basales y tras la SOG .....	82
Tabla 13. Características clínicas del grupo completo para el estudio de la metilación .....	87
Tabla 14. Datos bioquímicos del grupo completo para el estudio de la metilación .....	88
Tabla 15. Características de los <i>primers</i> .....	89
Tabla 16. Valores considerados para selección de muestras .....	92
Tabla 17. Diferencias en la metilación entre la referencia y los sitios seleccionados .....	93
Tabla 18. Diferencias en la metilación en los distintos tejidos y sitios seleccionados .....	94

## Lista de figuras

Figura 1. Efectos metabólicos de la obesidad debidos a la lipotoxicidad .....	24
Figura 2. Alteraciones que incrementan el riesgo cardiovascular en obesos con excesiva grasa ectópica y/o visceral .....	28
Figura 3. Cambios en el tejido adiposo y hepático en la obesidad e insulinresistencia .....	31
Figura 4. Influencia de factores de vida y enfermedades metabólicas sobre LPP .....	33
Figura 5. Acumulación de loci asociados con IMC y obesidad .....	38
Figura 6. Esquema del estudio .....	55
Figura 7. Esquema del proceso de secuenciación con MiSeq de Illumina .....	64
Figura 8. Archivo .fastq .....	65
Figura 9. Comparación de los niveles de TG, CT, HDLc, LDL-c, ApoB y AGL plasmáticos en cada punto de la SOG entre obesos con menor y mayor grado de RI .....	78
Figura 10. Variación de la trigliceridemia con respecto al valor basal en la SOG .....	79
Figura 11. Cambios en los niveles séricos de CT, apoB, LDL-c y HDL-c con respecto al valor basal en la SOG según el grado de insulinorresistencia .....	80
Figura 12. Variación de los niveles séricos de triglicéridos con respecto al punto previo en la SOG en obesos con menor y mayor grado de insulinorresistencia .....	81
Figura 13. Comparación de los niveles de glucosa, insulina y HOMA-IR en la SOG .....	83
Figura 14. Comparación de los niveles de insulina y HOMA-IR en cada punto de la SOG entre obesos metabólicamente sanos o no .....	84
Figura 15. Variación de los niveles séricos de glucosa, insulina y HOMA-IR con respecto al valor basal a las 2, 4, 6 y 8 horas de la SOG ... ..	85
Figura 16. Variación de los niveles séricos de glucosa, insulina y HOMA-IR con respecto al punto previo en la SOG, a las 2, 4, 6 y 8 horas .....	86
Figura 17. Cobertura del amplicón para el sitio cg14530382 en sangre .....	90
Figura 18. Control de calidad y gráfico de calidad por secuencia .....	91
Figura 19. Porcentaje de metilación de cg07064495 y cg22730047 en grasa visceral según grado de insulinorresistencia .....	95
Figura 20. Metilación de cg07064495 y cg22730047 en diferentes tejidos .....	97
Figura 21. Vías metabólicas alteradas en la DM tipo 2 .....	112





## I. Introducción



# 1. Arteriosclerosis y riesgo cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte en el mundo.<sup>1</sup> El envejecimiento poblacional y el incremento en la prevalencia de determinados factores de riesgo cardiovascular, tales como la obesidad o la diabetes, se han relacionado con la creciente incidencia de enfermedades no transmisibles, tanto en países desarrollados como en aquellos de ingresos medio-bajos.<sup>2,3</sup> En España, aproximadamente el 7% de la mortalidad global adulta es atribuible a la obesidad, elevándose al 30% al considerar el exceso de peso como un factor de riesgo de mortalidad.<sup>4</sup>

La arteriosclerosis (AE) es la enfermedad subyacente en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares, y afecta principalmente a las arterias de mediano y gran calibre. Se caracteriza por la pérdida de elasticidad y la formación de placas arterioscleróticas que conduce a la reducción del lumen arterial y finalmente al desarrollo de complicaciones, como es la hemorragia o el trombo mural. Aunque la acumulación de las partículas oxidadas de colesterol LDL (LDL-c) es el factor inicial fundamental en el desarrollo de la placa de ateroma, tal y como se ha establecido en múltiples estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales;<sup>5</sup> existen otros factores, tanto genéticos como ambientales, que intervienen en el proceso aterotrombótico. Por ello, la AE es mucho más que el mero depósito de lípidos en la pared arterial, siendo una enfermedad inflamatoria crónica.<sup>6</sup>

El riesgo de desarrollar arteriosclerosis y las complicaciones cardiovasculares derivadas de ella, no es uniforme en toda la población. Son muchos los factores de riesgo cardiovascular conocidos (como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, el tabaquismo, la insulinoresistencia o la obesidad) que inducen la disfunción endotelial, fase inicial de la AE.<sup>6,7</sup> Por ello, las enfermedades cardiovasculares son un modelo de patología multifactorial, donde interaccionan factores genéticos y ambientales; promoviendo efectos locales y sistémicos para el desarrollo y mantenimiento de la AE. Uno de los principales factores de riesgo es la obesidad. Dentro de la misma destaca, por su elevado riesgo cardiovascular, la obesidad mórbida.<sup>8</sup>

## 2. Obesidad mórbida

### 2.1 Introducción

La prevalencia de obesidad se ha incrementado de forma significativa en las últimas décadas, convirtiéndose en un importante problema de salud pública. La Organización Mundial de la Salud estimó en 2016 que en el mundo había más de 650 millones de adultos obesos; afectando por lo tanto al 13% de la población adulta mundial (11% de los hombres y 15% de las mujeres).<sup>9</sup> En España, datos del estudio ENRICA llevado a cabo entre 2008 y 2010 revelaron una prevalencia del 22,9% de obesidad en la población adulta (24,4% en varones y 21,4% en mujeres); superior a la encontrada en 1992 en el estudio DRECE, que era del 14,4%.<sup>10,11</sup>

El estudio NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) realizado en EEUU entre 2007 y 2008, reveló una prevalencia de obesidad en la edad adulta superior a la hallada en nuestro país (33,8 vs. 22,9%); y una prevalencia de obesidad mórbida nada desdeñable (afectando al 5,7% de la población adulta; 7,2% en mujeres y 4,2% en hombres).<sup>12</sup> En España, datos de la Encuesta Nacional de Salud de 2006 en mayores de 16 años muestran una prevalencia de obesidad mórbida del 6,1‰ (6,8‰ en mujeres y 5,4‰ en hombres).<sup>13</sup>

El aumento en la prevalencia de obesidad conlleva un incremento de la morbimortalidad derivada de ella, con graves consecuencias socioeconómicas y sanitarias. La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de ECV y se asocia con la presencia de otras comorbilidades que incluyen diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2), hipertensión, dislipemia, algunos tipos de cáncer y osteoartritis.<sup>7</sup> Por ello, dada su elevada prevalencia, la creciente incidencia y la importante morbimortalidad derivada de ella; el conocimiento de los mecanismos subyacentes entre obesidad y ECV es una prioridad.

## 2.2 Criterios diagnósticos

La obesidad es una enfermedad multifactorial que ocasiona una alteración metabólica crónica y se caracteriza por el exceso de grasa corporal.<sup>14</sup> Por lo tanto, se considera obeso a aquel sujeto que presenta cifras superiores a la normalidad de grasa corporal; excediendo el 12-20% de la masa corporal en hombres o el 20-30% en mujeres.<sup>15</sup>

Sin embargo, los métodos actuales para la determinación de la masa grasa corporal no están disponibles en la práctica clínica habitual. Por ello, frecuentemente se emplean métodos indirectos que estiman la masa grasa, como es la antropometría.

La mayoría de sociedades científicas recomiendan la definición operativa de obesidad mediante el índice de masa corporal (IMC); dada su simplicidad, reproductibilidad y capacidad de reflejar la adiposidad a nivel poblacional.<sup>7</sup> El IMC se calcula dividiendo el peso expresado en kilogramos por la altura de la persona expresada en metros al cuadrado. Así, al incrementar la masa grasa aumentará el peso corporal, y por tanto, a igualdad de talla aumenta el IMC. En población adulta, la obesidad se define por un IMC igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> y se considera sobrepeso al IMC entre 25 y 29,9 kg/m<sup>2</sup>.<sup>16</sup> El riesgo de morbilidad y mortalidad se incrementa proporcionalmente con el grado de exceso de peso.<sup>4</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de los adultos según IMC (OMS 2000)

<b>Clasificación</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>
Peso insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5 – 24,9
Sobrepeso	≥ 25
Preobesidad	25 – 29,9
Obesidad	≥ 30
Obesidad clase I	30 – 34,9
Obesidad clase II	35 – 39,9
Obesidad clase III o mórbida	≥ 40

Se considera obesidad clase III o mórbida al IMC igual o superior a 40 kg/m<sup>2</sup>. Posteriormente, debido al incremento de sujetos con IMC superior a 40 kg/m<sup>2</sup>, se subdividió esta categoría en dos grupos: obesidad clase III o mórbida (IMC entre 40 y 49,9 kg/m<sup>2</sup>) y obesidad clase IV o extrema o super-obesidad (IMC  $\geq$  50 kg/m<sup>2</sup>).

Existen otros parámetros antropométricos que permiten estimar la cantidad de grasa abdominal, como son el perímetro abdominal o la relación cintura/cadera. El perímetro abdominal, medido en el punto medio entre la cresta iliaca anterosuperior y el margen inferior de la última costilla, se correlaciona positivamente con la grasa abdominal. Sin embargo, no existe consenso acerca del punto de corte para definir la obesidad abdominal; ya que un perímetro de la cintura elevado se debe correlacionar con un incremento del riesgo cardiovascular.<sup>17</sup>

En 2002, el Panel III de Tratamiento de Adultos (ATP III) del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol de los EE.UU., consideró patológico un perímetro de la cintura superior a 102 cm en hombres y 88 cm en mujeres.<sup>18</sup> Posteriormente, el consenso de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) redujo estos puntos de corte a un perímetro abdominal  $\geq$  94 cm en hombres europeos y  $\geq$  80 cm en mujeres europeas.<sup>17</sup> En sujetos con sobrepeso u obesidad se recomienda emplear el límite de 94 cm en hombres y de 80 cm en mujeres para definir un riesgo elevado para la salud; y por encima de 102 cm en hombres y de 88 cm en mujeres, se considera un riesgo muy elevado.<sup>19</sup>

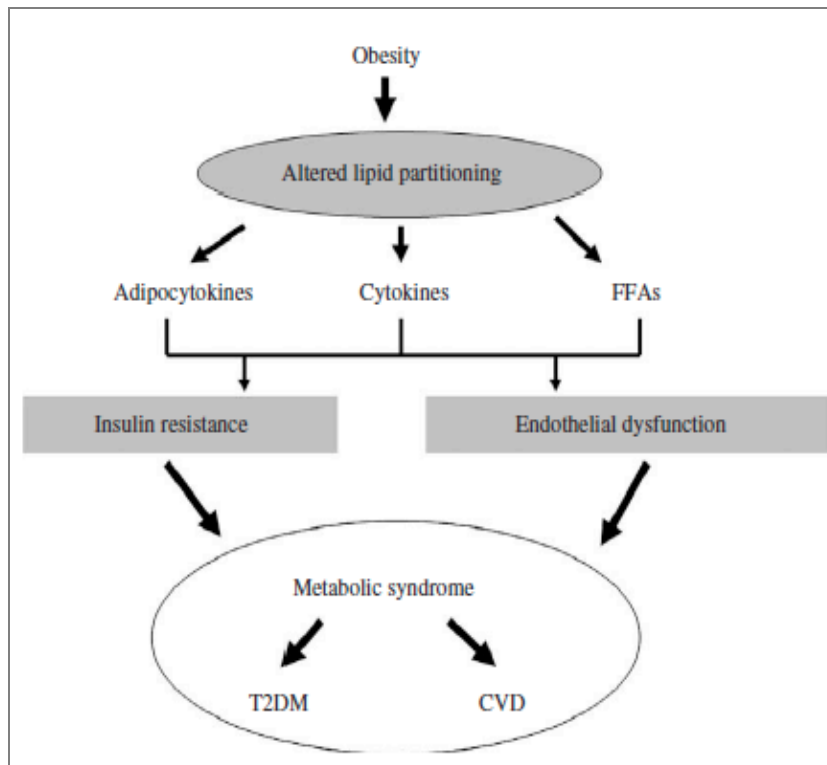
### 2.3 Obesidad mórbida, resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular

Los pacientes con obesidad mórbida presentan un riesgo elevado de desarrollar ECV, diabetes o cáncer; así como una reducción de la esperanza de vida.<sup>3</sup> La obesidad frecuentemente se asocia con la presencia de resistencia a la insulina (RI), implicada en la patogenia del síndrome metabólico y en el desarrollo de DM tipo 2. La RI se caracteriza por la disminución en la respuesta biológica de

los tejidos periféricos a la acción de la insulina. Es un factor de riesgo en el desarrollo de ECV y, por ella misma o sus consecuencias, en el desarrollo y mantenimiento de la AE.<sup>20</sup> La definición de RI se basa en el percentil 90 de la población de estudio, siendo para el índice HOMA el punto de corte de 3,8 en nuestra población.<sup>21</sup>

La obesidad es frecuentemente el resultado de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, produciéndose habitualmente un excesivo aporte energético debido al incremento de la ingesta calórica y a un descenso del gasto energético; así como una predisposición genética que facilita la sobrecarga energética del adipocito. El depósito lipídico es un mecanismo adaptativo fisiológico de almacenamiento energético eficiente, en el que se acumulan las máximas calorías posibles por unidad de volumen. Este depósito subcutáneo actúa como aislante térmico y juega un papel primordial en las situaciones de ayuno. Por ello, en épocas de abundancia energética la homeostasis calórica intenta evitar los daños secundarios de la sobrecarga lipídica (lipotoxicidad) mediante la acumulación de triglicéridos (TG) en los adipocitos y a través de la secreción de leptina, de efecto anorexígeno, que a su vez estimula la oxidación de ácidos grasos libres en tejidos no-adiposos.<sup>22</sup> Sin embargo, cuando el aporte calórico excesivo se mantiene y los depósitos subcutáneos están saturados, el almacenamiento de lípidos se moviliza a otros tejidos, como es la grasa visceral o tejidos insulinosensibles como son el hígado o el músculo esquelético. El depósito de lípidos en estos tejidos puede afectar a su correcto funcionamiento y metabolismo, contribuyendo a la lipotoxicidad.<sup>23</sup>

Cuando el desequilibrio energético perdura, la tendencia a acumular grasa en depósitos menos ventajosos que el tejido adiposo subcutáneo influye en el perfil de secreción de citoquinas, factores inflamatorios y señales hormonales; así como en la circulación de ácidos grasos libres (AGL) (*Figura 1*). El efecto combinado de estos factores modula la RI de los tejidos insulinosensibles e influye en el sistema vascular a través de la disfunción endotelial.<sup>22,23</sup>



**Figura 1. Efectos metabólicos de la obesidad debidos a la lipotoxicidad.** El acúmulo lipídico influye en el perfil de secreción de citoquinas, factores inflamatorios y señales hormonales; así como en la circulación de ácidos grasos libres. Fuente: "Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where and how? *Eur J Endocrinol* 2007;157:S39-S45"<sup>23</sup> CVD, enfermedad cardiovascular; FFA, ácidos grasos libres; T2DM, diabetes mellitus tipo 2

El incremento circulante de AGL y glucosa se asocia a un aumento del estrés oxidativo y de factores inflamatorios que contribuyen a un incremento de la RI.<sup>23,24</sup> En situaciones de RI se reduce el aclaramiento plasmático de partículas ricas en TG, y se incrementa el flujo de AGL al hígado y la exportación de TG hepáticos como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) al tejido adiposo.<sup>25</sup> Este incremento en AGL circulantes se produce tanto en ayunas como tras las ingestas; pero es especialmente relevante en la fase postprandial, cuando la RI es más evidente.

Sin embargo, la experiencia clínica y estudios recientes apoyan que no todos los sujetos con obesidad presentan el riesgo metabólico y cardiovascular descrito previamente; existiendo distintos fenotipos metabólicos en obesos. Los individuos obesos metabólicamente sanos (OMS) o sujetos con obesidad no complicada u



obesidad metabólicamente benigna, son aquellos con un IMC igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> y un perfil metabólico favorable, caracterizado por una elevada sensibilidad a la insulina, un perfil lipídico normal, ausencia de hipertensión arterial y parámetros inflamatorios dentro de la normalidad.<sup>26</sup> No obstante, todavía no existe una definición estandarizada de los distintos fenotipos de tamaño corporal, por lo que existen distintas definiciones para clasificar a los OMS. La más frecuentemente empleada es la definición ampliada del ATP-III (*Tabla 2*).<sup>27</sup>

**Tabla 2.** Definición de fenotipos de tamaño corporal

### **Alteraciones cardiometabólicas consideradas**

Aumento de la presión arterial:  $\geq 130/85$  mmHg o uso de medicación antihipertensiva

Triglicéridos séricos en ayunas elevados:  $\geq 150$  mg/dL

Descenso de los niveles de HDL-colesterol:  $< 40$  mg/dL en hombres y  $< 50$  mg/dL en mujeres o uso de medicación hipolipemiente

Incremento de cifras de glucosa: Glucosa en ayunas  $\geq 100$  mg/dL o uso de mediación antidiabética

Resistencia a la insulina: HOMA-IR  $> 5.13$  o  $> p90$  de la población

### **Fenotipo de tamaño corporal**

Obeso metabólicamente sano:  $IMC \geq 30.0$  y  $\leq 1$  alteración cardiometabólica

Obeso metabólicamente alterado:  $IMC \geq 30.0$  y  $> 1$  alteración cardiometabólica

La mayoría de estudios han detectados que los OMS tienen porcentajes de grasa corporal total similar a los obesos metabólicamente alterados, pero con una distinta distribución de la misma, presentando una menor proporción de grasa visceral y ectópica; así como una mayor sensibilidad a la insulina y un perfil lipídico más favorable.<sup>26</sup> Con todo, no se conocen la totalidad de mecanismos etiopatogénicos que condicionan la aparición o no de alteraciones cardiometabólicas; y dada la limitada capacidad terapéutica actual en el tratamiento de la obesidad, poder predecir que sujetos tienen un mayor riesgo de complicaciones crónicas es de gran importancia.

Un destacado metanálisis ha evaluado el riesgo de mortalidad y ECV en los OMS detectando un riesgo aumentado tras 10 o más años respecto a sujetos con normopeso metabólicamente sanos (RR 1,24; 95% CI, 1,02 – 1,55). Curiosamente, todos los sujetos metabólicamente enfermos tenían un mayor riesgo de ECV independientemente del IMC, siendo éste menor al incrementar el IMC (RR 3,13 en normopeso, 2,70 en sobrepeso y 2,65 en obesidad).<sup>28</sup> A pesar de esta realidad, estos datos no deben emplearse para justificar la obesidad; de igual manera que los beneficios del consumo moderado de alcohol no pueden justificar el alcoholismo.

Todo ello refuerza la necesidad de encontrar marcadores precoces que nos permitan identificar a aquellos sujetos con obesidad y un mayor riesgo de ECV, y las alteraciones metabólicas e inflamatorias podrían ser ese eslabón intermedio.

## 2.4 Patogenia

Los complejos mecanismos patogénicos implicados en la obesidad son muy heterogéneos y actualmente no son totalmente conocidos. Algunos de los principales mecanismos fisiopatológicos parecen ser el patrón de fraccionamiento lipídico (depósitos ectópicos) y la disfunción del tejido adiposo blanco (mediante la liberación excesiva de citoquinas o una reducción de las adipoquinas).<sup>7,23</sup>

### 2.4.1 Depósitos adiposos ectópicos

Se considera que la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo subcutáneo, así como la acumulación de TG son fenómenos fisiológicos que intentan evitar la lipotoxicidad. Sin embargo, tal y como se ha comentado previamente, según la localización del depósito adiposo varían sus características metabólicas, el estado inflamatorio y el perfil de secreción de citoquinas y adipoquinas; lo que influye en el riesgo cardiovascular del paciente con obesidad. Por ello, es importante distinguir entre los depósitos no-ectópicos (grasa subcutánea) y los ectópicos (grasa visceral o depósitos intrahepáticos, intramusculares, pericárdicos,

miocárdicos, perivasculares...); siendo estos últimos metabólicamente más deletéreos.<sup>29</sup>

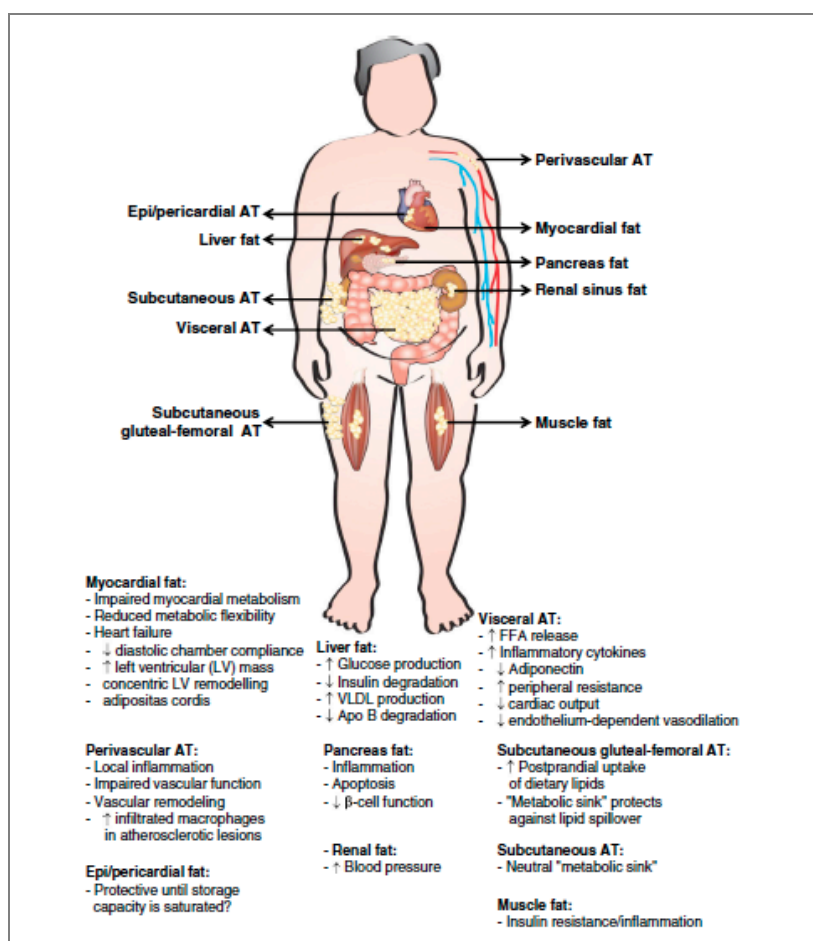
En condiciones fisiológicas, en el sujeto delgado existe una pequeña proporción de tejido adiposo ectópico. Incrementos en estos depósitos (superiores al percentil 50 de tejido adiposo visceral) a pesar de un peso normal condicionan un incremento del riesgo cardiovascular;<sup>30</sup> de manera análoga a lo que sucede en el paciente con obesidad.<sup>31</sup>

Estudios prospectivos han asociado el incremento de grasa visceral con el desarrollo de enfermedad cardiovascular, tras ajustar por factores clínicos de riesgo CV.<sup>32</sup> De igual manera, la acumulación de lípidos a nivel hepático y muscular se ha relacionado con alteraciones del metabolismo lipídico e hidrocarbonado, sobre todo si se asocia a inflamación; y la acumulación a nivel del seno renal se ha relacionado con el desarrollo de microalbuminuria e hipertensión arterial.<sup>33</sup> El depósito lipídico a nivel pericárdico y miocárdico se ha relacionado con un efecto deletéreo sobre los vasos coronarios, por lipotoxicidad o debido al efecto de las citoquinas segregadas a su torrente circulatorio.<sup>34</sup> (*Figura 2*)

Los mecanismos que condicionan el desarrollo de los depósitos adiposos ectópicos no son completamente conocidos. Estudios previos han relacionado la hipertrofia de los adipocitos subcutáneos con el riesgo a desarrollar DM tipo 2;<sup>35</sup> lo que apoyaría que la saturación del tejido adiposo subcutáneo subyace a la aparición de los depósitos ectópicos en situaciones no patológicas (ej. lipodistrofia). Por otro lado, la capacidad angiogénica del tejido adiposo subcutáneo, fisiológicamente mayor a la del tejido visceral, se encuentra disminuida en el sujeto con obesidad. Esta limitada capacidad angiogénica podría contribuir a un menor flujo sanguíneo a nivel subcutáneo, una menor capacidad de almacenamiento de energía y una mayor liberación de AGL;<sup>36,37</sup> así como a su menor actividad metabólica, justificada por un menor consumo de oxígeno local. Otro posible mecanismo es la mayor actividad lipolítica de la grasa visceral, lo que condiciona un incremento en el flujo de AGL hacia el hígado y podría contribuir a

un mayor depósito lipídico hepático, al incremento de la lipogénesis y al desarrollo de RI.<sup>38,39</sup>

Asimismo, la grasa visceral se ha relacionado con un estado inflamatorio crónico de bajo grado y un aumento de los marcadores inflamatorios séricos, como son la proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us), la interleucina-6, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), ...; y éstos con el desarrollo de alteraciones metabólicas. Estudios experimentales han observado la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo visceral, así como una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias y una menor secreción de adipocinas beneficiosas por este tejido.<sup>36,40</sup> Sin embargo, estos mecanismos no explican totalmente la complejidad de los depósitos adiposos y su fisiopatología.



**Figura 2. Alteraciones que conllevan un aumento del riesgo cardiovascular en obesos con excesiva grasa ectópica y/o visceral.** Fuente: "Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2014;56:369-81". AT, tejido adiposo; FFA, ácidos grasos libres

## 2.4.2 Alteración del flujo de ácidos grasos libres

En condiciones fisiológicas, el tejido adiposo es un órgano activo sometido a un proceso dinámico de depósito de ácidos grasos procedentes de la dieta y la liberación de AGL a la circulación portal y sistémica. El tejido adiposo subcutáneo y visceral almacenan aproximadamente el 50% de los lípidos procedentes de la alimentación; y para mantener un equilibrio energético estable deben liberar la misma cantidad de AGL al torrente circulatorio.<sup>37,41</sup>

Estudios *in vivo* en sujetos con normopeso muestran una mayor capacidad de almacenamiento de ácidos grasos de la dieta por la grasa visceral que en el tejido graso subcutáneo, siendo ésta a su vez mayor en la mitad superior corporal frente a la mitad inferior. Además, la grasa visceral es más activa lipolíticamente (mayor liberación de AGL por kg de grasa) que la subcutánea, y a su vez es más resistente a la supresión postprandial o en caso de hiperinsulinemia.<sup>41</sup>

En el estado patológico de obesidad, con un incremento de la grasa visceral, la liberación de AGL en ayunas está incrementada en un 30%; al igual que sucede en la situación postprandial. El incremento en ayunas de los AGL así como la alteración en la supresión de AGL se asocian con la presencia de hipertrigliceridemia.<sup>37</sup> Se cree que la exposición de los tejidos libres de grasa o tejidos magros a estas elevadas concentraciones de AGL contribuyen al desarrollo de las alteraciones metabólicas observadas en obesos con incremento de la grasa visceral.

Estudios *in vivo* han demostrado un incremento en el flujo de AGL hepáticos en obesos insulinoresistentes, seguramente en relación a la resistencia del tejido adiposo visceral a los efectos antilipolíticos de la insulina.<sup>42</sup> Ello condiciona una mayor exposición hepática a los AGL que en los tejidos periféricos, lo que incrementará la síntesis y liberación de VLDL y facilitará la aparición de LDL pequeñas y densas. Así mismo facilitará una menor captación muscular y hepática de insulina, contribuyendo a la RI presente frecuentemente en la obesidad.

Además, en sujetos con incrementos de la grasa visceral existe una disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL). La LPL actúa facilitando el aclaramiento de remanentes lipoproteicos (partículas ricas en TG) en situación postprandial, por lo que existe un incremento del flujo de AGL, remanentes de QM y VLDL ricos en TG al hígado, contribuyendo a una mayor lipemia postprandial. Así, la menor actividad de la LPL explica en parte la amplificación de los efectos deletéreos de la lipemia postprandial en estos sujetos.<sup>43,44</sup>

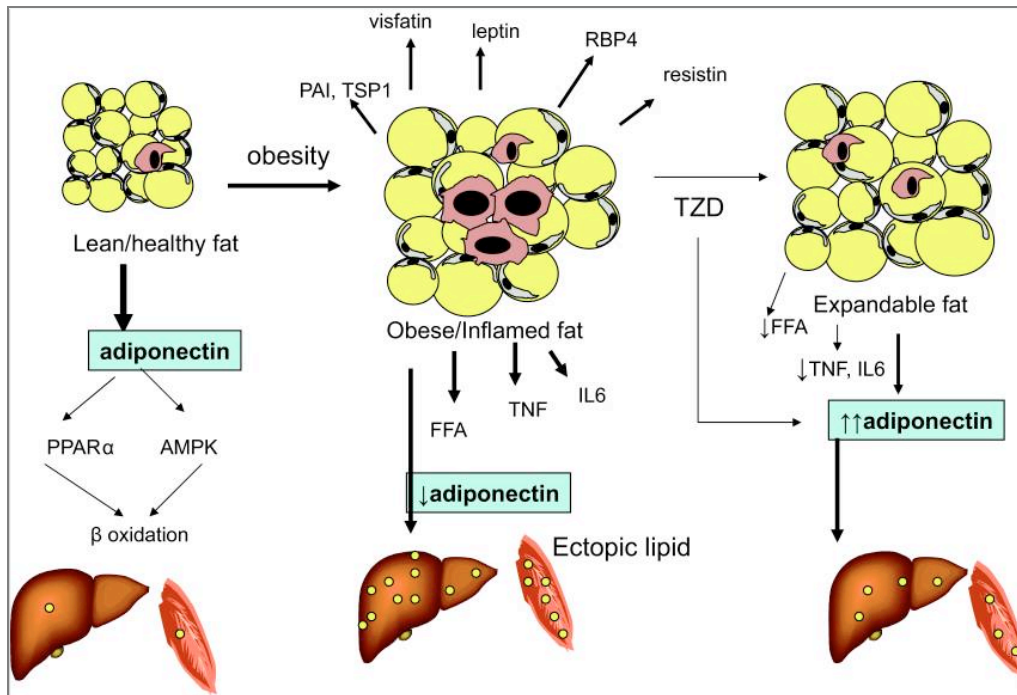
### 2.4.3 Disfunción del tejido adiposo blanco

El patrón de almacenamiento lipídico parece influir en el estrés oxidativo, el perfil de secreción de adipoquinas, citoquinas y otros factores inflamatorios, así como en la circulación de AGL.<sup>23</sup> La inflamación del tejido adiposo parece surgir al limitar su expansión, debido a una alteración en su desarrollo (como en los casos de lipodistrofia), a un descenso de la síntesis lipídica o a alteraciones de la matriz intercelular que impiden la hipertrofia del adipocito.<sup>45</sup>

Los adipocitos segregan numerosas proteínas denominadas adipoquinas, que influyen en la RI e inflamación, actuando localmente o a distancia (efecto hormonal). Las adipoquinas son factores proinflamatorios derivados del tejido adiposo, como la leptina, la resistina, la visfatina o el factor estimulante de colonias de células pre-B (PBEF), la proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP-4), etc. Sin embargo, el adipocito inflamado segrega menos adiponectina, un factor antiinflamatorio, que al incrementar el gasto energético y la oxidación de AGL mejora la sensibilidad a la insulina. (*Figura 3*)

Así mismo, el tejido adiposo segrega citoquinas, proteínas mediadoras de bajo peso molecular que son liberadas en la proximidad de las estructuras donde actúan. El término citoquinas engloba a más de 100 factores conocidos actualmente, que se subdividen en interleuquinas, factores de necrosis tumoral, interferones, factores estimuladores de colonias, factores transformadores de crecimiento y quimioquinas (citoquinas quimiotácticas). Las citoquinas tienen un papel dual, con efecto pro- y antiinflamatorio, y a través de interacciones

complejas modulan su influencia sobre las células implicadas en el desarrollo de la placa arteriosclerótica. El balance entre unas y otras será decisivo en el desarrollo de la lesión arteriosclerótica.<sup>46</sup>



**Figura 3. Cambios en el tejido adiposo, hepático y muscular en la obesidad y RI.**

Fuente: "Rasouli N, Kern P.A. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:S64-S73."

AMPK, proteína quinasa activada por AMP; FFA, ácidos grasos libres; IL6, interleukina 6; PAI, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; PPAR, proliferador de peroxisoma activados de los receptores; RBP4, proteína fijadora de retinol 4; TNF, factor de necrosis tumoral; TSP1, trombospondina 1; TZD, tiazolidinedionas;

Tanto la inflamación como el estrés oxidativo generados, producen un incremento de la RI.<sup>24,47</sup> Esta RI inicialmente puede ser considerada como fisiológica o adaptativa, al inducir saciedad en un contexto de exceso de nutrientes circulantes, intentando liberar de la sobrecarga de energía al adipocito. Sin embargo, si esta adaptación no se produce, la RI mantenida en el tiempo genera dislipemia mixta y la alteración del metabolismo hidrocarbonado.<sup>48</sup>

### 3. Lipemia postprandial

La hipertrigliceridemia en ayunas es un conocido factor de riesgo cardiovascular y de mortalidad.<sup>49,50</sup> Sin embargo, desde un punto de vista clínico es trascendente conocer el papel de la lipemia postprandial (LPP), ya que gran parte de la población occidental consume varias comidas a lo largo del día y permanece en estado postprandial la mayor parte del tiempo (aproximadamente 18 a 20 horas diarias).

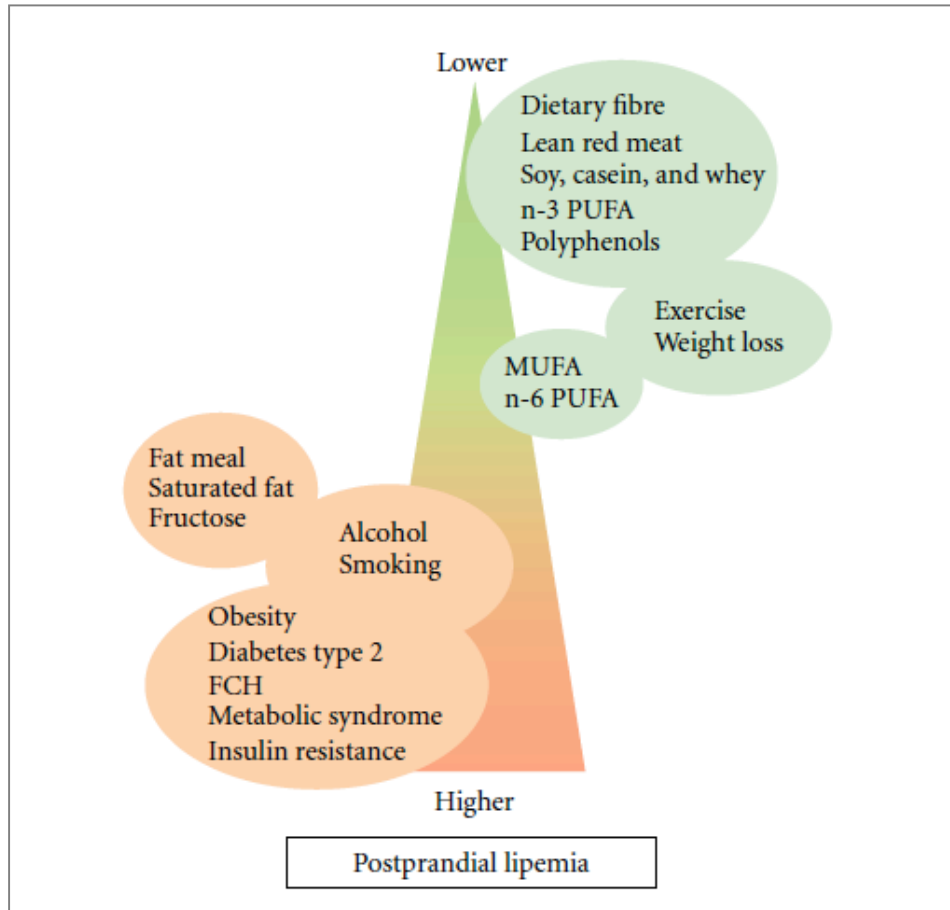
La relación entre arteriosclerosis y LPP ha sido motivo de estudio en las últimas cuatro décadas.<sup>51</sup> La LPP se refiere al acumulo en plasma de lipoproteínas ricas en TG (quilomicrones, VLDL y sus remanentes) hasta 6 a 10 horas tras una comida grasa.<sup>52</sup>

La LPP es un mecanismo fisiológico que se produce tras la ingesta de una comida que contenga más de 30 g de grasa. El incremento plasmático de TG es mayor a la 4ª hora y la curva que se genera es dosis-dependiente hasta los 80 g de grasa.<sup>52</sup> El contenido graso medio de una comida occidental es de 20 a 40 g y, dado que realizamos entre 3 y 5 comidas diarias, a partir de la segunda ingesta el resto se realizan antes de que los TG plasmáticos retornen a sus cifras basales. Así, podemos concluir que la población occidental se encuentra en situación de ayuno sólo tras el descanso nocturno con una continua fluctuación en el grado de lipemia durante el resto del día, alcanzando valores máximos tras la cena.<sup>53,54</sup>

La LPP se ve influenciada por múltiples factores ambientales y genéticos, entre los que encontramos el género, el estado hormonal de la mujer, el consumo de alcohol y tabaco, el grado de actividad física y el contenido graso de la comida.<sup>53,55</sup> (Figura 4) Según el tipo de grasa varía la extrusión postprandial de TG, siendo mayor con grasa saturada, menor tras el consumo de grasa monoinsaturada (MUFA) y todavía menor con grasa poliinsaturada (PUFA). Otro de los factores que modulan la LPP es el ejercicio físico. Éste, moderado o intenso de corta duración, disminuye la LPP y su efecto es sinérgico con los cambios dietéticos.



Probablemente su efecto es debido a un mayor aclaramiento de las lipoproteínas ricas en TG, a través de una mayor actividad de la LPL.<sup>53,56</sup>



**Figura 4. Influencia de factores de estilo de vida y enfermedades metabólicas sobre la LPP.** Los factores en verde disminuyen la LPP, mientras que los rodeados por rojo empeoran la LPP. Fuente: “Klop B, Proctor S.D, Mamo J.C, Botham K.M, Castro-Cabezas M. Understanding postprandial inflammation and its relationship to lifestyle behaviour and metabolic diseases. *Int J Vasc Med.* 2012;947417.”

n-3 PUFA, n-3 ácidos grasos poliinsaturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; n-6 PUFA, n-6 ácidos grasos poliinsaturados; FCH, insuficiencia cardiaca congestiva

En ayunas, los TG son principalmente transportados en el torrente sanguíneo por las VLDL que contienen apolipoproteína B100 (apo B100). Las VLDL se convierten en su remanente (lipoproteínas de densidad intermedia, IDL) gracias a la LPL de las células endoteliales. En condiciones fisiológicas, las IDL (y los

remanentes de quilomicrones) son captadas a nivel hepático por el receptor de LDL principalmente, donde son degradadas y el colesterol es excretado a través de la bilis. Otra parte de las IDL son degradadas a LDL-c por acción de otras enzimas, como la lipasa de TG hepática (*hepatic triglyceride lipase*, HTGL).<sup>57</sup>

Tras la ingesta de grasa los enterocitos del intestino secretan quilomicrones al torrente sanguíneo para transportar la grasa de la dieta a los tejidos periféricos. Los quilomicrones son lipoproteínas ricas en TG cuya proteína estructural es la apolipoproteína B48 (apo B48); y comparten ruta metabólica y la unión a la LPL, para la hidrólisis en ácidos grasos y glicerol, con las lipoproteínas endógenas (VLDL). Los quilomicrones son retirados del torrente circulatorio más rápidamente que las VLDL, probablemente debido a su menor tamaño y mayor contenido en TG.<sup>58</sup> Dado que la disponibilidad de la LPL es limitada, en fase postprandial puede saturarse y por lo tanto favorecer la acumulación de partículas ricas en TG. Así, el incremento de triglicéridos tras la ingesta de grasa puede deberse tanto a un defecto en el aclaramiento de quilomicrones como a una sobreproducción hepática de lipoproteínas ricas en TG (VLDL).<sup>59</sup> La persistencia de lipoproteínas ricas en TG en el torrente circulatorio conlleva un aumento del intercambio de los ésteres de colesterol por TG con las LDL, produciendo partículas de LDL pequeñas y densas.<sup>58</sup>

La importancia de la LPP viene determinada por su asociación con la ECV, ya que los remanentes lipoproteicos postprandiales pueden migrar al espacio subendotelial e inducir localmente inflamación y favorecer la disfunción endotelial.<sup>51,60</sup> La lipemia postprandial es un factor de riesgo independiente de arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular, tanto en hombres como en mujeres, incluso en ausencia de hipertrigliceridemia. Un aumento de los TG postprandiales se asocia a un mayor riesgo de desarrollar un infarto agudo de miocardio (RR 1,4, IC 95% 1,1-1,72).<sup>61</sup>

Los mecanismos que asocian la LPP y la arteriosclerosis no son completamente conocidos, pero implican al estrés oxidativo y la inflamación.<sup>62</sup> Los remanentes de QM procedentes de la dieta pueden atravesar el endotelio vascular,

donde su acúmulo subendotelial favorecerá la alteración de la función vascular y la formación de la placa de ateroma. Además, la LPP favorece el incremento de citoquinas proinflamatorias (como IL-6, IL-8 o TNF- $\alpha$ ) y de especies reactivas de oxígenos (ROS, marcadores de estrés oxidativo), que actúan perpetuando el daño endotelial.<sup>57</sup>

No existe un test estandarizado para la evaluación de la LPP. El método más frecuentemente empleado es la sobrecarga oral grasa (SOG), aunque actualmente no existe consenso acerca de la cantidad o el tipo de grasa a administrar, la asociación o no de otros macronutrientes o el tipo de lipoproteínas a medir. Sin embargo, de acuerdo con la experiencia de otros grupos, consideramos preferible el uso de un preparado homogéneo exento en hidratos de carbono, evitando el factor de confusión que supone la administración de otros macronutrientes.<sup>52</sup>

Nuestro grupo ha estudiado la relación entre la lipemia postprandial y la RI en sujetos con hiperlipemias primarias u obesidad abdominal, observando diferencias significativas respecto a los controles.<sup>63,64</sup> Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan estudiado la relación entre la lipemia postprandial y la obesidad mórbida.<sup>65-69</sup>

### 3.1 Lipemia postprandial y obesidad mórbida

La dislipemia en la obesidad mórbida se caracteriza por la presencia de hipertrigliceridemia, tanto en ayunas como postprandial, junto a la presencia de partículas de LDL colesterol pequeñas y densas y un descenso del HDL-c. Diversos estudios han explorado la relación fisiopatológica entre la lipemia postprandial e insulinoresistencia en sujetos con obesidad mórbida. Tinahones et al observaron un aumento de los marcadores de estrés oxidativo, mediante una reducción significativa de la actividad de la superóxido dismutasa plasmática y un aumento de los indicadores de formación de malondialdehído, tras una SOG en obesos mórbidos con insulinoresistencia.<sup>69</sup> Así, la hipertrigliceridemia postprandial induciría disfunción endotelial a través de un aumento del estrés oxidativo.

Otro estudio observó una asociación negativa entre los niveles de estrés oxidativo y la lactoferrina sérica. La lactoferrina es una glicoproteína de actividad antiinflamatoria cuyos niveles séricos están descendidos en sujetos con obesidad. Tras una SOG en obesos mórbidos se objetivó que un mayor aumento de los AGL postprandiales se asociaba inversamente al incremento en las cifras de lactoferrina circulante; es decir, a mayor incremento de AGL menor lactoferrina sérica.<sup>68</sup>

La respuesta de la trigliceridemia postprandial previa a la cirugía bariátrica ha demostrado ser el mejor predictor de la mejoría en la RI de los pacientes con obesidad mórbida ( $R^2$  0,705). Así, aquellos obesos con un mayor incremento de TG tras la sobrecarga (incrementos superiores a 90 mg/dl) presentaron una mayor mejoría de la RI frente a aquellos con una menor extrusión lipídica (< 30 mg/dL) (porcentaje de cambio de HOMA-IR a los 6 meses de la intervención: 68,92%  $\pm$  15,94% vs 50,48%  $\pm$  20,56%, respectivamente).<sup>67</sup>

Dado el creciente número de pacientes con obesidad mórbida es importante determinar el fenotipo de los pacientes en los que se espera obtener mayor beneficio tras la cirugía bariátrica, y tal vez la respuesta postprandial podría ayudarnos a ello. Así, la lipemia postprandial podría explicar, al menos parcialmente, la heterogeneidad observada en el riesgo cardiovascular de los pacientes con obesidad mórbida.

## 4. Genética y obesidad

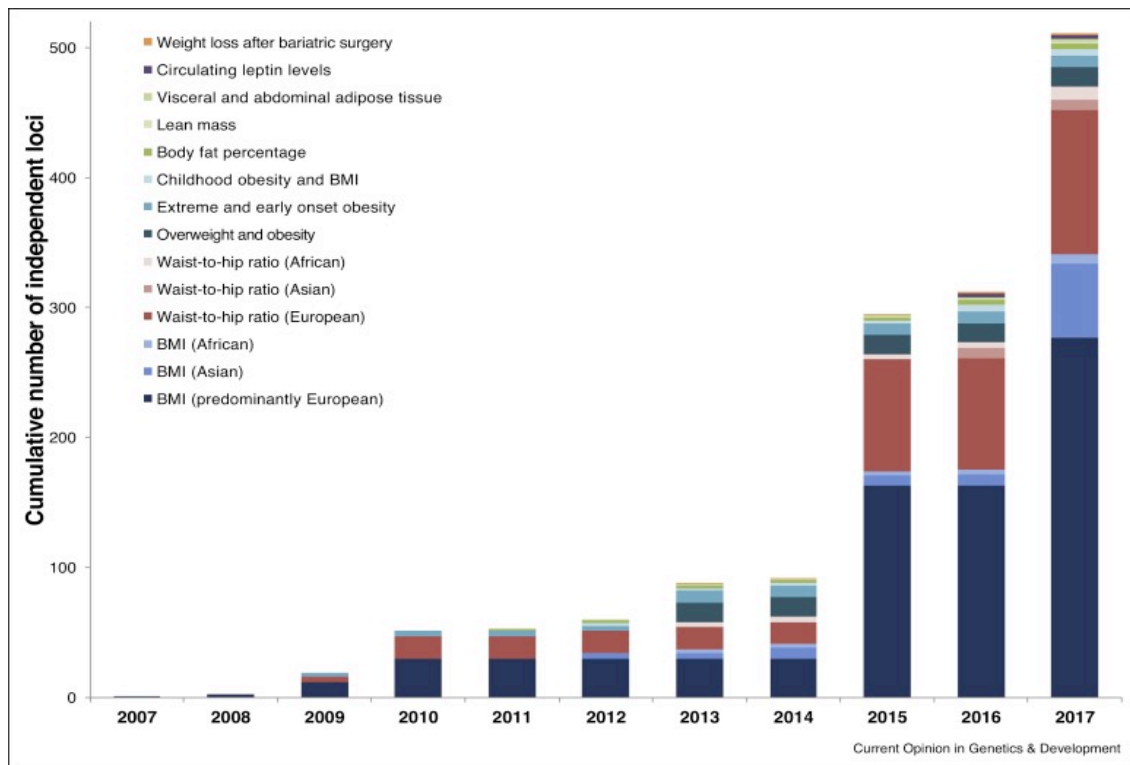
Son muchos los factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad, interaccionando determinantes dietéticos, psicológicos, hormonales y genéticos. En la búsqueda de las posibles causas de la obesidad no podemos menospreciar la influencia genética en esta patología. A pesar de los intentos por identificar genes responsables, solo una minoría de los casos son debidos a mutaciones de un único gen (obesidad monogénica), siendo generalmente secundaria a la interacción entre distintos genes o entre los genes y el ambiente.

La influencia genética se ha evaluado mediante estudios con obesos adoptados y gemelos monocigotos con obesidad. El estudio de sujetos adoptados en la infancia ha demostrado que su peso se correlaciona mejor con el de sus padres biológicos ( $p < 0,02$ ) que con el de sus familiares adoptivos; apoyando la importancia de la carga genética.<sup>70</sup> Otro estudio que valoró el IMC de gemelos monocigotos criados juntos o separados en la primera infancia (edad media de separación a los 2.8 años), apoya la importante influencia genética; estimando que hasta el 50-70% de la varianza del IMC es debido a factores genéticos.<sup>71</sup>

Desde hace décadas se intenta localizar a aquellos genes responsables de la enfermedad. Los estudios de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) en estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han permitido identificar múltiples genes con fuertes asociaciones con el rasgo de obesidad (*FTO*, *MC4R*, *BDNF*, *SH2B1*, *INSIG2*, *TMEM18*, *KCTD15*, *GNPDA2*...). Sin embargo, la contribución de cada uno de ellos a la variación ponderal, a pesar de ser significativa, es limitada (2 ó 3 kg aproximadamente).<sup>72,73</sup> Claramente algunos genes identificados mediante GWAS son más relevantes que otros, como es el caso del gen *FTO* (fat mass and obesity-associated proteína) y del gen *MC4R* (melanocortin 4 receptor); cuyas 2 variantes más comunes suponen menos del 2% de la variación del IMC en adultos.<sup>74</sup>

La mayoría de los *loci* de susceptibilidad genética identificados actúan incrementando el apetito del individuo a nivel del sistema nervioso central,

aunque se postula que otros muchos mecanismos también podrían estar implicados. Se han identificado más de 500 *loci* localizados asociados con el rasgo de obesidad, obesidad abdominal e insulinoresistencia; y este número aumenta con el transcurso de los años (Figura 5).<sup>75</sup>



**Figura 5. Acumulación de loci asociados con IMC y obesidad.** Fuente: “Loos RJF. *The genetics of adiposity. Curr Opin Gene and Development* 2018;50:86-95.”

En vista de los resultados obtenidos hasta el momento, cada vez parece más claro que las enfermedades comunes, como la obesidad, podrían estar causadas por polimorfismos de muy variable frecuencia, pudiendo estar implicados tanto los polimorfismos de frecuencia elevada (frecuencia del alelo menor superior al 5 ó 10% en la población) como los de frecuencia baja (frecuencia del alelo menor entre el 0.5 y 5% en la población).<sup>76</sup> Estos polimorfismos de baja frecuencia es posible que no se detecten a través de los GWAS, ajustándose más a la premisa “enfermedad común, variante rara”. En tal caso, el estudio de genes candidatos en los sujetos en el extremo de la enfermedad (como es el obeso mórbido) puede identificar polimorfismos de frecuencia baja y efecto intermedio.<sup>77</sup>

A pesar de ello, dado que los GWAS, los estudios de genes candidatos y los de vínculos familiares no han podido explicar la creciente incidencia de la obesidad, parece lógico estudiar la relación entre las posibles modificaciones epigenéticas y el incremento de susceptibilidad de alteraciones metabólicas en estos sujetos.

#### 4.1 Epigenética y metilación del ADN

El término epigenética hace referencia a los distintos procesos que modifican la expresión génica sin alterar la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN). Los mecanismos epigenéticos que modifican la estructura de la cromatina pueden clasificarse en 3 categorías principales: metilación del ADN, modificación de histonas por metilación, acetilación o fosforilación y la regulación por ácido ribonucleico (ARNs).<sup>78</sup>

Aunque las marcas epigenéticas se establecen principalmente durante el desarrollo fetal; éstas pueden ser modificadas a lo largo de la vida en respuesta a factores intrínsecos o ambientales (como son la nutrición, los contaminantes o el ejercicio), permitiendo la adaptación génica en un menor tiempo y pudiendo tener efectos importantes sobre la salud. Así, a pesar de la estabilidad del genoma humano, éste puede verse modificado de manera reversible por las modificaciones epigenéticas siendo, algunas de estas marcas, específicas del tipo celular o del momento del desarrollo.<sup>78,79</sup>

Tanto la infra como la sobrealimentación durante el embarazo se han relacionado con el grado de adiposidad y el desarrollo de enfermedades en la edad adulta. La deprivación calórica durante la primera mitad del embarazo se ha relacionado con un mayor IMC en la edad adulta, existiendo estudios que apoyan la presencia de metilación de islas CpGs, que modulan la expresión de genes como los de *IGF2*, *H19* o *IGF2R*, con dichos cambios ponderales.<sup>80</sup> Estos cambios adaptativos epigenéticos le permitirían lidiar mejor con una posible hambruna, pero en un

ambiente de excesos predispone al individuo al desarrollo de DM tipo 2 u obesidad.

A pesar de la importancia de la carga epigenética durante la gestación, existen períodos posteriores al nacimiento en los que hay una mayor susceptibilidad a modificar el epigenoma, como es la primera infancia.<sup>81</sup> Estudios del patrón de metilación del ADN en gemelos monocigotos han demostrado que, a pesar de ser éste genéticamente similar durante los primeros años de vida, posteriormente difiere considerablemente; reforzando el impacto epigenético adquirido.<sup>82</sup> También parece existir la posibilidad de intervenir en la edad adulta.<sup>83</sup> Además, las alteraciones epigenéticas parecen ser reversibles, lo que ofrece la oportunidad de controlar los genes afectados mediante la manipulación de factores ambientales.

Actualmente se consideran los cambios en la metilación del ADN como el principal factor epigenético para la memoria celular. Consiste en la adición covalente de grupos metilo (CH<sub>3</sub>) en posición 5 de las citosinas, produciéndose mayoritariamente en los dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos son secuencias de dos bases nitrogenadas adyacentes en la misma hebra de ADN, generalmente en dirección 5' a 3', y representándose mediante la *p* el enlace fosfodiéster que los une.<sup>84</sup> El genoma humano está altamente metilado, afectando aproximadamente al 80% de las citosinas de los dinucleótidos CpG.<sup>85</sup>

Los dinucleótidos CpG son infrecuentes en la mayor parte del genoma. Sin embargo, su frecuencia es mayor en las islas CpG. Una isla CpG es aquella región del genoma de tamaño superior a 500 pares de bases (pb) en la que el contenido de C y G es igual o superior al 55% del mismo y con un promedio de CpG esperado/observado mayor a 0,6.<sup>86</sup> Las islas CpG suelen agruparse alrededor de un promotor (5' hacia el *transcription start site*, TSS), aunque estas islas también pueden localizarse intra o intergénicas.<sup>78</sup>

Los procesos epigenéticos alteran la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a un determinado gen, pudiendo así determinar si este gen está



activo o no en una determinada célula y un momento concreto. Dichos cambios pueden transmitirse durante la mitosis y/o meiosis. Es por esto que el análisis de la metilación de genes específicos es el rasgo epigenético más estudiado. Históricamente se postulaba que un gen hipermetilado suponía la represión en la expresión de dicho gen. Sin embargo, esto no es tan sencillo y la expresión variará según la localización del gen metilado. De forma sintética podría decirse que la metilación de las regiones promotoras y activadoras lleva al silenciamiento génico (inhibe la transcripción), mientras que la del cuerpo génico estimula la transcripción.<sup>84</sup>

La metilación del ADN está rigurosamente regulada a través del control en la expresión de ADN-metiltransferasas (DNMT), enzimas responsables de la transferencia de grupos metilo a la región CpG, particularmente a través del control de la metilación *de novo* que podría destruir el patrón de metilación del ADN. Las distintas isoformas de las DNMT aparentemente realizan funciones complementarias: DNMT1 mantendría los patrones de metilación durante la replicación celular mientras que las formas DNMT3a y DNMT3b intervendrían en la metilación *de novo*. Actualmente se está investigando en sus funciones y efectos post-transcripcionales; tal y como sucede en relación a la enzimología de la demetilación del ADN.<sup>87,88</sup> A pesar de no conocer completamente los mecanismos que regulan la metilación y aquellos por los que ésta regula la síntesis proteica, existen pocas dudas sobre su papel crucial en el desarrollo, diferenciación y viabilidad celular.

Existen varios métodos para el estudio de los patrones epigenéticos y su asociación con enfermedades como la obesidad, como son el estudio de asociación del epigenoma completo con los microarrays de metilación (EWAS) o el estudio de metilación del ADN locus-específicos mediante secuenciación (NGS). Nosotros emplearemos este último enfoque para el estudio de distintas regiones génicas.

NGS es una técnica de secuenciación de fragmentos individuales de ADN. Para poder conocer el estado de metilación del genoma las muestras deben ser procesadas previamente. Existen tres métodos principales para conocer el estado

de metilación: la digestión del ADN con enzimas de restricción sensibles a la metilación de las citosinas, métodos basados en el enriquecimiento de fragmentos de ADN metilado por afinidad (anticuerpos) y métodos químicos de conversión (que incluyen el tratamiento del ADN con bisulfito). En nuestro caso se optó por el tratamiento con bisulfito sódico que convierte las citosinas no metiladas en timina mediante una reacción de desaminación, sin modificar las citosinas metiladas. Posteriormente se procede a la secuenciación del ADN, pudiendo cuantificar e identificar las bases metiladas y localizar las regiones diferencialmente metiladas, regiones relativamente hipermetiladas en un tipo celular e hipometiladas en otro. La NGS es una técnica robusta, rápida, económica y ampliamente disponible, con posibles aplicaciones en el ámbito clínico.<sup>85,89</sup>

## 4.2 Metilación del ADN y obesidad

En los últimos años se han realizado amplios estudios poblacionales que han relacionado modificaciones en la metilación del ADN con aumentos en el IMC mediante las técnicas de EWAS. Entre ellos destaca el estudio realizado en las cohortes del Framingham Heart Study y Lothian Birth Cohorts, en el que se identificaron 83 regiones CpGs diferentemente metiladas asociadas al IMC.<sup>90</sup>

Estudios poblacionales europeos mediante EWAS han detectado un aumento de la metilación del gen *HIF3A* (subunidad alfa del factor 3 inducible por hipoxia) en linfomonocitos séricos y adipocitos, lo que refuerza su importancia biológica.<sup>91</sup> El HIF3A es un componente del factor inducible por hipoxia que regula una gran variedad de respuestas celulares y fisiológicas, e interviene en la regulación del metabolismo y el gasto energético. Sin embargo, estudios posteriores no han podido establecer una relación causal entre ambos, por lo que los cambios epigenéticos a dicho nivel probablemente sean secundarios a la misma obesidad o a factores de confusión no identificados.

Así mismo, parece existir una interacción entre la predisposición genética para la obesidad y los hábitos alimentarios del individuo. Tal y como se ha

comentado previamente, un aporte calórico deficiente o excesivo durante la gestación se ha relacionado con el grado de adiposidad y el desarrollo de enfermedades metabólicas. Así, aquellos nacidos durante la epidemia de obesidad infantil presentan un aumento en la varianza genética del IMC. La heredabilidad del IMC entre 1951 y 1983 aumentó del 75% al 78,8%, sugiriendo que un ambiente obesogénico incrementa la influencia de los genes relacionados con la adiposidad.<sup>82</sup>

La mayoría de enzimas relacionadas con las modificaciones epigenéticas requieren nutrientes o sus metabolitos como sustratos o cofactores y, por tanto, la composición de la dieta es de interés para la investigación actual, ya que adaptándola podríamos modificar nuestro epigenoma. Estudios animales han demostrado que una dieta rica en grasas saturadas se asocia a la hipermetilación del promotor de la leptina y descenso de sus niveles séricos, así como a cambios epigenéticos en el receptor mu opioide (*OPRM1*) con modificaciones en el comportamiento respecto a la comida.<sup>92</sup>

Otro enfoque es el estudio de la metilación global del genoma en lugar del estudio de zonas determinadas. La metilación global del genoma hace referencia al nivel general de metilcitosina en el genoma, expresado como el porcentaje de 5-metilcitosina respecto a la citosina total. Un nivel bajo de metilación global se asocia con inestabilidad cromosómica y un aumento en la tasa de mutaciones. Estudios previos han intentado relacionar la presencia de hiper o hipometilación global con la obesidad, pero sus resultados son inconsistentes (probablemente al no haber corregido por todos los posibles factores de confusión existentes).<sup>79</sup> Un estudio coreano realizado en 244 mujeres halló una distribución en U en los niveles de metilación, con una menor metilación global en sujetos con infra y sobrepeso, tras corregir por edad, tabaquismo o consumo de alcohol. La curva en U en el patrón de metilación concuerda con la relación existente entre IMC y mortalidad.<sup>93</sup>

### 4.3 Metilación del ADN e insulinoresistencia, lipemia postprandial y grasa subcutánea o visceral

Al plantearnos el estudio del epigenoma en obesos con mayor o menor resistencia a la insulina y su posible relación con la lipemia postprandial, es importante conocer los estudios previos existentes; así como aquellos que analizan los cambios en la metilación del ADN en los distintos tejidos implicados (linfomonocitos, adipocitos, hepatocitos o células musculares).

El tejido adiposo subcutáneo y visceral difieren en sus características celulares, propiedades y riesgo metabólico. Sin embargo, las bases moleculares y genéticas que justifican estas discrepancias son poco conocidas. Estudios previos en humanos han observado diferencias en la expresión génica entre los depósitos adiposos subcutáneos y viscerales, principalmente en un conjunto de factores de transcripción de los genes homeóticos o homeobox (*HOXC9*, *HOXC10*, *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXC6*, *HOXB7* y *PAX3*).<sup>94</sup>

Estudios recientes sugieren cambios en la regulación génica a nivel tisular (grasa subcutánea o visceral, tejido hepático y sangre) por factores epigenéticos en función de la presencia o no de diabetes. Se han identificado sitios CpG diferentemente metilados (CDMs) en los 4 tejidos, pero en una mayor proporción en la grasa visceral (340 CDMs) y en el tejido hepático (185 CDMs).<sup>95</sup> Algunos de los sitios CpGs distintamente metilados identificados tienen que ver con genes conocidos por presentar un patrón de metilación alterado en sujetos con diabetes mellitus tipo 2, como son *ADIPOQ*, *IRS1* o *LEP* en la grasa subcutánea y *KCNQ1* en la visceral; y otros con genes que intervienen en vías metabólicas, como *LCAT* y *FOXA2* en grasa visceral y *PON1* y *FGF21* en el tejido hepático.

Al revisar la bibliografía disponible sobre los cambios en la metilación y el grado de RI (insulina basal y HOMA-IR), destaca un estudio en población no diabética en el que se hallaron diferencias en el gen *ABCG1* (cg06500161). Este gen está implicado en el transporte de colesterol y fosfolípidos en los macrófagos.<sup>96</sup> A pesar de la importancia de este hallazgo, este estudio sólo evaluó el estado de

metilación de los linfocitos, sin estudiar los posibles cambios en otros tejidos metabólicamente implicados, como son los adipocitos o los hepatocitos.

En cuanto a la posible relación entre la LPP y los cambios en el epigenoma, los estudios existentes son escasos. Se han identificado 8 DMRs asociadas con la respuesta postprandial de TG. Estas DMRs se localizan en 5 genes: 4 posiciones de metilación en CPT1A (cg00574958, cg09737197, cg17058475, cg01082498) que codifica la enzima que convierte acil-coenzima A en acilcarnitina para la oxidación de AGL, otra en APOA5 (cg12556569) cuya hipermetilación se asocia una baja expresión del gen y menores niveles de apolipoproteína A5, otra en ABCG1 (cg06500161) con un papel clave en la formación de HDL-c, otra en el locus SREBF1/miR33B (cg11024682) que codifica un factor de transcripción que regula la síntesis de esteroides y la última (cg16464007) que probablemente regula otros genes a distancia y es responsable del 3% de la variabilidad fenotípica. Sin embargo, al corregir estas asociaciones por la trigliceridemia en ayunas, éstas desaparecen; lo que resalta la importancia tanto de los TG basales como de la LPP en dichas marcas epigenéticas.<sup>97</sup>

En relación a lo descrito previamente podemos plantearnos algunas cuestiones interesantes: ¿Existe por tanto una asociación entre la metilación génica y la presencia de RI en la obesidad? En tal caso, ¿La modulación en la expresión de dichos genes repercute sobre las vías metabólicas?, ¿Existe una relación entre los cambios epigenéticos y la lipemia postprandial? o ¿Están los cambios epigenéticos desencadenados por estímulos metabólicos reversibles?

Por todo lo descrito, la metilación de las CpGs tiene gran potencial como biomarcador de riesgo de enfermedad, de progresión de enfermedad o como respuesta a un tratamiento. Dado que mecanismos tejido-específicos parecen intervenir en el desarrollo de la obesidad y que las marcas epigenéticas son dinámicas y específicas del tipo celular, el estudio del patrón de metilación en cada uno de ellos podría ayudarnos a conocer su fisiopatología.

Así, pensamos que aquellos obesos que precozmente tengan RI deben presentar modificaciones del metiloma que sobreexpresen o repriman genes, grupos de genes o vías de señalización relacionadas con la RI y el posible desarrollo de diabetes mellitus que no estarán presentes en los obesos con menor grado de RI. Por lo tanto, poder cuantificar la metilación del genoma en tejidos no invasivos, como la sangre, podría ser de utilidad diagnóstica en enfermedades como la DM tipo 2 u obesidad.

## II. Hipótesis y objetivos





Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo y suponen un importante gasto socio-sanitario. La arteriosclerosis es la enfermedad subyacente en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. El riesgo de desarrollar arteriosclerosis, y las complicaciones derivadas de ella, no es uniforme en toda la población y depende de múltiples factores. La obesidad, caracterizada por un aumento de la grasa corporal, es uno de los factores conocidos de riesgo cardiovascular. Los pacientes con obesidad presentan también un aumento del riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas, como es la diabetes mellitus tipo 2. Dentro de la obesidad destaca, por su elevado riesgo cardiovascular, la obesidad mórbida.

La incapacidad actual para prevenir o revertir el desarrollo de la obesidad nos obliga a buscar estrategias alternativas para identificar a aquellos sujetos con un mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardiometabólicas, y así tratar de contener una segunda oleada de complicaciones cardiovasculares. La heterogeneidad existente parece no poder explicarse por los factores de riesgo “tradicionales o clásicos” conocidos. La lipemia postprandial, referida como el acumulo en plasma de lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones, VLDL y sus remanentes) hasta 6 a 10 horas tras una comida grasa, podría explicar parcialmente dicha heterogeneidad.

Sin embargo, son muchos los factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad. Debido a su creciente prevalencia, creemos importante el estudio de los cambios epigenéticos, marcadores de la interacción entre distintos genes o entre los genes y el ambiente. Aunque las marcas epigenéticas se establecen principalmente durante el desarrollo fetal; éstas pueden ser modificadas a lo largo de la vida en respuesta a factores intrínsecos o ambientales (como son la nutrición, los contaminantes o el ejercicio), permitiendo la adaptación génica en un menor tiempo y pudiendo tener efectos importantes sobre la salud.

El estudio y análisis del patrón de metilación del ADN de los adipocitos subcutáneos y omentales, células implicadas en el desarrollo y mantenimiento de

la resistencia a la insulina, puede ayudar a conocer los marcadores epigenéticos de la insulinoresistencia.

Los estudios previos sobre LPP, marcadores epigenéticos y obesidad mórbida son todavía incompletos, lo que justifica llevar a cabo nuevos estudios. Pensamos que la obesidad mórbida con RI y alteración de la LPP es un importante factor de riesgo cardiovascular, aún en ausencia de hipertrigliceridemia en ayunas. Una excesiva respuesta lipémica postprandial podría constituir un factor de riesgo cardiovascular encubierto y explicar parcialmente la variabilidad en la incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular en esta población. El grado de RI y la LPP podrían relacionarse con un distinto patrón de metilación en los adipocitos; lo que nos permitiría conocer genes que identifiquen biomarcadores precoces de riesgo cardiovascular y posibles nuevas dianas terapéuticas.

En este sentido, **nuestra hipótesis de trabajo** es:

En el sujeto con obesidad mórbida debe existir un diferente patrón de metilación en las células implicadas en la resistencia a la insulina (adipocitos subcutáneos y omentales) relacionado con el grado de RI y la respuesta lipídica postprandial tras la SOG. Este diferente patrón de metilación permitiría conocer genes reprimidos o sobreexpresados que identifiquen biomarcadores de RI y de las alteraciones metabólicas asociadas con ellas.

Los **objetivos** de nuestro estudio son:

*Objetivo general:*

Conocer la relación entre RI y la respuesta lipídica en la SOG con el patrón de metilación del ADN en adipocitos omentales y subcutáneos obtenidos durante el bypass gástrico de sujetos con obesidad mórbida.

*Objetivos específicos:*

1. Conocer antes de la cirugía para el tratamiento de la obesidad, cómo responden durante la SOG sujetos con obesidad mórbida según el grado de RI
2. Determinar en los obesos mórbidos la relación entre el patrón de metilación del ADN de adipocitos, omentales y subcutáneos, con el grado de RI basal medida por HOMA-IR
3. Conocer si los marcadores epigenéticos (diferente patrón de metilación) encontrados se asocian con una diferente respuesta lipídica durante la SOG

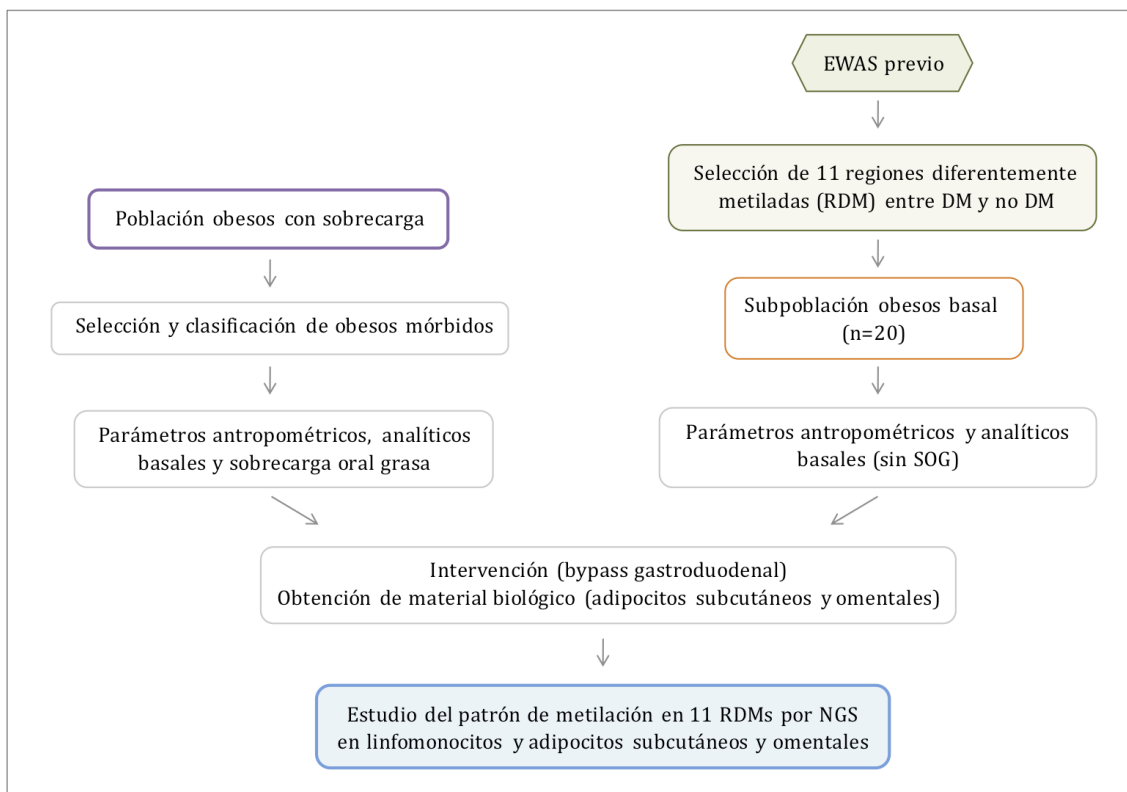


### III. Sujetos y métodos



Este proyecto de tesis doctoral se concibió como un estudio transversal con el objetivo de conocer la respuesta postprandial en obesos mórbidos según el grado de RI, así como validar los resultados obtenidos en el estudio previo de nuestro grupo mediante EWAS en una muestra de pacientes obesos no diabéticos.

El estudio buscaba analizar la asociación entre distintas variables relacionadas con la RI, incluyendo la LPP como marcador precoz de la misma, y regiones distintamente metiladas seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en el EWAS ya indicado, en linfomonocitos y adipocitos subcutáneos y viscerales. (Figura 6) (ver “4. Análisis del patrón de metilación del ADN”)



**Figura 6. Esquema del estudio**

# 1. Sujetos

Se estudiaron a sujetos con obesidad mórbida incluidos en el programa de cirugía bariátrica del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valencia. La selección de pacientes se realizó por muestreo consecutivo.

## Criterios de inclusión:

- Edad: 18 a 65 años
- Ambos sexos
- Obesidad clase III o mórbida ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) o clase II con comorbilidades asociadas ( $IMC$  entre 35 y 39,9  $\text{kg/m}^2$ )

## Criterios de exclusión:

- Diabetes mellitus tipo 2
- Insuficiencia renal ( $ClCr < 30 \text{ ml/min/m}^2$ )
- Insuficiencia cardiaca (NYHA  $\geq$  II)
- Insuficiencia respiratoria (necesidad de oxigenoterapia)
- Hepatopatía: Elevación de transaminasas superior al doble del límite de normalidad, hepatopatía crónica, insuficiencia hepática o cirrosis hepática
- Enfermedad cardiovascular arteriosclerótica (infarto agudo de miocardio, angioplastia transluminal, by-pass aorto-coronario, angor pectoris con test de esfuerzo positivo, accidente cerebrovascular o claudicación intermitente en los últimos 10 años)
- Enfermedad neoplásica
- TSH  $> 10 \text{ mU/mL}$
- Ingesta de alcohol  $>30 \text{ g/día}$
- Fumador activo, independientemente del número de cigarrillos/día, o exfumador desde hace menos de 6 meses
- Cualquier proceso infeccioso, inflamatorio o alérgico sufrido que acontezca en el momento del estudio o durante las seis semanas previas al mismo



## 2. Métodos

Tras comprobar la idoneidad de los sujetos seleccionados, en base a los criterios de inclusión y exclusión mencionados, y la firma del consentimiento informado, se recogieron los siguientes datos en situación basal, una semana antes de la intervención quirúrgica:

- Parámetros clínicos: Se realizó una anamnesis detallada con especial énfasis en:
  - Edad y sexo
  - Consumo de alcohol (gramos/día)
  - Registro del hábito tabáquico expresado como número de cigarrillos/día. En caso de ser exfumador se registró el nº de cigarrillo/día fumados previamente, la dosis acumulada en paquetes/año y el tiempo desde que se abandonó el hábito (en años).
  - Ejercicio físico realizado habitualmente, registrado en minutos/semana
  - Fármacos de uso habitual u ocasional que coincidiesen con el periodo de estudio
  - Antecedentes médico-quirúrgicos de interés tanto personales como familiares, incluyendo los años de evolución de la obesidad y presencia de eventos cardiovasculares hasta la fecha de inclusión
  - Procesos de tipo inflamatorio, infeccioso o alérgicos padecidos
  - Determinación de la presión arterial (PA) sistólica y diastólica, utilizando el valor medio de 3 mediciones separadas entre si 5 minutos
  
- Parámetros antropométricos:
  - Peso en kilogramos (kg)
  - Talla en metros (m)
  - Índice de masa corporal en  $\text{kg}/\text{m}^2$
  - Perímetro de la cintura, determinado en el punto medio entre el borde costal inferior y la cresta iliaca anterosuperior. La medida se obtiene con una cinta métrica graduada en centímetros, estando el sujeto en bipedestación y los brazos en posición anatómica.<sup>98</sup>

- Parámetros bioquímicos
  - Hemograma y bioquímica estándar
  - Estudio del metabolismo lipídico, tras 12 horas de ayuno, con determinaciones de colesterol total (CT), HDL-c, LDL-c, TG, AGL y apolipoproteínas A y B (apoA y apoB). El procesado de las muestras se realizó en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, excepto por los AGL que se procesaron en un laboratorio externo. Los coeficientes de variación para lípidos y lipoproteínas fueron < 5%.
    - CT y TG mediante un método enzimático colorimétrico
    - HDL-c mediante un método enzimático colorimétrico tras precipitación de las lipoproteínas que contienen apoB con polianoles
    - LDL-c en mg/dl calculado empleando la fórmula de Friedewald.<sup>99</sup>

$$\text{LDL-c} = \text{CT} - [\text{HDL-c} + (\text{TG}/5)]$$

En los casos con hipertrigliceridemia (TG > 400) se empleó la determinación del colesterol no-HDL.<sup>100</sup>
    - Apolipoproteínas B y A1 se determinaron por inmunoturbimetría
    - Ácidos grasos libres
  - Metabolismo hidrocarbonado:
    - Glucosa, por el método de la glucosa oxidada
    - Determinación de insulina basal mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)
    - Cálculo del índice de HOMA: Este índice es considerado un marcador indirecto de insulinoresistencia.<sup>101</sup>

$$\text{HOMA-IR} = \text{insulina } (\mu\text{U/ml}) * [\text{glucosa (mmol/l)}/22,5]$$
- Datos genéticos (ver punto 4. Análisis del patrón de metilación del ADN)
  - ADN de las muestras de tejido adiposo (subcutáneo y omental) obtenidos durante la cirugía bariátrica
  - ADN de linfomonocitos de sangre periférica extraídos antes de iniciar la sobrecarga oral grasa (a las 0 horas)

### 3. Diseño del estudio

Una vez explicado el estudio, sus objetivos y habiendo firmado el sujeto el consentimiento, se determinaron los parámetros clínico-biológicos previamente comentados (ver apartado anterior).

Durante las 3 semanas anteriores a la extracción sanguínea los sujetos mantuvieron una dieta de muy bajo contenido calórico (Optifast®), con un contenido diario de 624 kcal repartido en 52,5g de proteínas, 67,5g de carbohidratos y 13,5g de grasas (de los cuales 5,4g son saturadas, 3,9g MUFA y 4,5g PUFA). Además, se les recomendaba beber líquidos acalóricos (exceptuando café y té). Dicha dieta se mantenía una semana más después de la extracción sanguínea, hasta el momento de la cirugía bariátrica. Se obtenían datos clínicos y antropométricos en dicho momento.

La extracción basal se realizó en la Unidad de Pruebas Funcionales de nuestro servicio, tras 12 horas de ayuno. Posteriormente, todos los sujetos se sometieron a una sobrecarga oral grasa estandarizada mediante la ingesta de un módulo nutricional lipídico de triglicéridos de cadena larga en forma de emulsión (Supracal®, SHS International, Liverpool, UK). La composición de este preparado comercial se recoge en la *Tabla 3*.

La SOG se realizó durante 8 horas, tomando muestras cada 2 horas (obteniendo un total de 5 muestras por sujeto estudiado). La dosis ingerida fue de 60 g del preparado comercial lipídico, tal y como han realizado otros grupos de investigación,<sup>69</sup> ya que al tratarse de sujetos con obesidad mórbida la dosis habitual, calculada por m<sup>2</sup> de superficie corporal, resulta excesiva. La dosis de 125 ml contiene 60g de grasa, de las cuales 12g son saturadas, 35,35g son monoinsaturadas y 12,75g son poliinsaturadas.

**Tabla 3.** Composición módulo nutricional lipídico en emulsión (Supracal®)

Información nutricional	Por 100 ml	Ácidos grasos	g por 100g de ácidos grasos
Valor energético kJ (kcal)	1850 (450)	Láurico (C12)	<1
Grasas g de los cuales:	50	Mirístico (C14)	<1
- Saturadas g	5,3	Palmítico (C16)	10
- Monoinsaturadas g	30,4	Esteárico (C18)	3
- Poliinsaturadas g	14,3	Oleico (C18:1)	58
%LCT	100	Linoleico (C18:2)	20
Hidratos de carbono g	0,1	$\alpha$ -linoleico (C18:3)	<1
de los cuales azúcares g	0	Araquidónico (C20)	1
Proteínas g	0	Eicosanoico (C20:1)	1
Fibra g	0	Behénico (C22)	3
Sal g	0,02	Lignocérico (C24)	1
Minerales y elementos traza g			
- Na mg (mmol)	7 (0,3)		
- K mg (mmol)	0,1 (0,0)		
Osmolaridad	0 mOsm/L		

Tras la ingesta del preparado y durante toda la SOG, los sujetos permanecieron sentados o en decúbito supino, y sólo se les permitió la ingesta de agua mineral. Se realizaron extracciones sanguíneas a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG para la determinación de los parámetros bioquímicos y genéticos señalados anteriormente. (Tabla 4) Las muestras plasmáticas obtenidas eran centrifugadas e inmediatamente congeladas a -80°C hasta su análisis.

**Tabla 4.** Determinación de parámetros basales y postprandiales durante el estudio

	- 3 sem	Basal	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Datos clínicos	X					
Antropometría	X	X				
Bioquímica		X				
Glucosa, insulina		X	X	X	X	X
Hemograma		X	X	X	X	X
Perfil lipídico		X	X	X	X	X
AGL		X	X	X	X	X
Células		X				
Extracción ADN		X				

## 4. Análisis del patrón de metilación del ADN

Además de las determinaciones clínicas y analíticas, en estos sujetos se ha estudiado el patrón de metilación del ADN de linfomonocitos extraídos antes de iniciar la SOG y del ADN de muestras de tejido adiposo, tanto subcutáneo como omental, obtenidos durante la intervención del bypass gastroyeyunal realizado una semana después de la SOG. (ver *Figura 6*)

Para nuestro trabajo partíamos de un estudio previo sobre el patrón de metilación realizado en una muestra de pacientes diabéticos y no diabéticos con obesidad mórbida en más de 485.000 citosinas distribuidas a lo largo del genoma mediante el sistema Infinium HumanMethylation450K Array (Illumina) y el lector HiScan-SQ (Illumina) (datos pendientes de publicación). De este estudio se seleccionaron las 11 DMRs que presentaban diferencias significativas en el porcentaje de metilación entre diabéticos y no diabéticos (deltabeta superior al 10%) y se asociaban a la presencia de DM tipo 2. (*Tabla 5*) Es en estas regiones génicas donde nosotros hemos estudiado el patrón de metilación en distintos tejidos (linfomonocitos, grasa subcutánea y grasa visceral) en obesos mórbidos no diabéticos con mayor o menor grado de RI.

**Tabla 5.** Selección de 11 regiones diferentemente metiladas con mayor asociación con DM tipo 2

CpG	Cr	Gen	Par de bases	Delta $\beta$ (%)	P valor
cg14530382	19	SH2D3A	6753525	-12,07	0,0232
cg07064495	18		29304111	-10,05	0,0025
cg19533582	2	ASAP2	9463422	-10,05	0,0160
cg07249765	7	SDK1	4244643	-10,04	0,3805
cg26354017	1	PM20D1	205819088	-10,88	0,2579
cg14341177	9	BICD2	95475787	-10,64	0,1819
cg08441918	19	TUBB4	6495210	10,07	0,0103
cg04245305	3		195940754	-11,09	0,2170
cg08354527	1		229252042	14,37	0,0087
cg22730047	1		161410551	10,00	0,2520
cg22504140	1		176318588	12,93	0,1440

## 4.1 Extracción del ADN

Las muestras de tejido adiposo fueron analizadas mediante el procedimiento estándar de anatomía patológica para este tejido. Los adipocitos se extrajeron y purificaron a partir de unos 100 mg de tejido, mediante tratamiento con colagenasa del tejido adiposo y posteriores centrifugaciones de baja intensidad<sup>102</sup>. El ADN de los adipocitos se extrajo utilizando la tecnología Maxwell de Promega para tejido embebido en parafina (Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit) siguiendo las instrucciones del proveedor.

El ADN de las células sanguíneas se extrajo utilizando la tecnología Maxwell de Promega (Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit). Se tomaron 300 µl de sangre y se incubó, siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial, con 30 µl de proteinasa K y 300 µl de tampón de lisis durante veinte minutos a 56°C. Posteriormente se introdujo en el reservorio del cartucho de reactivos y se llevó a cabo la purificación mediante partículas paramagnéticas de sílice revestido, lo cual proporcionó una fase sólida móvil que optimizó la captura, el lavado y la elución del ADN.

Tras extraer el ADN genómico de cada una de las muestras, se procedió a su cuantificación mediante fluorescencia emitida en el espectrofluorímetro GLOMAX Multi+ Detection System (Promega), ya que la concentración mínima necesaria para el siguiente paso era de 12.5 ng/µl.

## 4.2 Diseño de *primers*

Los *primers* son fragmentos de ADN de cadena sencilla y entre 18 y 30 nucleótidos habitualmente, que son utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para amplificar regiones de interés al delimitar dichas regiones.

Se había identificado previamente la secuencia de referencia en torno al sitio de metilación de interés del estudio previo en obesos mórbidos diabéticos y

no diabéticos. El diseño de los *primers* se realizó empleando la herramienta web PRIMER 3, considerando un tamaño entre 18 y 35 bases, un tamaño de producto de PCR o amplicón entre 80 y 200 pb y Temperatura de Melting de entre 55 y 58°C. Para poder aplicar posteriormente la técnica de secuenciación fue necesario incluir en la secuencia del *primer* específico las colas adaptadoras de Nextera (Illumina Inc.).

Cola *primer* 5'

**5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG3'** (33pb)

Cola *primer* 3'

**5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG3'** (34pb)

#### 4.3 Conversión con bisulfito

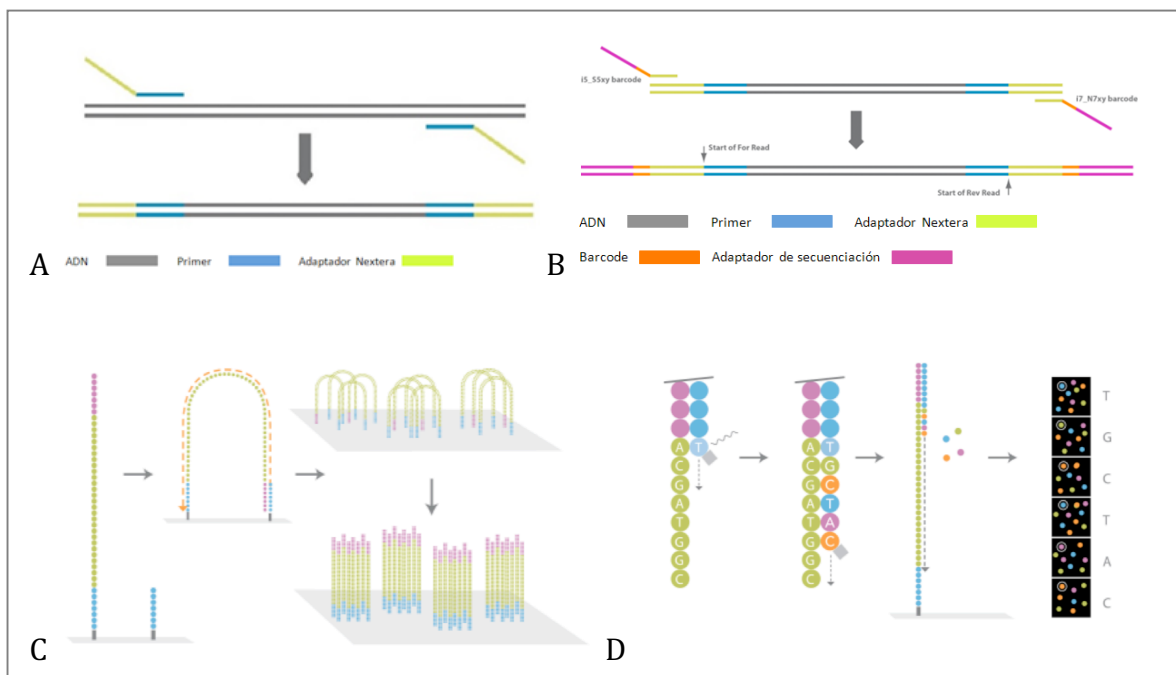
Para el estudio del estado de metilación fue necesario tratar el ADN y así poder diferenciar entre las citosinas metiladas y las no metiladas. Para ello se empleó el tratamiento químico mediante bisulfito sódico, utilizando los kits EZ-96 DNA Methylation Gold Kit de la casa comercial Zymo Research, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Mediante esta técnica las citosinas no metiladas se convierten en uracilo que actúan como timinas en la RCP, mientras que las citosinas metiladas permanecen inalteradas. De esta forma podemos conocer el estado de metilación en las posiciones de interés en nuestro estudio, al emplear las muestras tratadas con bisulfito para la secuenciación de nueva generación.

#### 4.4 Generación de las librerías

La preparación de las librerías consiste en una serie de amplificaciones en las cuales vamos, en primer lugar, a enriquecer nuestra muestra con las regiones de interés mediante una reacción en multiplex y, posteriormente, identificar de forma inequívoca cada muestra con una secuencia de 8 nucleótidos. Esta secuencia

de 8 nucleótidos recibe el nombre de *barcode* y es específica de cada una de las muestras, la cual nos permitirá asignar a cada una de las muestras su correspondiente secuencia generada por el secuenciador en el análisis bioinformático. (Ver Figura 7)

A continuación, se comprobó el resultado de la amplificación mediante electroforesis capilar y se generó un *pool* con todas las muestras, asumiendo la misma eficacia para todas ellas.



**Figura 7. Esquema del proceso de secuenciación con MiSeq de Illumina.** A) Reacción para generación de librerías; B) Incorporación de *barcodes*; C) Generación de *clusters*, anclaje y amplificación en puente; D) Proceso de secuenciación por síntesis.

#### 4.5 Secuenciación de nueva generación (NGS)

La secuenciación se realizó empleando el secuenciador de nueva generación MiSeq de Illumina, donde se añaden los reactivos al *pool* de muestras de las librerías. Ahí se produce la amplificación clonal o generación de *clusters*, que consiste en la unión de la secuencia adaptadora de secuenciación a su complementaria, anclada covalentemente a la superficie de las celdas de flujo



(*flow-cell*) y su posterior amplificación empleando la conformación de puente típica de Illumina.

Tras la generación de *clusters* comienza la secuenciación por síntesis que emplea como *primer* de secuenciación un *primer* que se une al adaptador empleado en la amplificación. Así, mediante ciclos de incorporación de nucleótidos modificados con grupos fluorescentes y terminadores reversibles, se captura la fluorescencia emitida y posteriormente se elimina el grupo fluorescente y terminador. Este ciclo se repite hasta obtener el tamaño deseado.

La secuenciación realizada fue de tipo *pair end*, con lecturas del ADN desde ambos extremos de los amplicones, y en forward. Primero se secuencia el *barcode* de la hebra complementaria y luego las bases del inserto, de modo que nuestros amplicones están correctamente identificados y secuenciados en ambas direcciones.

#### 4.6 Análisis bioinformático

Se realizó utilizando el propio software de MiSeq. El primer paso es generar dos ficheros de texto *.fastq* por muestra, identificados gracias al *barcode*, y que poseen una cabecera donde se identifica la secuencia, la lectura de la secuencia, el signo + que indica el fin de la misma, y los caracteres que hacen referencia a la calidad.

```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT
+
!*"(((***)%+%+)(%+%%)1***-+*')**55CCF>>>>>CCCCCCC65
```

**Figura 8.** Archivo *.fastq*

Tras comprobar la calidad del archivo y eliminar las bases de mala calidad de los extremos, proceso de *trimming*, se obtiene un archivo *.fastq* modificado. Sobre este archivo se realiza el mapeo, que consiste en localizar cada lectura en el genoma de referencia, en nuestro caso con las 11 posiciones de interés elegidas de los chips de metilación. En este paso es importante considerar la cobertura, es decir, cuantificar el número de lecturas que se han cubierto de cada amplicón, ya que a mayor número de lecturas mayor fiabilidad.

A continuación, se comprobó que se hubieran alineado las lecturas respecto a la referencia, comparando cada posición y si coincidía cada posición o no, es el llamado de variantes. Finalmente, se procedió al cálculo del porcentaje de metilación. Para ello se calculó el número de lecturas para cada uno de los alelos asignados y su porcentaje respecto al total, y así obtener el porcentaje de metilación para cada muestra y sitio estudiado.

## 5. Análisis estadístico

Al tratarse de un estudio piloto, no se realizó una estimación del tamaño muestral. En el estudio sobre lipemia postprandial (SOG) se incluyeron 38 sujetos, 19 obesos con menor RI y 19 con mayor RI. La inclusión de casos se realizó de manera consecutiva. Posteriormente, para el estudio epigenético de las muestras tisulares se amplió el tamaño muestral a 58 pacientes.

El estudio estadístico se realizó con el programa informatizado *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) software (version 24.0, IBM, Chicago, IL, USA). Las variables cuantitativas de distribución normal han sido expresadas como media y desviación estándar, y las de distribución no normal como mediana y rango intercuartílico. Las variables cualitativas se presentaron como porcentajes o número total. Dado el tamaño muestral, se utilizaron pruebas no paramétricas: para la comparación de medias el test de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis para variables independientes o el test de Wilcoxon para variables apareadas. El grado

de relación entre dos variables cuantitativas se determinó con el coeficiente de correlación de Spearman.

Las posibles diferencias en la metilación entre los distintos grupos de individuos en los diferentes tejidos estudiados se analizaron mediante un ANOVA de un factor tras realizar la conversión logarítmica de la variable de estudio en caso necesario. Se realizaron comparaciones múltiples para identificar las diferencias entre grupos (Bonferroni con un p valor < 0,05).



## IV. Resultados



Los resultados del estudio se presentan en función de los trabajos realizados. En primer lugar, se muestran los resultados de la asociación de la LPP según el grado de RI, seguidos de los resultados del patrón de metilación mediante NGS en los distintos tejidos y su relación con las variables antropométricas y bioquímicas basales. Finalmente se exponen los marcadores epigenéticos y su relación con la respuesta postprandial.

## 1. Comparación de los parámetros analizados en ayunas

En las tablas y figuras que se exponen a continuación comparamos las características generales, antropométricas y bioquímicas, de los obesos mórbidos con menor o mayor grado de RI (p50 HOMA-IR 3,34).

### 1.1 Características generales

En la *Tabla 6* se muestran las características generales del grupo completo, así como para los subgrupos de pacientes según el grado de RI basal (mayor o menor al percentil 50 HOMA-IR: 3,34). Se observan diferencias estadísticamente significativas en el peso e IMC. Al analizar las diferencias por género, encontramos diferencias en el perímetro de la cintura ( $140,9 \pm 9,9$ cm en hombres vs  $125,3 \pm 13,3$ cm en mujeres,  $p < 0,001$ ) y en el peso, pero no en el IMC ( $46,2 \pm 3,5$  kg/m<sup>2</sup> en hombres vs  $46,5 \pm 6,2$  kg/m<sup>2</sup> en mujeres,  $p < 0,834$ ).

**Tabla 6.** Características clínicas de la población de estudio

	Grupo completo (n = 38)	Menor RI (n = 19)	Mayor RI (n = 19)
Edad (años)	$45,2 \pm 10,5$	$48,5 \pm 11,3$	$41,9 \pm 8,6$
Sexo hombre/mujer (n)	16/22	8/11	8/11
Peso (kg)	$135,7 \pm 22,1$	$119,9 \pm 19,6$	$139,5 \pm 16,9$ *
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	$48,5 \pm 5,3$	$43,6 \pm 4,7$	$49,1 \pm 4,2$ **
Perímetro de cintura (cm)	$138,8 \pm 14,7$	$126,7 \pm 15,6$	$136,4 \pm 11,2$
Presión arterial sistólica (mmHg)	$146,0 \pm 20,8$	$144,7 \pm 23,7$	$147,6 \pm 17,6$
Presión arterial diastólica (mmHg)	$92,3 \pm 10,9$	$90,8 \pm 10,8$	$94,0 \pm 11,0$

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,001$

Al analizar las diferencias según si eran obesos metabólicamente sanos o no, vemos que aquellos sujetos sin alteraciones metabólicas presentan una mayor edad con menor peso, IMC y presión arterial sistólica.

**Tabla 7** Características clínicas de la población de estudio en función del fenotipo corporal

	Grupo completo (n = 38)	OMS (n = 22)	OMNoS (n = 16)
Edad (años)	45,2 ± 10,5	48,8 ± 10,8	40,3 ± 7,9 *
Sexo hombre/mujer (n)	16/22	10/12	6/10
Peso (kg)	135,7 ± 22,1	121,7 ± 18,8	140,7 ± 18,1 *
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	48,5 ± 5,3	44,1 ± 4,1	49,5 ± 4,9 **
Cintura (cm)	138,8 ± 14,7	129,3 ± 14,8	135,0 ± 13,0
Presión arterial sistólica (mmHg)	146,0 ± 20,8	138,6 ± 14,5	158,1 ± 24,3 *
Presión arterial diastólica (mmHg)	92,3 ± 10,9	89,3 ± 9,9	97,1 ± 11,0

Los datos se expresan como media ± desviación estándar \* p<0,05 \*\* p<0,001.

OMS: Obeso metabólicamente sano; OMNoS: Obeso metabólicamente no-sano

## 1.2 Datos bioquímicos en ayunas

En la *Tabla 8* se muestran los principales resultados bioquímicos en ayunas del grupo completo. Se observan niveles significativamente mayores de insulina, HOMA-IR y triglicéridos en ayunas en el grupo con mayor RI.

Al analizar las diferencias bioquímicas basales en función de ser OMS o no, como era esperable encontramos que aquellos obesos sin alteraciones metabólicas presentan valores inferiores de triglicéridos (97,9 ± 27,7 vs 133,6 ± 50,4 mg/dl, p 0,02), insulina y HOMA-IR (2,8 ± 1,5 vs 4,8 ± 2,5, p 0,008).



**Tabla 8.** Características bioquímicas de la población de estudio

	Grupo completo (n = 38)	Menor RI (n = 19)	Mayor RI (n = 19)
Glucosa (mg/dl)	88,2 ± 9,4	85,9 ± 10,3	90,5 ± 8,0
HbA1c (%)	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,4	5,6 ± 0,6
Insulina (μU/ml)	16,7 ± 9,9	9,52 ± 4,2	23,8 ± 8,7 **
HOMA-IR	3,6 ± 2,2	2,0 ± 0,9	5,3 ± 1,8 **
CT (mg/dl)	163,1 ± 36,6	164,9 ± 47,2	161,3 ± 22,8
TG (mg/dl)	112,9 ± 42,2	99,0 ± 34,3	126,8 ± 45,6 *
HDL-c (mg/dl)	37,8 ± 7,8	39,6 ± 8,3	35,9 ± 6,9
LDL-c (mg/dl)	115,5 ± 34,4	114,2 ± 37,2	116,7 ± 32,3
Apo B (mg/dl)	92,2 ± 21,7	94,2 ± 26,3	90,2 ± 16,3
AGL (mg/dl)	0,88 ± 0,23	0,83 ± 0,17	0,93 ± 0,27
Leucocitos (/mm <sup>3</sup> )	5876,8 ± 1298,8	5949,5 ± 1348,0	5804,2 ± 1280,5
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	3537,4 ± 985,2	3652,1 ± 1083,6	3422,6 ± 890,7
Linfocitos (/mm <sup>3</sup> )	1665,3 ± 400,3	1578,4 ± 367,2	1752,1 ± 422,7
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	224,0 ± 63,9	231,0 ± 77,7	217,1 ± 47,6

\* p < 0,05 \*\* p < 0,001

### 1.3 Correlaciones del grupo completo a nivel basal

#### 1.3.1 Determinantes del metabolismo lipídico

En la *Tabla 9* se muestran las correlaciones entre los parámetros del metabolismo lipídico a nivel basal y las variables antropométricas del grupo completo. Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el grado de insulinoresistencia (HOMA-IR) y la edad e IMC. La edad también se correlacionó con la trigliceridemia en ayunas. Así mismo, se encontró una relación inversa entre el perímetro de la cintura y las cifras de apolipoproteína B.

Al analizar por subgrupos de pacientes con menor o mayor grado de RI (p50 HOMA-IR 3.34) encontramos diferencias en las correlaciones. En el grupo de mayor RI no existe una correlación entre las características antropométricas y el perfil bioquímico, excepto entre la edad y el HDL-c ( $\rho$  0,500, p 0,03). Sin embargo, en el subgrupo con menor RI persisten las correlaciones entre el perímetro de la

cintura y CT ( $\rho$  -0,626,  $p < 0,01$ ), LDL-c ( $\rho$  -0,715,  $p < 0,01$ ) y apoB ( $\rho$  -0,651,  $p < 0,01$ ); y entre la presión arterial sistólica y los AGL ( $\rho$  -0,519,  $p$  0,03).

Al analizar por sexos destaca la ausencia de correlaciones en los hombres, mientras que las mujeres presentan una correlación medio-alta entre el HOMA-IR y el perímetro de la cintura ( $\rho$  0,580,  $p$  0,006) e IMC ( $\rho$  0,609,  $p$  0,003).

**Tabla 9.** Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre parámetros del metabolismo lipídico basales y las variables antropométricas del grupo completo

	CT (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	TG (mg/dl)	HOMA-IR	ApoB (mg/dl)	AGL (mg/dl)
Edad (años)	0,120	0,154	0,284	-0,388 *	-0,410 *	0,100	-0,203
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,047	0,095	-0,048	0,256	0,464 **	0,043	0,104
Cintura (cm)	-0,318	-0,312	-0,214	0,115	0,294	-0,343 *	-0,017
PAS (mmHg)	-0,073	-0,081	-0,054	0,042	0,039	-0,051	-0,234
PAD (mmHg)	0,091	0,039	-0,211	0,148	0,089	0,101	-0,292

\*  $p < 0,05$  (bilateral) \*\*  $p < 0,01$  (bilateral)

### 1.3.2 Determinantes del metabolismo hidrocarbonado

En la *Tabla 10* se muestran las correlaciones entre los parámetros del metabolismo hidrocarbonado a nivel basal y las variables antropométricas del grupo completo; con correlaciones débiles o moderadas entre el IMC y los distintos parámetros bioquímicos evaluados, así como una correlación inversa con la edad.

**Tabla 10.** Correlación de Spearman entre los parámetros basales del metabolismo hidrocarbonado y las variables antropométricas del grupo completo

	Glucosa (mg/dl)	Insulina ( $\mu$ U/ml)	HOMA-IR
Edad (años)	0,200	-0,449 **	-0,410 *
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,503 **	0,420 **	0,464 **
Cintura (cm)	0,010	0,279	0,294
PAS (mmHg)	0,043	0,046	0,039
PAD (mmHg)	-0,061	0,107	0,089

\*  $p < 0,05$  (bilateral) \*\*  $p < 0,01$  (bilateral)

## 2. Comparación de los parámetros analizados a nivel postprandial

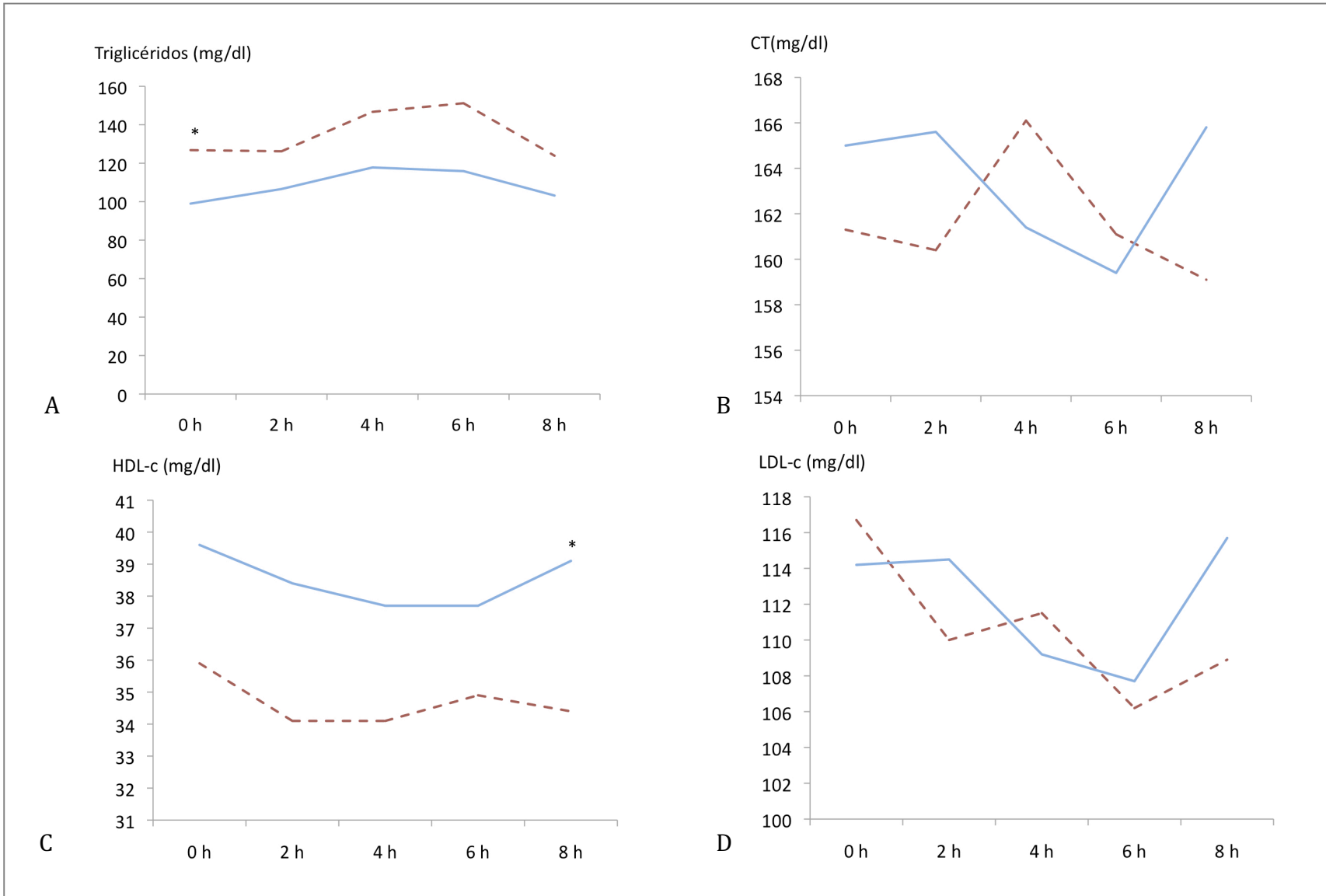
A continuación, se exponen las tablas y figuras que comparan los parámetros del metabolismo lipídico y la RI a nivel basal y a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG del grupo de obesos con menor y mayor RI basal.

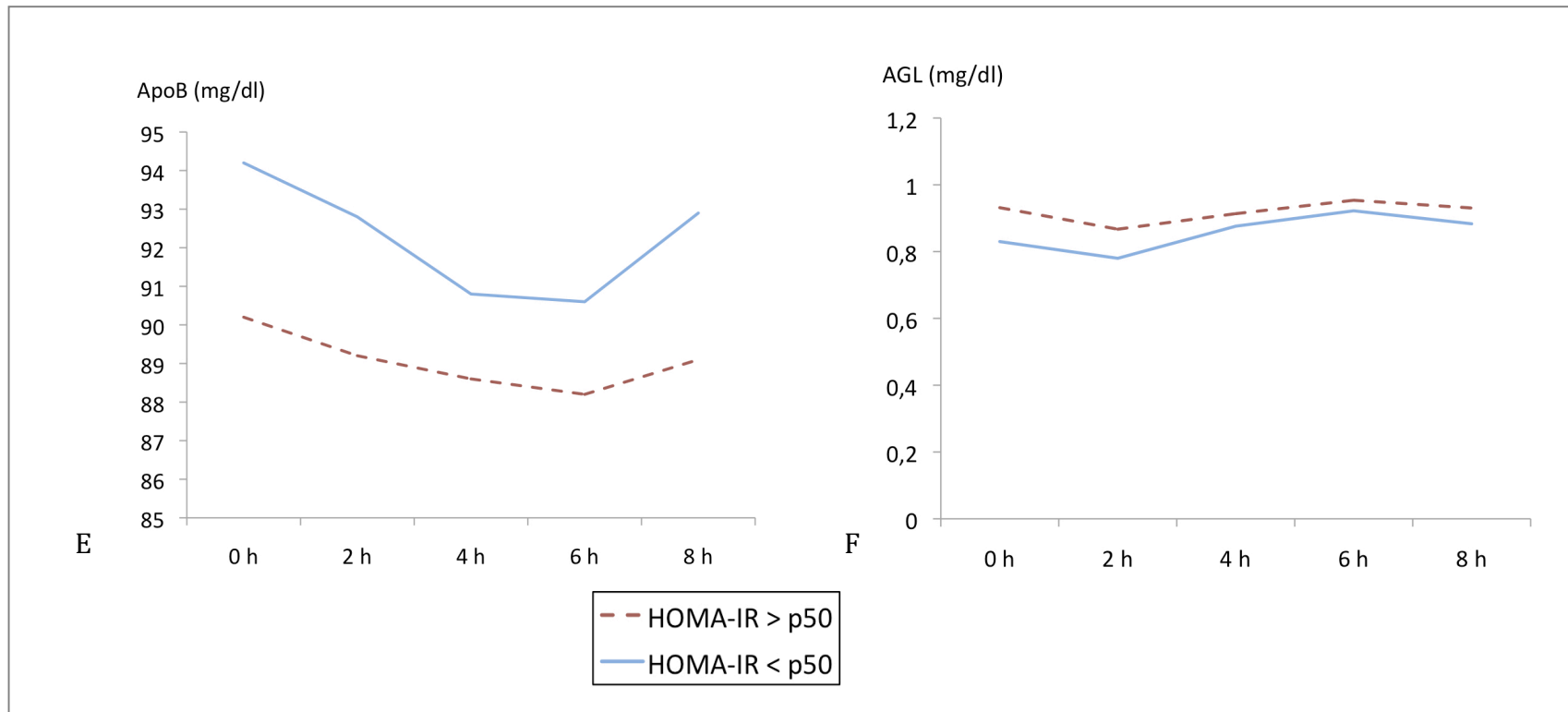
### 2.1 Efecto de la SOG sobre los parámetros del metabolismo lipídico

#### 2.1.1 Comparación entre grupos de los parámetros lipídicos durante la SOG

En la *Tabla 11* y la *Figura 9* se exponen los valores lipídicos del grupo completo antes y después de la SOG. Los niveles de triglicéridos se mantuvieron superiores en los obesos con mayor grado de RI en todos los puntos de la SOG, presentando diferencias significativas sólo a nivel basal. No encontramos diferencias significativas según el grado de RI en ningún punto de la sobrecarga en los valores de CT, LDL-c, apoB y AGL, salvo en las cifras de HDL-c a las 8 horas de la sobrecarga.

Al analizar la respuesta durante la SOG según el fenotipo del tamaño corporal, vemos que las diferencias basales existentes en las cifras de TG plasmáticos se reducen; persistiendo cifras inferiores en todos los puntos de la SOG en los OMS (diferencias no significativas). Tampoco encontramos diferencias significativas en los valores de colesterol total, LDL-c, HDL-c, apoB o AGL en función de la presencia de obesidad metabólicamente sana o no en ningún punto de la sobrecarga.





\* p < 0,05 \*\* p < 0,01

**Figura 9. Comparación de los niveles de TG (A), CT (B), HDL-c (C), LDL-c (D), ApoB (E) y AGL (F) plasmáticos en cada punto de la SOG entre obesos con menor y mayor grado de RI**

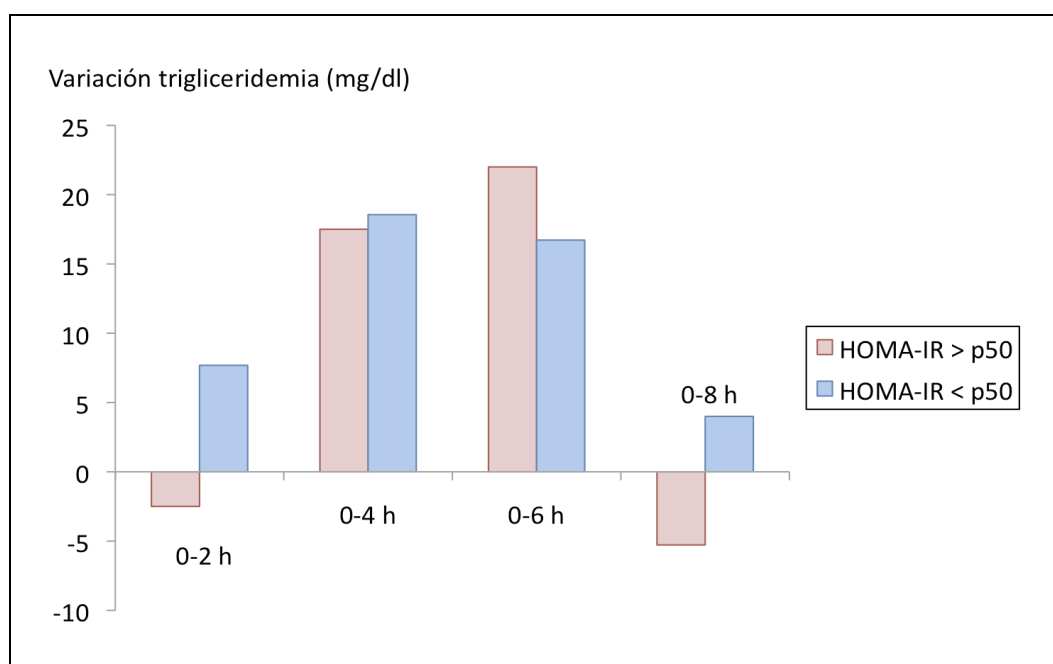
**Tabla 11.** Parámetros lipídicos basales y a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG, entre obesos con menor y mayor grado de RI (HOMA-IR p50)

Tiempo (horas)		0	2	4	6	8
CT (mg/dl)	Menor RI (n=19)	165,0 ± 47,2	165,6 ± 48,5	161,4 ± 46,3	159,4 ± 46,7	165,8 ± 49,9
	Mayor RI (n=19)	161,3 ± 22,8	160,4 ± 19,3	166,1 ± 33,0	161,1 ± 21,7	159,1 ± 19,5
HDL-c (mg/dl)	Menor RI (n=19)	39,6 ± 8,3	38,4 ± 8,4	37,7 ± 8,2	37,7 ± 7,5	39,1 ± 8,2
	Mayor RI (n=19)	35,9 ± 6,9	34,1 ± 7,3	34,1 ± 7,6	34,9 ± 7,6	34,4 ± 7,7*
LDL-c (mg/dl)	Menor RI (n=19)	114,2 ± 37,2	114,5 ± 37,6	109,2 ± 35,0	107,7 ± 36,7	115,7 ± 39,3
	Mayor RI (n=19)	116,7 ± 32,3	110,0 ± 16,3	111,5 ± 26,1	106,2 ± 16,6	108,9 ± 16,2
ApoB (mg/dl)	Menor RI (n=19)	94,2 ± 26,3	92,8 ± 26,4	90,8 ± 25,1	90,6 ± 25,7	92,9 ± 27,2
	Mayor RI (n=19)	90,2 ± 16,3	89,2 ± 15,6	88,6 ± 15,4	88,2 ± 15,9	89,1 ± 15,1
TG (mg/dl)	Menor RI (n=19)	99,0 ± 34,3	106,6 ± 34,3	117,8 ± 37,7	115,9 ± 40,1	103,2 ± 29,7
	Mayor RI (n=19)	126,8 ± 45,6*	126,2 ± 47,5	146,7 ± 59,1	151,2 ± 67,1	123,9 ± 53,9
AGL (mg/dl)	Menor RI (n=19)	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	Mayor RI (n=19)	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2

\* p < 0,05 \*\* p < 0,01

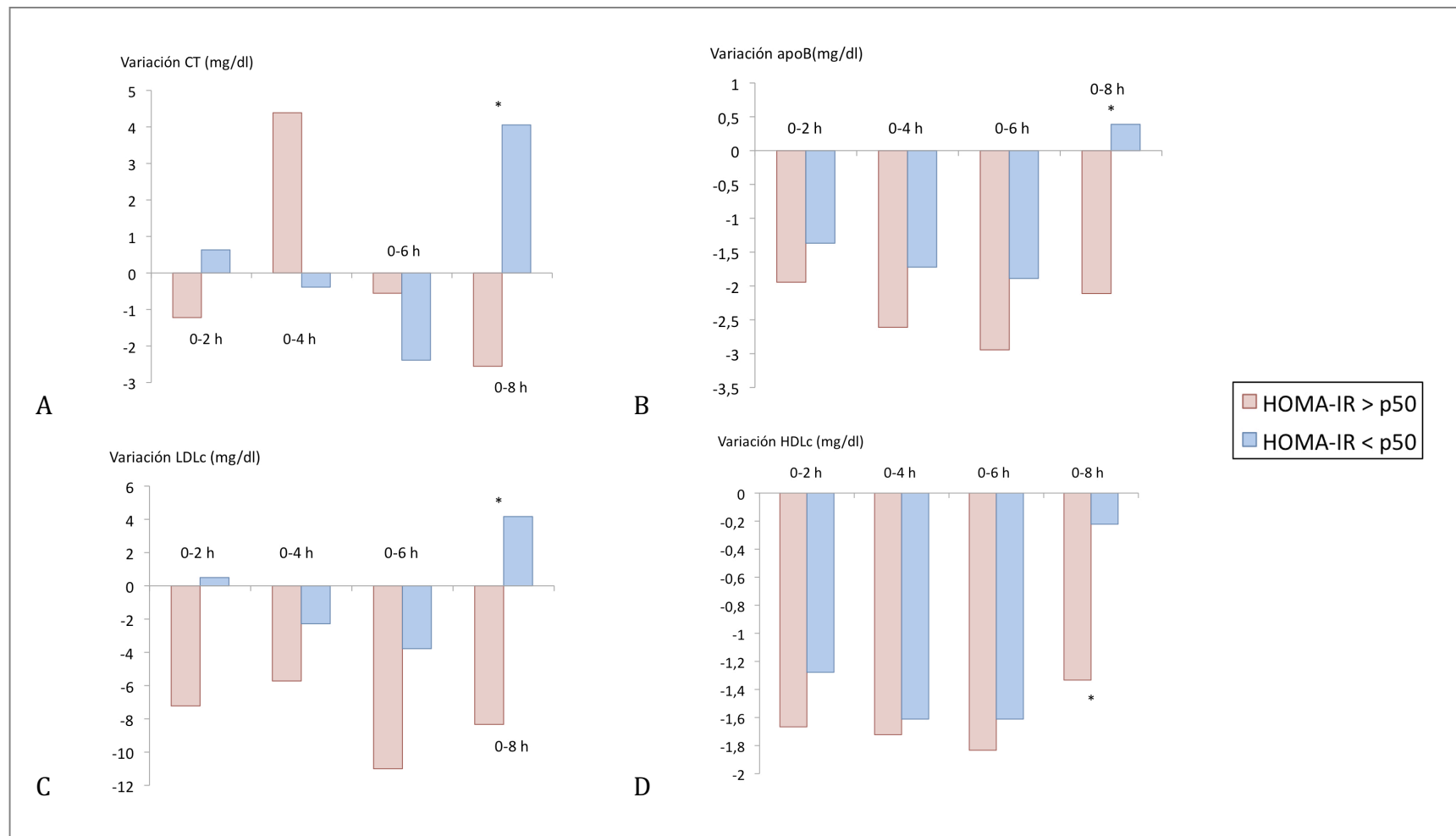
### 2.1.2 Comparación de la variación de los parámetros lipídicos durante la SOG respecto al valor basal en ambos grupos

En la *Figura 10* se muestra la variación de los niveles plasmáticos de TG en cada punto de la SOG con respecto al valor basal de los obesos con menor y mayor RI. Observamos un aumento en los niveles de TG plasmáticos en ambos grupos, alcanzando un pico máximo a las 4 horas en los sujetos con menor RI y a las 6 horas en los sujetos con mayor RI. Posteriormente se produce una reducción progresiva hasta alcanzar cifras similares a las previas a la realización de la SOG o incluso ligeramente menores, como es el caso en los obesos con mayor RI. A pesar de las diferencias existentes entre grupos, no encontramos diferencias significativas en ningún punto de la SOG respecto al valor basal.



**Figura 10. Variación de la trigliceridemia con respecto al valor basal a las 2, 4, 6 y 8 horas de la SOG en obesos con menor y mayor grado de RI**

Sin embargo, al analizar las variaciones en el resto de parámetros lipídicos respecto a los niveles basales (CT, LDL-c, HDL-c, no-HDLc y apoB) encontramos diferencias a las 8h respecto al nivel basal en todos ellos ( $p < 0,05$ ). (*Figura 11*)



\* p < 0,05 \*\* p < 0,01

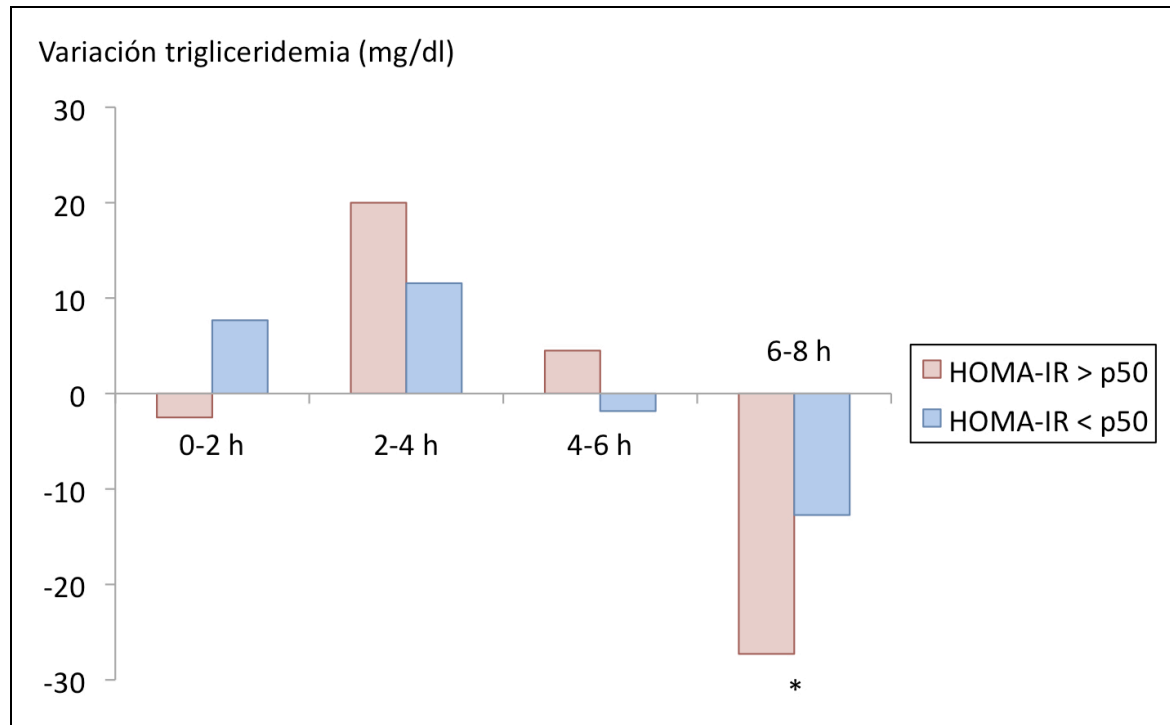
**Figura 11. Cambios en los niveles séricos de CT (A), apoB (B), LDL-c (C) y HDL-c (D) con respecto al valor basal a las 2, 4, 6 y 8 horas de la SOG en obesos según el grado de RI**



### 2.1.3 Comparación de la variación de los parámetros lipídicos durante la SOG con respecto al valor previo (a las 2, 4, 6 y 8 horas) en obesos con menor y mayor grado de insulinoresistencia

En la *Figura 12* se muestra la variación de los niveles séricos de TG en cada punto de la SOG con respecto al valor previo, en sujetos con mayor y menor grado de RI. Se observa un decremento de las cifras de triglicéridos entre las 6 y 8 horas, siendo este descenso significativamente mayor en el grupo de sujetos con mayor insulinoresistencia.

Al analizar las variaciones del resto de parámetros lipídicos respecto a sus puntos previos no encontramos diferencias significativas entre grupos (CT, LDL-c, HDL-c, no-HDLc y AGL); excepto en las cifras de colesterol total de 6 a 8h (ascenso de  $6,4 \pm 7,1$  mg/dl en menor IR vs descenso de  $2,0 \pm 10,6$  mg/dl en caso de mayor RI,  $p < 0,005$ ).



\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$

**Figura 12.** Variación de los niveles séricos de TG con respecto al punto previo en la SOG, a las 2, 4, 6 y 8 horas, en obesos con menor y mayor grado de RI

## 2.2 Efecto de la SOG sobre los parámetros del metabolismo hidrocarbonado

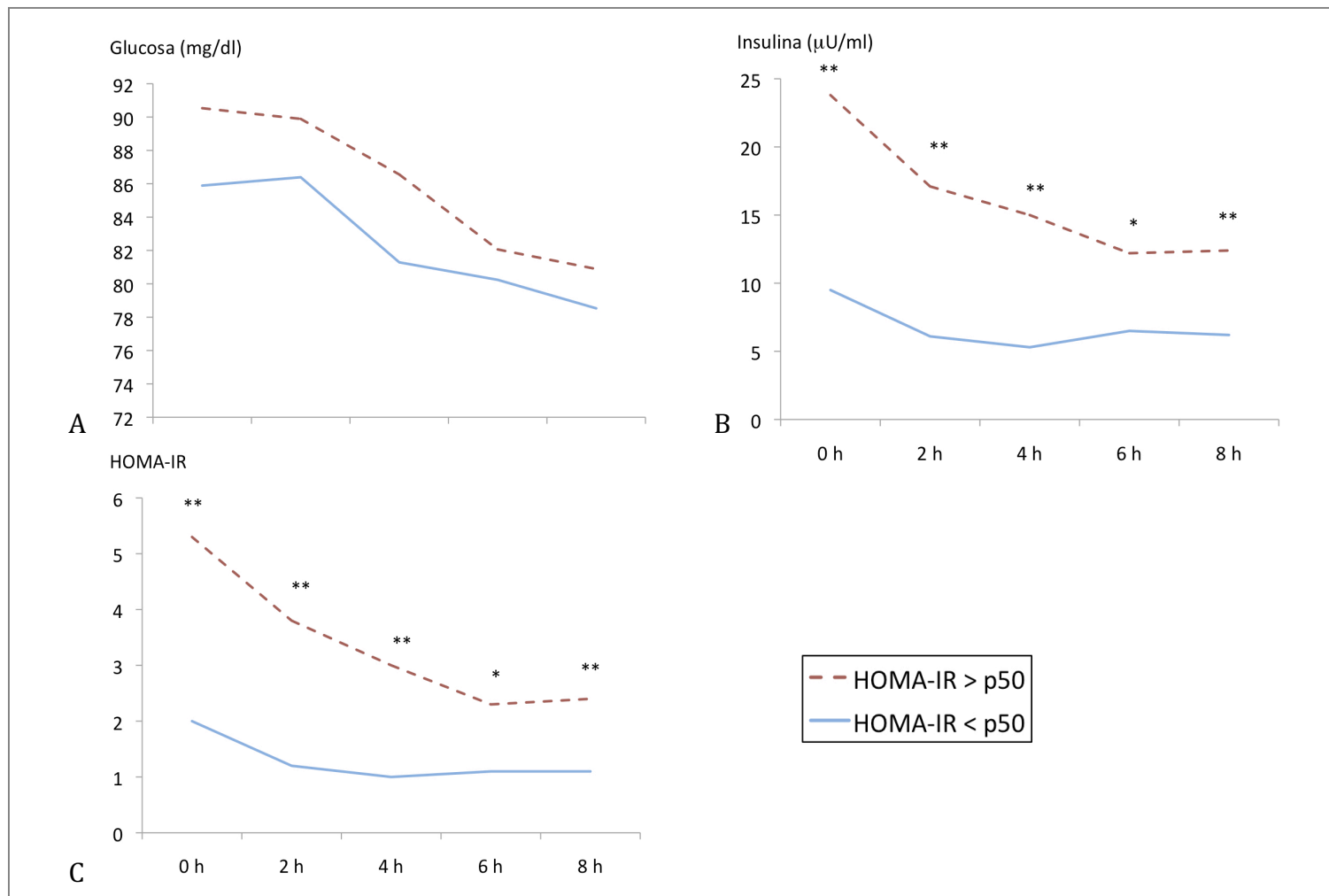
### 2.2.1 Comparación entre grupos de los parámetros del metabolismo hidrocarbonado durante la SOG

En la *Tabla 12* y la *Figura 13* quedan reflejados los datos del metabolismo hidrocarbonado del grupo completo antes y después de la SOG. Los niveles de insulina y HOMA-IR se mantuvieron superiores en los obesos con mayor grado de RI. Aunque encontramos diferencias en las cifras de glucemia estas no fueron significativas y en los últimos puntos de la SOG los valores de glucemia se aproximaron entre los grupos. Las concentraciones de los tres parámetros descienden a lo largo de la SOG, alcanzando valores mínimos de HOMA-IR a las 6 horas y siendo dichos valores inferiores a los considerados como diagnósticos de RI.

**Tabla 12.** Parámetros del metabolismo hidrocarbonado basales y a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG, entre obesos con menor y mayor grado de insulinoresistencia (HOMA-IR p50)

Tiempo (horas)		0	2	4	6	8
HOMA-IR	Menor RI (n=19)	2,0 ± 0,9	1,2 ± 0,8	1,0 ± 0,9	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,7
	Mayor RI (n=19)	5,3 ± 1,8**	3,8 ± 2,5**	3,0 ± 1,9**	2,3 ± 1,7*	2,4 ± 1,6**
Glucosa (mg/dl)	Menor RI (n=19)	85,9 ± 10,3	86,4 ± 8,8	81,3 ± 9,0	80,3 ± 8,3	78,5 ± 9,6
	Mayor RI (n=19)	90,5 ± 8,0	89,9 ± 8,1	86,6 ± 7,6	82,1 ± 7,3	80,9 ± 8,7
Insulina (μU/ml)	Menor RI (n=19)	9,5 ± 4,2	6,1 ± 3,9	5,3 ± 4,0	6,5 ± 2,7	6,2 ± 3,0
	Mayor RI (n=19)	23,8 ± 8,6**	17,1 ± 10,9**	15,0 ± 8,3**	12,2 ± 8,3*	12,4 ± 6,5**

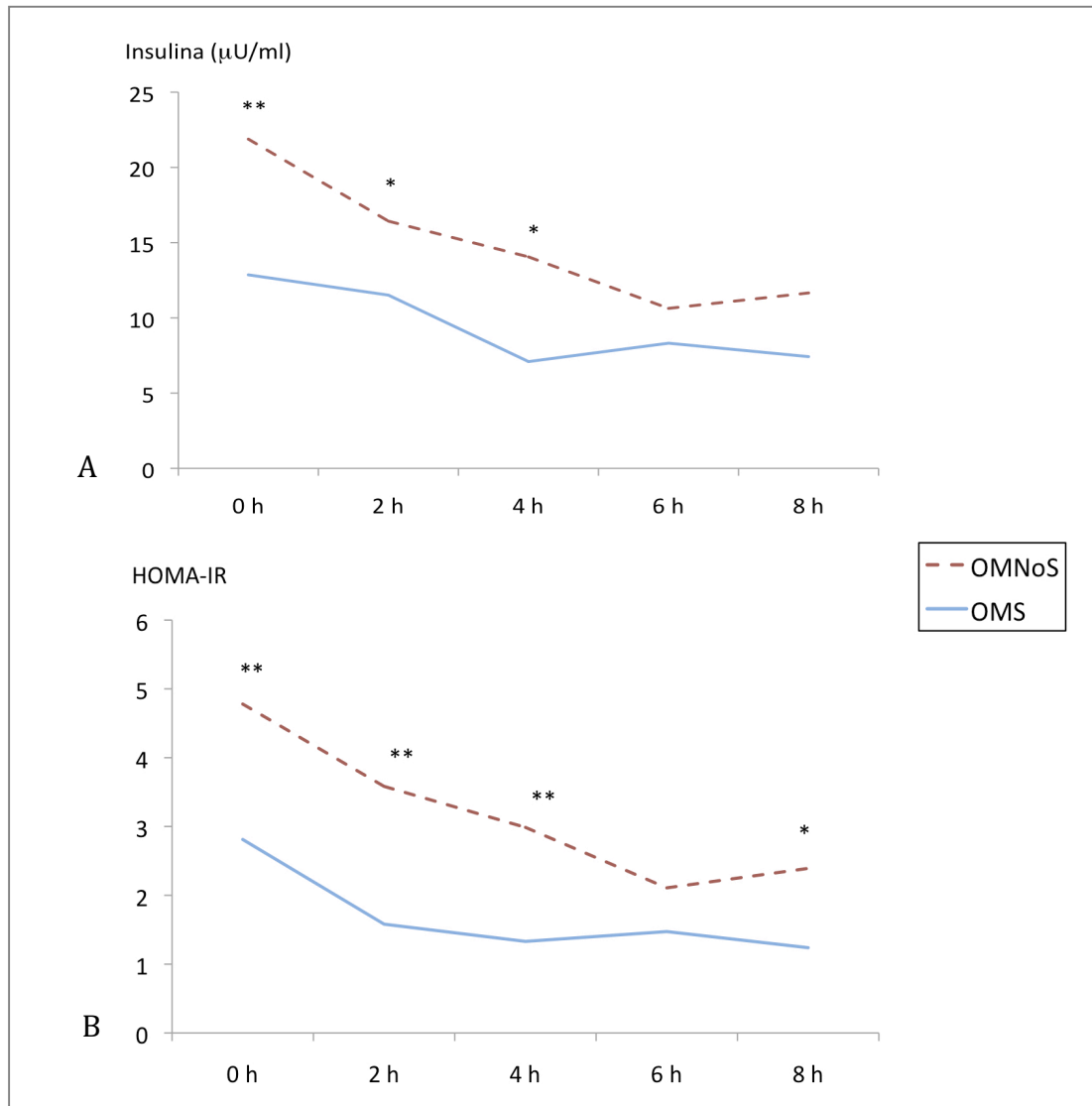
\* p < 0,05 \*\* p < 0,01



\* p < 0,05 \*\* p < 0,01

**Figura 13. Comparación de los niveles de glucosa (A), insulina (B) y HOMA-IR (C) en cada punto de la sobrecarga oral grasa entre obesos según insulinoresistencia basal**

Al analizar la respuesta durante la SOG en función de si los obesos eran metabólicamente sanos o no, encontramos diferencias significativas en las cifras de insulina a las 2 y 4 horas y en HOMA-IR a las 2, 4 y 8 horas. Ver *Figura 14*.



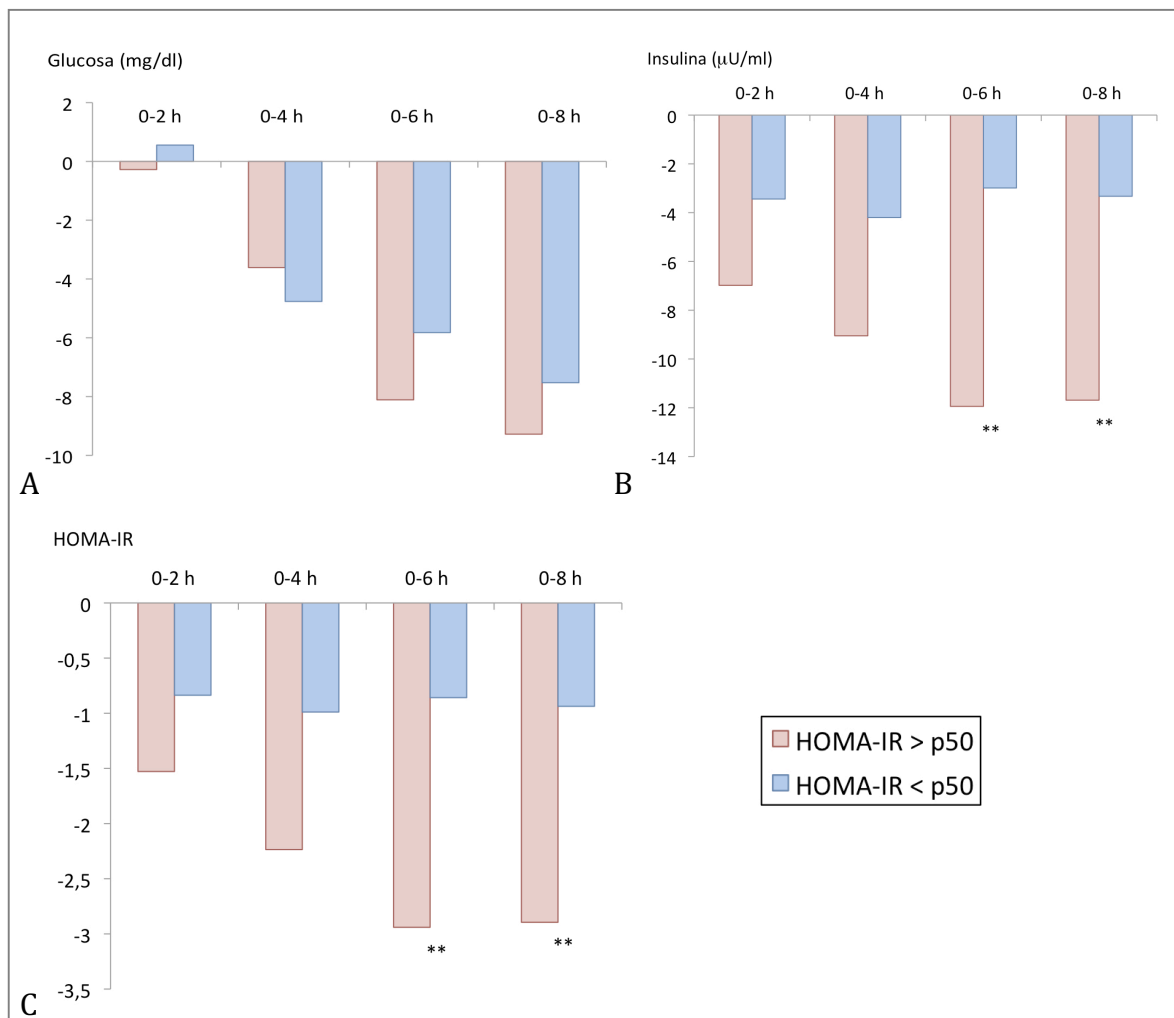
\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$

OMS, obeso metabólicamente sano; OMNoS: obeso metabólicamente no-sano

**Figura 14. Comparación de los niveles de insulina (A) y HOMA-IR (B) en cada punto de la SOG entre obesos metabólicamente sanos o no**

## 2.2.2 Comparación de la variación de los parámetros del metabolismo hidrocarbonado durante la SOG respecto al valor basal en ambos grupos

En la *Figura 15* se muestran las variaciones en los niveles plasmáticos de insulina, glucosa y cifras de HOMA-IR en cada punto de la SOG con respecto al valor basal de los obesos con menor y mayor RI. Observamos un descenso en los niveles de los tres parámetros, con valores mínimos de glucemia a las 8 horas en ambos grupos. El descenso en la insulinemia es significativamente mayor en el grupo de obesos con mayor RI, siendo este máximo a las 6 horas.

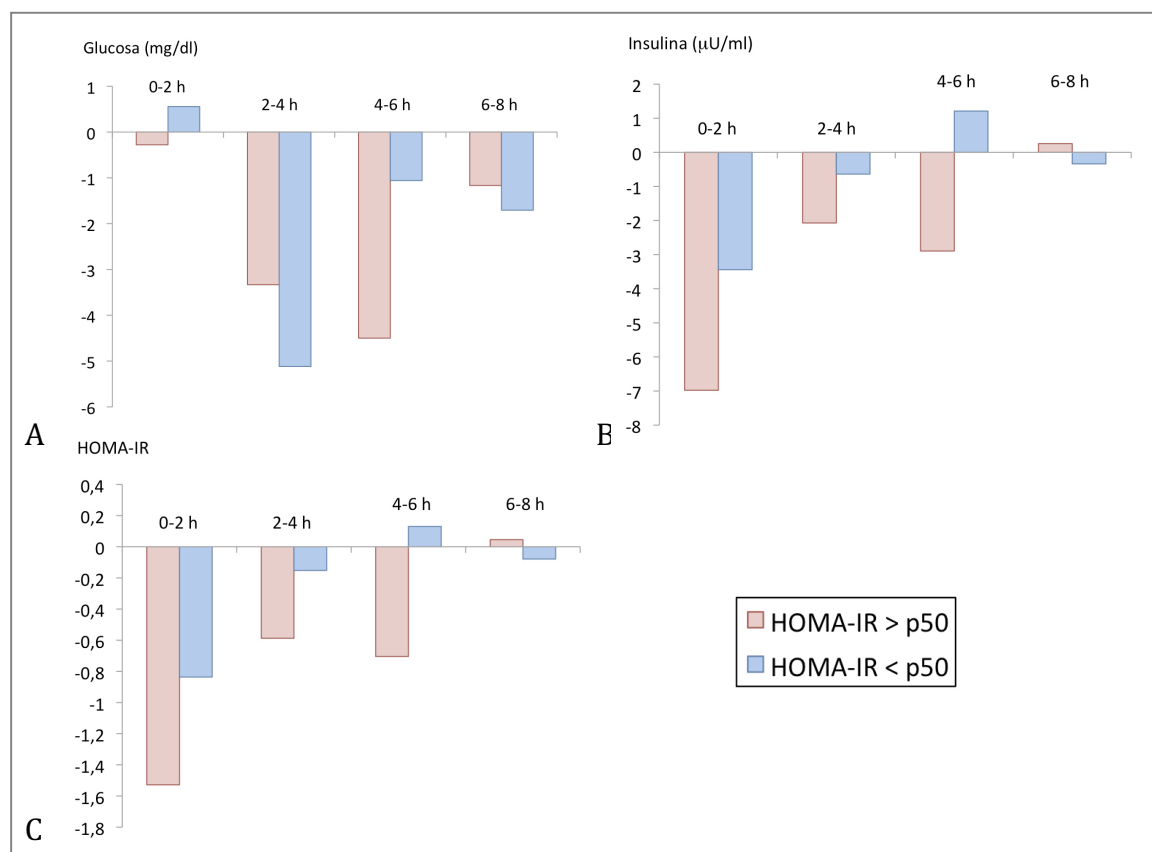


\* p < 0,05 \*\* p < 0,01

**Figura 15. Variación de los niveles séricos de glucosa (A), insulina (B) y niveles de HOMA-IR (C) con respecto al valor basal a las 2, 4, 6 y 8 horas de la SOG en obesos con menor y mayor grado de RI**

### 2.2.3 Comparación de la variación de los parámetros del metabolismo hidrocarbonado durante la SOG con respecto al valor previo (a las 2, 4, 6 y 8 horas) en obesos con menor y mayor grado de insulinoresistencia

En la *Figura 16* se muestra la variación de los niveles séricos de insulina, glucosa y cifras de HOMA-IR en cada punto de la sobrecarga con respecto al valor previo, en sujetos con mayor y menor grado de RI. Se observa un descenso progresivo en los valores de glucemia respecto a los puntos anteriores en la SOG. Sin embargo, al valorar la respuesta en las cifras de insulina, y por tanto también en los niveles de HOMA-IR, observamos un decremento en los sujetos con mayor RI hasta las 6 horas momento en el que se produce un incremento respecto al punto anterior. En los sujetos más insulinsensibles este aumento en de insulinemia y HOMA-IR respecto al punto anterior se produce más precozmente, de 4 a 6 horas.



\* p < 0,05 \*\* p < 0,01

**Figura 16.** Variación de los niveles séricos de glucosa (A), insulina (B) y niveles de HOMA-IR (C) con respecto al punto previo en la SOG, a las 2, 4, 6 y 8 horas, en obesos con menor y mayor grado de RI

### 3. Comparación del patrón de metilación del ADN de adipocitos y linfomonocitos según el grado de RI basal

Para el estudio del patrón de metilación en los linfomonocitos y los adipocitos de la grasa subcutánea y la grasa visceral se emplearon las muestras obtenidas de nuestros pacientes, así como las muestras procedentes de los obesos mórbidos no diabéticos del estudio previo, en el que se había analizado el patrón de metilación con los chips Infinium 450K de Illumina. De esta forma, pudimos ampliar el tamaño muestral para el estudio de las diferencias en el patrón de metilación y su correlación con los parámetros basales; no así con los datos postprandiales, ya que a este otro subgrupo de pacientes no se les había realizado la SOG.

#### 3.1 Características clínicas del grupo completo para estudio de la metilación

En la *Tabla 13* se muestran las características generales del grupo completo (obesos con datos postprandiales y obesos del estudio previo) empleado para el estudio de la metilación, así como los subgrupos de pacientes con menor y mayor grado de RI (según p50 HOMA-IR previo: 3,34). Se observan diferencias estadísticamente significativas en la edad, el peso y en el IMC; presentando diferencias sólo en cuanto a la edad respecto al análisis previo de los obesos con SOG. Sin embargo, al analizar por género sólo se vieron diferencias en el perímetro de la cintura y en el peso (no en el IMC), al igual que sucedía en el grupo de la SOG.

**Tabla 13.** Características clínicas del grupo para el estudio de la metilación

	Grupo completo (n = 58)	Menor RI (n = 20)	Mayor RI (n = 38)
Edad (años)	43,8 ± 10,3	48,4 ± 11,1	41,4 ± 9,1 *
Sexo hombre/mujer (n)	21/37	7/13	14/24
Peso (kg)	129,4 ± 21,5	120,1 ± 23,3	134,2 ± 19,0 *
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	46,2 ± 5,6	44,1 ± 5,9	47,4 ± 5,2 *
Perímetro de cintura (cm)	130,7 ± 15,4	126,0 ± 16,6	133,0 ± 14,5
Presión arterial sistólica (mmHg)	129,0 ± 16,5	125,2 ± 13,2	131,0 ± 17,9
Presión arterial diastólica (mmHg)	80,7 ± 11,8	78,8 ± 8,8	81,8 ± 13,1

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. \* p<0,05 \*\* p<0,001

### 3.2 Datos bioquímicos del grupo completo para estudio de la metilación

En la *Tabla 14* se muestran los principales resultados bioquímicos en ayunas del grupo completo para estudio del metiloma. Tal y como sucedía con el subgrupo de pacientes a los que se les realizó la SOG y cabría esperar, observamos niveles significativamente mayores de insulina y HOMA-IR en el grupo con mayor RI (HOMA-IR > 3,34).

**Tabla 14.** Datos bioquímicos del grupo completo para el estudio de la metilación

	Grupo completo (n = 58)	Menor RI (n = 20)	Mayor RI (n = 38)
Glucosa (mg/dl)	89,8 ± 9,7	86,2 ± 9,0	91,7 ± 9,6 *
HbA1c (%)	5,5 ± 0,4	5,4 ± 0,3	5,5 ± 0,4
Insulina (μU/ml)	18,7 ± 9,8	10,3 ± 3,4	23,4 ± 9,1 **
HOMA-IR	4,1 ± 2,1	2,2 ± 0,7	5,2 ± 1,8 **
CT (mg/dl)	160,4 ± 43,0	163,8 ± 44,4	158,6 ± 42,7
TG (mg/dl)	111,2 ± 45,3	97,0 ± 34,6	118,6 ± 48,7
HDL-c (mg/dl)	38,7 ± 7,9	39,3 ± 7,8	38,3 ± 8,1
LDL-c (mg/dl)	113,7 ± 33,7	113,8 ± 34,9	113,6 ± 33,4
Apo B (mg/dl)	91,3 ± 22,9	93,9 ± 24,7	89,9 ± 22,2
Leucocitos (/mm <sup>3</sup> )	6057,9 ± 1329,4	6053,0 ± 1279,5	6060,5 ± 1371,8
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	3626,7 ± 981,1	3735,0 ± 1005,1	3569,7 ± 977,0
Linfocitos (/mm <sup>3</sup> )	1742,8 ± 448,6	1611,5 ± 380,3	1811,8 ± 470,6
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	239,1 ± 66,9	246,6 ± 78,5	235,2 ± 60,7

\* p < 0,05 \*\* p < 0,001



### 3.3 Diseño de *primers*

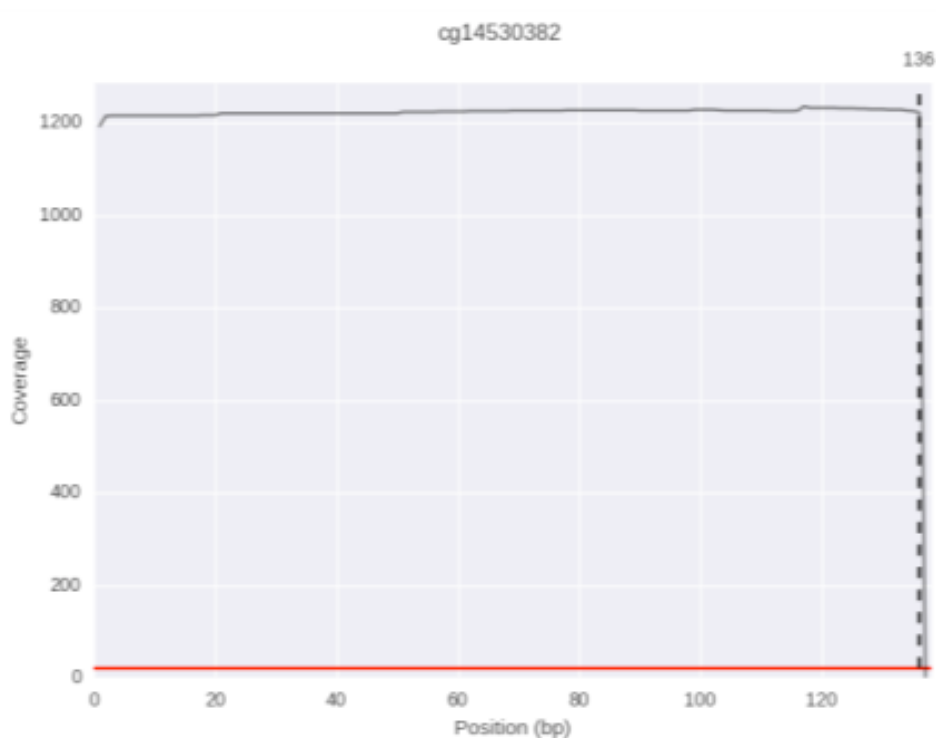
Las características de los *primers* diseñados para amplificar cada uno de los fragmentos de interés están detalladas en la *Tabla 15*. Tras la amplificación quedaron añadidas las colas universales de Nextera, de 67 bases, así como el resto de adaptadores necesarios para la NGS, incluyendo los *barcodes*; lo que supuso un aumento considerable del tamaño respecto al del fragmento inicial.

**Tabla 15.** Características de los *primers*

Nombre	Secuencia	Tamaño PCR1	Tamaño PCR2
cg14530382_5	gttgttattttgYggaattt	203	272
cg14530382_3	taacaccataattcRccta		
cg07064495_5	aggtttgggttgattgt	178	247
cg07064495_3	catcccRtcctttattaact		
cg19533582_5	aagagatggaaaaggagagg	229	298
cg19533582_3	caacaatacatataatattttctctaaaac		
cg07249765_5	ttggtatgggtagatagga	245	314
cg07249765_3	ctacataacacacRcaaacc		
cg26354017_5	tgagtataggtgggtgaagg	231	300
cg26354017_3	atactactcctaattttccctac		
cg14341177_5	aggggttgtagtgtgatagg	252	321
cg14341177_3	catacaaattcttctctaccaa		
cg08441918_5	gggttttagggtttagagatg	229	298
cg08441918_3	tctaaataccaacaatacctaaaa		
cg04245305_5	aaggttttattaggggtttt	233	302
cg04245305_3	tcctatacRttctatcactcc		
cg08354527_5	ttagtttttggttaatttagtg	161	230
cg08354527_3	aaacRcactactcaatatcc		
cg22730047_5	aaagggttaggttaggttaggtt	150	219
cg22730047_3	caacctataaacctccttct		
cg22504140_5	gtgggaggttaggtatgg	191	260
cg22504140_3	tactaaattcctccccaac		

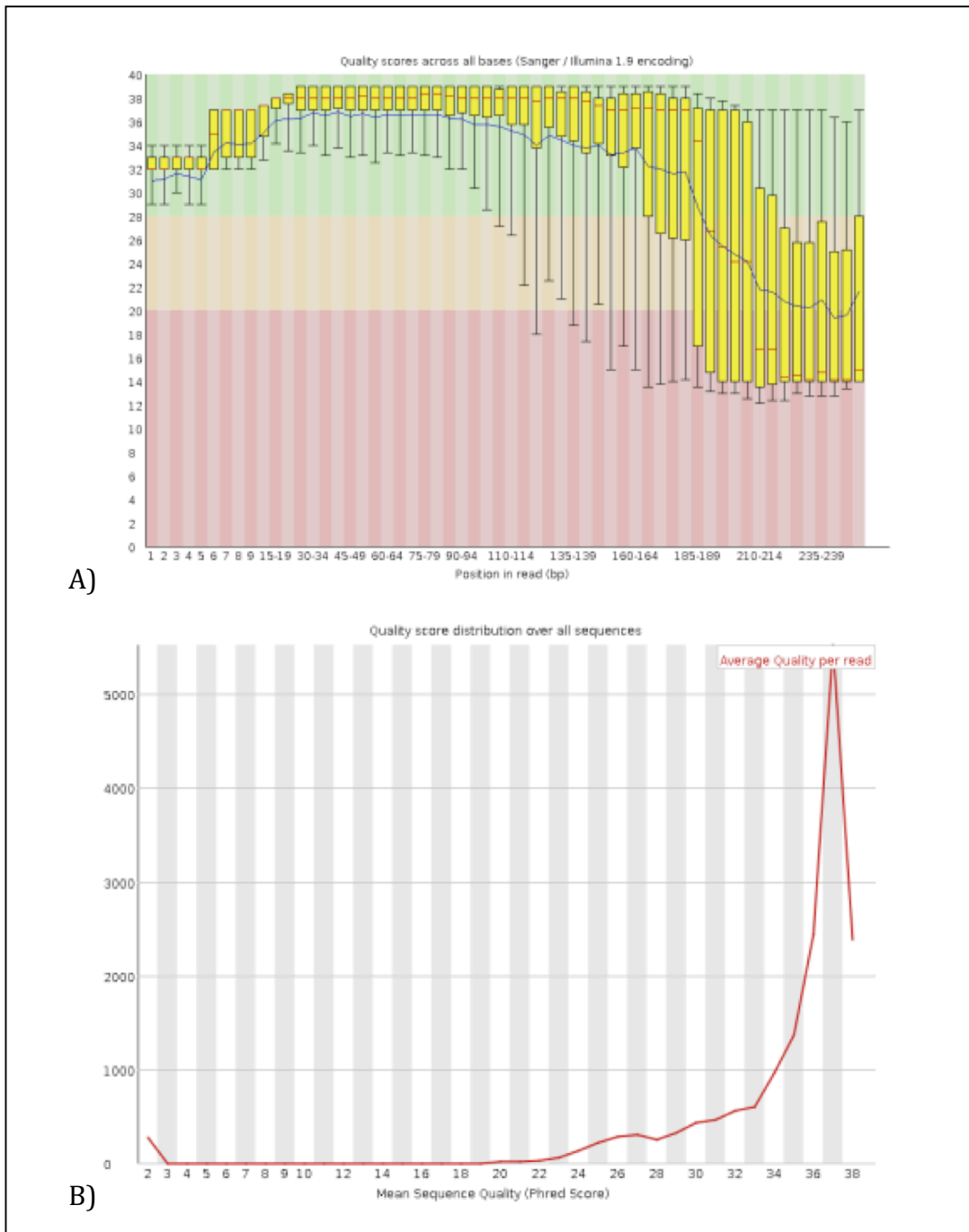
### 3.4 Controles de calidad

Previo al análisis del epigenoma ha sido necesario comprobar los controles de calidad asociados a la calidad de las muestras y a la calidad del proceso. Para ello se comprobó la cobertura, es decir, se cuantificó el número de lecturas que se había cubierto de cada una de las bases de cada amplicón; ya que a mayor número de lecturas mayor fiabilidad. En la *Figura 17* se muestra la imagen de la cobertura de una de las secuencias.



**Figura 17. Cobertura del amplicón para el sitio cg14530382 en sangre**

También se comprobó la calidad de las lecturas por base de secuenciación según el Phred score, que representa la probabilidad de error en la nomenclatura de una base. Así, se asigna una puntuación entre 4 y 60, correspondiendo los valores superiores a muestras de mayor calidad. Tal y como vemos en la *Figura 18*, todas nuestras lecturas tuvieron un Phred score superior a 20 y en la mayoría de casos superior a 30. Por lo tanto, representan una buena calidad en la identificación de las bases incorporadas durante la secuenciación, con una precisión del 99% al denominar la base en caso de un Phred score de 20 y del 99,9% si éste es de 30.



**Figura 18. A) Control de calidad por base de secuenciación; B) Gráfico de calidad por secuencia**

Para los distintos sitios seleccionados de los chips de metilación, se comprobó en las distintas muestras la calidad del genotipado y la calidad de las bases. Así, debían cumplir una calidad superior a 90 en el genotipado y un valor superior a 100

en relación a la profundidad de la lectura. En la *Tabla 16* se muestra el informe de dos muestras y los 11 sitios seleccionados con la comparación de la base localizada en el alelo de referencia (ref) y la del alelo alternativo (alt), así como si supera o no las condiciones exigidas para su posterior análisis.

**Tabla 16.** Valores considerados para selección de muestras.

Muestra	chr	Posición	ref	alt	DP	GQ	FILTER
3004	cg08441918	120	C	C	512	99	PASS
3004	cg22730047	53	C	T	570	99	PASS
3004	cg08354527	29	C	C	797	99	PASS
3004	cg22504140	87	C	C	388	99	PASS
3004	cg04245305	111	C	C	652	99	PASS
3004	cg26354017	91	C	C	779	99	PASS
3004	cg07064495	77	C	C	378	99	PASS
3004	cg14341177	101	C	C	733	99	PASS
3004	cg19533582	90	C	C	1181	99	PASS
3004	cg07249765	124	C	A	359	99	PASS
3004	cg14530382	45	C	C	402	99	PASS
3018	cg08441918	120	C	C	412	99	PASS
3018	cg22730047	53	C	T	1052	99	PASS
3018	cg08354527	29	C	C	1219	99	PASS
3018	cg22504140	87	C	C	707	99	PASS
3018	cg04245305	111	C	C	402	99	PASS
3018	cg26354017	91	C	C	448	99	PASS
3018	cg07064495	77	C	C	324	10	NO PASS
3018	cg14341177	101	C	C	127	99	PASS
3018	cg19533582	90	C	C	210	99	PASS
3018	cg07249765	124	C	C	294	99	PASS
3018	cg14530382	45	C	C	399	99	PASS

DP: profundidad de lectura o nº de bases de alta calidad; GQ: calidad de genotipado

### 3.5 Cuantificación de la metilación del ADN

Tras haber depurado las muestras según los controles de calidad, se comprobó el estado de metilación de nuestras muestras respecto al patrón de metilación del genoma completo de referencia. En la *Tabla 17* se muestra algunas de estas

diferencias en dos muestras, destacando en ambas la diferencia en el sitio cg22730047, con una citosina no metilada (T) en lugar de una citosina metilada (C).

**Tabla 17.** Diferencias en la metilación entre la referencia y los sitios seleccionados.

Muestra	chr	meth ref	alt	AD	REF	ALT	ADF	ADR	%METH
3004	cg08441918	C	C	492	492		479	13	100
3004	cg22730047	C	T	5;565	5	565	5;515	0;50	1
3004	cg08354527	C	C	780	780		731	49	100
3004	cg22504140	C	C	383	383	565	336	47	100
3004	cg04245305	C	C	627	627		615	12	100
3004	cg26354017	C	C	764	764		740	24	100
3004	cg07064495	C	C	324	324		312	12	100
3004	cg14341177	C	C	712	712		656	56	100
3004	cg19533582	C	C	1123	1123		1052	71	100
3004	cg07249765	C	A	1;355	1	355	1;122	0;233	0
3004	cg14530382	C	C	382	382		353	29	100
3018	cg08441918	C	C	404	404		394	10	100
3018	cg22730047	C	T	19;1032	19	1032	17;946	2;86	2
3018	cg08354527	C	C	1195	1195		1137	58	100
3018	cg22504140	C	C	695	695		635	60	100
3018	cg04245305	C	C	392	392		376	16	100
3018	cg26354017	C	C	418	418		403	15	100
3018	cg07064495	C	C	311	311		305	12	100
3018	cg14341177	C	C	123	123		119	4	100
3018	cg19533582	C	C	205	205		198	7	100
3018	cg07249765	C	C	288	288		157	131	100
3018	cg14530382	C	C	372	372		357	15	100

*ref: alelo referencia; alt: alelo alternativo; AD: cobertura total; REF: n° de lecturas que soportan el alelo de referencia; ALT: n° de lecturas que soportan el alelo alternativo; ADF: n° de lecturas en cadena directa; ADR: n° de lecturas en cadena reversa*

De los once sitios de metilación (CG) seleccionados a partir de los resultados obtenidos a partir de los chips Infinium Human Methylation 450K de Illumina, tan solo encontramos variaciones en el patrón de metilación en tres de ellos: cg07064495, cg07249765 y cg22730047. El resto de sitios estudiados encontramos

que estaban metilados (100%) en todos los tejidos. En la *Tabla 18* se muestran las diferencias de metilación de los sitios estudiados en los distintos tejidos.

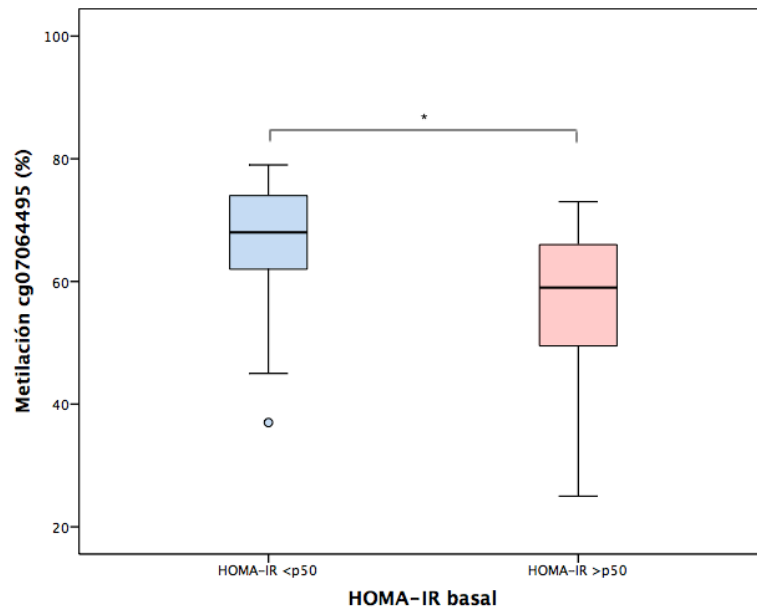
**Tabla 18.** Diferencias en el % de metilación en los distintos tejidos y sitios seleccionados

	Sangre		Grasa visceral		Grasa subcutánea	
	N	% met	N	% met	N	% met
cg14530382	33	100	43	99,44	30	100
cg07064495	35	80,26	44	59,77	36	61,89
cg19533582	19	100	48	100	45	100
cg07249765	21	95,43	42	95,33	44	95,50
cg26354017	34	100	44	100	41	100
cg14341177	20	100	53	100	49	100
cg08441918	36	100	53	100	45	100
cg04245305	38	100	52	100	49	100
cg08354527	49	100	52	100	50	100
cg22730047	50	1,22	53	2,06	50	1,46
cg22504140	49	100	54	100	50	100

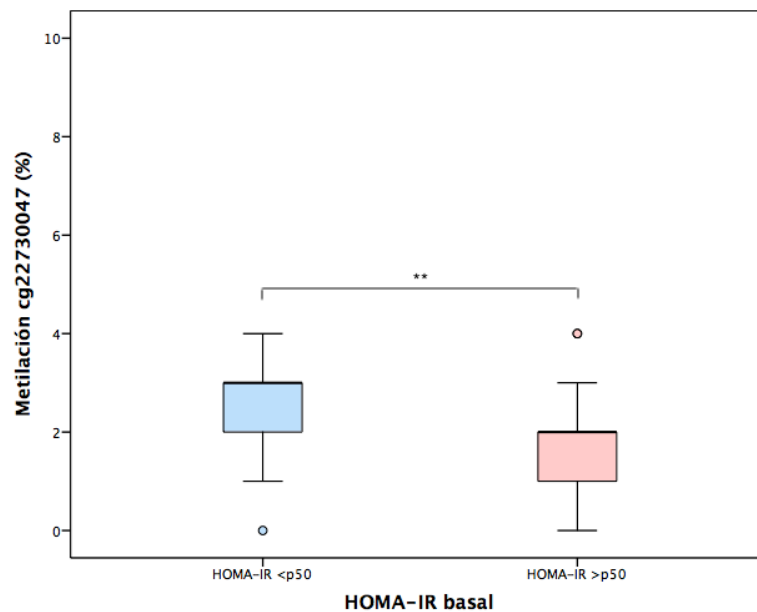
### 3.6 Comparación del patrón de metilación del ADN de adipocitos y linfomonocitos según resistencia a la insulina en obesos mórbidos

Al comparar el porcentaje de metilación en las distintas posiciones entre obesos con mayor o menor RI no hallamos diferencias significativas, excepto en las posiciones cg07064495 y cg22730047 de la grasa visceral (*Figura 19*). Aun sin encontrar diferencias significativas, sí que observamos una mayor metilación en obesos con menor RI frente a aquellos con un HOMA-IR mayor en los 3 sitios estudiados y en todos los tejidos.

A)



B)



**Figura 19. Porcentaje de metilación de cg07064495 (A) y cg22730047 (B) en grasa visceral según grado de insulinorresistencia.**

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

Al evaluar la correlación entre HOMA-IR y la metilación en las distintas posiciones, sólo encontramos una correlación significativa con cg22730047 en la grasa visceral ( $\rho -0,296$ ,  $p 0,04$ ).

### 3.7 Asociación del patrón de metilación del ADN de adipocitos y linfomonocitos con variables antropométricas y bioquímicas basales

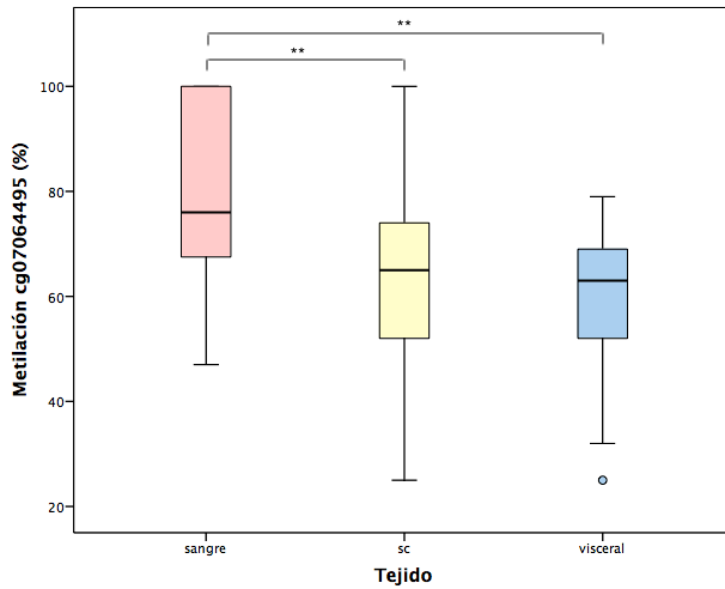
Al analizar el patrón de metilación en las distintas posiciones y las variables antropométricas, no encontramos asociación excepto para cg07249765 y el perímetro de la cintura ( $\rho$  0,237, p 0,01), la presión arterial sistólica ( $\rho$  0,234, p 0,02) y la presión arterial diastólica ( $\rho$  0,203, p 0,047). Al analizar por tejidos la correlación con la PA diastólica aumenta en grasa visceral ( $\rho$  0,354, p 0,03).

En relación a los parámetros bioquímicos basales tan solo encontramos correlaciones significativas al subdividir por tejidos, y siendo estas débiles. La metilación en sangre de cg07064495 se correlaciona con las cifras de AGL ( $\rho$  0,360, p 0,04) y de cg07249765 en grasa visceral con la glucemia basal ( $\rho$  0,348, p 0,02).

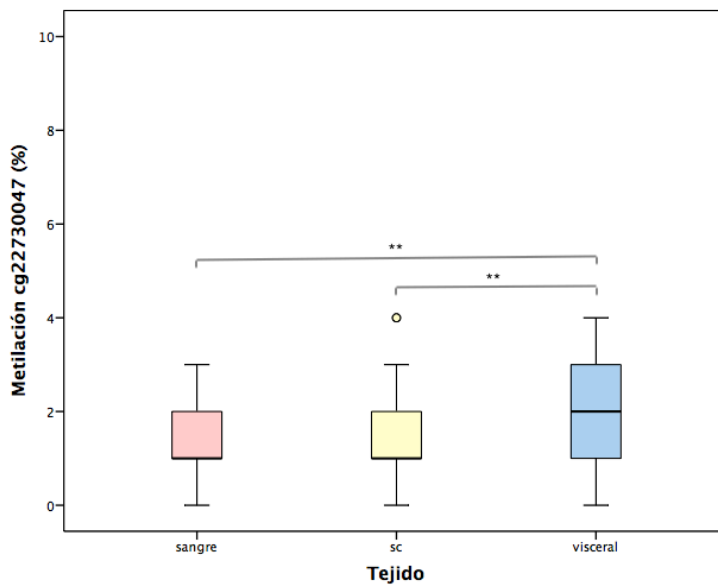
### 3.8 Comparación de la metilación del ADN según tejidos

Tras valorar la metilación en todos los sitios comparamos el porcentaje de metilación en los dos sitios CG que presentaban variaciones significativas entre los distintos tejidos (cg07064495 y cg22730047); ver *Figura 20*. El 13,6% y 21,1% de la variabilidad del rango de porcentaje de metilación de cg07064495 y cg22730047 respectivamente, puede deberse al tejido analizado. No encontramos diferencias en el patrón de metilación de cg07249765 entre los linfomonocitos, la grasa subcutánea y la grasa visceral.





A)



B)

**Figura 20. A) Metilación de cg07064495 en diferentes tejidos.** Esta región en las proximidades del promotor del gen B4Gal-T está significativamente más metilado en sangre comparado con grasa sc ( $p < 0,001$ ) y visceral ( $p < 0,001$ ); **B) Metilación de cg22730047 en diferentes tejidos,** estando significativamente más metilado en grasa visceral comparado con grasa sc ( $p < 0,001$ ) y sangre ( $p < 0,004$ )

\*\*  $p < 0,01$

#### 4. Comparación del patrón de metilación del ADN de adipocitos y linfomonocitos según la respuesta lipídica tras la SOG

Al evaluar el patrón de metilación y la respuesta postprandial de los TG a las 4 horas encontramos una asociación débil con cg07249765 ( $\rho$  0,241,  $p$  0,05), no así con las otras posiciones o con la trigliceridemia posterior. También encontramos una asociación entre la metilación de cg07249765 y las cifras plasmáticas postprandiales de apoB a las 2, 4, 6 y 8 horas, siendo mayor a las 6 horas ( $\rho$  0,337,  $p$  0,005).

Al comparar la respuesta postprandial según presentasen trigliceridemia plasmática a las 4 horas mayor o menor a 175 mg/dl (punto de corte según Castro-Cabezas<sup>54</sup>), no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de metilación de las distintas posiciones (cg07064495, cg07249765 y cg22730047).

Sin embargo, si consideramos la respuesta postprandial según la extrusión de TG a las 4h (superior o no a 175 mg/dl) y el tejido analizado, existe un efecto principal significativo del tejido en la metilación de cg07064495 [F (2,67)=16,374,  $p < 0,001$ ,  $\eta^2$  parcial 0,328] y cg22730047 [F (2,93)=3,317,  $p$  0,041,  $\eta^2$  parcial 0,067]. Así, el 40,8% de la variabilidad del rango de porcentaje de metilación de cg07064495 y el 13,8% de la de cg22730047 pueden deberse a la interacción entre la extrusión postprandial de TG y el tejido analizado (linfomonocitos, grasa subcutánea o grasa visceral).

En los obesos con TG postprandiales menores a 175 mg/dl, existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de metilación de cg22730047 ( $p < 0,05$ ) según el tejido analizado (grasa visceral vs linfomonocitos o grasa subcutánea).

Al considerar otros factores (edad, género, insulinoresistencia basal, tabaquismo previo, obesos metabólicamente sanos...) no encontramos interacciones significativas con la lipemia postprandial a las 4 horas y la metilación en las posiciones analizadas.

## V. Discusión



Estudios previos han demostrado la relación entre la lipemia postprandial y las complicaciones metabólicas y el desarrollo de DM. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio había analizado la posible relación entre la metilación de determinados genes involucrados en el metabolismo hidrocarbonado y el grado de resistencia a la insulina y la lipemia postprandial en sujetos con obesidad mórbida no diabéticos. Nuestro estudio establece una relación entre la lipemia postprandial y la resistencia a la insulina en pacientes obesos, así como identifica patrones de metilación en distintas regiones del genoma en relación tanto con la lipemia postprandial como con la resistencia a la insulina.

Algunos trabajos han analizado el impacto de la LPP como factor de riesgo independiente de arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular,<sup>60</sup> mientras que otros estudios demuestran que la LPP predice mejor el desarrollo de futuros eventos cardiovasculares que la trigliceridemia en ayunas.<sup>57</sup> Algunos trabajos han evaluado los cambios en la metilación en distintos tejidos y el grado de resistencia a la insulina basal en función de la presencia o no de DM tipo 2,<sup>95,96</sup> mientras que otros autores han explorado la posible relación entre la LPP y las modificaciones en el epigenoma en sangre periférica.<sup>97</sup> Pero ninguno se ha diseñado como nuestro estudio, porque en ninguno se ha estudiado el impacto de la LPP sobre el patrón de la metilación de distintos tejidos implicados en la patogenia de la RI y la obesidad, con el fin de profundizar en los cambios epigenéticos tejido-específicos que parecen intervenir en su desarrollo y podrían ayudarnos a conocer su fisiopatología.

La novedad de este trabajo de investigación reside en la integración de factores de riesgo cardiovascular encubiertos, como son la RI o la LPP, con los cambios en la metilación del genoma humano en los distintos tejidos implicados en la patogenia de la obesidad; detectando alteraciones antes del desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Porque de esta forma, podríamos identificar a aquellos obesos con un mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardio-metabólicas e incidir en el tratamiento dietético-conductual, farmacéutico o quirúrgico.

## 1. Discusión de la metodología

### 1.1 Diseño del estudio

El presente trabajo ha sido concebido en dos partes, ambas de corte transversal. En la primera fase, nuestro objetivo ha sido conocer la respuesta a una SOG en obesos con mayor o menor grado de RI. Para ello, seleccionamos a pacientes con obesidad mórbida, exceptuando a tres pacientes con obesidad clase II y comorbilidades (sus IMC eran de 36,6, 37,5 y 39,4 kg/m<sup>2</sup> respectivamente); y evaluamos la respuesta postprandial.

En la segunda fase del trabajo hemos replicado los resultados de metilación obtenidos en un estudio de EWAS previo de nuestro grupo (datos pendientes de publicación); así como analizado las asociaciones con las características clínicas y bioquímicas basales en una muestra ampliada de pacientes. En el estudio previo se identificaron 11 DMRs que estaban asociadas a la presencia de diabetes mellitus tipo 2, y éstas fueron las regiones estudiadas en nuestra muestra.

Para esta segunda fase hemos contado con los pacientes de la SOG, así como con otro subgrupo de obesos mórbidos no diabéticos intervenidos en nuestro centro a los que se les había realizado el estudio bioquímico basal (sin SOG) y de los cuales se habían obtenido muestras tisulares durante la cirugía bariátrica (grasa subcutánea y visceral). Esta segunda fase incluyó una muestra de 58 obesos en la que se analizó el patrón de metilación de 11 regiones génicas en distintos tejidos (linfomonocitos, grasa subcutánea y grasa visceral) mediante secuenciación de nueva generación (NGS). (Ver *Figura 6*)

Todos los participantes dieron su consentimiento informado para la cesión de sus muestras para la investigación científica, así como la garantía de que los resultados de la investigación serían de acceso público. Todos los estudios planteados fueron aprobados por el comité ético correspondiente.

## 1.2 Selección de pacientes

La selección de pacientes fue determinante para el estudio propuesto. Dado que nuestro objetivo era evaluar la respuesta postprandial en obesos mórbidos en los que no existieran otros factores de confusión que pudieran modificar los resultados (diabetes mellitus tipo 2, tabaquismo...); esto retrasó la inclusión de sujetos en el estudio.

Entre los grupos estudiados, obesos con mayor o menor RI (según p50 HOMA-IR: 3,34), encontramos diferencias estadísticamente significativas en el peso, el IMC, las cifras de insulina y trigliceridemia basal. Estas diferencias eran esperables, ya que los grupos se diferencian por las cifras de RI; y la obesidad abdominal y trigliceridemia basal se relacionan directamente con la RI.<sup>44</sup>

## 1.3 Evaluación del test de sobrecarga oral grasa

La SOG es un método estandarizado para el estudio de la LPP, así como la evaluación de otros parámetros del metabolismo hidrocarbonado que podrían modificarse tras la administración de una comida mixta de prueba o un preparado líquido lipídico, como el empleado en nuestro estudio. Sin embargo, la respuesta lipémica postprandial depende de distintos factores (ambientales, genéticos, fisiopatológicos...), por lo que hemos seleccionado una población bien caracterizada y un preparado lipídico estandarizado para minimizar la variabilidad atribuible a estos factores.

Nuestro objetivo era evaluar la influencia que ejerce la presencia de RI en sujetos con obesidad mórbida, como modelo extremo de obesidad, sobre la respuesta postprandial. Para ello se dividió a los pacientes según el grado de RI en ayunas (p50 HOMA-IR: 3,34). Entre los criterios de exclusión se incluyó la realización de ejercicio físico moderado o intenso, ya que la actividad aeróbica aguda aumenta la actividad de la LPL y puede reducir en más del 20% la lipemia postprandial. Así mismo, se evitó

que los pacientes realizaran ejercicio físico intenso las 24 horas previas al estudio y durante la SOG mantuvieron un reposo relativo. Otro criterio de exclusión fue el consumo de tabaco, ya que estudios previos han hallado incrementos de hasta el 50% en la LPP en sujetos que fuman sin presentar diferencias a nivel basal.<sup>103</sup> También se excluyeron a los pacientes con ingestas de alcohol superiores a 30 g/día, ya que su consumo estimula la secreción de partículas VLDL que compiten con los quilomicrones en su aclaramiento por la LPL.

En relación al preparado empleado para estudiar la LPP, a diferencia de otros estudios en los que se emplean comidas mixtas de prueba, nosotros decidimos utilizar una solución lipídica rica en ácidos grasos insaturados para evitar el factor de confusión que supone el consumo de otros componentes de la dieta. Así, el preparado utilizado no contenía proteínas, carbohidratos (que al afectar al aclaramiento de lipoproteínas pueden incrementar la trigliceridemia postprandial) o fibra (que interfiere en la absorción de la grasa dietética atenuando la exacerbación lipídica).<sup>104</sup>

El tipo de grasa empleada y la dosis ingerida también pueden ser motivo de controversia. El módulo lipídico comercial ingerido en nuestro estudio está compuesto por triglicéridos de cadena larga (LCTs), que al entrar en la circulación como quilomicrones incrementan la LPP, a diferencia de los ácidos grasos de cadena corta y media. El preparado es rico en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, 56.6% del contenido graso) y a diferencia del aceite de oliva contiene una mayor proporción de poliinsaturados (PUFA, 20.2 vs 8.6%) aunque menor a la hallada en frutos secos como las nueces (68.3%). Este hecho es importante ya que influye en la extrusión postprandial de TG, siendo menor con PUFA e incrementándose progresivamente con la ingesta de MUFA y grasas saturadas.<sup>53</sup>

La cantidad de grasa administrada fue de 60g (125 ml del preparado), ya que se asemeja a la contenida en la mayoría de comidas habituales (de 30 a 60g de grasa). Aunque la mayoría de estudios sobre LPP calculan la dosis a administrar en función de la superficie corporal ( $50\text{g}/\text{m}^2$ ), al estudiar a obesos mórbidos la dosis resultante por esta fórmula sería excesiva; ya que dosis superiores a 80g exageran la LPP sin



relación dosis-dependiente.<sup>52</sup> Por ejemplo, un paciente con un IMC de 47,63 kg/m<sup>2</sup> (162cm y 125kg) tiene una superficie corporal de 2,24 m<sup>2</sup>, por lo que la dosis a administrar sería de 112g, muy superior a la ingesta grasa habitual. Estudios previos con este preparado lipídico en obesos mórbidos refrendan el uso de la dosis de 60g.<sup>67,69</sup>

Cabe destacar que todos los pacientes incluidos habían realizado 3 semanas de dieta de muy bajo contenido calórico (VLCD) previo a la SOG y posteriormente la mantuvieron hasta la intervención quirúrgica, tal y como se contempla en el protocolo de cirugía bariátrica de nuestro hospital.

#### 1.4 Secuenciación NGS

En la segunda parte del trabajo, el estudio del metiloma, nos decantamos por un estudio de secuenciación de nueva generación, dado que se trata de una técnica robusta y que proporciona gran cantidad de información. Dada la rápida evolución de la metodología de secuenciación, la tecnología NGS permite el análisis epigenético de manera rápida y económica, gracias a la secuenciación en multiplex.<sup>85,89</sup>

El sistema utilizado ha sido el MiSeq de Illumina, que permite la secuenciación de fragmentos individuales de ADN. A diferencia de los estudios de asociación del epigenoma completo con los microarrays de metilación (EWAS), como el realizado en el estudio previo del que se seleccionaron las regiones posteriormente secuenciadas, la secuenciación mediante NGS es más robusta y reproducible. Estudios previos han demostrado que el sistema Infinium HumanMethylation450K Array (de Illumina; EWAS) suele presentar cifras más elevadas en el porcentaje de metilación en zonas pobremente metiladas, con una tendencia a sobreestimar los niveles de metilación; lo que puede explicar parcialmente las diferencias encontradas en nuestro estudio.<sup>89</sup>

Estas diferencias también podrían deberse al punto de corte elegido para establecer diferencias en la metilación al seleccionar los sitios de estudio (deltabeta

>10% vs >20% como se ha empleado en otros estudios epigenéticos). Esta actitud más laxa al establecer diferencias en el patrón de metilación mediante EWAS podría justificar parcialmente la ausencia de tales diferencias al evaluarlo mediante NGS, siendo ruido de fondo durante el proceso.<sup>89</sup>

Otro de los factores que afectan a los métodos para el estudio de la metilación es la correcta correspondencia entre la región de estudio y la región deseada del genoma (“correctly mapped”). Para evaluar tal concordancia en nuestro estudio se realizaron distintas pruebas, como el análisis de la calidad de las secuencias obtenidas mediante el Phred score. Como criterio de buena calidad se estableció un Phred score superior a 20 (precisión del 99% al denominar la base incorporada durante la secuenciación), presente en todas nuestras muestras.

Así, dado que en nuestro estudio la técnica empleada es la secuenciación mediante NGS, los resultados son altamente fiables.

## 2. Discusión de resultados

### 2.1 Lipemia postprandial e insulinoresistencia

La obesidad se asocia con el desarrollo de dislipemia y RI, implicadas en la patogenia del síndrome metabólico y el desarrollo de DM tipo 2.<sup>7,20</sup> La dislipemia en la obesidad mórbida se caracteriza por la presencia de hipertrigliceridemia, tanto en ayunas como a nivel postprandial; y dado que la mayor parte de la población occidental come varias veces al día, permanece en estado postprandial la mayor parte del tiempo. Así, la determinación de la lipemia basal infravalora la exposición lipídica a la que se somete diariamente un individuo. Además, la LPP predice mejor el desarrollo de futuros eventos cardiovasculares que la trigliceridemia en ayunas.<sup>57</sup> Un estudio prospectivo estadounidense realizado en más de 25000 mujeres sanas demostró el valor pronóstico independiente de los TG postprandiales para la ECV, incluso tras ajustar por CT, HDL-c y valores de RI (HR 1,67 (1,18-2,35) vs 1,11 (0,92-

1,34) para TG en ayunas).<sup>105</sup> De hecho, la magnitud y duración de la extrusión postprandial de TG se ha relacionado con la progresión de la arteriosclerosis.<sup>106</sup> Por todo ello, la evaluación de la LPP como alteración metabólica es más importante que el estudio de la trigliceridemia en situación basal.

En este trabajo observamos que los niveles de TG no sólo son superiores en los obesos con mayor RI a nivel basal, sino que este incremento persiste durante toda la SOG. Sin embargo, las diferencias entre grupos disminuyen durante la SOG, siendo menores a las 8 horas. El pico máximo se alcanza a las 4 horas en el grupo con menor RI, tal y como está descrito en estudios previos, que abogan por el uso de la trigliceridemia a las 4 horas como punto más representativo para el estudio de la LPP.<sup>52</sup> Sin embargo, en el subgrupo de pacientes con mayor RI el pico máximo se alcanzó más tardíamente, a las 6 horas; descendiendo por debajo de las cifras basales a las 8 horas. (ver *Figura 10*)

Estudios previos consideran inapropiadas trigliceridemias basales >150 mg/dl y postprandiales >175 mg/dl.<sup>54</sup> En nuestro caso el 22% de los obesos presentaron cifras superiores a este punto de corte en algún momento de la SOG, siendo su máxima frecuencia a las 4 horas. Al analizar la respuesta postprandial según sobrepasasen los 175 mg/dl o no, tan solo encontramos diferencias en las cifras de insulina en ayunas y HOMA-IR basal, desapareciendo éstas durante la SOG.

La duración de la LPP es relevante, ya que la evidencia actual apoya que los remanentes de QM son aterogénicos y, aunque su paso a la pared arterial es menor que el de las partículas LDL-c, su salida de la misma también está disminuida, siendo 20 veces menor.<sup>107</sup> Los TG y remanentes de QM están directamente relacionados, con un coeficiente de correlación de 0,99. Por ello, aunque midamos TG postprandiales podemos asumir el incremento posterior de los remanentes de QM.<sup>54</sup> La capacidad lesiva de los QM sobre la pared vascular no reside exclusivamente en la partícula intacta, sino también en los productos de su lipólisis que actúan indirectamente estimulando la inflamación. Sin embargo, nosotros no hemos encontrado correlación entre la LPP y las cifras de PCRus, los factores del complemento C3 y C4 o el

fibrinógeno plasmático. Otros estudios agudos sobre la LPP (mediante test de tolerancia oral grasa) tampoco encontraron asociación con cambios en la PCRus.<sup>66</sup>

Al comparar con otro tipo de pacientes estudiados por nuestro grupo, destaca una menor LPP en los obesos mórbidos respecto a la observada en los pacientes con obesidad abdominal, DM tipo 2 o hipercolesterolemia primaria. Cabe destacar la respuesta a la SOG rica en grasa insaturada de los obesos abdominales (pacientes con sobrepeso u obesidad clase I y perímetro de la cintura superior a 102 cm en hombres o 88 cm en mujeres); ya que a pesar de presentar cifras de TG en ayunas superiores al subgrupo de obesos mórbidos con mayor RI, a las 6 y 8 horas muestran valores inferiores ( $111,5 \pm 36,4$  vs  $123,9 \pm 53,9$  mg/dl, respectivamente).

Otras publicaciones relacionan una mayor LPP prequirúrgica en obesos mórbidos con un mayor descenso de la RI tras la cirugía bariátrica, al año.<sup>67</sup> El estudio de Waldmann et al, evaluó la LPP antes y a los 3 meses de una gastrectomía tubular, mostrando una mejoría de RI y LPP con descensos significativos en las concentraciones postprandiales de TG.<sup>65</sup> Esto refleja un descenso de los remanentes de QM, lo que probablemente se traduzca en un descenso significativo del riesgo cardiovascular. Sin embargo, son necesarios más estudios que evalúen la respuesta postquirúrgica a largo plazo (pérdida de peso y comorbilidades) en relación a la respuesta postprandial, para poder recomendar su realización sistemática previa a la intervención.

A diferencia de los TG séricos, las cifras de apoB y colesterol no-HDL no se influyen por la situación prandial.<sup>108</sup> Sin embargo, nosotros sí que encontramos diferencias a las 8h en las cifras de colesterol total, apoB, LDL-c y colesterol no HDL-c respecto a la situación basal según el grado de RI; con mayores descensos en el grupo con mayor RI. Además, al evaluar cada punto de la SOG observamos diferencias a las 8h en HDL-c, produciéndose un aumento del mismo hasta retornar casi a sus cifras basales en el grupo con mayor sensibilidad a la insulina.

Al realizar la prueba también evaluamos los parámetros del metabolismo hidrocarbonado, ya que la sensibilidad a la insulina es modulada por múltiples factores entre ellos los hábitos dietéticos, incluyendo la composición de la dieta.<sup>109</sup> Tras la ingesta del preparado rico sobre todo en MUFA se observa una mejoría en la sensibilidad a la insulina con una reducción significativa en las cifras de insulina y HOMA-IR hasta alcanzar valores mínimos a las 6 horas, siendo éstos inferiores a los definidos para establecer la presencia de RI en ambos grupos (HOMA-IR menor a 3,8 según nuestro p90).<sup>21</sup> Cabe destacar una mayor mejoría en la sensibilidad a la insulina en el grupo con mayor RI (HOMA-IR > 3,34). Además, la mejoría en la RI que se produce en nuestro estudio sucede a pesar del incremento en la trigliceridemia durante la SOG.

En este sentido, Paniagua et al compararon el área bajo la curva de la glucosa e insulina en pacientes prediabéticos insulínresistentes tras la administración de una dieta rica en MUFA, otra rica en ácidos grasos saturados y otra rica en carbohidratos, hallando una mejoría en la sensibilidad a la insulina con el consumo de MUFA (siendo los niveles de insulina progresivamente mayores con la dieta rica en carbohidratos y grasas saturadas, respectivamente).<sup>110</sup>

Otros estudios han evaluado el efecto de distintos tipos de grasa sobre la LPP y los posibles mecanismos subyacentes, ya que siguen sin conocerse por completo. Algunos autores proponen que el mecanismo por el que el consumo de MUFA mejora la sensibilidad a la insulina esté mediado por un mayor estímulo en la secreción de GLP1, que produciría una disminución de la glucemia plasmática y un retraso del vaciado gástrico. A diferencia de estos, otros trabajos que han comparado el consumo de dietas ricas en MUFAs y grasa saturada, observaron una menor LPP junto con un menor incremento de las cifras de IL-6 vía inhibición de NF- $\kappa$ B con el consumo de grasa insaturada.<sup>60</sup> En nuestro estudio observamos que aunque hay diferencias en las cifras de TG en ayunas según el grado de RI, éstas desaparecen con el consumo de un preparado rico en ácidos grasos insaturados; destacando un mayor descenso en el grupo más insulínresistente, con cifras a las 8 horas inferiores a las basales.

Por tanto, nuestros resultados muestran que tras una sobrecarga rica en grasa insaturada se produce una mejoría de la LPP, siendo este beneficio mayor en obesos con mayor RI. Este hecho es importante, ya que los sujetos con obesidad mórbida y RI presentan un elevado riesgo cardiovascular y es en este subgrupo de pacientes donde el consejo dietético podría ser especialmente relevante. Sin embargo, cabe destacar que nosotros sólo evaluamos la respuesta aguda al consumo de grasa, por lo que no puede emplearse este estudio para sustentar modificaciones dietéticas en este sentido.

## 2.2 Diferencias en el patrón de metilación en obesos mórbidos

La segunda parte de nuestro estudio se centró en el análisis de la metilación en población obesa, tanto en aquellos con SOG como en la muestra previa de pacientes del EWAS con datos basales. Para ello inicialmente se evaluaron las características del conjunto de la población. Como era de esperar, los individuos con mayor RI fueron los que presentaron un mayor peso e IMC, así como niveles significativamente superiores de glucosa e insulina en ayunas.

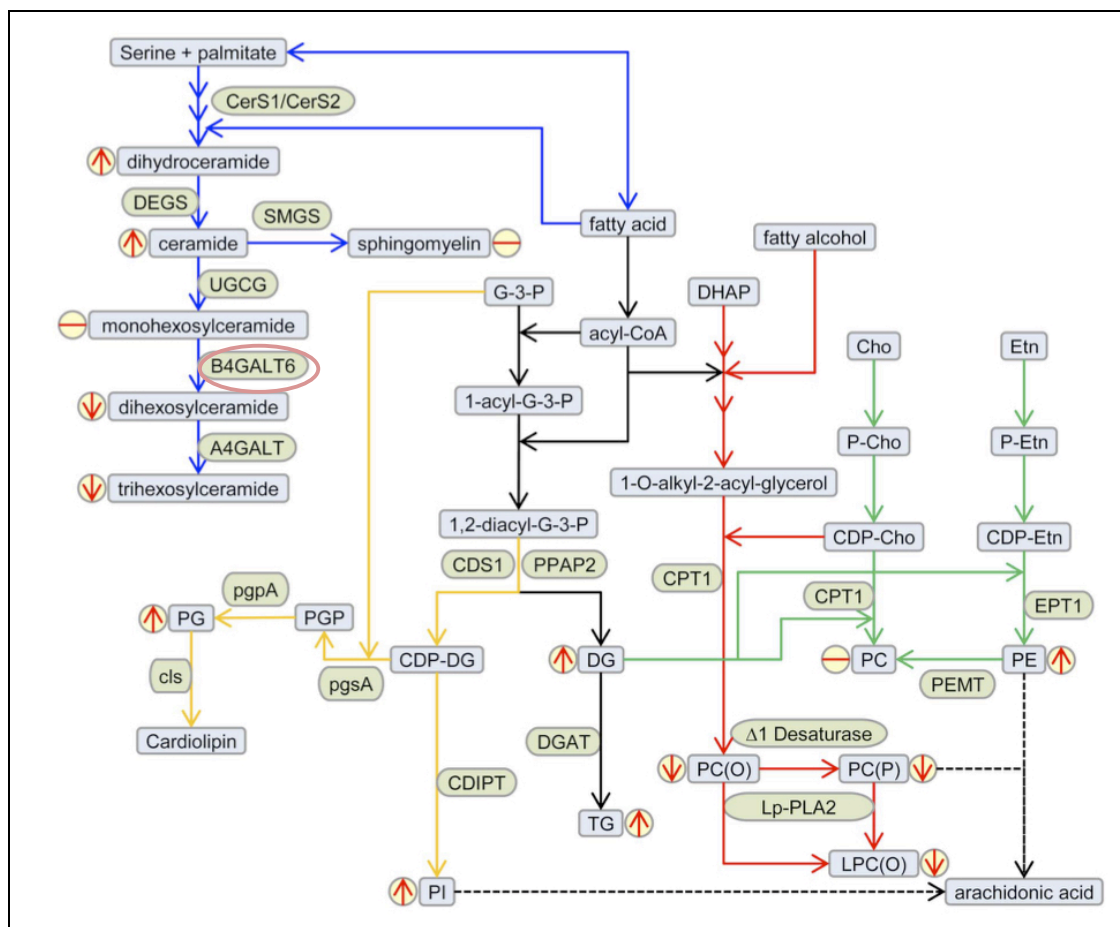
Es interesante señalar que en la selección de las posiciones a analizar, se incluyeron aquellas 11 DMRs que habían mostrado mayor asociación con DM tipo 2 en un EWAS previo. De las 11 regiones génicas estudiadas sólo 3 no presentaban una metilación completa al analizarlas mediante NGS en nuestra cohorte, y por tanto fueron los sitios confrontados (cg07064495, cg07249765 y cg22730047).

Al comparar la metilación según el grado de RI basal (mayor o menor al percentil 50 de HOMA-IR) no encontramos diferencias significativas, excepto al analizarlo por tejidos. Así, los obesos con menor RI presentaban una mayor metilación en las posiciones cg07064495 y cg22730047 de la grasa visceral. Asimismo, hemos encontrado una correlación significativa en la grasa visceral entre HOMA-IR y la metilación en cg22730047 ( $\rho$  -0,296,  $p$  0,04).

Tras revisar la literatura existente, hallamos que la posición cg07064495 se encuentra en las proximidades del promotor del gen B4GalT6 que aparentemente está relacionado con procesos importantes asociados con la homeostasis del tejido adiposo, como es la síntesis de los glicoesfingolípidos y las ceramidas, la modulación de la red inflamatoria y la sensibilidad a la insulina.<sup>111,112</sup>

El gen B4GalT6 se encuentra en el cromosoma 18q12.1, en la hebra reversa y codifica la proteína beta-1,4-galactosiltransferasa 6. Se trata de una glicoproteína de membrana tipo II con actividad galactosiltransferasa, que media en el aparato de Golgi la transferencia de galactosa desde UDP-galactosa a lactosilceramida, e interviene en la síntesis de este precursor de los glicoesfingolípidos.<sup>113</sup>

Estudios previos han relacionado esta vía metabólica, la de las ceramidas, con los procesos metabólicos alterados en la DM tipo 2 y el desarrollo de arteriosclerosis. (*Figura 20*) Destaca una regulación a la baja de las galactosiltransferasa en pacientes con DM tipo 2, con una menor conversión a dihexosilceramida. Otros estudios en animales suplementados con PUFA durante la gestación han hallado una menor concentración de lactosilceramida muscular y hepática en su descendencia, con una mayor sensibilidad a la insulina posiblemente al mejorar la señalización de la adiponectina e interferir en la secreción de citoquinas proinflamatorias a través de vías epigenéticas. Así, muchas de las alteraciones lipídicas relacionadas con esta vía parecen estar relacionadas con un incremento de AGL, lo que resalta su importancia en la disregulación de la homeostasis lipídica asociada a la DM tipo 2.<sup>112,114</sup>



**Figura 21. Vías metabólicas alteradas en la DM tipo 2.** Fuente: “Meikle P.J, Wong G, Barlow C.K, et al. Plasma lipid profiling shows similar associations with prediabetes and type 2 diabetes. PLoS ONE 2013;8(9):e74341”

En nuestra muestra encontramos la posición cg07064495 parcialmente metilada (valor  $\beta$  entre 59 y 68% en grasa visceral según el grado de RI). Una mayor metilación en los individuos con menor RI se asociaría a un silenciamiento en la expresión de dicho gen y por tanto con un menor nivel de la proteína beta-1,4-galactosiltransferasa 6; lo que produciría una menor concentración de lactosilceramidas, que mejoraría la sensibilidad, y un acúmulo de sus precursores. Sin embargo, no hemos encontrado estudios epigenéticos previos que vinculen esta posición con la obesidad o DM tipo 2.

Al analizar la metilación de esta posición según tejidos, la encontramos significativamente más metilada en linfomonocitos respecto a grasa subcutánea o



visceral. Por tanto, no nos serviría como marcador de metilación con utilidad diagnóstica en un tejido mínimamente invasivo, como es la sangre.

Por otro lado, encontramos una mayor metilación en cg22730047 en la grasa visceral de obesos con menor RI, así como una correlación significativa entre la metilación en esta posición y la RI medida por HOMA-IR. Esta posición se encuentra en el cromosoma 1 (1q23.3) en una isla CpG, aunque sin clara relación con ningún gen conocido. Dicha posición también se encuentra más metilada en grasa visceral respecto a grasa subcutánea o linfomonocitos en nuestra muestra; lo que podría tener relevancia fisiopatológica al tratarse del tejido diana en sujetos con obesidad.

### 2.2.1 Diferencias en el patrón de metilación y lipemia postprandial

Al analizar los resultados del subgrupo de pacientes a los que se realizó la SOG, objetivamos una asociación entre la metilación de cg07249765 y la respuesta postprandial de TG a las 4 horas. Sin embargo, al comparar la metilación según si la trigliceridemia plasmática a las 4 horas era mayor o menor a 175 mg/dl (punto de corte según Castro-Cabezas<sup>54</sup>) o respecto a nuestro percentil 50 (110 mg/dl), no encontramos diferencias significativas en el valor medio de metilación en esta posición (valor  $\beta$   $92,6 \pm 21,7\%$  vs  $98,5 \pm 8,6\%$ , p 0,16).

Este sitio está localizado en el cromosoma 7 (7p22.2), en el gen SDK1 (sidekick cell adhesion molecule 1) que codifica una proteína de adhesión celular relacionada con la familia de las inmunoglobulinas que guía las terminaciones axonales en las sinapsis. Se activa en situaciones de estrés celular, especialmente en caso de aumento de especies reactivas de oxígeno, y su expresión aumenta en las células cancerígenas.<sup>115</sup> Estudios previos han detectado una mayor metilación en casos de hepatocarcinoma (metilación media en promotor de SDK1 36% vs 11% en tejido hepático sano).<sup>116</sup>

Un importante gen parálogo de SDK1 es el gen FNDC3B (Fibronectin type III Domain Containing 3B), que interviene en la regulación de la adipogénesis. Su inhibición se asocia a reducciones de PPAR $\gamma$ , al afectar a la diferenciación adipocítica.<sup>117</sup>

Al investigar la posible relación entre la metilación en esta posición y la patogenia de la obesidad, encontramos que algunos estudios previos vinculan la obesidad con los efectos de SDK1, aunque los mecanismos subyacentes se desconocen.<sup>118</sup>

Las otras posiciones evaluadas en relación a la trigliceridemia a las 4 horas, sólo mostraban diferencias al considerar el tejido analizado, siendo éste el responsable de las diferencias en el modelo. Por tanto, cabe destacar la importancia del tejido a analizar dado que los cambios epigenéticos son frecuentemente tejido-específicos; tal y como apoyan nuestros resultados.<sup>119</sup>

Tal y como hemos comentado previamente, los estudios disponibles sobre modificaciones del epigenoma y LPP son escasos.<sup>97</sup> Entre las DRMs asociadas con la trigliceridemia tras la SOG no se encuentran las posiciones analizadas en nuestro estudio, ni los genes en los que éstas se encuentran. Sin embargo, la ausencia de estudios previos en estas localizaciones no debe depreciar su importancia.

Es posible que debido a la ausencia de grupo control, sujetos sin obesidad con mayor o menor grado de RI, y al reducido tamaño muestral no hallamos encontrado diferencias en el patrón de metilación según la RI y la extrusión postprandial de TG.

### 3. Limitaciones

La principal limitación de este trabajo es que el número de sujetos evaluados es pequeño, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que se haya producido un error tipo II y por tanto, a algún factor que pudiera haber contribuido a que la asociación descrita no haya sido identificada.

Además, al comparar dos grupos de obesos mórbidos según el grado de RI, siendo ambos modelos extremos de la enfermedad y careciendo de grupo control; dificulta la posibilidad de hallar diferencias entre los grupos. Por tanto, sería de interés la comparación de estos resultados con los de individuos sanos o con sobrepeso, así como con obesos mórbidos diabéticos; para conocer la evolución y los posibles cambios epigenéticos en las distintas fases de la obesidad.

Asimismo, al estudiar exclusivamente el efecto agudo de la grasa insaturada no podemos asegurar que los cambios observados no se deban a la ausencia de otros macronutrientes. Para ello se debería haber comparado la SOG actual y otra con agua o con una comida mixta rica en hidratos de carbono. Además, al tratarse de una intervención puntual con un preparado lipídico comercial que no representa la ingesta fisiológica de grasa, los resultados no pueden extrapolarse para plantear estrategias terapéutico-dietéticas a medio o largo plazo.

Otro punto a tener en cuenta es que en este trabajo los genes seleccionados para realizar el estudio lo fueron en base a la identificación de diferencias en el patrón de metilación mediante EWAS en función de la presencia o no de DM tipo 2. El estudio previo del epigenoma se llevó a cabo mediante el Infinium Human Methylation450K Array (de Illumina), que permite evaluar la metilación de <2% del genoma aunque incluye el 96% de las islas CpGs y alrededores. Además, se realizó en un pequeño número de individuos debido a las limitaciones presupuestarias. Sin embargo, las técnicas de secuenciación, como la NGS empleada en nuestro estudio, han demostrado ser más robustas y permitir su posible aplicación en la práctica clínica.

#### 4. Perspectivas de futuro

Los datos obtenidos en este estudio deben entenderse como preliminares, aunque necesarios, para poder alcanzar mayores conocimientos en la epigenética de los genes involucrados en la obesidad e insulinoresistencia. Los resultados obtenidos con la sobrecarga oral grasa insaturada nos han permitido seleccionar una población, la de obesos con mayor resistencia a la insulina, para ampliar en estudios posteriores el efecto sobre la arteriosclerosis de la suplementación a medio o largo plazo con grasa insaturada. Así mismo, los resultados del epigenoma nos permitirán diseñar nuevos estudios sobre el patrón de metilación en cg07064495, cg07249765 y cg22730047 y su impacto en el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, debiendo aconsejar para ello el uso de la grasa visceral.

Una de las acciones a tomar de cara al futuro de este proyecto es el análisis de las posibles variaciones del epigenoma, a partir de los datos ya generados, en una muestra fenotípicamente divergente; incluyendo un grupo control de sujetos normopeso o con sobrepeso, no diabéticos y con menor y mayor RI y, un grupo de obesos mórbidos diabéticos. De esta forma se podrían comparar la metilación desde las etapas más precoces sin RI hasta su estado en el obeso mórbido diabético. Esto debería completarse con el estudio de su expresión proteica, así como del conjunto de vías metabólicas alteradas.

Se ha visto que el gen B4GalT6, cuya función en la vía de las ceramidas parece estar relacionada con las alteraciones metabólicas en la DM tipo 2, presenta asociación con la insulinoresistencia en la grasa visceral. Una vía interesante sería el estudio del gen completo mediante secuenciación, y en caso de identificar variaciones de efecto funcional, completarlo con estudios funcionales.

Del mismo modo, el presente trabajo muestra una asociación entre el gen SDK1 y la lipemia postprandial; lo que nos abre una ventana a la investigación del papel de esta ruta y su posible impacto cardiovascular a medio-largo plazo.

Dado que estos pacientes han sido intervenidos de cirugía bariátrica, interesaría conocer la influencia de estas alteraciones epigenéticas en la respuesta terapéutica (pérdida de peso y desarrollo de complicaciones cardiometabólicas) y la posterior respuesta postprandial tras la pérdida ponderal; así como si se mantienen a medio plazo.



## VI. Conclusiones





De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo y los resultados obtenidos, se formulan las siguientes conclusiones:

PRIMERA - Los obesos mórbidos con mayor insulinoresistencia tras una sobrecarga oral grasa rica en grasa insaturada experimentaron un mayor descenso de la lipemia postprandial. Este efecto beneficioso sobre la lipemia postprandial podría identificar una población de obesos, aquellos con mayor resistencia a la insulina, en los que realizar nuevos estudios para valorar si la suplementación a medio o largo plazo con grasa insaturada reduce los factores aterogénicos.

SEGUNDA - Se ha identificado una asociación entre el índice de resistencia a la insulina y la metilación en cg22730047 del cromosoma 1q23.3 en la grasa visceral de los obesos mórbidos no diabéticos.

TERCERA - En la grasa visceral de estos pacientes, se ha asociado el grado de resistencia a la insulina con el marcador epigenético ubicado en el promotor del gen codificante de beta-1,4-galactosiltransferasa 6 (B4GalT6), el cual participa en la síntesis de las ceramidas.

CUARTA - No hemos encontrado un patrón de metilación específico asociado a la presencia de diabetes mellitus tipo 2, entre obesos con mayor y menor resistencia a la insulina, en función de la respuesta postprandial. Sin embargo, la respuesta postprandial, evaluada mediante la trigliceridemia a las 4 horas de una sobrecarga oral grasa, sí se asocia al porcentaje de metilación de cg07249765 localizado en el gen SDK1.

QUINTA - Lamentablemente de nuestro estudio se puede concluir que, en las regiones estudiadas asociadas a la presencia de diabetes mellitus tipo 2, el patrón de

metilación en sangre periférica no es predictivo de lo que ocurre en grasa visceral, como tampoco lo fue el epigenoma hallado en grasa subcutánea.

Por todo lo expuesto, podemos afirmar que esta tesis doctoral constituye un paso importante en el camino de la lipidómica, ya que aporta nuevas áreas de estudio en las que profundizar, identificando precozmente los cambios epigenéticos tejido-específicos e intentando contener el desarrollo de complicaciones cardio-metabólicas en estos sujetos.

## VII. Bibliografía



1. WHO | World Health Organization. *WHO* Available at: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/). (Accessed: 14th February 2017)
2. Ni Mhurchu C, Rodgers A, Pan WH, Gu DF, Woodward M, Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Body mass index and cardiovascular disease in the Asia-Pacific Region: an overview of 33 cohorts involving 310 000 participants. *Int. J. Epidemiol.* 2004;33:751–758
3. Finucane MM, Stevens GA, Cowan M, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet Lond Engl.* 2011;377:557–67
4. Martín-Ramiro JJ, Álvarez-Martín E, Gil-Prieto R. Mortalidad atribuible al exceso de peso en España. *Med Clínica.* 2014;142:526–30
5. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet Lond Engl.* 2014;383:999–1008
6. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115–26.
7. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med.* 2017;376:254–66
8. Skinner AC, Perrin EM, Moss LA, Skelton JA. Cardiometabolic Risks and Severity of Obesity in Children and Young Adults. *N Engl J Med.* 2015;373:1307–17
9. WHO | Obesity and overweight. *WHO* Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. (Accessed: 15th February 2017)
10. 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;13:388–92
11. Gómez Gerique JA, Rubio Herrera MA, Gómez de la Cámara A, Gutierrez Fuentes JA. DRECE I. *Med Clin.* 2011;12:6–15
12. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among us adults, 1999-2008. *JAMA.* 2010;303:235–41
13. Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Bes-Rastrollo M, Toledo E, García-López M,

Martínez-González M.A. Tendencia creciente de la prevalencia de obesidad mórbida en España: de 1,8 a 6,1 por mil en 14 años. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:424–6

14. Ravussin E, Swinburn BA. Pathophysiology of obesity. *Lancet*. 1992;340:404–8

15. Bray, G, Bouchard, C, James, WPT. Definitions and proposed current classifications of obesity. In: *Handbook of obesity*. Marcel Dekker. New York; 1998. p. 31–40

16. WHO: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Geneva; 2000. (WHO Technical Report Series). Report No.: 894

17. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet*. 2005;366:1059–62

18. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143–421

19. Obesity | Guidance and guidelines | NICE [Internet]. [cited 2014 Sep 19]. Available from: <http://www.nice.org.uk/guidance/CG43>

20. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115:1111–9

21. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population. *Med Clin* 2001;117:530-3

22. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801:209–14

23. Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol*. 2007;157:S39–45

24. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulinresistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:1553–67

25. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. 2016;126:12–22

26. Karelis AD. Metabolically healthy but obese individuals. *The Lancet*. 2008;372:1281–3

27. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes

- among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med.* 2008;168:1617-24
28. Kramer CK, Zinman B, Retnakaran R. Are metabolically healthy overweight and obesity benign conditions?: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2013;159:758-69
29. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014;56:369-81
30. De Larochelière E, Côté J, Gilbert G, Bibeau K, Ross M-K, Dion-Roy V, et al. Visceral/epicardial adiposity in nonobese and apparently healthy young adults: Association with the cardiometabolic profile. *Atherosclerosis.* 2014;234:23-9
31. Lim S, Meigs JB. Links Between Ectopic Fat and Vascular Disease in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1820-6
32. Britton KA, Massaro JM, Murabito JM, Kreger BE, Hoffmann U, Fox CS. Body Fat Distribution, Incident Cardiovascular Disease, Cancer, and All-Cause Mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:921-5
33. Chughtai HL, Morgan TM, Rocco M, Stacey B, Brinkley TE, Ding J, et al. Renal Sinus Fat and Poor Blood Pressure Control in Middle-Aged and Elderly Individuals at Risk for Cardiovascular Events. *Hypertension.* 2010;56:901-6
34. Iacobellis G, Lonn E, Lamy A, Singh N, Sharma AM. Epicardial fat thickness and coronary artery disease correlate independently of obesity. *Int J Cardiol.* 2011;146:452-4
35. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia.* 2000;43:1498-506
36. Goossens GH, Bizzarri A, Venticlef N, Essers Y, Cleutjens JP, Konings E, et al. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation.* 2011;124:67-76
37. Ebbert JO, Jensen MD. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients.* 2013;5:498-508
38. Kabir M, Catalano KJ, Ananthnarayan S, Kim SP, Citters GWV, Dea MK, et al. Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral

adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2005;288:E454–61

39. Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol.* 2012;57:91–7

40. Barbarroja N, López-Pedrerá R, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, et al. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochem J.* 2010;430:141–9

41. Jensen MD. Role of Body Fat Distribution and the Metabolic Complications of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:S57–63

42. Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman RN. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes.* 2002;51:755–61

43. Taira K, Hikita M, Kobayashi J, Bujo H, Takahashi K, Murano S, et al. Delayed postprandial lipid metabolism in subjects with intra-abdominal visceral fat accumulation. *Eur J Clin Invest.* 1999;29:301–8

44. Frayn KN. Insulin resistance, impaired postprandial lipid metabolism and abdominal obesity. A deadly triad. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent.* 2002;11:31–40

45. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:S64–73

46. Buckley ML, Ramji DP. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852:1498–510

47. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444:860–7

48. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23:201–29

49. Tenenbaum A, Klempfner R, Fisman EZ. Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:159

50. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a Cardiovascular Risk Factor. *Am J Cardiol.* 1998;81:7B–12B

51. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation.* 1979;60:473–85



52. Mihas C, Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, Lairon D, Nordestgaard BG, et al. Diagnostic value of postprandial triglyceride testing in healthy subjects: a metaanalysis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9:271–80
53. Klop B, Proctor SD, Mamo JC, Botham KM, Castro Cabezas M. Understanding postprandial inflammation and its relationship to lifestyle behaviour and metabolic diseases. *Int J Vasc Med*. 2012:947417
54. Castro Cabezas M, Burggraaf B, Klop B. Is it time to break the fast?-a paradigm shift in clinical lipidology. *Ann Transl Med*. 2016;4:430
55. Bergeron N, Havel RJ. Assessment of postprandial lipemia: nutritional influences. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:43–52
56. Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr*. 2007;98:458–73
57. Alipour A, Elte JWF, van Zaanen HCT, Rietveld AP, Castro Cabezas M. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atheroscler Suppl*. 2008;9:39–44
58. Goldberg IJ, Eckel RH, McPherson R. Triglycerides and heart disease: still a hypothesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1716–25
59. Cardona F, José Tinahones F. [El eslabón perdido del síndrome metabólico: hiperlipemia posprandial y estrés oxidativo]. *Endocrinol Nutr*. 2006;53:345–52
60. de Vries MA, Klop B, Eskes SA, van der Loos TLJM, Klessens-Godfroy FJM, Wiebolt J, et al. The postprandial situation as a pro-inflammatory condition. *Clínica E Investig En Arterioscler*. 2014;26:184–92
61. Kannel WB, Vasan RS. Triglycerides as vascular risk factors: new epidemiologic insights. *Curr Opin Cardiol*. 2009;24:345–50
62. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2001 Feb 1;154(2):475–83
63. Martinez-Hervas S, Navarro I, Real JT, Artero A, Peiro M, Gonzalez-Navarro H, et al. Unsaturated Oral Fat Load Test Improves Glycemia, Insulinemia and Oxidative Stress Status in Nondiabetic Subjects with Abdominal Obesity. *PloS One*. 2016;11(8):e0161400

64. Cortes R, Martinez-Hervas S, Ivorra C, De Marco G, Gonzalez-Albert V, Rojo-Martínez G, et al. Enhanced reduction in oxidative stress and altered glutathione and thioredoxin system response to unsaturated fatty acid load in familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem.* 2014;47:291-7
65. Waldmann E, Hüttl TP, Göke B, Lang R, Parhofer KG. Effect of sleeve gastrectomy on postprandial lipoprotein metabolism in morbidly obese patients. *Lipids Health Dis.* 2013;12:82
66. Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Murri M, Boto-Ordoñez M, Perez-Martinez P, Andres-Lacueva C, et al. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res.* 2012;53:973-8
67. Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI, Clemente-Postigo M, Fernandez-Garcia D, Mingrone G, Cardona F. Postprandial hypertriglyceridemia predicts improvement in insulin resistance in obese patients after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg.* 2013;9:213-8
68. Fernández-Real JM, García-Fuentes E, Moreno-Navarrete JM, Murri-Pierri M, Garrido-Sánchez L, Ricart W, et al. Fat overload induces changes in circulating lactoferrin that are associated with postprandial lipemia and oxidative stress in severely obese subjects. *Obes Silver Spring Md.* 2010;18:482-8
69. Tinahones FJ, Murri-Pierri M, Garrido-Sánchez L, García-Almeida JM, García-Serrano S, García-Arnés J, et al. Oxidative stress in severely obese persons is greater in those with insulin resistance. *Obes Silver Spring Md.* 2009;17:240-6
70. Stunkard AJ, Sørensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, et al. An adoption study of human obesity. *N Engl J Med.* 1986;314:193-8
71. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The Body-Mass Index of Twins Who Have Been Reared Apart. *N Engl J Med.* 1990;322:1483-7
72. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal eighteen new loci associated with body mass index. *Nat Genet.* 2010;42:937-48
73. Bessesen DH. Update on obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2027-34
74. Bogardus C. Missing Heritability and GWAS Utility. *Obesity.* 2009;17:209-10
75. The genetics of adiposity. *Curr Opin Genet Dev.* 2018;50:86-95

76. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet.* 2008;40:695
77. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461:747–53
78. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol.* 2009;219:243–50.78
79. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS; Members of EpiSCOPE. Epigenetics and human obesity. *Int. J. Obes.* 2015;39,85–97
80. Waterland R.A., Jirtle R.L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition.* 2004;20:63-8
81. Slyvka Y, Zhang Y, Nowak FV. Epigenetic effects of paternal diet on offspring: emphasis on obesity. *Endocrine.* 2015;48:36–46
82. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci* 2016;130:943-86
83. Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie.* 2012;94:2242–63
84. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13:484-92
85. Rivera CM, Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell.* 2013;155:39–55
86. Asmar F, Sogaard A, Grønbaek K. Chapter 2 - DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cancer. In: Gray SG, editor. *Epigenetic Cancer Therapy* Boston: Academic Press; 2015. p. 9–30
87. Szyf M, McGowan P, Meaney MJ. The social environment and the epigenome. *Environ Mol Mutagen* 2008;49:46-60
88. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2571–87
89. BLUEPRINT consortium. Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. *Nat Biotechnol.* 2016;34:726–37
90. Mendelson MM, Marioni RE, Joehanes R, Liu C, Hedman AK, Asilbekyan S, et al.

Association of Body Mass Index with DNA Methylation and Gene Expression in Blood Cells and Relations to Cardiometabolic Disease: A Mendelian Randomization Approach. *PLoS Med* 2017;14:e1002215

91. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *The Lancet*. 2014;383:1990–8

92. Remely M, de la Garza AL, Magnet U, Aumueller E, Haslberger AG. Obesity: epigenetic regulation – recent observations. *Biomol Concepts*. 2015;6:163–75

93. Na YK, Hong HS, Lee DH, Lee WK, Kim DS. Effect of body mass index on global DNA methylation in healthy Korean women. *Mol Cells*. 2014;37:467–72

94. Schoettl T, Fischer IP, Ussar S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol*. 2018;221:162958

95. Barajas-Olmos F, Centeno-Cruz F, Zerrweck C, Imaz-Rosshandler I, Martínez-Hernández A, Cordova EJ, et al. Altered DNA methylation in liver and adipose tissues derived from individuals with obesity and type 2 diabetes. *BMC Med Genet*;2018;19:28

96. Hidalgo B, Irvin MR, Sha J, Zhi D, Aslibekyan S, Absher D, et al. Epigenome-Wide Association Study of Fasting Measures of Glucose, Insulin, and HOMA-IR in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network Study. *Diabetes*. 2014;63:801–7

97. Parnell LD, Ordovas JM, Lai C-Q. Environmental and epigenetic regulation of postprandial lipemia. *Curr Opin Lipidol*. 2018;29:30–5

98. Bray GA. Pathophysiology of obesity. *Am J Clin Nutr*. 1992;55:488S–494S

99. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499–502

100. Srisawasdi P, Chaloeysup S, Teerajetgul Y, Pocathikorn A, Sukasem C, Vanavanan S, et al. Estimation of plasma small dense LDL cholesterol from classic lipid measures. *Am J Clin Pathol*. 2011;136:20–9

101. Radziuk J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4426–33

102. Fernyhough ME, Vierck JL, Hausman GJ, Mir PS, Okine EK, Dodson MV. Primary adipocyte culture: adipocyte purification methods may lead to a new understanding of adipose tissue growth and development. *Cytotechnology*. 2004;46:163–72

103. Mero N, Syväne M, Eliasson B, Smith U, Taskinen MR. Postprandial elevation of ApoB-48-containing triglyceride-rich particles and retinyl esters in normolipemic males who smoke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2096–102
104. Layman DK, Baum JI. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr.* 2004;134:968S–73S
105. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007;298:309-16
106. Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med.* 1999;246:341–55
107. de Vries MA, Klop B, Alipour A, van de Geijn G-JM, Prinzen L, Liem AH, et al. In vivo evidence for chylomicrons as mediators of postprandial inflammation. *Atherosclerosis.* 2015;243:540–5
108. de Vries M, Klop B, Castro Cabezas M. The use of the non-fasting lipid profile for lipid-lowering therapy in clinical practice - point of view. *Atherosclerosis.* 2014;234:473–5
109. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2004;23:447–56
110. Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sánchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, et al. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr.* 2007;26:434–44
111. CSC Genome Browser Home [Internet]. [cited 2018 Jul 11]. Available from: <https://www.genome.ucsc.edu/>
112. Kasbi-Chadli F, Ferchaud-Roucher V, Krempf M, Ouguerram K. Direct and maternal n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation improved triglyceridemia and glycemia through the regulation of hepatic and muscle sphingolipid synthesis in offspring hamsters fed a high-fat diet. *Eur J Nutr.* 2016;55:589–99
113. Chatterjee S, Kolmakova A, Rajesh M. Regulation of lactosylceramide synthase (glucosylceramide beta1-->4 galactosyltransferase); implication as a drug target. *Curr Drug Targets.* 2008;9:272–81
114. Meikle PJ, Wong G, Barlow CK, Weir JM, Greeve MA, MacIntosh GL, et al.

Plasma lipid profiling shows similar associations with prediabetes and type 2 diabetes. *PloS One*. 2013;8:e74341

115. Mäki-Nevala S, Sarhadi VK, Knuutila A, Scheinin I, Ellonen P, Lagström S, et al. Driver Gene and Novel Mutations in Asbestos-Exposed Lung Adenocarcinoma and Malignant Mesothelioma Detected by Exome Sequencing. *Lung*. 2016;194:125–35

116. Gentilini D, Scala S, Gaudenzi G, Garagnani P, Capri M, Cescon M, et al. Epigenome-wide association study in hepatocellular carcinoma: Identification of stochastic epigenetic mutations through an innovative statistical approach. *Oncotarget*. 2017;8:41890–902

117. Tominaga K, Kondo C, Johmura Y, Nishizuka M, Imagawa M. The novel gene *fad104*, containing a fibronectin type III domain, has a significant role in adipogenesis. *FEBS Lett*. 2004;577:49–54

118. Rhee J-K, Lee J-H, Yang HK, Kim T-M, Yoon K-H. DNA Methylation Profiles of Blood Cells Are Distinct between Early-Onset Obese and Control Individuals. *Genomics Inform*. 2017;15:28–37

119. Waterland RA. Epigenetic mechanisms affecting regulation of energy balance: many questions, few answers. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:337–55

ISBN: 978-84-09-08048-9

