

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA 3139



TESIS DOCTORAL

Metilación del ADN de adipocitos en sujetos con obesidad mórbida

Juncal Martínez Ibáñez

DIRECTORES:

Dr. Juan Francisco Ascaso Gimilio

Dr. José Tomás Real Collado

Valencia, febrero de 2019

ISBN: 978-84-09-09552-0

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA 3139



Metilación del ADN de adipocitos en sujetos con obesidad mórbida

Juncal Martínez Ibáñez

Licenciada en Medicina – Especialista en Endocrinología y Nutrición

Dirigida por:

Prof. D. Juan Francisco Ascaso Gimilio

Profesor Emérito. Catedrático de Medicina. Departament de Medicina. Universitat de València

Dr. José Tomás Real Collado

Catedrático de Medicina. Departament de Medicina. Universitat de València

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Ascaso Gimilio, Juan Francisco, N.I.F. 73722920P, Departamento/Instituto: Medicina, Centro: Medicina y Odontología

2.- Apellidos y nombre: Real Collado, José Tomás, N.I.F. 24329722T, Departamento/Instituto: Medicina, Centro: Medicina y Odontología

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: .N.I.F. , Departamento/Instituto: Centro:

Directores de la tesis doctoral: "Metilación del ADN de adipocitos en sujetos con obesidad mórbida"

de D/Dña. Juncal Martínez Ibáñez,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe **favorable** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: València, 14 de febrero de 2019

Fdo.: JF Ascaso Gimilio



Director/a

Fdo.: JT Real Collado



Director/a

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Agradecimientos

Al Doctor Real y al Doctor Ascaso, por ser ejemplares como médicos, como investigadores, como docentes y como personas, además de proponerme la idea de realizar una tesis doctoral y poner todo lo que ha estado a su alcance para ayudarme a cumplir este objetivo.

A Geles Viguer y Ana Albert, porque sin su disposición absoluta y su inestimable ayuda en las extracciones no habría muestras que analizar.

A Verónica Albert y Laura Olivares, por los cientos de horas que han dedicado al procesado de la muestras, a logística de conservación y envíos de muestras, aún a costa de su tiempo personal. A Felipe Javier Chaves y Pilar Rentero por su enorme trabajo en el análisis de la metilación y por resolver todas las dudas que me han podido surgir en el transcurso.

A todos mis R-mayores, R-pequeños y en especial a la Doctora Ester Savall, por su apoyo, su ayuda en todos los aspectos y su amistad.

A todos los pacientes por su voluntad de participar en esta investigación.

A mis padres, Eduardo y Lourdes, mi hermana Ana y a Pablo, por su apoyo constante, sus ánimos y por hacerme quien soy. Esta tesis es tan vuestra como mía.

Índice

Abreviaturas	11
Tablas y figuras	13
I. Introducción	15
1. Obesidad	17
2. Resistencia a la insulina (RI).....	18
3. Diabetes mellitus tipo 2.....	24
4. Genética.....	25
5. Epigenética.....	27
II. Hipótesis y objetivos	33
III. Sujetos y métodos	37
1. Sujetos	39
2. Métodos.....	41
IV. Resultados	47
1. Características generales del grupo completo	49
2. Estudio de los tejidos.....	52
V. Discusión	83
1. Métodos.....	85
2. Selección de tejidos a analizar y análisis de las muestras	86
3. Resultados obtenidos	87
4. Limitaciones del estudio	90
VI. Conclusiones	93
VII. Bibliografía	97

Abreviaturas

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CT: Colesterol total

cHDL: Colesterol asociado a lipoproteína de alta densidad

cLDL: Colesterol asociado a lipoproteína de baja densidad

CpG: Dinucleótido citosina-guanina

DCCT: *The Diabetes Control and Complications Trial*

DE: Desviación estándar

DMP: (*Differentially methylated positions*). Posiciones con metilación diferencial

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DNMT: (*DNA methyltransferases*). ADN metiltransferasas

GIANT: ("Genetic Investigation of Anthropometric Traits")

GWAS: *Genome wide association studies*

G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa

HbA1C: Hemoglobina glicosilada

HDL: (*High density lipoprotein*). Lipoproteína de alta densidad

IDL: (*Intermediate density lipoprotein*). Lipoproteína de densidad intermedia

IMC: Índice de masa corporal

IQ: Intervención quirúrgica

IRS-2: *Insulin receptor substrate 2*

LDL: (*Low density lipoprotein*). Lipoproteína de baja densidad

MTP: Proteína microsomal transferidora de triglicéridos

NS: No significativo

NYHA: New York Heart Association

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PKB: Protein kinasa B

PCSK1: Convertasa de prohormonas 1

POMC: Proopiomelanocortina

PPAR γ : (*Peroxisome-proliferator activated receptor gamma*)

RI: Resistencia a la insulina

SNP: (*Single nucleotide polymorphism*). Polimorfismo de nucleótido único

TAD: Tensión arterial diastólica

TAS: Tensión arterial sistólica

TG: Triglicéridos

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TSH: Hormona estimulante de tiroides

TSS (*Transcription start site*): lugar de inicio de la transcripción

VLDL: (*Very low density lipoprotein*). Lipoproteína de muy baja densidad

Tablas y figuras

Figura 1. Mecanismos potenciales por los cuales la adiposidad visceral podría estar relacionada con la resistencia a la insulina	Pág. 20
Tabla 1. Regiones del ADN con respecto a islas CpG	Pág. 29
Figura 2. Diseño del estudio	Pág. 41
Figura 3. Recta patrón para la cuantificación de muestras de DNA con Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Pág. 43
Figura 4. Esquema del procedimiento de análisis de metilación	Pág. 45
Tabla 2. Características antropométricas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio	Pág. 49
Tabla 3. Características bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio	Pág. 50
Tabla 4. Características antropométricas y clínicas: comparativa entre sujetos con diabetes y sujetos sin diabetes	Pág. 51
Tabla 5. Características bioquímicas: comparativa entre sujetos con diabetes y sujetos sin diabetes	Pág. 52
Figura 5. Representación de beta (porcentaje de metilación) en las diferentes muestras de grasa subcutánea analizadas	Pág. 53
Figura 6. Representación del género de los sujetos estudiados (representado como: masculino -azul o femenino-rosa). Muestras de grasa subcutánea	Pág. 54
Figura 7. Representación de la calidad de las muestras analizadas en cuanto a los sitios de metilación. Grasa subcutánea	Pág. 55
Figura 8. Representación de los patrones de metilación de las diferentes muestras de grasa subcutánea estudiadas ajustado tras eliminar sitios de metilación localizados en los cromosomas sexuales y sitios polimórficos	Pág. 57
Figura 9. Representación de beta (porcentaje de metilación) en las diferentes muestras de grasa visceral analizadas	Pág. 58
Figura 10. Representación del género de los sujetos estudiados (representado como: masculino -azul o femenino-rosa). Grasa visceral	Pág. 59
Figura 11. Representación de la calidad de las muestras analizadas en cuanto a los sitios de metilación. Grasa visceral	Pág. 60

Figura 12. Representación de beta (porcentaje de metilación) en las diferentes muestras de grasa visceral analizadas, tras normalización, depurado y eliminación de muestras inadecuadas	Pág. 61
Figura 13. Posiciones con metilación diferencial ($\Delta\beta >10\%$ entre casos y controles) en grasa subcutánea	Pág. 63
Figura 14. Posiciones con metilación diferencial ($\Delta\beta >10\%$ entre casos y controles) en grasa visceral	Pág. 73
Tabla 6. Relación de posiciones con $\Delta\beta$ (casos - controles) mayor a 15% en adipocitos de tejido adiposo subcutáneo	Pág. 82
Tabla 7. Relación de posiciones con $\Delta\beta$ (casos - controles) mayor a 15% en adipocitos de tejido adiposo visceral	Pág. 82

I. Introducción

1. Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, de elevada prevalencia y creciente incidencia en los países desarrollados. Datos extraídos del estudio ENPE mostraron una prevalencia de obesidad en España del 21,6% en la población general de 25 a 64 años (el 22,8% en hombres y el 20,5% en mujeres)(1). Las proyecciones a largo plazo indican que en el año 2030 el número de pacientes con obesidad en el mundo superará los 1.120 millones (2).

Esta enfermedad es un problema sanitario de primer orden por diversos motivos: por ser un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, por asociarse con el desarrollo de comorbilidades como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión arterial, dislipemia mixta secundaria, síndrome de apnea obstructiva del sueño o la artrosis, por su relación con varios tipos de cáncer (3–5) y por el aumento de mortalidad asociado (6,7). Dadas las proporciones epidémicas que ha alcanzado la obesidad, el conocimiento de los mecanismos subyacentes entre ésta y sus comorbilidades es una prioridad.

En el año 2004, se estimaba en unos 2.500 millones de euros, equivalente al 7% del gasto sanitario español, el coste atribuible a la obesidad y enfermedades derivadas de ella, según declaraciones del presidente de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) en aquel momento.

A nivel individual, la obesidad ocurre cuando se acumulan cantidades anormales de triglicéridos en el tejido adiposo y se liberan del tejido adiposo como ácidos grasos libres, con efectos deletéreos (8). El acúmulo excesivo de grasa ocurre cuando la ingesta calórica excede el gasto energético, aunque los individuos responden de manera diferente a este desequilibrio debido a predisposiciones genéticas variables (9). Además existen otros factores, como la nutrición materna perinatal (10), los factores psicosociales, horarios de trabajo, disminución de horas de sueño (11) y la exposición a sustancias que actúan como disruptores endocrinológicos (12), que pueden favorecer el exceso de peso.

Diversas técnicas de genómica y proteómica se han utilizado para el estudio de la predisposición a la obesidad, así como sus alteraciones metabólicas. Es importante remarcar que el fenotipo obesidad tiene una variable expresión de complicaciones cardiometabólicas: el mismo grado de obesidad en distintos pacientes puede llevar o no a alteraciones metabólicas, o ser estas de diferente gravedad.

El conocimiento de la fisiopatología del proceso, el descubrimiento de biomarcadores precoces del desarrollo de complicaciones, como por ejemplo la diabetes mellitus tipo 2, y la evaluación de los posibles tratamientos tiene gran interés para la investigación traslacional.

1.1. Criterios diagnósticos

El término obesidad supone un aumento de masa grasa. Sin embargo, los métodos actuales para la determinación de masa grasa corporal no están disponibles en la práctica clínica habitual. Por ello, frecuentemente, se emplean métodos indirectos que estiman la masa grasa (por ejemplo, la antropometría).

El índice de masa corporal (IMC) (peso en kilogramos dividido por la talla en metros elevada al cuadrado) se emplea desde 1972 en estudios epidemiológicos que han correlacionado el exceso de peso con el aumento de morbimortalidad. Se considera obesidad cuando el IMC (kg/m^2) es superior o igual a 30 y obesidad mórbida cuando este índice es superior o igual a 40.

2. Resistencia a la insulina (RI)

La resistencia a la insulina desempeña un papel fundamental en el desarrollo de intolerancia a la glucosa y la diabetes. Dicha resistencia a la insulina es un hallazgo constante en pacientes con DM2 y existe durante años antes del inicio de la enfermedad (13).

La resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución del transporte de glucosa estimulado por la insulina, por una alteración del metabolismo de la glucosa en los adipocitos y en el músculo esquelético y por una supresión alterada de la producción hepática de glucosa.

2.1. Obesidad y resistencia insulínica

2.1.1. Papel del tejido adiposo

La obesidad se relaciona con un excesivo incremento en los depósitos del tejido adiposo como consecuencia no solo de un aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) sino también con un aumento del tamaño de los mismos (hipertrofia). Para poder estudiar la relación entre la obesidad y la resistencia a la insulina es muy importante considerar la gran variabilidad existente en el tamaño y en la capacidad de expansión del tejido adiposo (14). Por ejemplo, cada desviación estándar (DE) de aumento de la masa de tejido adiposo subcutáneo decrece el riesgo de resistencia a la insulina un 48%, mientras que el aumento de una DE en el tejido adiposo visceral aumenta el riesgo de RI en un 80% (15). Esto explica claramente la existencia de una obesidad con peor pronóstico y mayores complicaciones metabólicas, asociada a un aumento de la RI, por lo que no todos los individuos con IMC elevado tienen el mismo riesgo de desarrollar patologías metabólicas asociadas con la obesidad.

Aquellos mecanismos que controlan la capacidad de expansión del tejido adiposo subcutáneo, incluyendo su capacidad para diferenciar adipocitos y su capacidad de depósito, podrían ser los factores clave que determinen el riesgo de diabetes en la obesidad (16). El aumento en la capacidad de formar adipocitos, expresado por la hiperplasia del tejido adiposo subcutáneo se correlaciona con un menor riesgo de presentar alteraciones del metabolismo hidrocarbonado (17). La importancia de este tejido adiposo subcutáneo queda reflejada por las mayores diferencias en la expresión génica en este tejido cuando comparamos individuos con o sin RI, superiores a las encontradas por ejemplo en el músculo esquelético. La mayor parte de las diferencias en la expresión génica se observaba en genes importantes en el metabolismo lipídico o

de los ácidos grasos, genes relacionados con la inflamación y aquellos relacionados con la regulación del ciclo celular (18).

Existen diversas teorías sobre por qué la grasa visceral se asocia a la presencia de resistencia a la insulina y al desarrollo de diabetes. Una posibilidad es que este tejido libere adipocitoquinas que alteren la sensibilidad a la insulina en el hígado y en el músculo (figura 1a). Otra posibilidad es que el tejido adiposo visceral sea un marcador subrogado del acúmulo de lípidos en sitios ectópicos y de lipotoxicidad, lo que ocurriría en paralelo en el hígado y en el músculo causando RI en esos tejidos (figura 1b). Una tercera posibilidad es que el exceso de grasa visceral adquiera por sí misma propiedades diabetogénicas (figura 1c). Esta teoría se apoyaría por el aumento de macrófagos en este tejido que liberarían citoquinas proinflamatorias que podrían causar RI. Otra posibilidad sería que tanto la lipotoxicidad en tejidos periféricos y la producción de citoquinas por la grasa visceral contribuyan a la RI sistémica (figura 1d). Las distintas teorías de asociación entre la grasa visceral y la RI se ejemplifican en la siguiente figura (19).

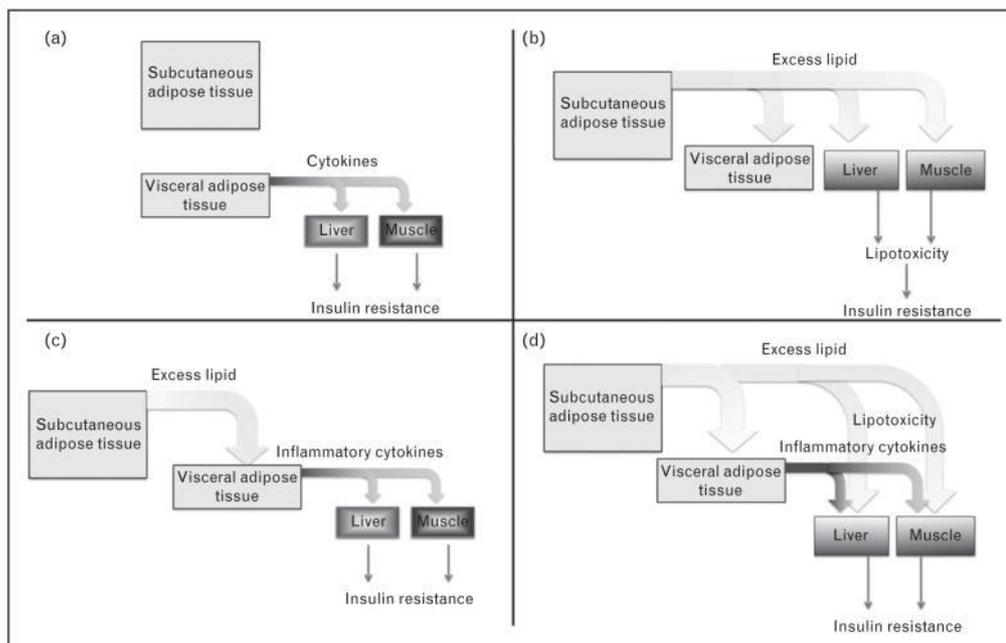


Figura 1. Mecanismos potenciales por los cuales la adiposidad visceral podría estar relacionada con la resistencia a la insulina. Tomado de Hardy OT et al (19).

Parece claro a raíz de múltiples estudios que el acúmulo de grasa visceral se correlaciona con el acúmulo de lípidos en el hígado dando como resultado una alteración celular en la ruta de señalización a la insulina. Además, la grasa visceral es susceptible a la inflamación y a la producción de citoquinas, lo que puede contribuir a aumentar aún más la RI. Más aún, el crecimiento del tejido adiposo visceral y el acúmulo de lípidos en el hígado y en el músculo, pueden limitar la capacidad de expansión del tejido adiposo subcutáneo en base a las propiedades de su matriz extracelular y su capacidad para el crecimiento de capilares.

A pesar de todas estas evidencias, los mecanismos exactos que inician o regulan todas estas respuestas que conducen a un aumento de la grasa visceral y a la aparición de la resistencia insulínica no están del todo aclarados.

2.1.2. Papel del hígado

La insulina es una hormona que controla la homeostasis hidrocabonada mediante diferentes mecanismos tales como la facilitación de la disponibilidad de glucosa a nivel muscular y del tejido adiposo, así como la supresión de la producción hepática de glucosa, inhibiendo la glucogenolisis y la gluconeogénesis. Además, la insulina también regula el metabolismo lipídico al incrementar la síntesis de ácidos grasos. Finalmente, la insulina también ejerce sus efectos anabólicos en el metabolismo proteico, incrementando la replicación del ADN y la síntesis proteica mediante la regulación de la captación de aminoácidos y la disminución de la proteólisis.

Los efectos de la insulina en el metabolismo celular están mediados por un receptor heterotetramérico expresado en múltiples tipos celulares, especialmente a nivel de las células hepáticas, del tejido adiposo y del músculo esquelético. La unión de la insulina a estos receptores inicia una cascada de procesos tales como la autofosforilación de los residuos tirosina, y la fosforilación de tirosina de diversas proteínas, que subsecuentemente activan el resto de moléculas de señalización. Una de las proteínas

implicadas es IRS-2, que es importante para el metabolismo lipídico y la proliferación de células beta.

El sobrepeso y la obesidad se relacionan con la presencia de RI. La presencia de RI se incrementa generalmente en paralelo con el incremento de la masa grasa corporal. En concreto, el acúmulo de grasa visceral se correlaciona con el acúmulo de lípidos en el hígado dando como resultado una alteración celular en la ruta de señalización a la insulina.

La hiperglucemia de ayuno, comúnmente observada en sujetos con diabetes tipo 2 y síndrome metabólico, es consecuencia de la disminución de la captación de glucosa por los tejidos periféricos y de la producción aumentada de glucosa por los hepatocitos, resistentes a la acción de la insulina. Se habla de resistencia a la insulina a nivel hepático cuando existe una alteración de la supresión de producción hepática de glucosa. La insulina media sus efectos inhibitorios sobre la producción de glucosa inhibiendo dos enzimas claves en la gluconeogénesis, como son la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). A nivel molecular, la proteína quinasa B (PKB), es necesaria para que se produzca el efecto inhibitorio transcripcional de la insulina sobre estas dos enzimas. La PKB puede fosforilar el factor de transcripción Foxo, que induce el paso nuclear de la proteína Foxo, la inactivación transcripcional, y por consiguiente la inhibición de PEPCK y G6Pasa. En animales de experimentación la deficiencia específica del receptor de insulina a nivel hepático muestra intolerancia a la glucosa severa, mientras que en ratones con deficiencia del receptor de insulina en el músculo esquelético y el tejido adiposo, los niveles de glucosa e insulina fueron normales. Esto sugiere que la resistencia a la insulina hepática es necesaria para el desarrollo de hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. Además, ratones deficientes IRS-2 a nivel hepático también presentaron resistencia a la insulina severa e hiperglucemia. Asimismo, ratones con resistencia a la insulina deficientes en el gen Foxo-1, mostraron una reducción de G6Pasa. Todos estos datos tomados conjuntamente sugieren que la resistencia a la acción de insulina en el tejido hepático conduce a la hiperglucemia, a la progresión hacia síndrome metabólico y diabetes tipo 2, y por tanto, al riesgo de enfermedad cardiovascular.

Por otro lado, la resistencia a la insulina comúnmente se acompaña de la denominada dislipemia aterogénica, caracterizada por niveles aumentados de triglicéridos plasmáticos, incremento de partículas de LDL pequeñas y densas, y disminución de los niveles de colesterol HDL. En condiciones normales, el metabolismo de las VLDL requiere la función coordinada de varias proteínas que son principalmente reguladas por la insulina. El ensamblaje de VLDL es iniciada por la “lipidación” de la apolipoproteína B100 por la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP) en el retículo endoplásmico rugoso de los hepatocitos, que conduce a la formación de partículas VLDL pobres en triglicéridos. Las VLDL son secretadas por el hígado, y son convertidas en IDL por la lipoprotein lipasa en los tejidos periféricos. Posteriormente, las IDL pueden ser hidrolizadas por la lipasa hepática para formar LDL ricas en colesterol que a su vez son eliminadas tras la captación por el receptor de LDL. Sin embargo, debido a la sobreproducción hepática de VLDL ricas en triglicéridos, se produce una alteración en estas vías, induciendo la dislipemia aterogénica, que se acompaña de un incremento en el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Además, la resistencia a la insulina está estrechamente asociada con un estado crónico inflamatorio, resultado de la producción anormal de citoquinas, aumento proteínas de fase aguda y otros mediadores, y la activación de una red de mecanismos inflamatorios, que se han asociado también con enfermedad cardiovascular.

2.1.3. Papel del músculo

El depósito de grasa a nivel muscular ha recibido menor atención que aquel que se produce en el hígado. Sin embargo, existen evidencias de que es uno de los primeros lugares de acúmulo patológico e incluso de que pudiese ser el componente principal del desarrollo de resistencia insulínica ya que el tejido muscular representa del 30% al 40% de la masa corporal y el 80% del consumo de glucosa mediado por insulina. De hecho, la RI en el músculo precede por muchos años al comienzo de la DM tipo 2. La posibilidad de que el acúmulo de grasa en el músculo induzca “lipotoxicidad” y sea el origen de la RI se basa en que el acúmulo de ácidos grasos, cuando existe un exceso de los mismos para la oxidación, entra en vías metabólicas no oxidativas que pueden

producir daño en el sentido de reducción de la RI. El depósito intracelular de lípidos, que puede estar presente en el músculo de atletas, aparece ligado a la no utilización de los reservorios de ácidos grasos y el acúmulo de lípidos intermedios que son metabólicamente activos.

3. Diabetes mellitus tipo 2

3.1. Epidemiología

La DM2 es la forma más frecuente de diabetes en todo el mundo. En el año 2017 existían 425 millones de personas con diabetes en el mundo y se estima que esta cifra aumentará hasta los 629 millones en el año 2045 (20). La DM2 supone el 90% de estos casos.

La DM2 se produce en personas con una predisposición genética expuestas a una serie de factores ambientales que precipitan su aparición. Entre estos factores destacan la obesidad, la inactividad física y la dieta. El hecho de que familiares de primer grado de pacientes con diabetes tipo 2 presenten resistencia a la insulina sin presentar obesidad implica la existencia de un importante componente genético (21).

3.2. Criterios diagnósticos

Los criterios diagnósticos de la diabetes mellitus según la Asociación Americana de Diabetes (ADA) son los siguientes:

1. Glucemia plasmática al azar ≥ 200 mg/dL con clínica hiperglucémica.
2. Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5\%$ (DCCT).
3. Glucemia plasmática basal ≥ 126 mg/dL.
4. Glucemia 2 horas después de sobrecarga oral con 75 g de glucosa ≥ 200 mg/dL.

Si la glucemia plasmática al azar no está elevada, los criterios 2 al 4 deben repetirse en un día distinto en los siguientes 3 a 6 meses (22).

3.3. Complicaciones crónicas

La diabetes mellitus puede asociarse a varias complicaciones crónicas a largo plazo, todas con un importante impacto en la calidad de vida del paciente. La hiperglucemia activa vías metabólicas como la vía del poliol, induce activación de la proteína cinasa C, favorece el estrés oxidativo y formación de productos avanzados de la glicosilación, con el consiguiente daño en tejidos vasculares y neurales (23).

Las complicaciones crónicas principales de la diabetes suelen dividirse en microvasculares y macrovasculares, según el diámetro del vaso al que afectan.

Las principales complicaciones microvasculares son la nefropatía diabética, que en estadios terminales puede precisar tratamiento sustitutivo renal con diálisis; la retinopatía diabética, que puede conducir a ceguera; la neuropatía diabética, tanto sensitivo-motora como autonómica y el pie diabético. Por otra parte, la diabetes, al favorecer un estado inflamatorio crónico y la arteriosclerosis puede desembocar en complicaciones macrovasculares, como la cardiopatía isquémica, enfermedad arterial periférica y enfermedad cerebrovascular.

Todas estas complicaciones suponen un alto impacto en la morbimortalidad de la diabetes y en la calidad de vida del paciente.

4. Genética

4.1. Genética de la obesidad y la resistencia a la insulina

Existe una considerable influencia individual en las variaciones del peso dentro de una población que comparte un mismo entorno. La evidencia actual apoya el gran componente genético en los cambios de IMC de una población, con una heredabilidad que varía entre el 40 y 70% (24,25). Evidencias más recientes corroboran que la similitud intrafamiliar en el IMC se debe principalmente a la similitud genética:

estudios en gemelos han demostrado alta heredabilidad (60-75%) y estudios en familiares revelaron heredabilidad moderada a alta (40-45%) (26–28).

En 1962, Neel propuso la hipótesis del “thrifty genotype”. En dicha hipótesis habla de la ventaja evolutiva de individuos con genotipos más proclives al “ahorro de energía” (almacenamiento de energía predominantemente en forma de grasa en lugar de como glucógeno) en condiciones de suministro escaso o inestable de alimento (29).

Siguiendo esta hipótesis, se han encontrado mutaciones en múltiples genes implicados en el desarrollo de obesidad, como el gen de la leptina o su receptor, gen proopiomelanocortina (POMC), gen de la convertasa de prohormonas 1 (PCSK1), receptores adrenérgicos $\beta 2$ y $\beta 3$, lipasas, $TNF\alpha$, $PPAR\gamma$, proteínas desacopladoras, etc., la mayoría de los cuales, además, están implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina (21). Otros loci, incluyendo los genes *INSIG2*, *TMEM 18*, *KCTD15*, *SH2B1*, *MTCH2*, *GNPDA2*, *BDNF* o *CHST8* también podrían estar asociados con obesidad.

Además, con los “genome wide association studies (GWAS)” más de 20 regiones del genoma se han asociado en la regulación del peso corporal y se han revelado más de 500 loci relacionados con numerosos rasgos de adiposidad. En un metaanálisis conducido por el consorcio GIANT (“Genetic Investigation of Anthropometric Traits”) se identificaron 32 SNPs fuertemente asociados con el IMC adulto (30). Sin embargo, incluso combinados, los 32 SNPs explican menos del 2% de la variación del IMC en adultos o niños. La discrepancia entre la alta heredabilidad estimada mediante análisis genético cuantitativo y la pequeña proporción de la variación explicada mediante GWAS en numerosos rasgos puede deberse a variantes genéticas infrecuentes y algunos efectos genéticos no aditivos. Estos dos factores contribuyen al efecto genético estimado en análisis genéticos cuantitativos pero no se detectan en análisis GWAS, que solamente captan efectos aditivos de SNPs comunes cuya frecuencia de alelo menor sea igual o superior al 5% (31).

La expresión genética en los adipocitos y hepatocitos de sujetos obesos y su relación con la RI ha sido previamente estudiada (32). Los estudios previos de genómica y

transcriptómica en obesos han identificado marcadores asociados con el desarrollo de RI y sus alteraciones metabólicas vinculadas que únicamente explican un 50% de dicho riesgo (32–34).

Por todo ello, la investigación entre genética, ambiente, obesidad y resistencia a insulina también incluye actualmente las modificaciones epigenéticas, mediante el uso de “microarrays” específicos para metilación del ADN.

5. Epigenética

5.1. Introducción

Con el conocimiento actual, se sabe que la expresión de ciertos genes está regulada por modificaciones heredables sobre los mismos, que varían su función, sin necesidad de alteración de la secuencia de ADN. Dichas modificaciones se denominan de forma global “epigenética” (35). A finales de la década de 1930, Waddington ya utilizó este término para describir lo que hoy se denomina “biología del desarrollo”, la idea de que el fenotipo o las propiedades morfológicas y funcionales de un organismo surgen secuencialmente bajo un programa definido por el genoma bajo la influencia del entorno del organismo (36). Factores ambientales como la dieta, sustancias contaminantes o el tabaco pueden desencadenar modificaciones epigenéticas, que a su vez alteran la expresión génica, proporcionando un mecanismo causal que explique la influencia de dichos factores en enfermedades complejas como la obesidad o la diabetes mellitus tipo 2.

Existen varias formas de modificación epigenética: la metilación del ADN, las modificaciones de la cromatina (concretamente modificaciones covalentes de las proteínas histonas, la densidad del empaquetamiento en nucleosomas a lo largo del ADN, complejos de ADN y nucleosomas con proteínas específicas que reconocen ADN metilado o histonas modificadas y la organización de estos elementos en estructuras complejas) (37) y la regulación por ARNs.

En cuanto a las modificaciones de la cromatina, se producen modificaciones covalentes de las histonas que forman los nucleosomas, alrededor de los cuales se enrolla la doble hélice de ADN. Estas modificaciones químicas incluyen metilación (en este caso de los aminoácidos arginina o lisina), fosforilación de serina, y acetilación y ubiquitinización de lisina. La relajación de los nucleosomas condensados es importante para la actividad génica. Se sabe que existen proteínas que colaboran con los factores de transcripción activando o silenciando genes mediante la acetilación o desacetilación de histonas, respectivamente (38,39). Además, la expresión tejido-específica de distintos genes está controlada por secuencias potenciadoras “enhancer” en el ADN y su relación física con los promotores. Dicha relación física se controla en parte por la metilación de secuencias aislantes (“insulator sequences”) y el consiguiente pliegue de regiones génicas en bucles de varios tamaños, dependiendo del estado de la célula.

Por ser la más estudiada y la que incumbe a esta tesis, hablaremos más detalladamente de la metilación del ADN.

5.2. Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo (CH_3) al carbono en posición 5 del nucleótido citosina. Dicha metilación se mantiene durante la división celular en los mamíferos únicamente en el dinucleótido citosina-guanina (CpG), mediante la enzima DNA metiltransferasa I. En el transcurso de la replicación semiconservativa del ADN, un CpG metilado en la hebra parental se aparea con un CpG de nueva síntesis, no metilado, en la hebra hija. La enzima DNA metiltransferasa I busca ese ADN hemimetilado y coloca un nuevo grupo metilo en el CpG de la hebra hija (37).

Gracias a estas modificaciones epigenéticas se regula la expresión de los genes: estas modificaciones pueden alterar la estructura de la cromatina, con lo que se modula la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los genes diana (40). Por ejemplo, grupos de genes pueden modificar su relación física unos con otros dependiendo de su estado transcripcional (41,42).

5.3. Islas CpG y otros conceptos

El genoma de los mamíferos está compuesto aproximadamente por 40% de citosina (C) y guanina (G) y 60% de nucleótidos adenina (A) y timina (T). Los dinucleótidos se componen de dos nucleótidos consecutivos en la misma hebra y generalmente se representan en la dirección 5' a 3'. La p entre las letras que representan los nucleótidos se refiere al enlace fosfodiéster que los une. Existen 16 dinucleótidos posibles, que en general ocurren a la frecuencia esperada; sin embargo, el dinucleótido CpG es excepcionalmente infrecuente en la mayor parte del genoma.

En contraste, en las islas CpG, la frecuencia global de G y C es superior al 40% del total del genoma y el dinucleótido CpG aparece a la frecuencia esperada (43).

Se define isla CpG a aquella región del genoma de más de 0.5 kb en las que el contenido de G y C es superior o igual al 55% y la ratio frecuencia observada/frecuencia esperada es de al menos 0.6. Las islas CpG se localizan típicamente en la región promotora, 5' hacia el TSS (transcription start site) (44).

Existen además denominaciones para las diferentes regiones colindantes en relación a su distancia con las islas CpG, como se detallan en la siguiente tabla:

Denominación	Características
CpG shores	Regiones con menor densidad de CpG que se localizan entre 2kb corriente arriba y corriente abajo de una isla CpG
CpG shelf	Se define como los 2kb exteriores a un CpG shore, entre 2 y 4 kb de una isla CpG
CpG canyon	Regiones de baja metilación a más de 3.5 kb de distancia de islas y shores. Contienen frecuentemente factores de transcripción
Open sea	Regiones con baja metilación no caracterizadas en ninguna de las anteriores.
Cuerpo del gen	Se define como la región entre el lugar de inicio de la transcripción y el final del transcrito
Gene desert	Regiones con pocos o ningún gen en una región de 500 kb

Tabla 1. Regiones del ADN con respecto a islas CpG.

5.4. Papel de la metilación

En ratones y probablemente en otros mamíferos, se produce el periodo embrionario precoz un ciclo de demetilación seguido de metilación de novo, que es crucial en la determinación de patrones somáticos de metilación del ADN. Una pequeña pero importante proporción de las islas CpG se metilan durante el desarrollo, y a consecuencia de ello se produce silenciamiento estable del promotor. Este tipo de metilación programada de islas CpG está relacionada con el imprinting genómico y la inactivación del cromosoma X. Se postula que la metilación ocurre en genes ya silenciados, al parecer para hacer irreversible el silenciamiento y que contribuye al silenciamiento de genes tejido-específicos en células en las que no se expresan (45).

En general, las citosinas dentro de las islas CpG en las regiones promotoras no están metiladas en los genes que se expresan constitutivamente, mientras que en genes regulados pueden estar metiladas o no, dependiendo del tejido (35).

En las CpG island shores la metilación se asocia con inactividad transcripcional, mientras que la metilación del ADN en los cuerpos génicos se correlaciona positivamente con la expresión génica (46,47).

A pesar de que en el periodo embrionario la metilación es particularmente activa, también puede ocurrir metilación de novo en células somáticas adultas. Para ello parece fundamental el papel de metiltransferasas de novo DNMT3A y DNMT3B.

5.5 Relación entre metilación de ADN y obesidad

Los cambios epigenéticos pueden tener un papel causal en la obesidad mediante expresión inadecuada o silenciamiento de genes relacionados con la obesidad y de secuencias reguladoras (48). Por otro lado, los cambios epigenéticos pueden producirse como una consecuencia de la obesidad, y una vez establecidos, predisponer a comorbilidades relacionadas con la obesidad, como la DM2.

Un rasgo común a la metilación y las modificaciones en histonas es que son tejido-específicas y pueden variar con la edad y el estado de desarrollo (37,49).

Dichos marcadores epigenéticos, como el patrón de metilación del ADN de adipocitos subcutáneos y omentales pueden ayudarnos a identificar a aquellos sujetos que sean metabólicamente inapropiados o predispuestos a desarrollar RI, y a consecuencia de ella diabetes mellitus tipo 2, ya que en ellos existirían modificaciones del metiloma que sobreexpresen o repriman genes y vías de señalización relacionadas con la resistencia a la insulina.

II. Hipótesis y objetivos

La obesidad condiciona numerosas complicaciones metabólicas, entre ellas la RI, que favorece la aparición de diabetes tipo 2. Esta complicación produce elevada morbilidad, mortalidad y gasto sanitario en el paciente obeso. No existen biomarcadores epigenéticos específicos que expliquen por qué algunos pacientes obesos tienen mayor riesgo de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

El estudio y análisis del patrón de metilación del ADN en las células implicadas en la resistencia a la insulina (adipocitos omentales y subcutáneos) de sujetos con obesidad mórbida puede ayudar a conocer marcadores epigenéticos de diabetes. El estudio del patrón de metilación del ADN de las células implicadas en la resistencia a la insulina en el paciente con obesidad mórbida está poco desarrollado.

Nuestra hipótesis de trabajo es que en el sujeto con obesidad mórbida y diabetes debe existir un diferente patrón de metilación en los adipocitos comparado con los sujetos con obesidad mórbida sin diabetes.

Este diferente patrón de metilación permitirá conocer genes reprimidos o sobre-expresados que identifiquen biomarcadores de resistencia a insulina y de las alteraciones metabólicas asociadas con ella, como la diabetes tipo 2.

Los objetivos son:

Objetivo general

Estudiar y analizar el patrón de metilación del ADN en adipocitos obtenidos durante el bypass gastroyeyunal de sujetos con obesidad mórbida. Identificar genes relacionados con diabetes tipo 2 en pacientes con obesidad mórbida.

Objetivos específicos

1. Conocer el patrón de metilación de ADN de adipocitos obtenidos durante el bypass gastroyeyunal en obesos mórbidos.

2. Analizar la relación del patrón de metilación del ADN de adipocitos con la presencia de diabetes tipo 2.

3. Identificar las vías metabólicas en las que participan los metabolitos codificados por los genes que han mostrado diferente patrón de metilación.

III. Sujetos y métodos

1. Sujetos

Se trata de un estudio de casos-contróles. Se consideró casos a aquellos pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica con diabetes tipo 2 y controles a aquellos sin diabetes.

En todos los sujetos se estudiaron los marcadores epigenéticos en adipocitos (procedentes de tejido adiposo omental y subcutáneo) obtenidos durante la intervención del bypass gástrico y su relación con la diabetes.

Se estudió a 40 pacientes con obesidad mórbida incluidos en el programa de cirugía bariátrica de nuestro centro, de los cuales 28 (70%) presentaban diabetes mellitus tipo 2 en el momento de la valoración. Los pacientes fueron seleccionados de forma consecutiva de la Unidad de Obesidad de nuestro centro e incluidos en el estudio de casos-contróles. A todos los pacientes se les explicó el procedimiento de extracción de las muestras, los posibles riesgos asociados y firmaron un documento de consentimiento informado. El protocolo quirúrgico de nuestro centro incluye un programa de pérdida de peso durante las 4 semanas previas a la intervención quirúrgica, que consiste en una dieta de muy bajo contenido calórico (de 3 a 4 envases al día de Vegestart complet®, Vegenat®, España), además de ingesta a demanda de líquidos acalóricos y el fomento de la actividad física en la medida de las posibilidades de los pacientes.

Criterios de inclusión:

Hombres y mujeres entre los 18 y 60 años de edad, con obesidad grave-mórbida (IMC $\geq 34,9$).

Criterios de exclusión:

- Enfermedad renal (creatinina > 2 mg/dL)
- Insuficiencia cardíaca (NYHA \geq II)
- Insuficiencia respiratoria (necesidad de oxigenoterapia)

- Cirrosis hepática o colestasis (GGT >32 mU/mL, bilirrubina directa > 0.2 mg/dL o fosfatasas alcalinas > 250 mU/mL)
- Enfermedad neoplásica
- 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)
- TSH > 10 mU/mL
- Ingesta de alcohol >30 g/día
- Cualquier infección sufrida durante las seis semanas previas al estudio o durante la realización del mismo

Los pacientes fueron clasificados en casos y controles según presentasen o no diabetes tipo 2. Se utilizaron los criterios diagnósticos de la ADA.

En todos ellos, se midieron parámetros antropométricos 1 mes antes de la intervención (justo al comienzo de la fase de pérdida de peso prequirúrgica), y 7 días antes de la cirugía se realizó una nueva valoración antropométrica y se extrajeron muestras de sangre en la Unidad Metabólica del Servicio de Endocrinología y Nutrición de nuestro centro para estudiar los parámetros biológicos en situación de ayuno.

Durante la intervención quirúrgica se tomaron muestras de tejido adiposo (omental y subcutáneo).

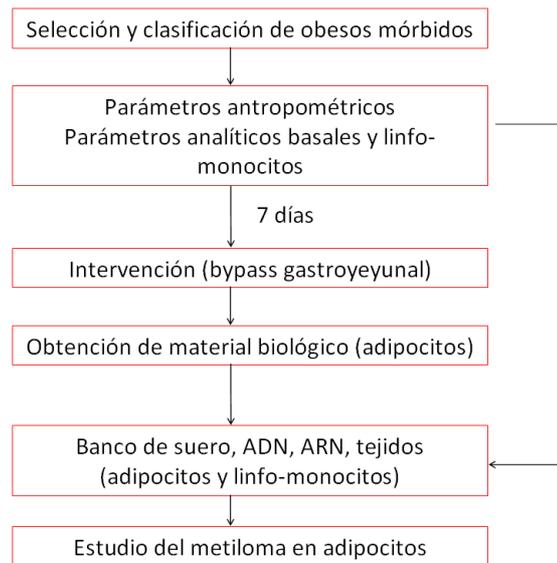


Figura 2. Esquema del estudio.

2. Métodos

La recogida de datos clínicos fue realizada por 3 investigadores. En ambos grupos se aplicó un protocolo en el que se recogían:

1. Parámetros clínicos

- Fármacos de uso habitual u ocasional
- Ejercicio físico realizado (minutos/semana)
- Consumo de alcohol (gramos/día)
- Registro del hábito tabáquico (cigarros/día y dosis acumulada en paquetes/año) y tiempo desde que se abandonó el hábito (en años)
- Años de evolución de la obesidad
- Problemas cardiovasculares presentados hasta la fecha de inclusión
- Procesos de tipo inflamatorio, infeccioso o alérgicos padecidos
- Determinación de la presión arterial con esfigmomanómetro

2. Parámetros antropométricos

- Peso en kilogramos
- Talla en metros

- Índice de masa corporal (IMC) en kg/m^2
- Perímetro de cintura, determinado en el punto medio entre el borde costal inferior y la cresta iliaca, expresado en centímetros.

3. Parámetros bioquímicos

- Hemograma y bioquímica estándar
- Colesterol total (CT) y triglicéridos por método colorimétrico en situación basal tras 12 horas de ayuno
- HDLc tras precipitación con polianiones
- LDLc en mg/dL calculado mediante la fórmula de Friedewald [$\text{LDLc} = \text{CT} - (\text{HDLc} + \text{TG}/5)$]. En caso de hipertrigliceridemia ($\text{TG} > 400 \text{ mg}/\text{dL}$) se empleará la determinación de colesterol no-HDL (50).
- Ácidos grasos libres por método enzimático colorimétrico
- Apoproteínas B y A1 por inmunoturbimetría
- Glucemia por método enzimático e insulinemia por ELISA.
- Cálculo del índice de HOMA [$\text{HOMA-IR} = (\text{glucosa} \times \text{insulina}) / 22,5$]

4. Datos genéticos

- ADN de muestras de tejido adiposo (subcutáneo y omental)
- ADN de linfo-monocitos de sangre periférica extraídos junto con el análisis de parámetros basales

Extracción y procesado de muestras de ADN

a. Extracción del ADN a partir de tejido graso

Desde los tejidos grasos (grasa omental y grasa subcutánea) se extrajo el ADN utilizando la tecnología Maxwell de Promega para tejido embebido en parafina (Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit), dado que se habría obtenido mejor rendimiento que con los kits específicos de tejido, siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta metodología consiste en el uso de partículas paramagnéticas de

sílice que permiten el aislamiento y la purificación del ADN de forma automática y con baja manipulación de la muestra.

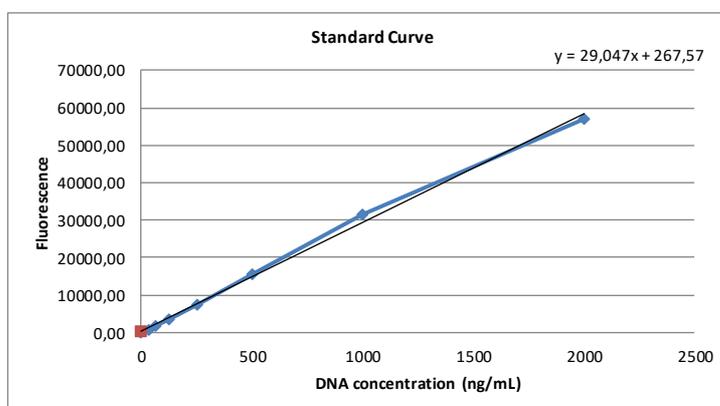
b. Cuantificación del ADN

Una vez extraído el ADN genómico de cada una de las muestras, se procedió a su cuantificación usando Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen™), midiendo la fluorescencia emitida entre 510-570 nm en el espectrofluorímetro GLOMAX Multi+ Detection System (Promega), según las especificaciones del proveedor.

En primer lugar, se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de ADN a la que se le añadió en cada posición 100 µL de PicoGreen (1:200) (Fig. 3). Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de las muestras, se tomó 1 µL de la muestra, el cual se diluyó en 99 µL de TE 1X y 100 µL de Quant-iT™ PicoGreen (1:200) y mediante interpolación en la gráfica se obtuvo la concentración de las muestras.

Standard curve

[] ng/mL	Fluorescence	C Fluorescence
2000	57806,30	57098,93
1000	32301,50	31594,13
500	16294,40	15587,03
250	7933,37	7226,00
125	4332,87	3625,50
62,5	2339,26	1631,89
31,25	1363,17	655,80
0	707,37	0



b (intersección)	267,57
a (pendiente)	29,05
r ²	0,9986

Figura 3. Recta patrón para la cuantificación de muestras de ADN con Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit.

Para el protocolo que se realizó la concentración mínima necesaria fue de 12.5ng/µL. Se normalizaron las concentraciones hasta tener una cantidad total de ADN de 200ng en 20 µL.

c. Tratamiento con bisulfito

Para la detección de la metilación, fue necesario tratar el ADN de forma que nos permitiera diferenciar entre las citosinas metiladas de las citosinas no metiladas. En nuestro caso se realizó el tratamiento químico mediante bisulfito.

Para este tratamiento se utilizaron los kits EZ-96 DNA Methylation Gold Kit de Zymo Research siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

d. Infinium HumanMethylation 450K Array

Con las muestras tratadas con bisulfito se llevó a cabo el procesado para la hibridación en los chips de metilación Infinium HumanMethylation 450K Array de la casa comercial Illumina Inc. siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

e. Análisis de los datos

Para realizar los análisis de los datos de intensidades obtenidos tras el escaneo de los chips en el lector iScan de Illumina Inc. se utilizaron diferentes paquetes de R y Bioconductor: minfi, limma. Se siguió el siguiente procedimiento:

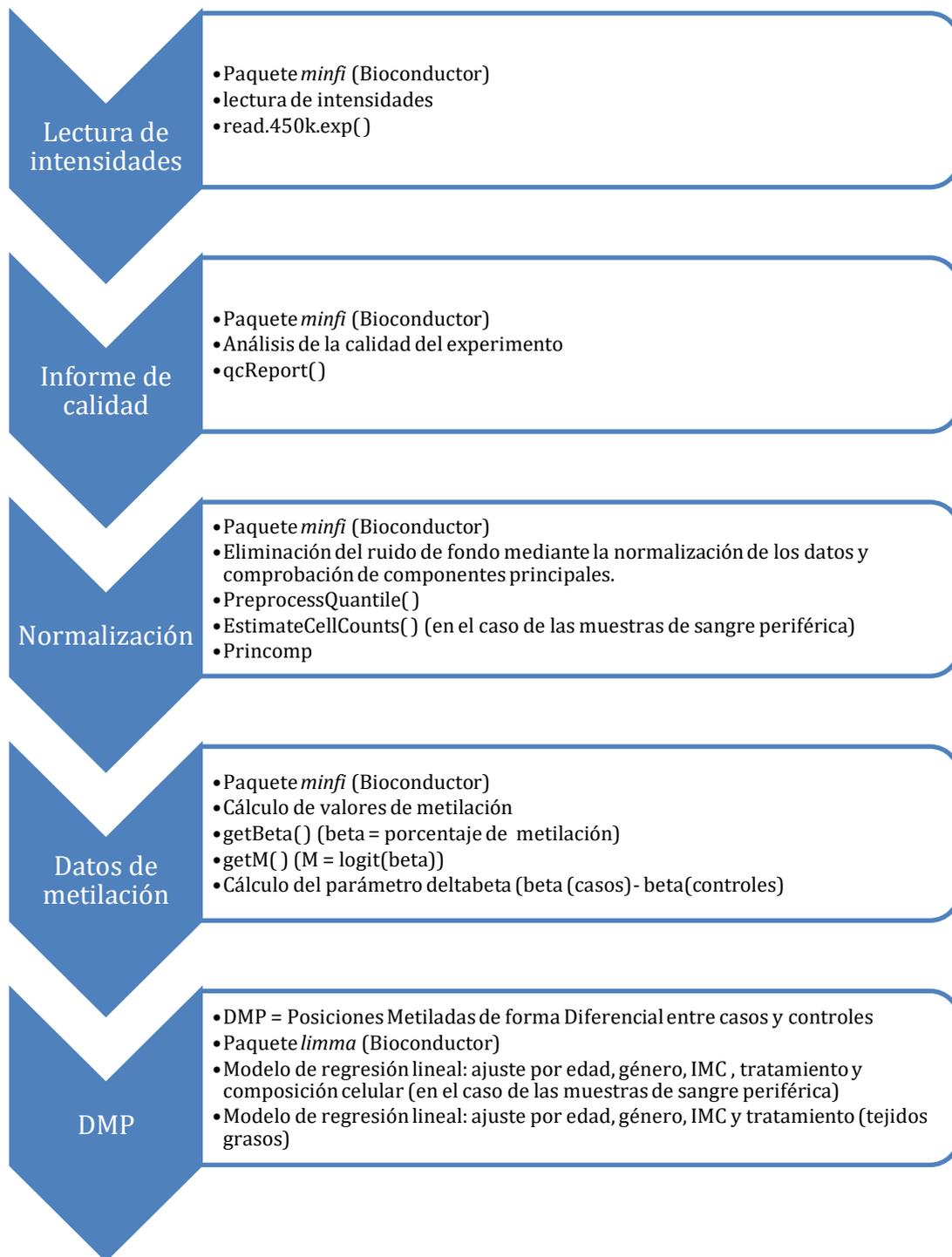


Figura 4. Esquema del procedimiento de análisis de metilación.

Métodos estadísticos

La población a estudio provino de pacientes asistidos y diagnosticados de obesidad mórbida seleccionados para cirugía bariátrica del Servicio de Endocrinología y Nutrición de nuestro Centro. Se trata de un estudio piloto por lo que no se realizó cálculo del tamaño muestral. El muestreo fue consecutivo.

El estudio estadístico se realizó con el programa informatizado Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software (version 22, SPSS, Chicago, IL, USA). La comparación de medias se hizo con la prueba de ANOVA. La comparación de proporciones con el test de χ^2 o de Fisher según el número. Las correlaciones simples se estimaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0,05$.

IV. Resultados

1. Características generales del grupo completo

1.1. Características antropométricas y clínicas. Comparación hombres vs mujeres

	Hombres (n = 15)	Mujeres (n = 25)	p-valor
Edad (años)	45,7 ± 7,0	47,8 ± 9,1	NS
Peso 1 mes pre IQ (Kg)	139,1 ± 22,4	118,5 ± 15,5	0,001
Peso 7 días preIQ (Kg)	132,62 ± 21,88	114,40 ± 16,07	0,005
IMC 1 mes preIQ (Kg/m ²)	45,35 ± 7,87	45,42 ± 7,61	NS
IMC 7 días preIQ (Kg/m ²)	43,23 ± 7,61	43,81 ± 4,74	NS
Perímetro de cintura 1 mes preIQ (cm)	138,7 ± 15,4	128,7 ± 9,0	0,016
Perímetro de cintura 7 días preIQ (cm)	132,8 ± 16,4	121,2 ± 8,7	0,006
TAS 1 mes preIQ (mmHg)	135,8 ± 15,7	147,4 ± 20,1	NS
TAD 7 días preIQ (mmHg)	84,9 ± 7,9	91,9 ± 7,3	0,01
TAS 7 días preIQ (mmHg)	130,7 ± 9,2	135,1 ± 29,2	NS
TAD 7 días preIQ (mmHg)	79,7 ± 7,3	82,0 ± 17,7	NS

Tabla 2. Características antropométricas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio. Resultados expresados como media ± desviación estándar.

1.2. Características bioquímicas

	Hombres (n = 15)	Mujeres (n = 25)	p-valor
Glucosa basal (mg/dL)	109,5 ± 35,1	121,5 ± 43,0	NS
Triglicéridos (mg/dL)	125,6 ± 72,9	139,8 ± 47,0	NS
Colesterol total (mg/dL)	138,7 ± 38,5	175,2 ± 33,2	0,003
LDL-colesterol (mg/dL)	90,9 ± 34,9	114,8 ± 29,7	0,026
HDL-colesterol (mg/dL)	35,7 ± 8,4	41,2 ± 9,3	NS
No HDL-colesterol (mg/dL)	103,0 ± 38,2	134,0 ± 34,6	0,016
GOT/AST	33,5 ± 11,3	34,1 ± 15,7	NS
GPT/ALT	39,8 ± 17,7	43,8 ± 21,0	NS
GGT	53,1 ± 60,4	51,1 ± 55,2	NS
Ácido úrico (mg/dL)	6,2 ± 2,1	6,8 ± 2,2	NS
Creatinina (mg/dL)	0,88 ± 0,25	0,84 ± 0,60	NS
Urea (mg/dL)	34,2 ± 12,3	34,8 ± 30,2	NS

Tabla 3. Características bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio. Resultados expresados como media ± desviación estándar.

1.3. Características antropométricas y clínicas. Comparación diabetes vs no diabetes

	DM2 (n = 28)	No DM2 (n = 12)	p-valor
Edad (años)	48,9 ± 7,2	42,4 ± 9,4	0,021
Peso 1 mes pre IQ (Kg)	126,1 ± 18,1	145,2 ± 24,2	0,001
Peso 7 días preIQ (Kg)	119,4 ± 15,7	142,2 ± 23,0	0,001
IMC 1 mes preIQ (Kg/m ²)	43,7 ± 4,9	49,3 ± 6,7	0,005
IMC 7 días preIQ (Kg/m ²)	41,9 ± 5,0	47,4 ± 6,2	0,005
Perímetro de cintura 1 mes preIQ (cm)	128,5 ± 8,5	141,7 ± 16,1	0,002
Perímetro de cintura 7 días preIQ (cm)	121,9 ± 8,6	134,3 ± 17,9	0,005
TAS 1 mes preIQ (mmHg)	147,7 ± 19,0	133,1 ± 16,2	0,036
TAD 7 días preIQ (mmHg)	90,7 ± 8,0	86,1 ± 7,9	NS
TAS 7 días preIQ (mmHg)	137,9 ± 26,6	123,7 ± 8,5	NS
TAD 7 días preIQ (mmHg)	82,2 ± 15,7	78,8 ± 11,5	NS

Tabla 4. Características antropométricas y clínicas: comparativa entre sujetos con diabetes y sujetos sin diabetes. Resultados expresados como media ± desviación estándar.

1.4. Características bioquímicas. Comparación diabetes vs no diabetes

	DM2 (n = 28)	No DM2 (n = 12)	p-valor
Glucosa basal (mg/dL)	126,6 ± 44,4	94,6 ± 9,7	0,019
HbA1c (%)	6,9 ± 1,2	5,6 ± 0,3	0,001
Insulina	19,7 ± 13,1	22,5 ± 13,6	NS
HOMA-IR	6,4 ± 4,8	5,1 ± 2,6	NS
Triglicéridos (mg/dL)	149,5 ± 60,2	99,5 ± 31,3	0,01
Colesterol total (mg/dL)	161,5 ± 43,0	161,6 ± 29,6	NS
LDL-colesterol (mg/dL)	103,8 ± 35,7	110,6 ± 28,2	NS
HDL-colesterol (mg/dL)	38,8 ± 9,5	40,1 ± 9,1	NS
No HDL-colesterol (mg/dL)	122,8 ± 42,4	121,5 ± 29,9	NS
Creatinina (mg/dL)	0,90 ± 0,61	0,76 ± 0,15	NS
Índice microalbumina/creatinina en orina (mg/g)	8,9 ± 6,9	6,0 ± 5,6	NS

Tabla 5. Características bioquímicas: comparativa entre sujetos con diabetes y sujetos sin diabetes. Resultados expresados como media ± desviación estándar.

2. Estudio de los tejidos

2.1. Preparación y análisis del patrón en tejidos

2.1.1. Grasa subcutánea

Las muestras iniciales en este tejido fueron 37 y las sondas iniciales 485 512.

Se realizaron los controles para verificar la calidad de las muestras. Primeramente, se comprobó que todas las muestras presentasen el perfil típico de la metilación, gran cantidad de sitios con una metilación próxima a 0% y gran cantidad de sitios con una metilación próxima a 100%, lo cual se puede observar en el siguiente gráfico.

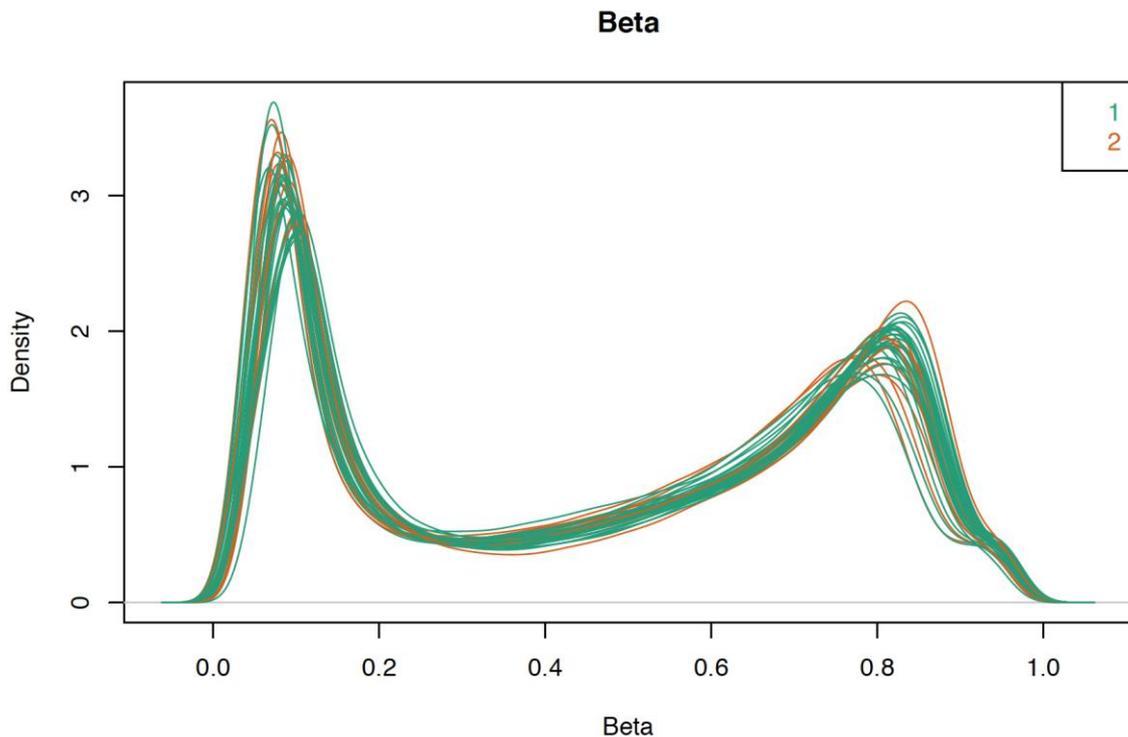


Figura 5. Representación de beta (porcentaje de metilación) en las diferentes muestras de grasa subcutánea analizadas.

Este gráfico se realiza antes del depurado y la normalización y por ello vemos diferencias entre las distintas muestras (cada línea representa un individuo).

Una vez comprobada la distribución y los controles de calidad del experimento, comprobamos el género de los individuos. Esto se realiza cotejando el género proporcionado con la base de datos con el género calculado por el programa en base a los sitios de los cromosomas sexuales en los que ha hibridado nuestra muestra.

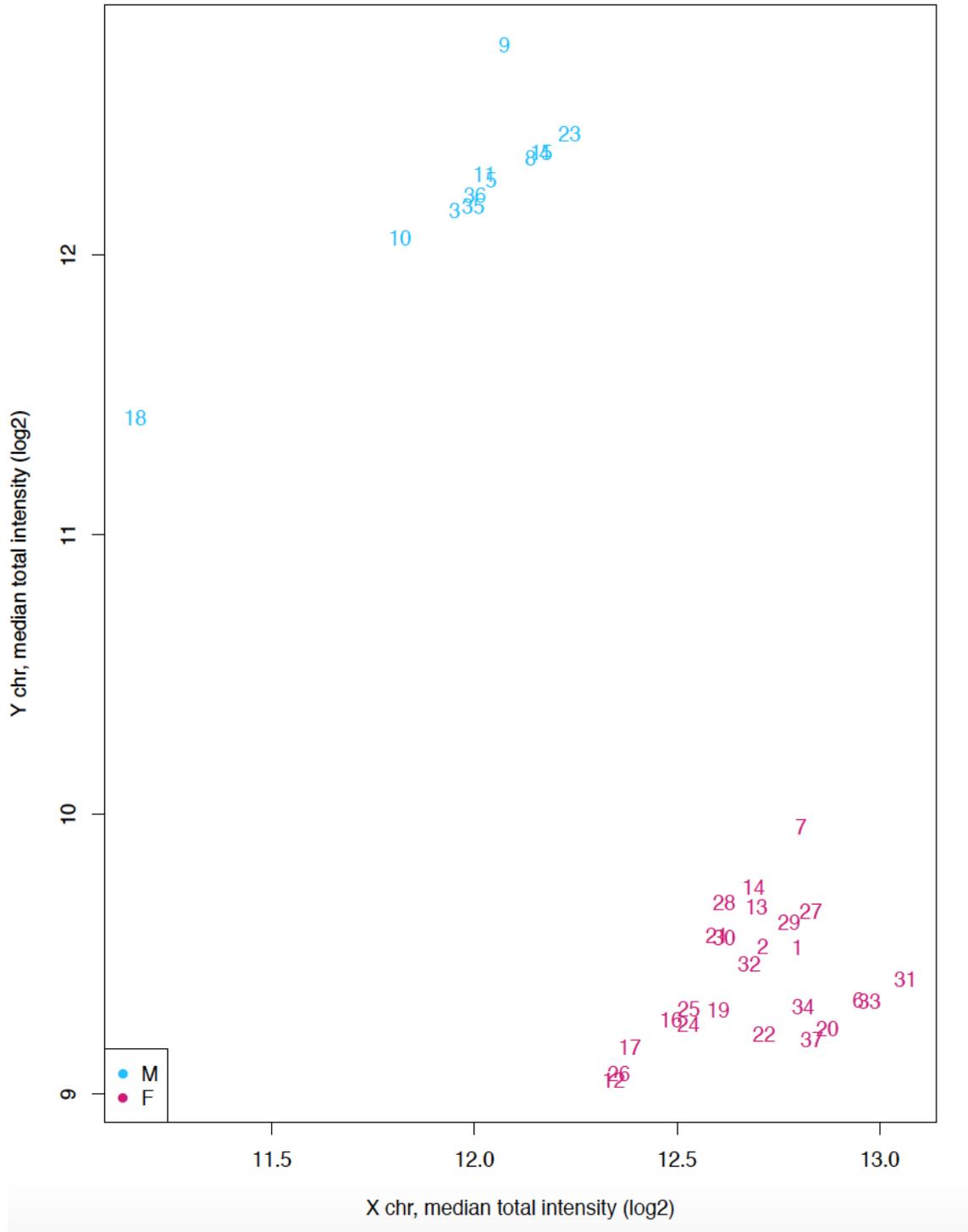


Figura 6. Representación del género de los sujetos estudiados (representado como: masculino -azul o femenino-rosa). Muestras de grasa subcutánea.

Todas las muestras presentaron el mismo género tanto en la base de datos como en la predicción en “minfi” y por tanto todas se incluyeron en el estudio.

El siguiente paso es la comprobación de la calidad tanto de las muestras como del total de los sitios de metilación. Tras la comprobación se llevó a cabo el depurado de las muestras y sitios de metilación de baja calidad

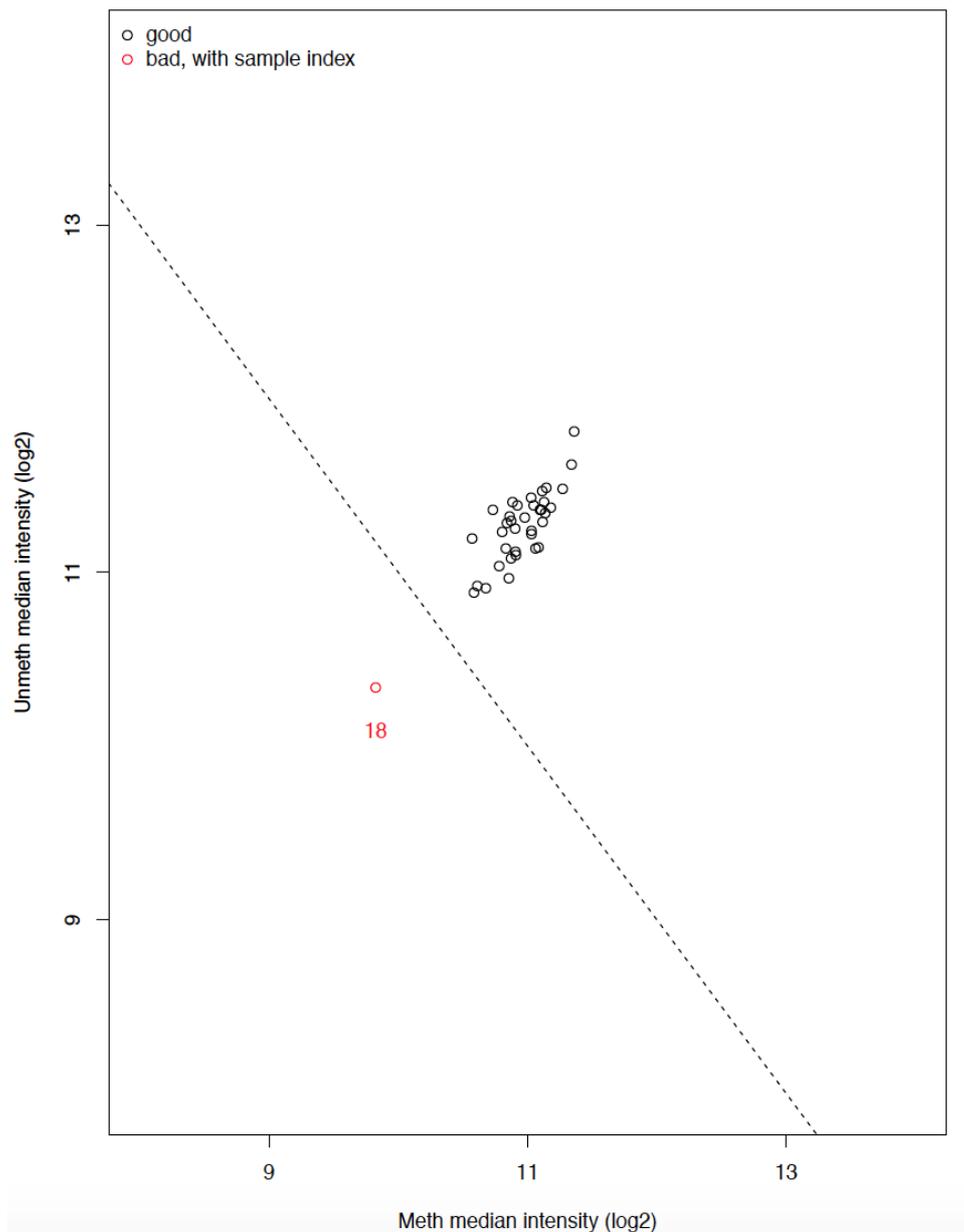


Figura 7. Representación de la calidad de las muestras analizadas en cuanto a los sitios de metilación. Grasa subcutánea.

El estudio de la calidad de las muestras mostró que MET18 presentaba baja calidad y fue eliminada del estudio.

Dado que tenemos muestras de ambos géneros, para evitar un efecto género en el estudio, se procedió a la eliminación de los sitios de metilación localizados en los cromosomas sexuales. Puesto que la información en sitios polimórficos puede llevar a datos confusos también fueron eliminados del estudio. Las muestras a estudio fueron 36 y el número de sondas totales 456 134. Tras la normalización y depurado, en el gráfico de densidad de sondas se aprecia una reducción de diferencias entre las distintas muestras. Esto se debe a que se ha eliminado el ruido de fondo y aquellas sondas que presentaban mala calidad. Finalmente, se cotejó que no hubiera “batch effect”

Beta Norm without X and Y and rs sites

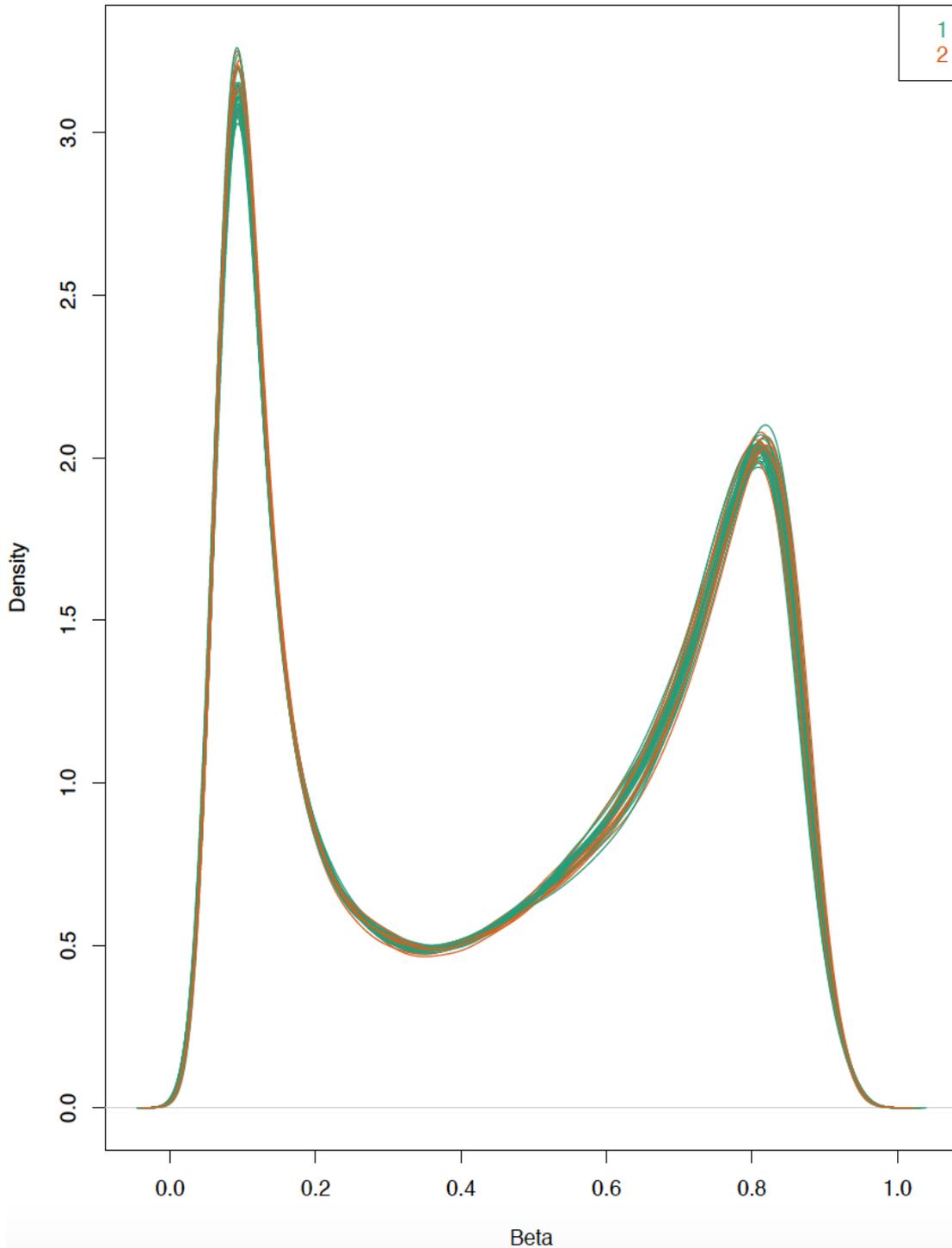


Figura 8. Representación de los patrones de metilación de las diferentes muestras de grasa subcutánea estudiadas ajustado tras eliminar sitios de metilación localizados en los cromosomas sexuales y sitios polimórficos.

2.1.2. Grasa visceral

Las muestras iniciales en este tejido fueron 37 y las sondas iniciales 485 512.

Al igual que con la grasa subcutánea, se comprobó la calidad de las muestras.

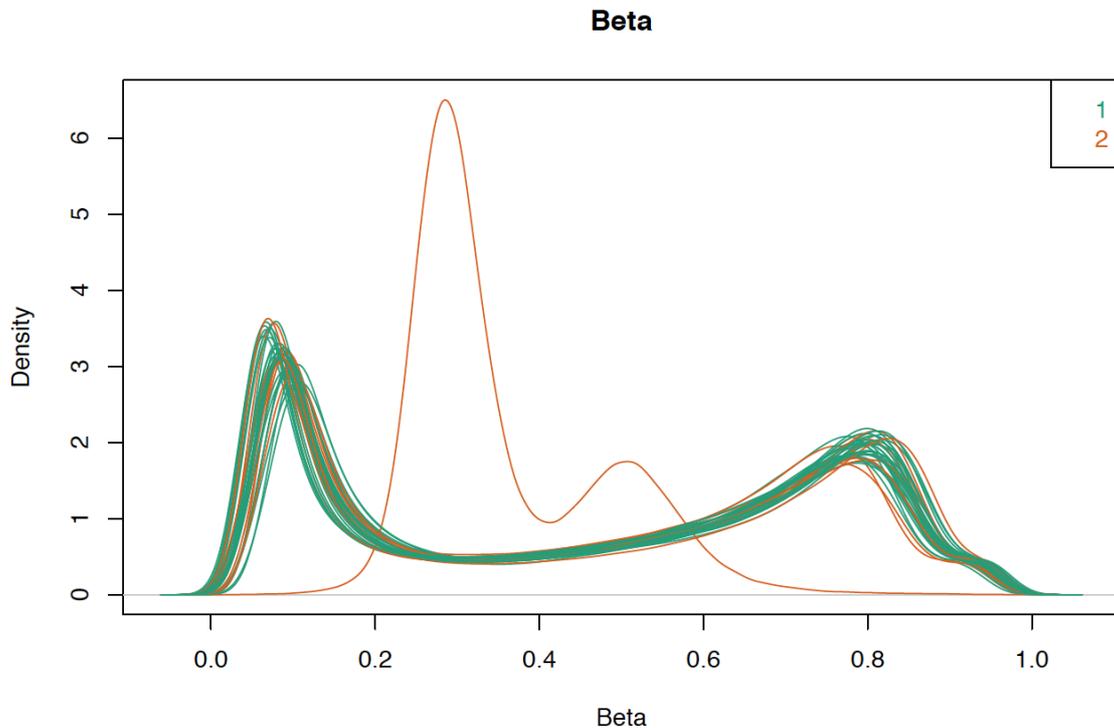


Figura 9. Representación de beta (porcentaje de metilación) en las diferentes muestras de grasa visceral analizadas.

En este grupo podemos observar que una de las muestras presentó una distribución anómala y por tanto fue eliminada del estudio. Una vez comprobada la distribución y los controles de calidad del experimento, cotejamos el género proporcionado con la base de datos con el género calculado por el programa en base a los sitios de los cromosomas sexuales en los que ha hibridado nuestra muestra.

En la muestra MET21 se observó discrepancia entre el género calculado por "minfi" y el género proporcionado por la base de datos y fue eliminada del estudio.

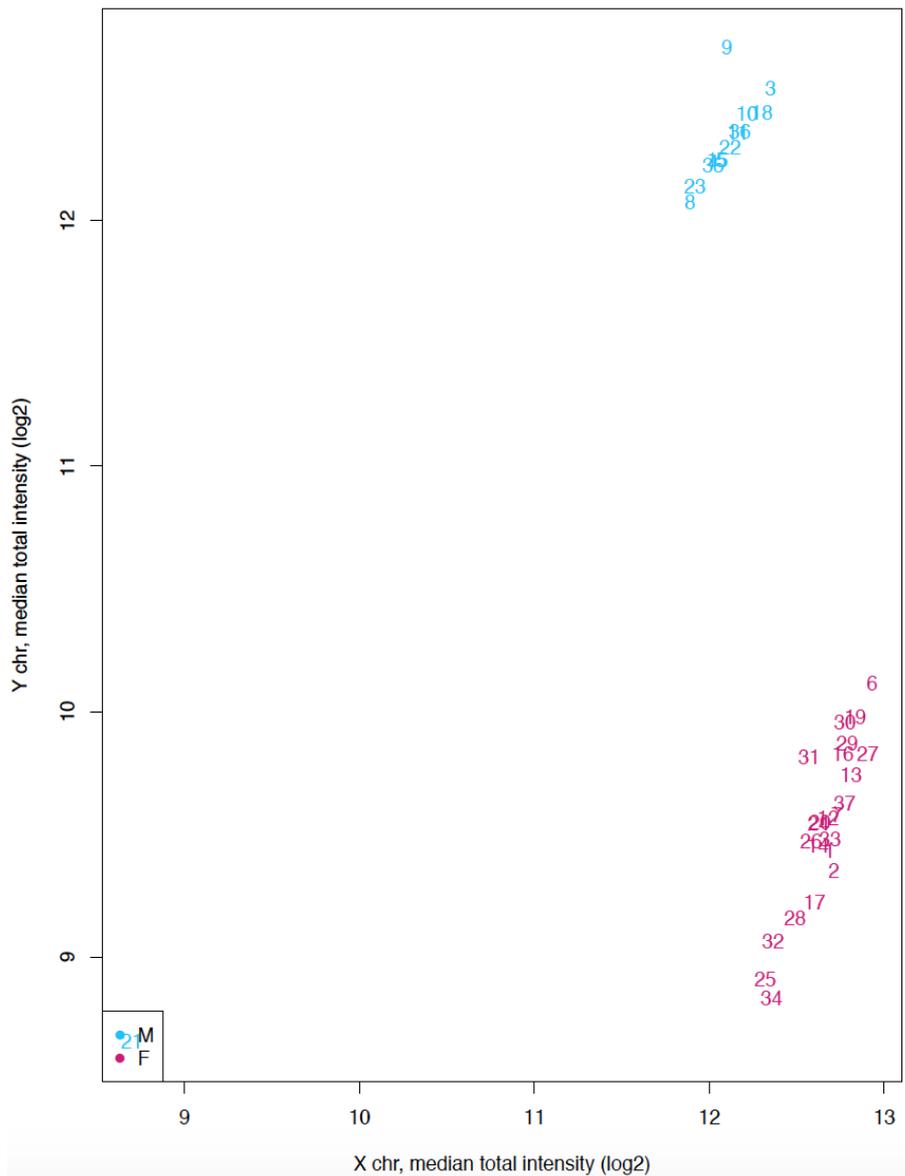


Figura 10. Representación del género de los sujetos estudiados (representado como: masculino -azul o femenino-rosa). Grasa visceral.

El siguiente paso es la comprobación de la calidad tanto de las muestras como del total de los sitios de metilación. Tras la comprobación se lleva a cabo el depurado de las muestras y sitios de metilación de baja calidad

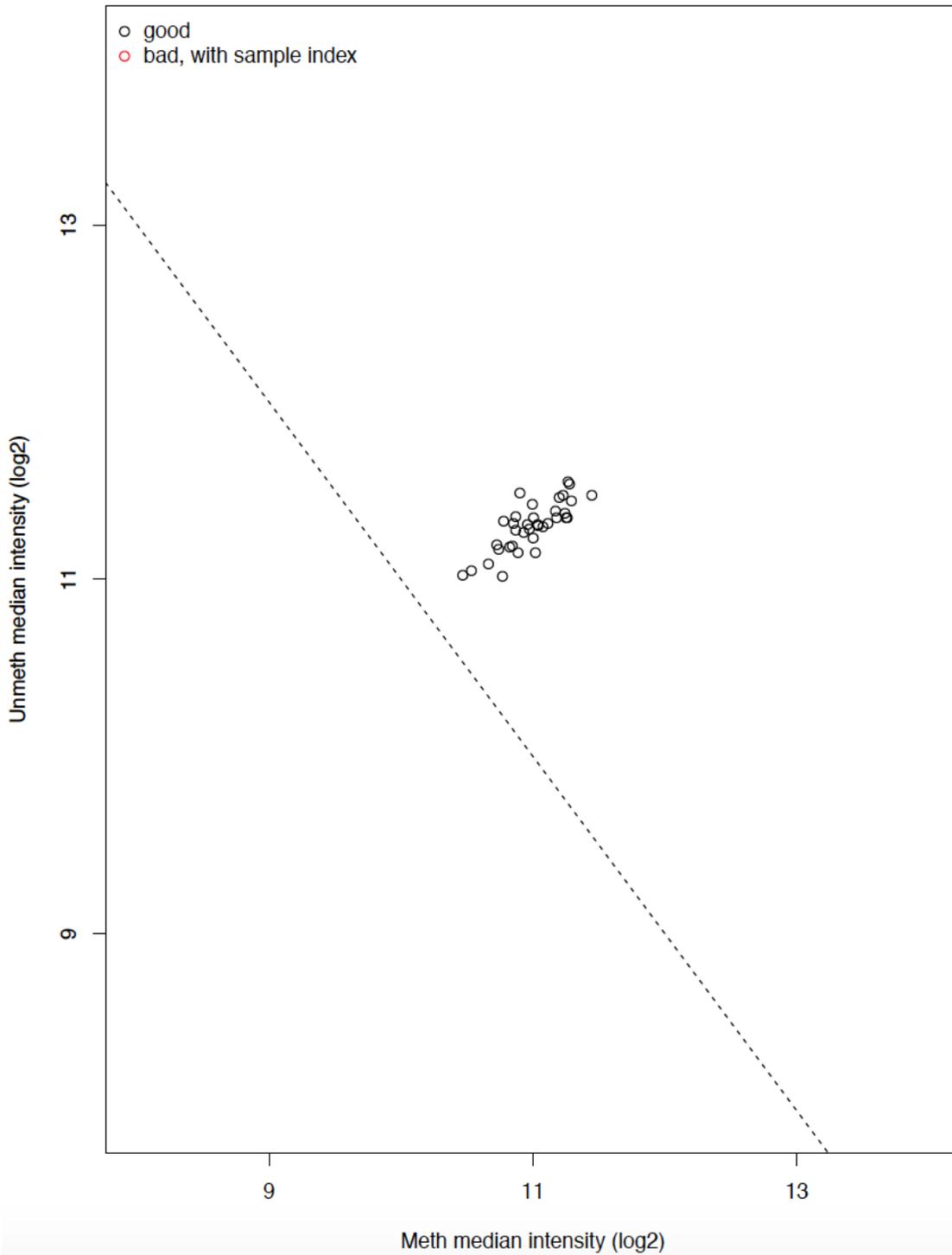


Figura 11. Representación de la calidad de las muestras analizadas en cuanto a los sitios de metilación. Grasa visceral.

El resto de muestras presentaron una buena calidad para poder continuar en el estudio.

Al igual que en el tejido adiposo subcutáneo, se procedió a la eliminación de los sitios de metilación localizados en los cromosomas sexuales y sitios polimórficos. Las muestras a estudio son 36 y el número de sondas totales 454 920.

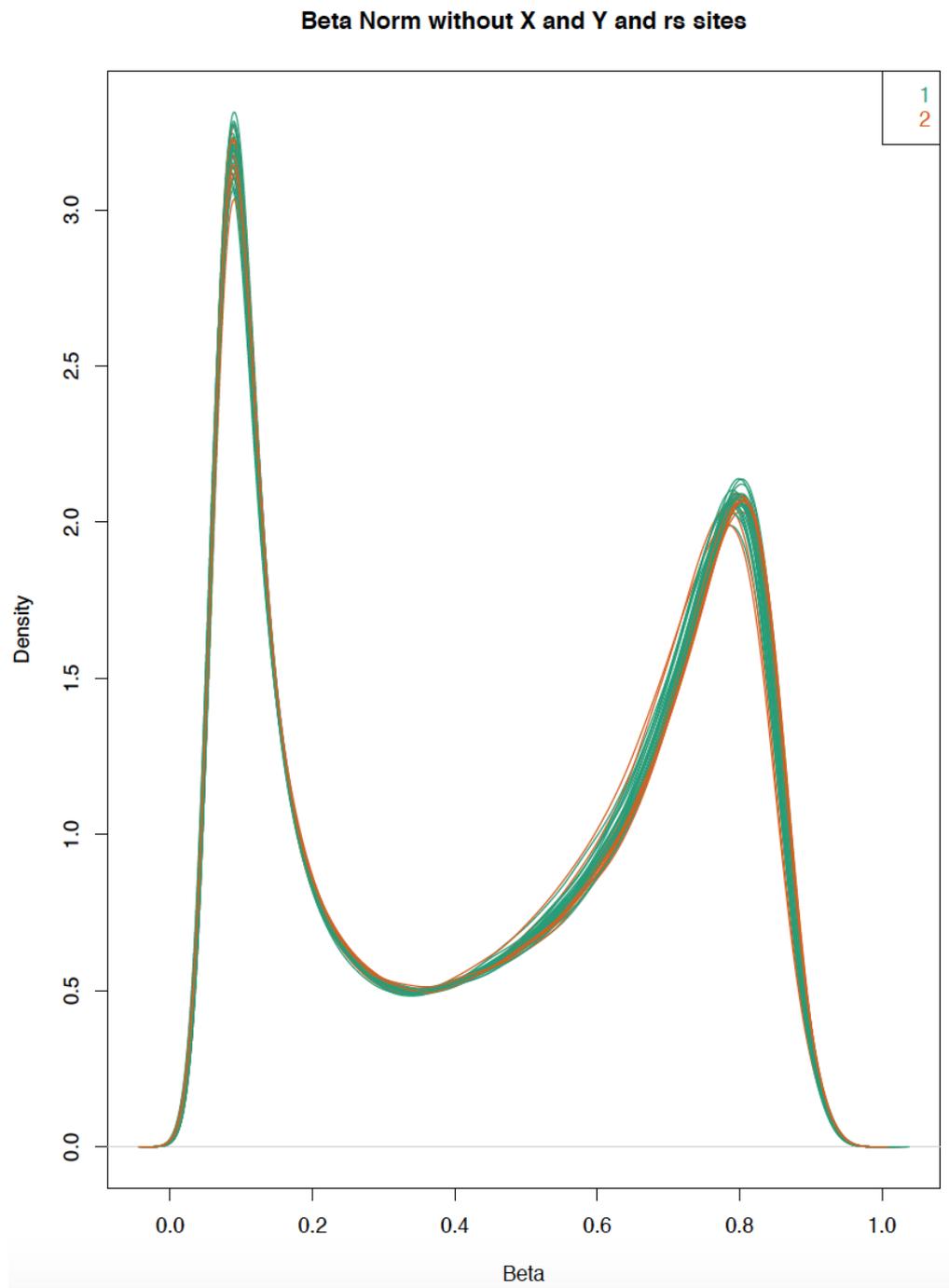


Figura 12. Representación de beta (porcentaje de metilación) en las diferentes muestras de grasa visceral analizadas, tras normalización, depurado y eliminación de muestras inadecuadas.

2.2. Comparación de zonas de metilación tisular según la presencia o no de diabetes

Los análisis estadísticos de las posiciones con metilación diferencial (DMP) para la variable DM en grasa subcutánea y visceral se ajustaron mediante las siguientes variables:

- Edad del paciente
- Género del paciente
- Tratamientos
- IMC (dado que existen diferencias significativas entre los grupos caso y control)

Los datos se han representado en función del valor de $\Delta\beta$ (delta beta: diferencia entre los valores medios de metilación de los casos – valores medios de metilación de los controles).

2.2.1. Comparación de patrón de metilación de tejido adiposo subcutáneo: casos vs controles

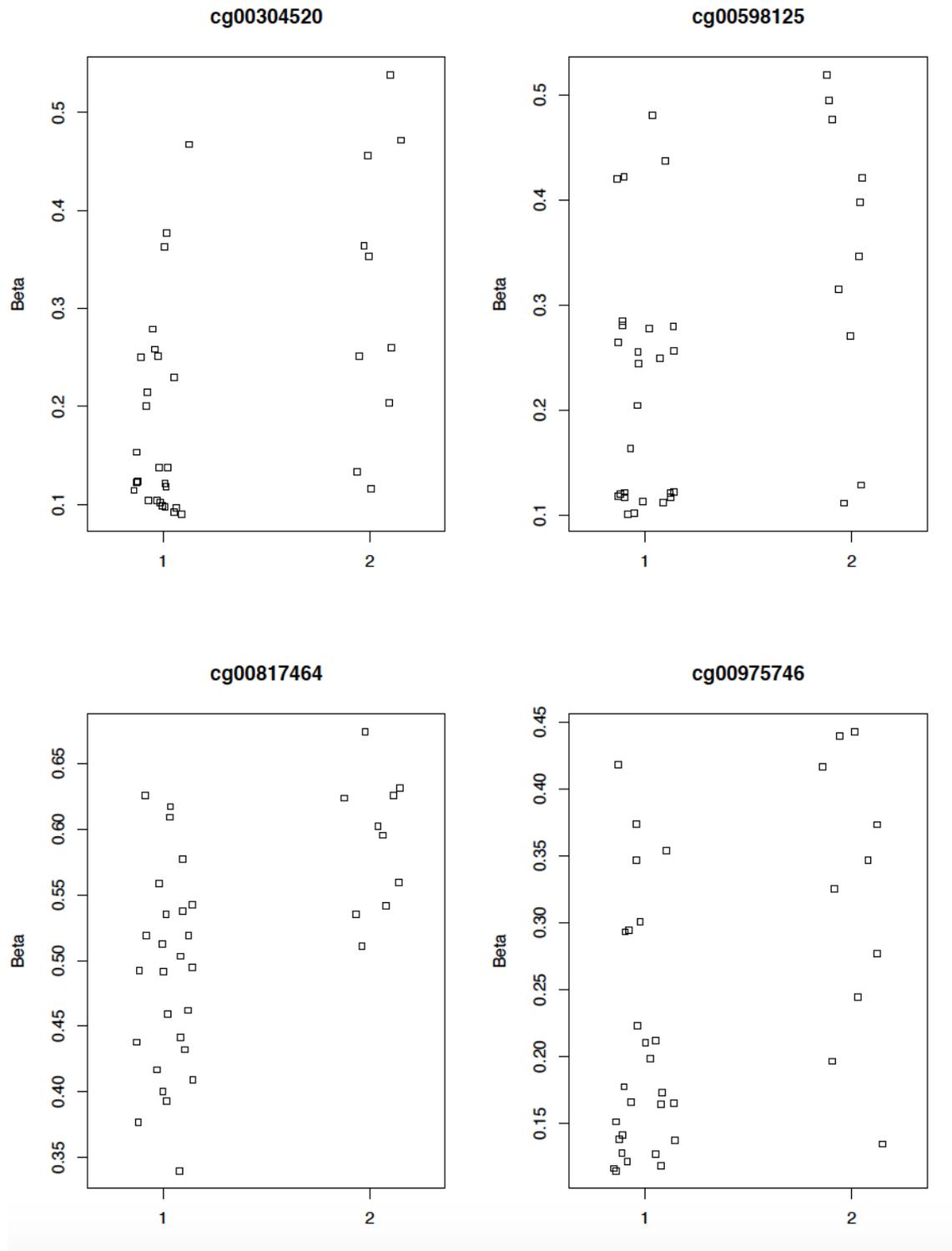
36 muestras de tejido adiposo subcutáneo mostraron calidad suficiente para el análisis. De las 456 134 sondas estudiadas, en 749 se encontró $\Delta\beta$ superior al 5% tras el ajuste por edad, género, tratamiento e IMC.

2.2.2. Posiciones con metilación diferencial ($\Delta\beta > 10\%$ entre casos y controles) en grasa subcutánea

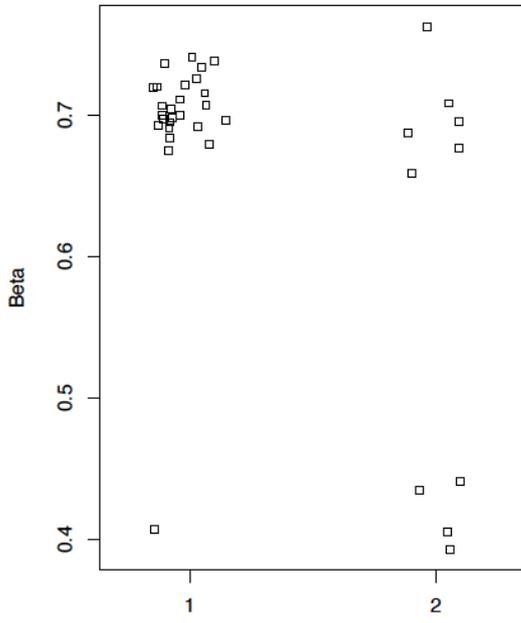
Se han hallado 39 posiciones con $\Delta\beta > 10\%$ entre casos y controles en grasa subcutánea. De ellas, 16 son tejido-específicas, 12 están hipermetiladas y 27 hipometiladas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

A continuación se muestran las representaciones de los porcentajes de metilación en las posiciones que han mostrado $\Delta\beta > 10\%$ entre casos y controles en grasa subcutánea. 1 indica casos y 2 indica controles.

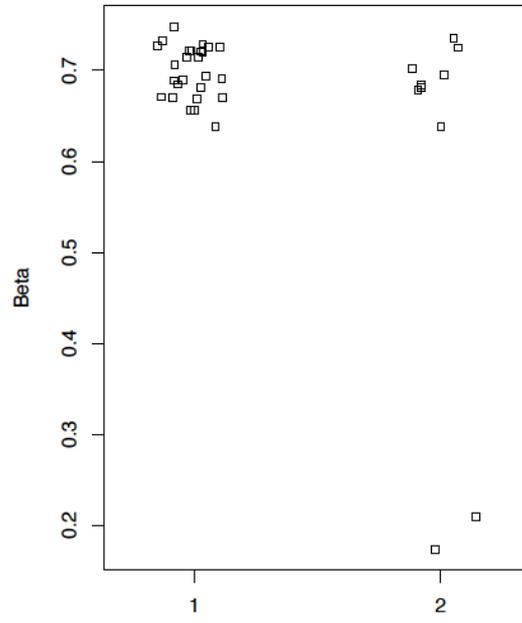
Figura 13. Posiciones con metilación diferencial ($\Delta\beta > 10\%$ entre casos y controles) en grasa subcutánea.



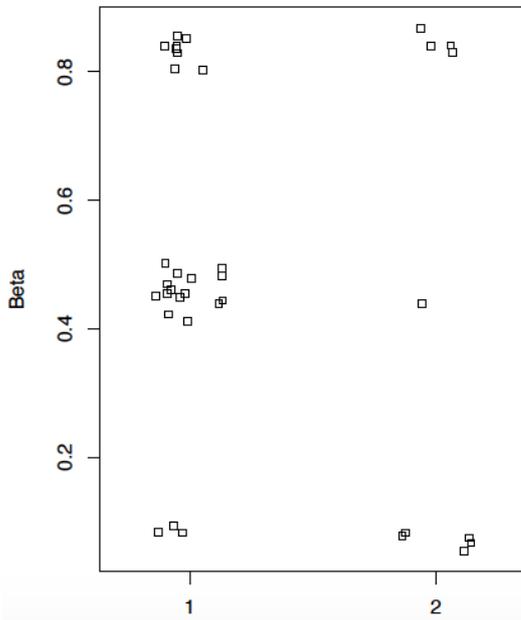
cg01019484



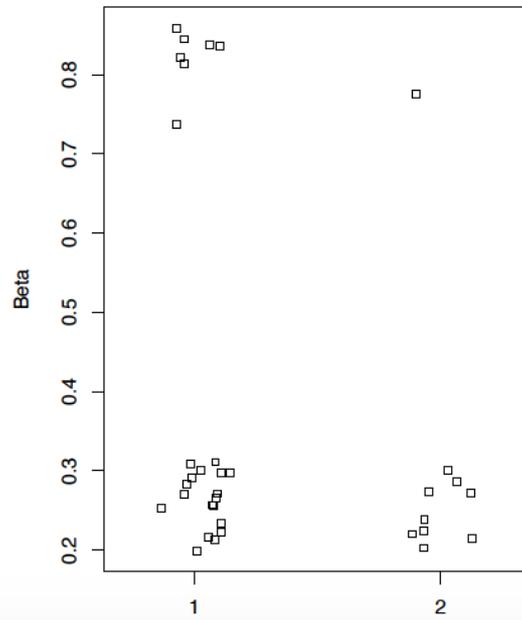
cg03997970



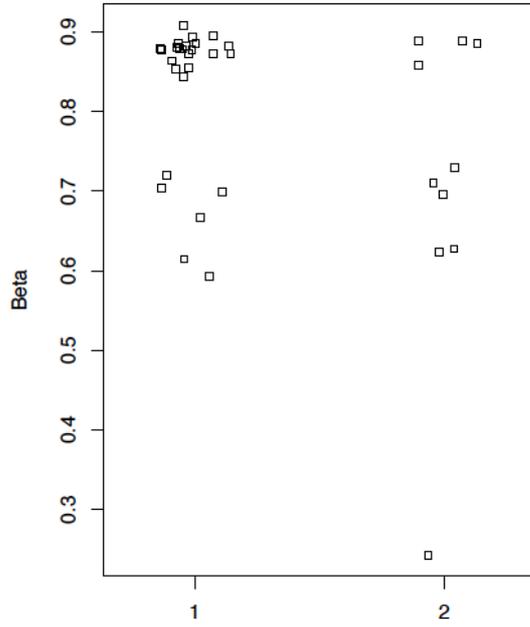
cg04131969



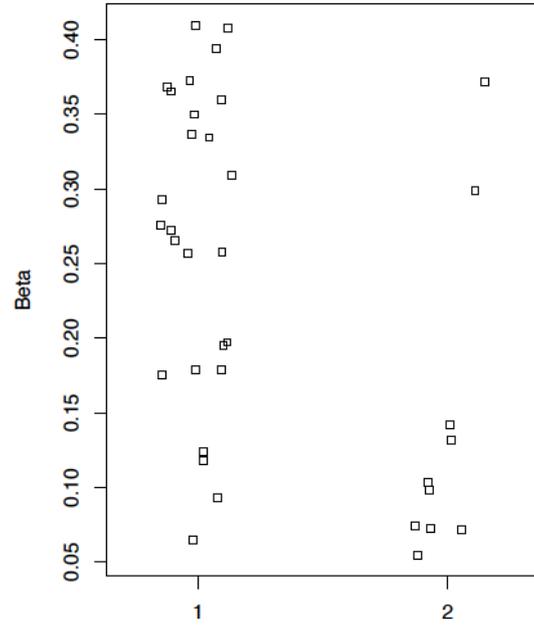
cg04234412



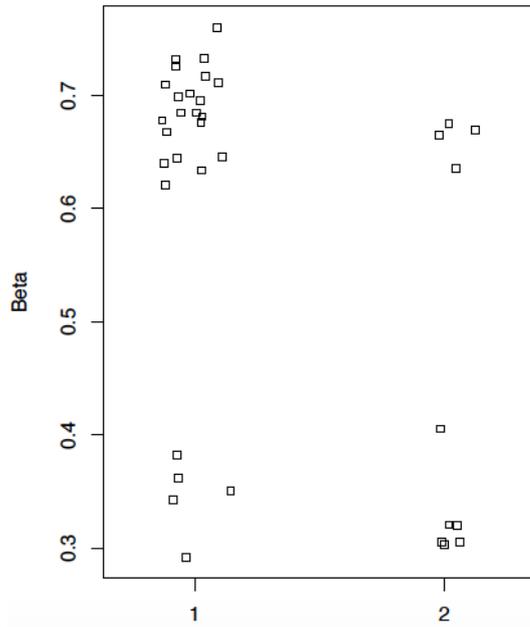
cg04245305



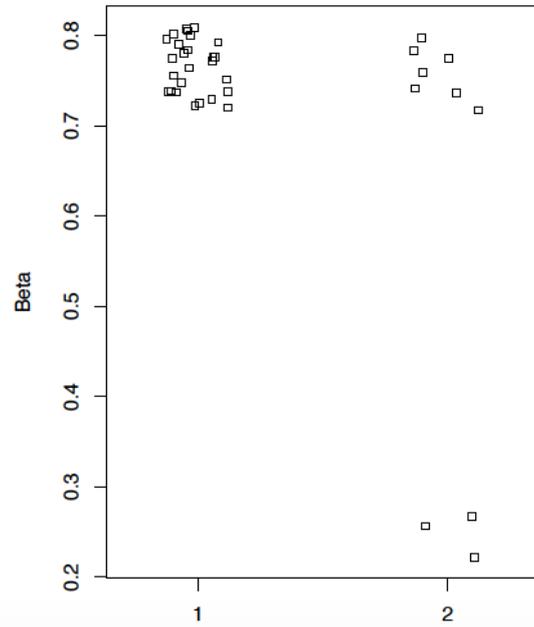
cg04875128



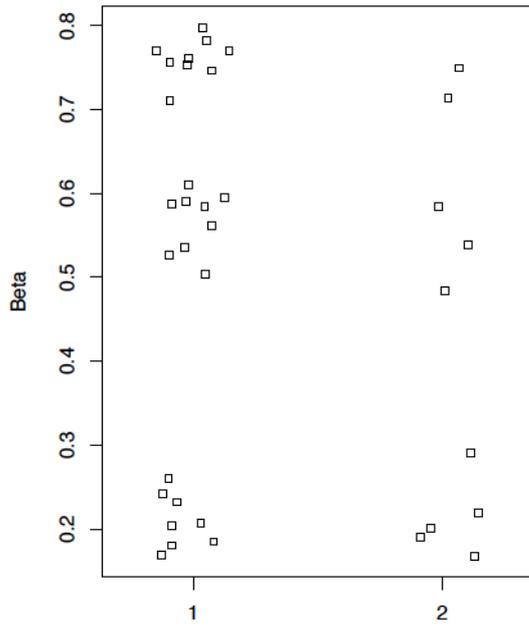
cg04926385



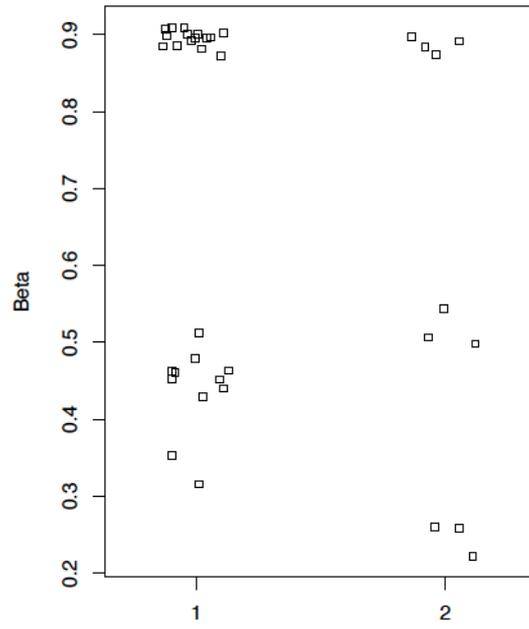
cg05840533



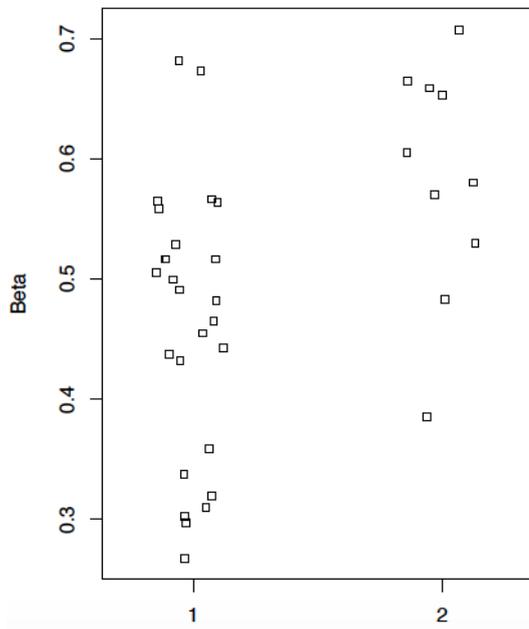
cg07167872



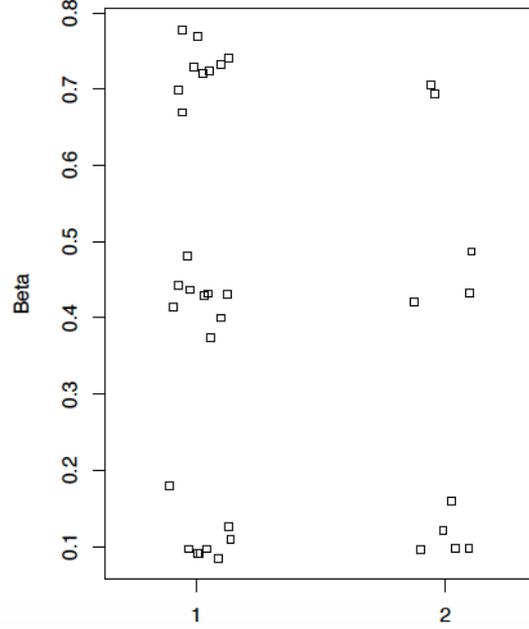
cg07249765



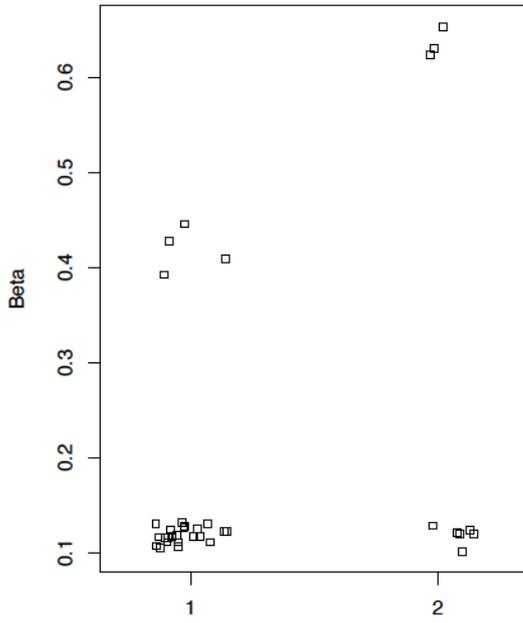
cg10486069



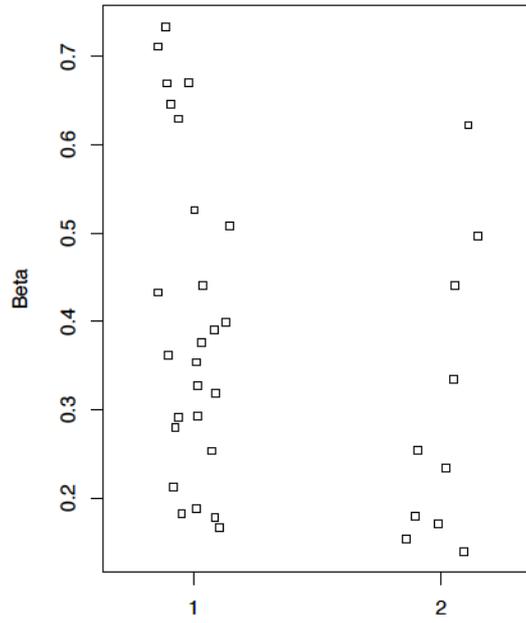
cg11965913



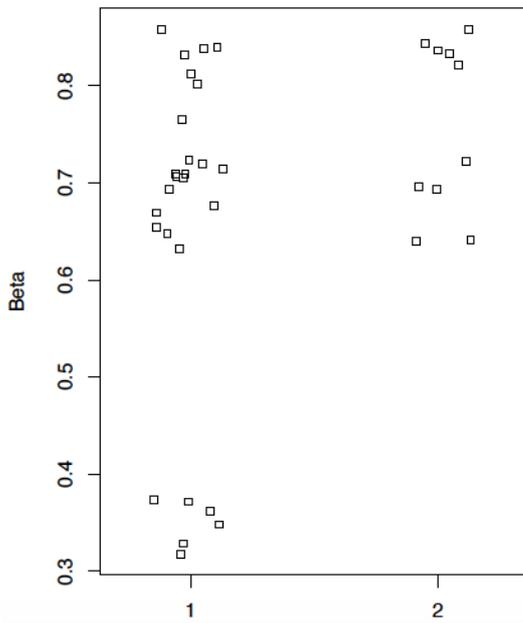
cg12856521



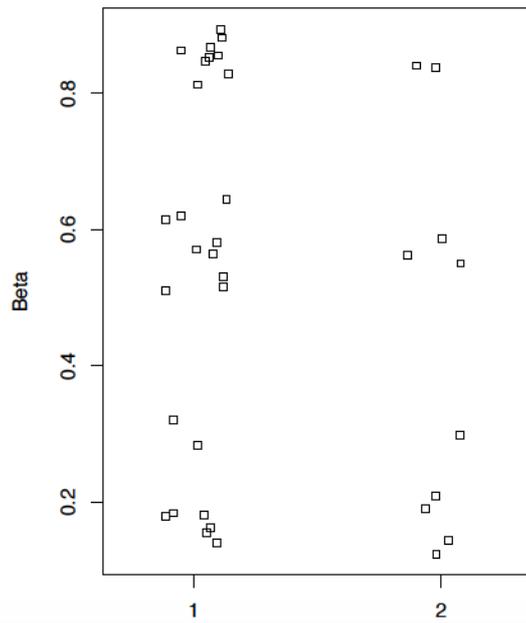
cg13401893



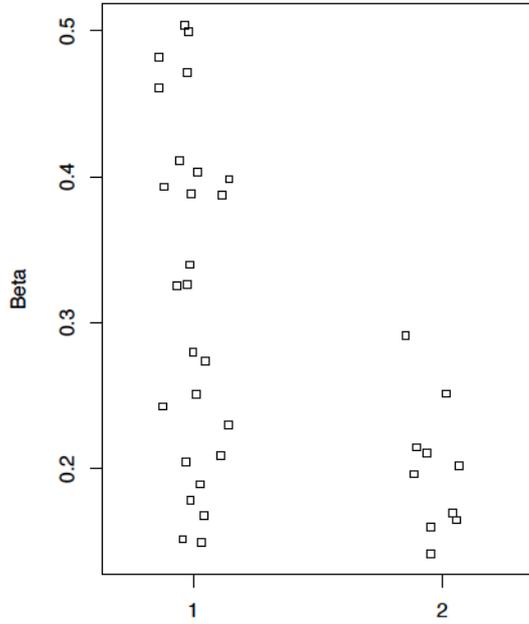
cg13684379



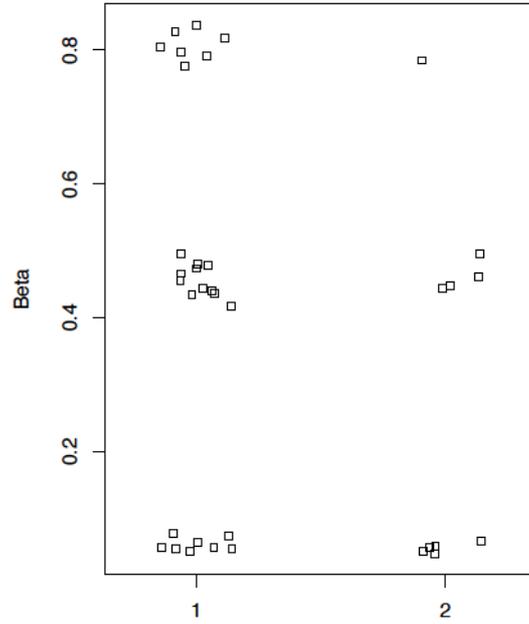
cg14159672



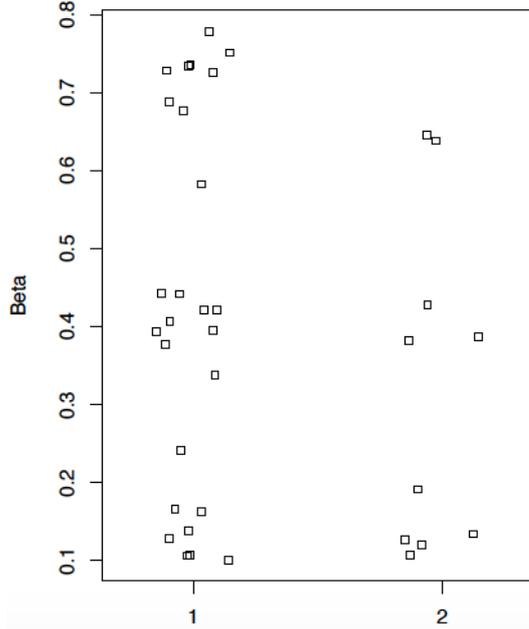
cg14530382



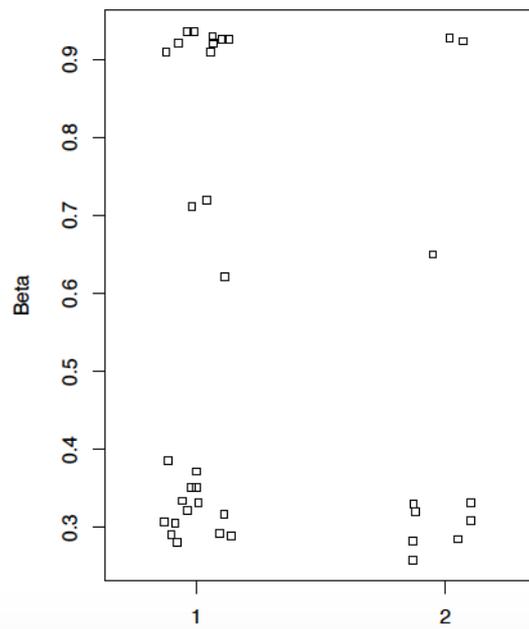
cg14859874



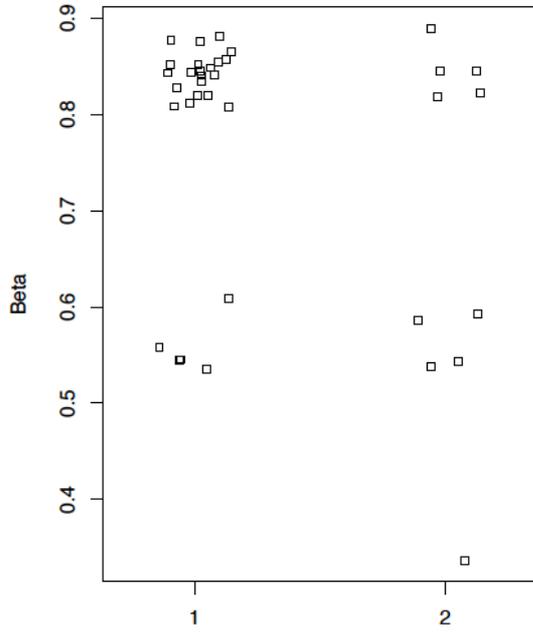
cg14893161



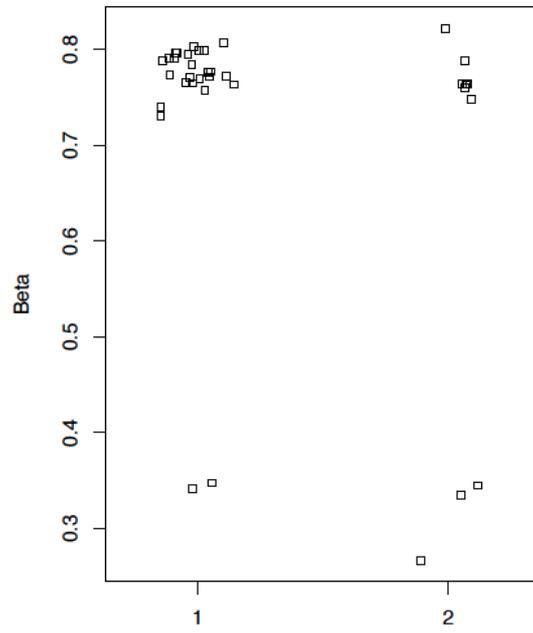
cg15415945



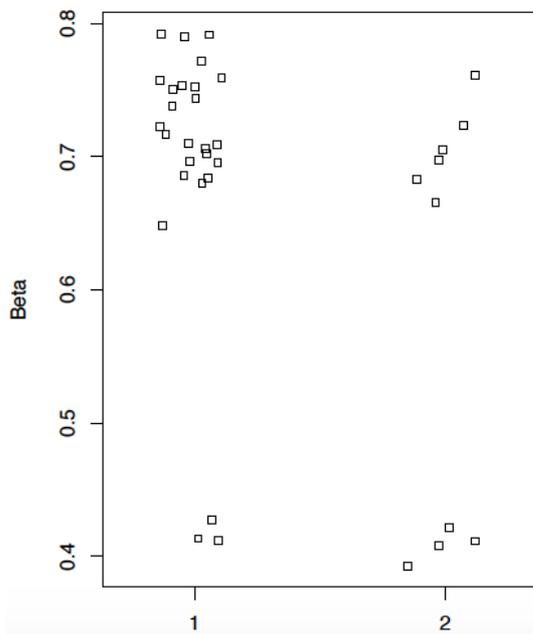
cg15820961



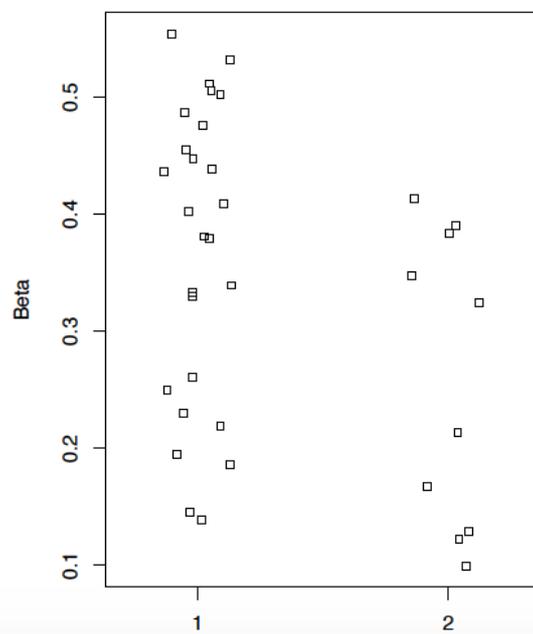
cg19263494



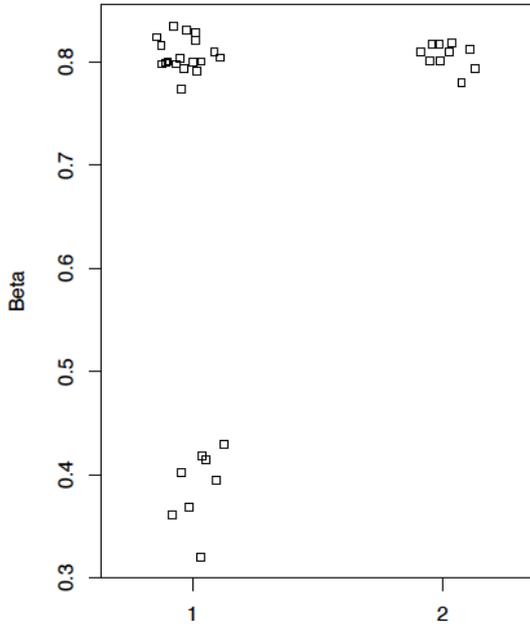
cg20409752



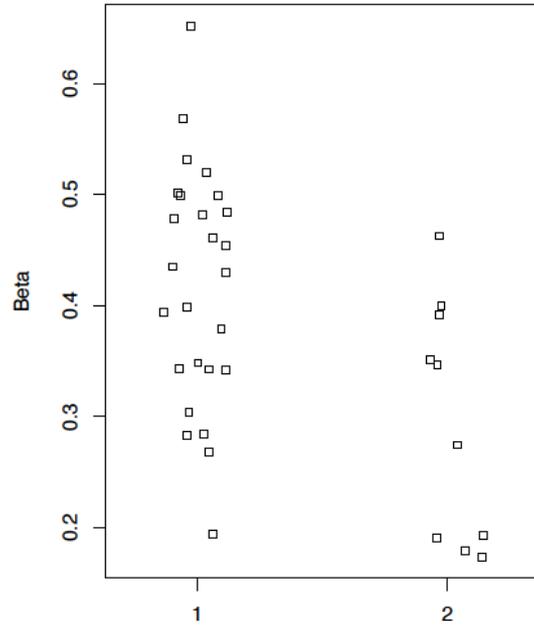
cg21697851



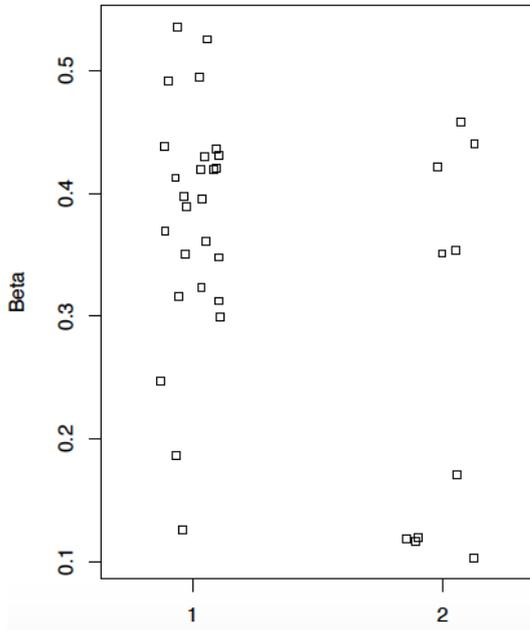
cg22504140



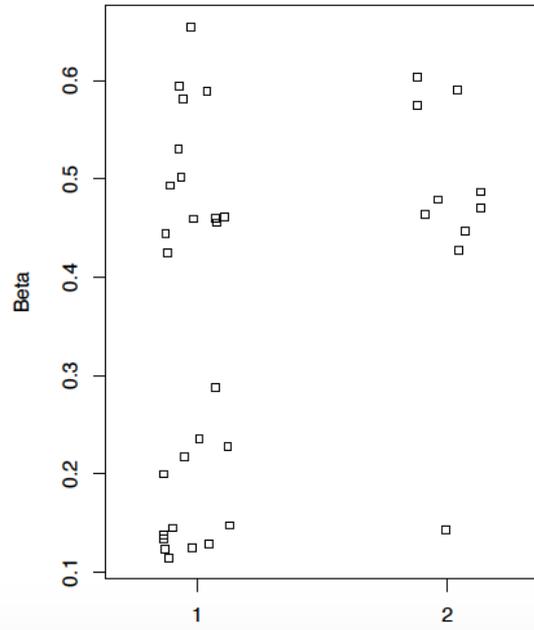
cg23279522



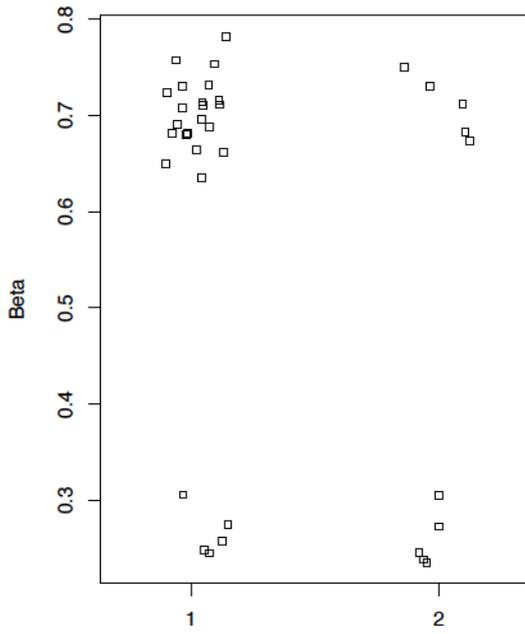
cg23286646



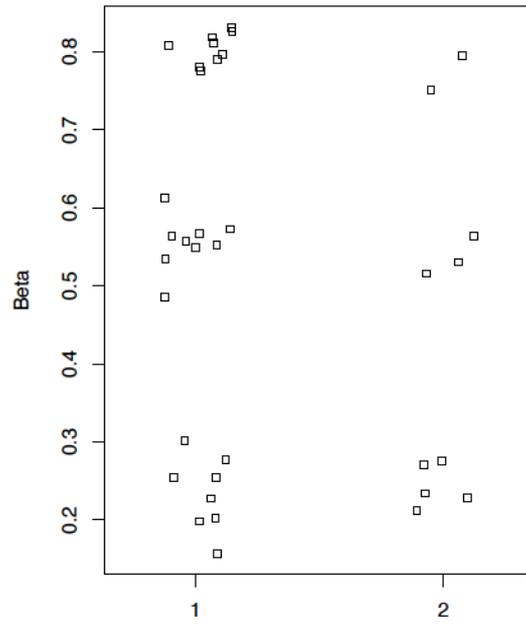
cg23758822



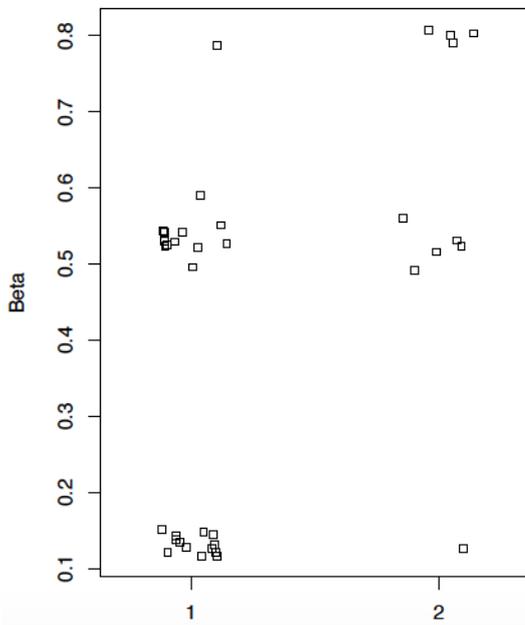
cg23804921



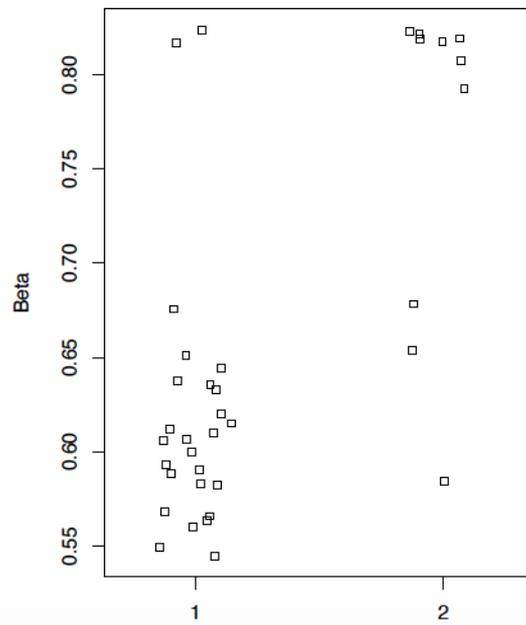
cg24503407

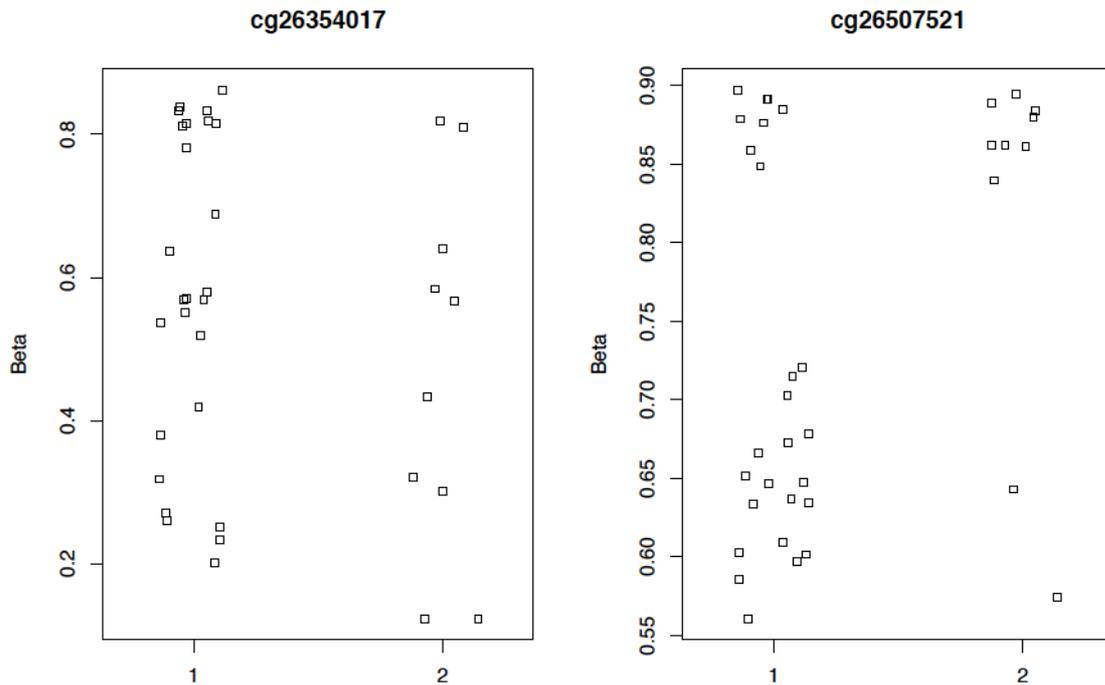


cg25134647



cg26287152





2.2.3. Comparación de patrón de metilación de tejido adiposo visceral: casos vs controles

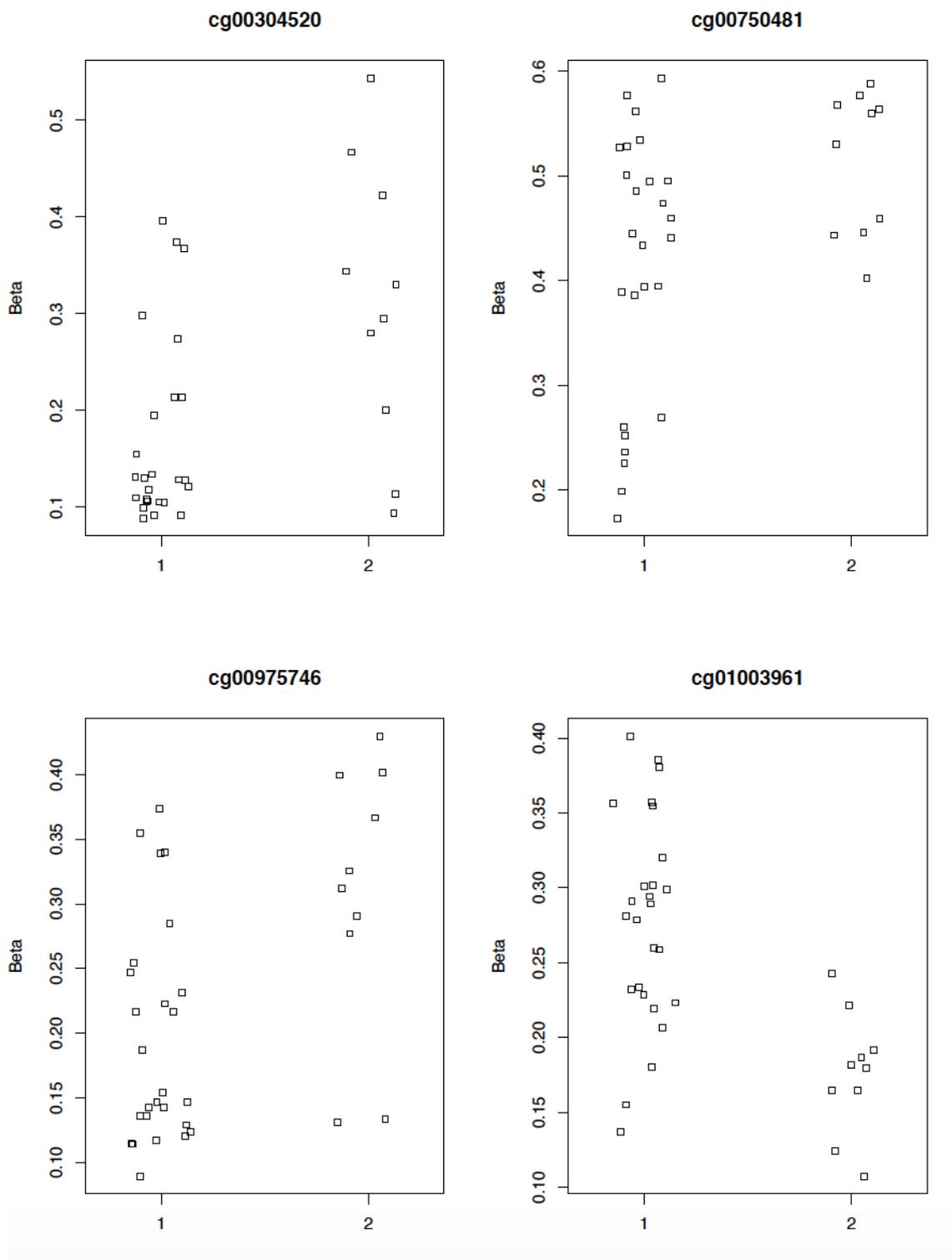
36 muestras de tejido adiposo visceral mostraron calidad suficiente para el análisis. De las 454 920 sondas estudiadas, en 862 se encontró $\Delta\beta$ superior al 5% tras el ajuste por edad, género, tratamiento e IMC.

2.2.4. Posiciones con metilación diferencial ($\Delta\beta >10\%$ entre casos y controles) en grasa visceral

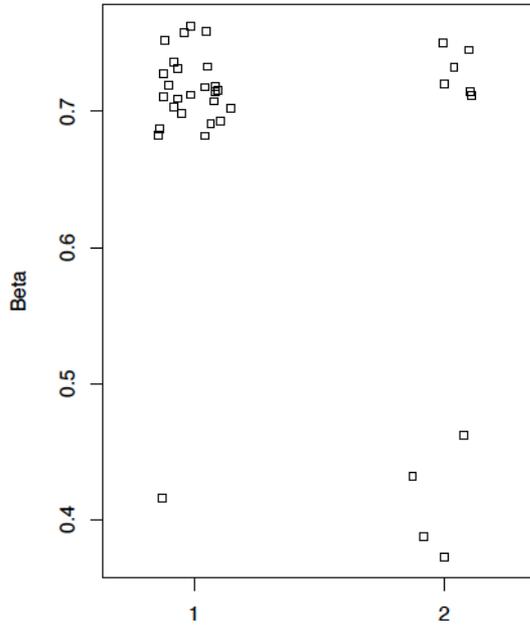
Se han hallado 41 posiciones con $\Delta\beta >10\%$ entre casos y controles en grasa visceral. De ellas, 21 son tejido-específicas, 17 están hipermetiladas y 24 hipometiladas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

A continuación se muestran las representaciones de los porcentajes de metilación en las posiciones que han mostrado $\Delta\beta >10\%$ entre casos y controles en grasa visceral. 1 indica casos y 2 indica controles.

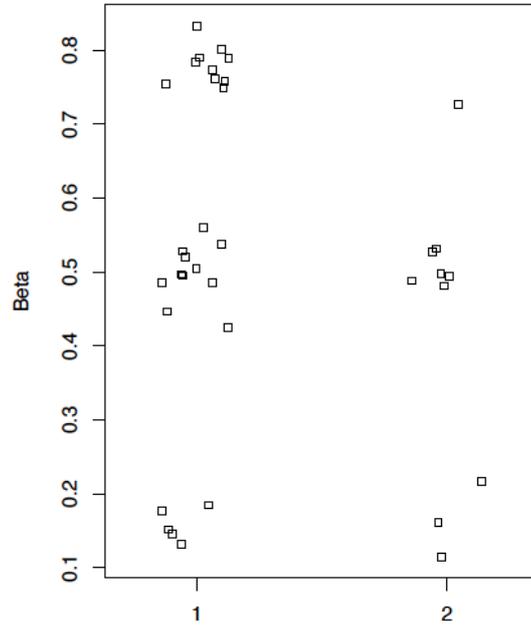
Figura 14. Posiciones con metilación diferencial ($\Delta\beta > 10\%$ entre casos y controles) en grasa visceral.



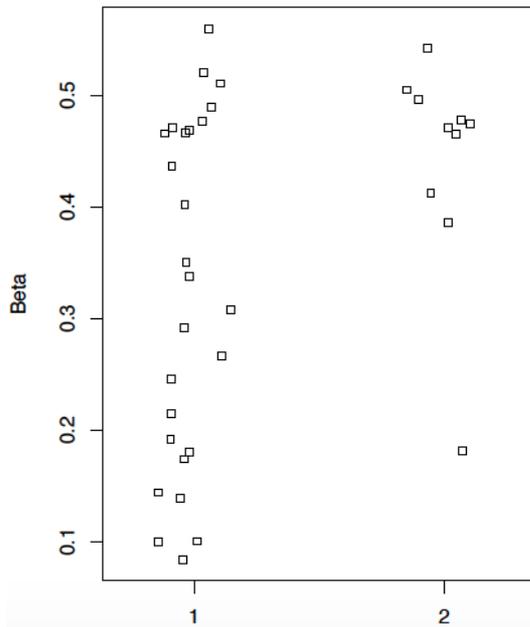
cg01019484



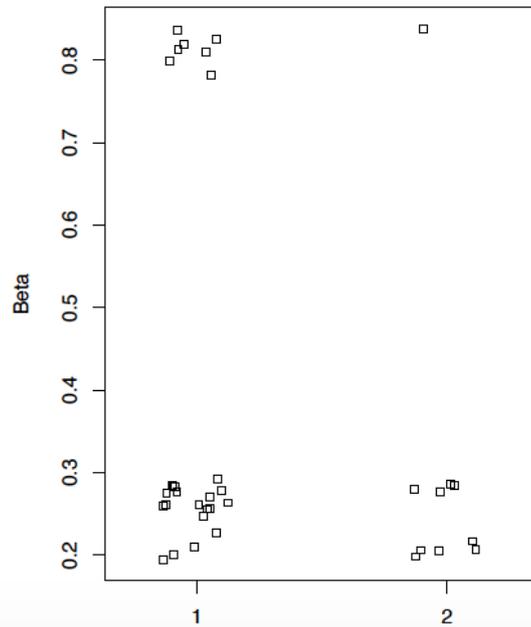
cg01778345



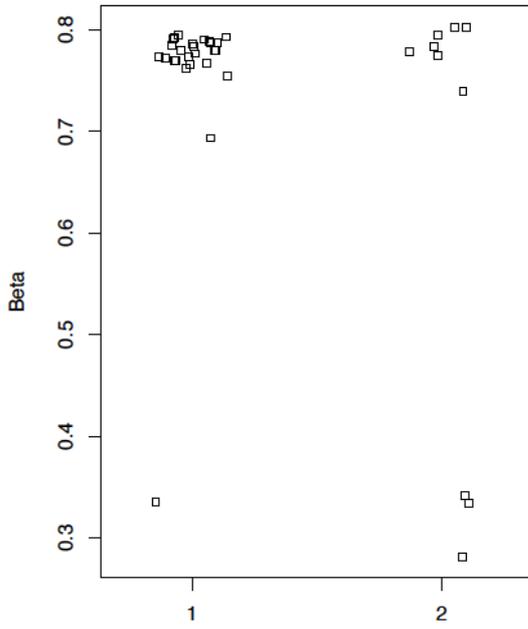
cg02009088



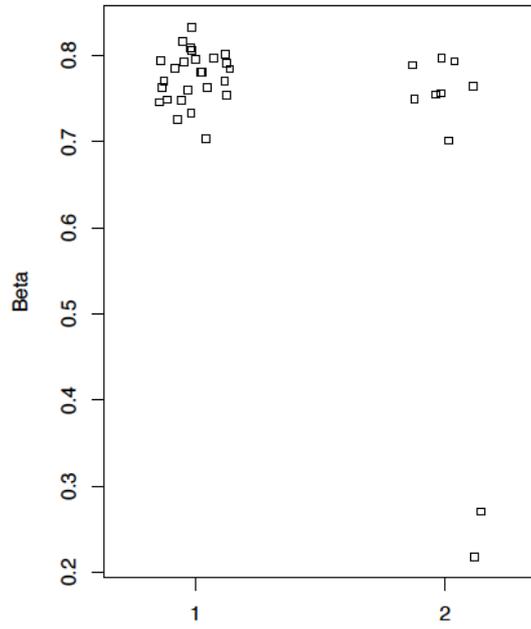
cg04234412



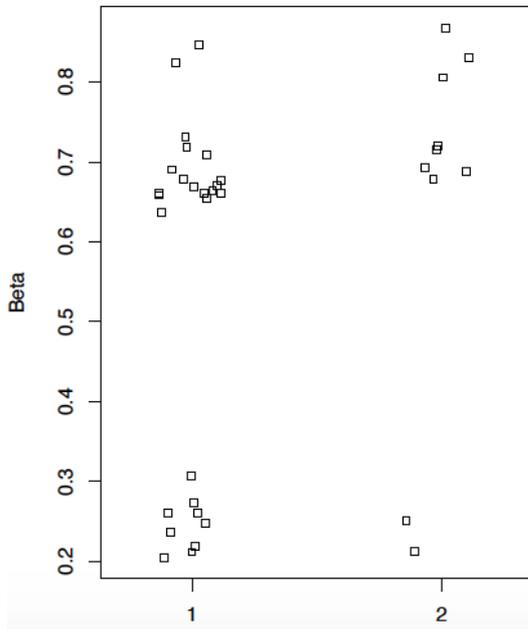
cg04757661



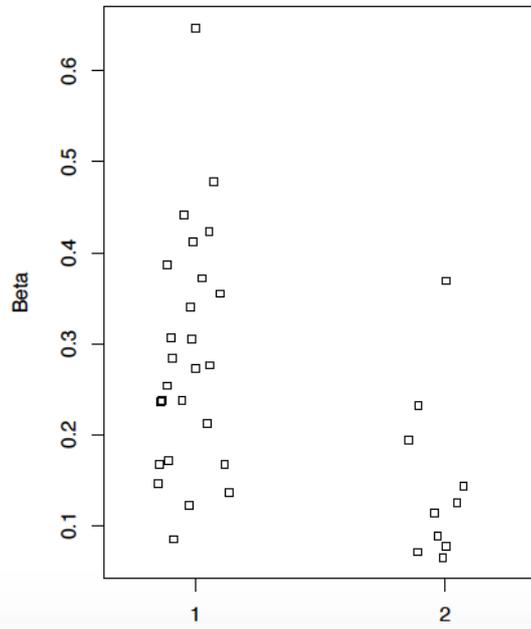
cg05840533



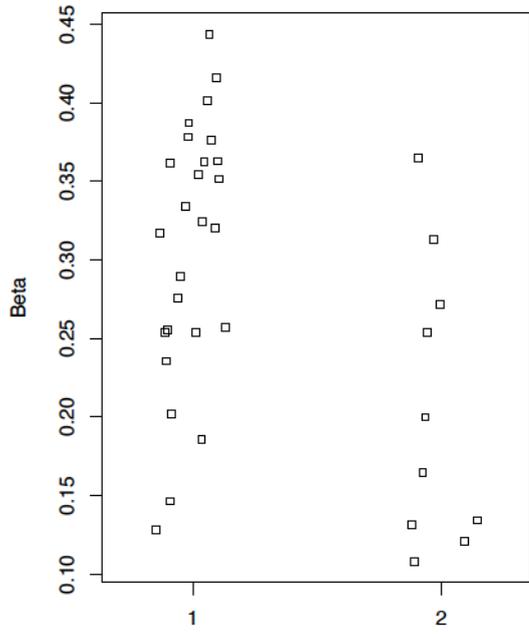
cg06193597



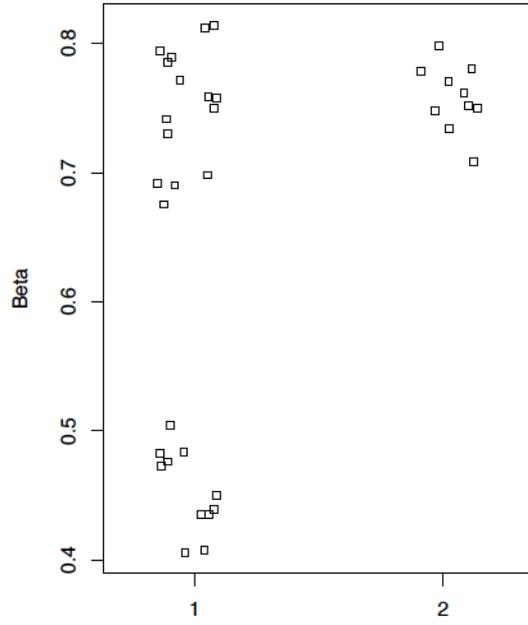
cg06249604



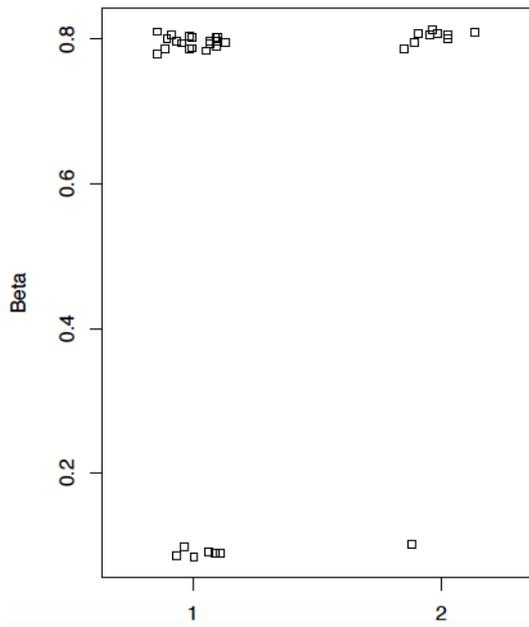
cg07064495



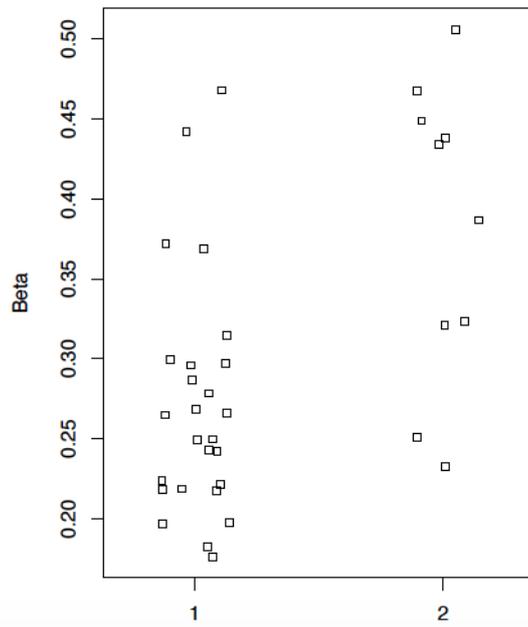
cg08354527



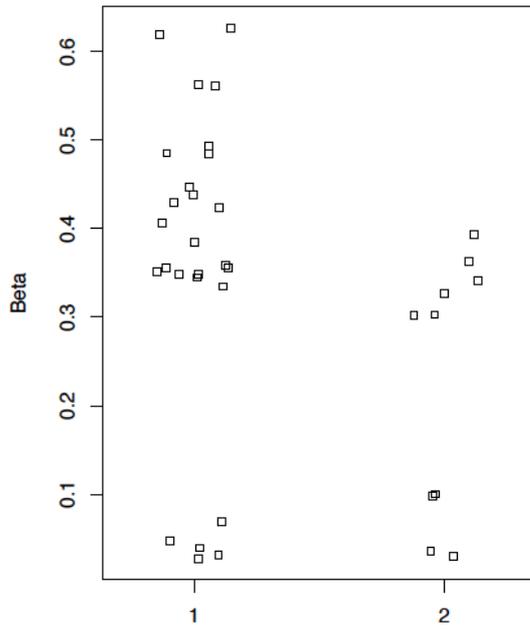
cg08441918



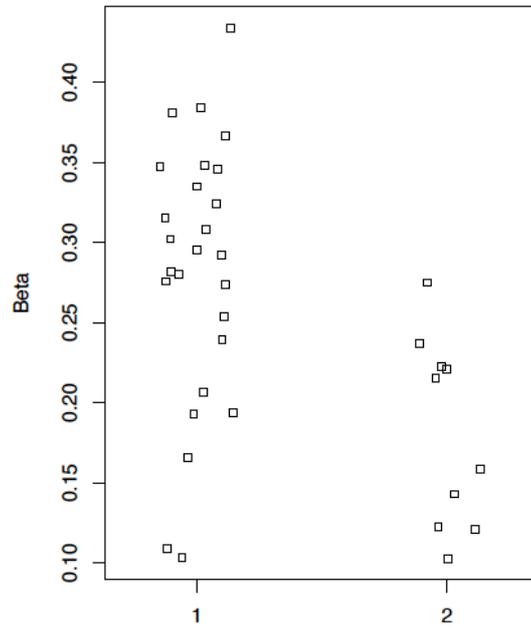
cg10143960



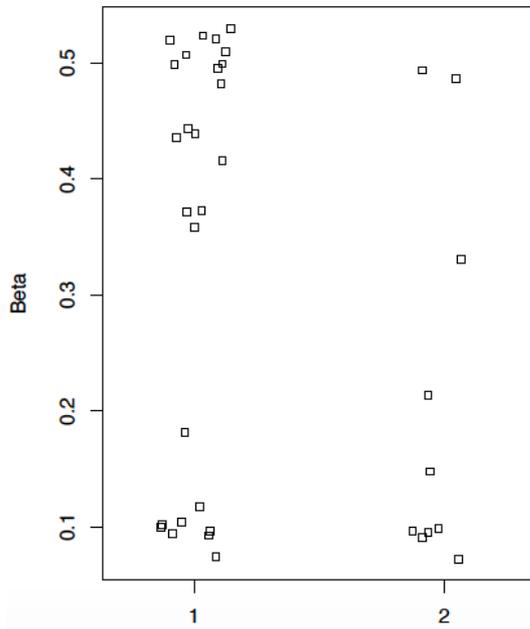
cg10982913



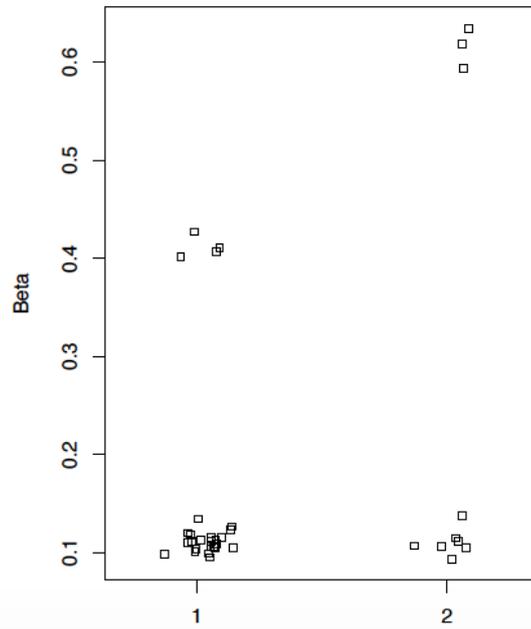
cg11218091



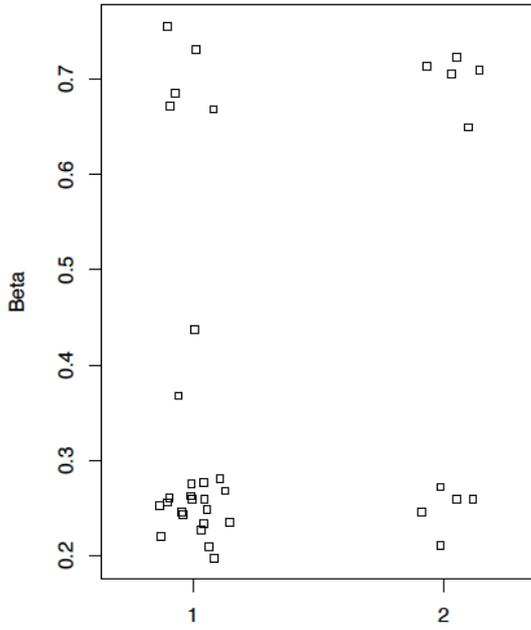
cg11424828



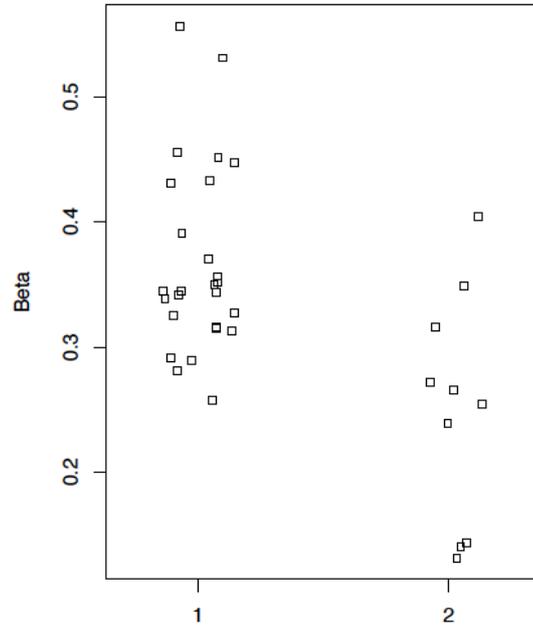
cg12856521



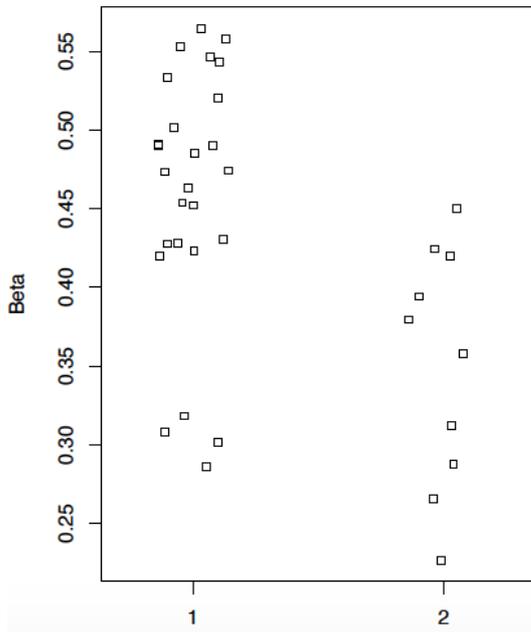
cg13064658



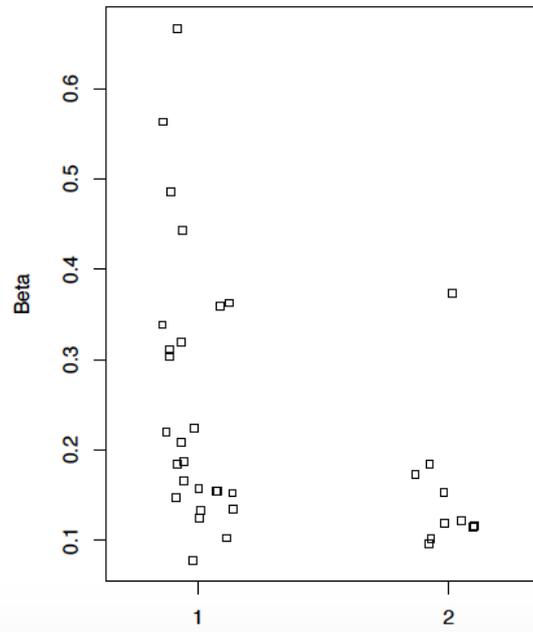
cg13185413



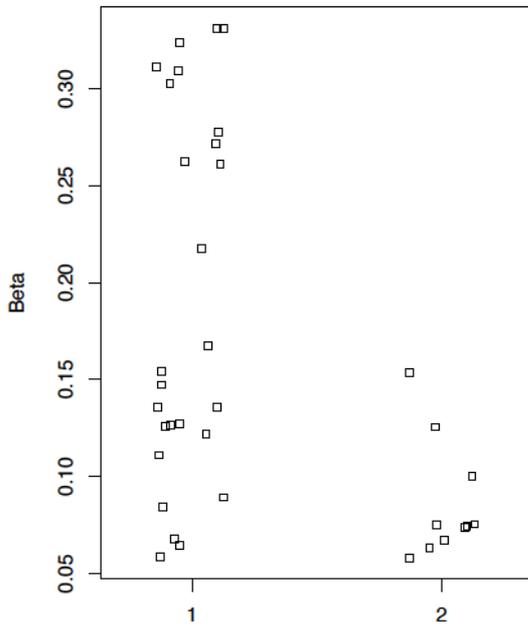
cg13526469



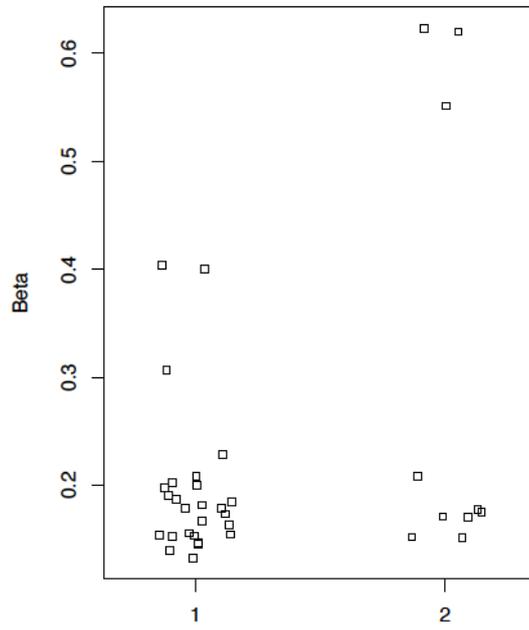
cg13918754



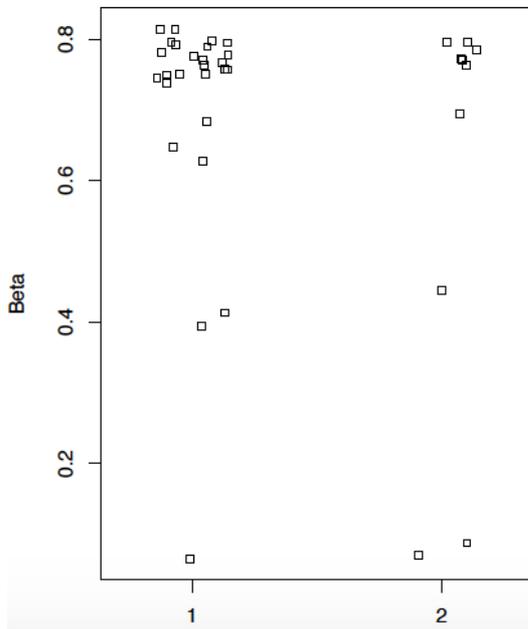
cg13985784



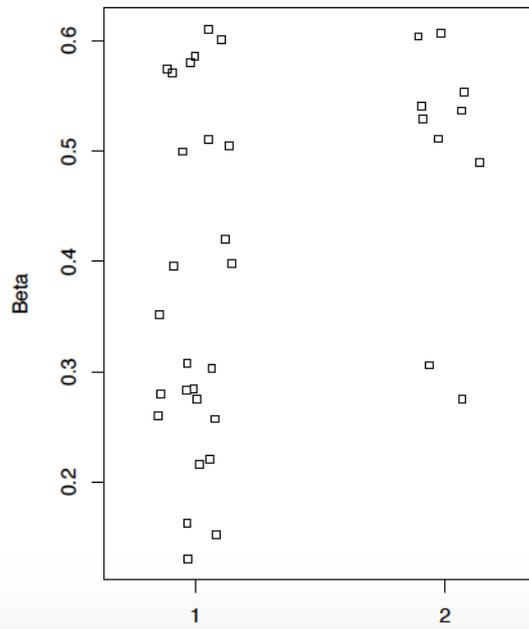
cg14120784



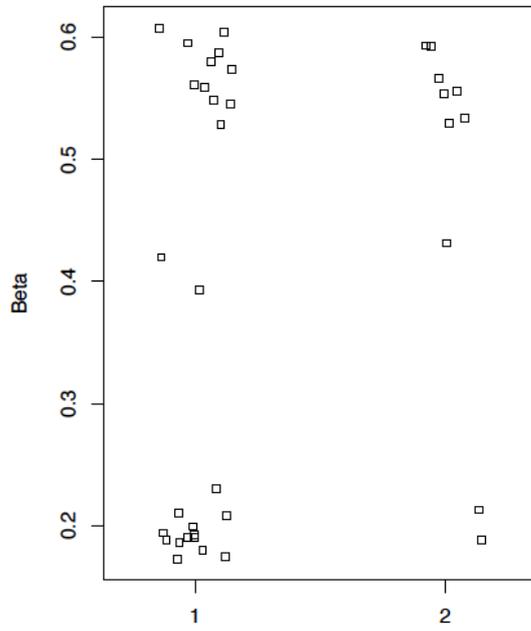
cg14341177



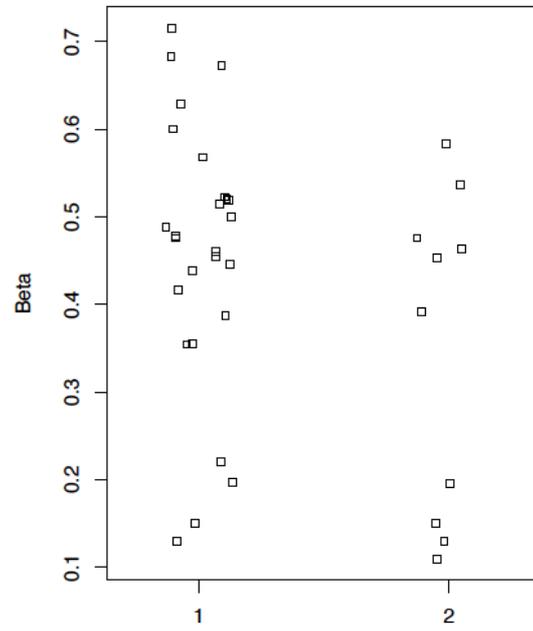
cg14825413



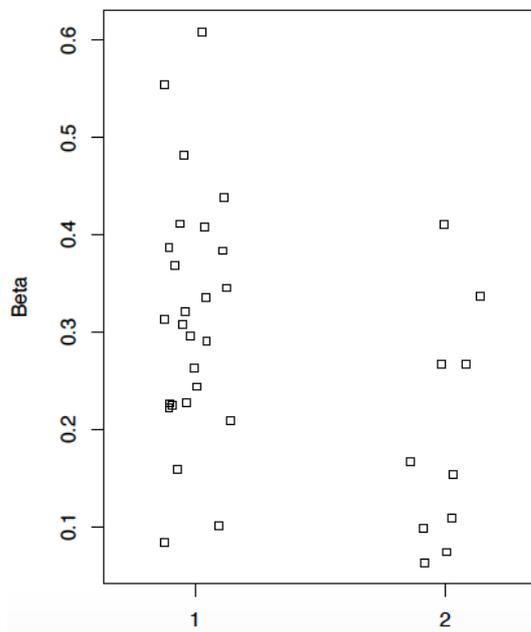
cg15279541



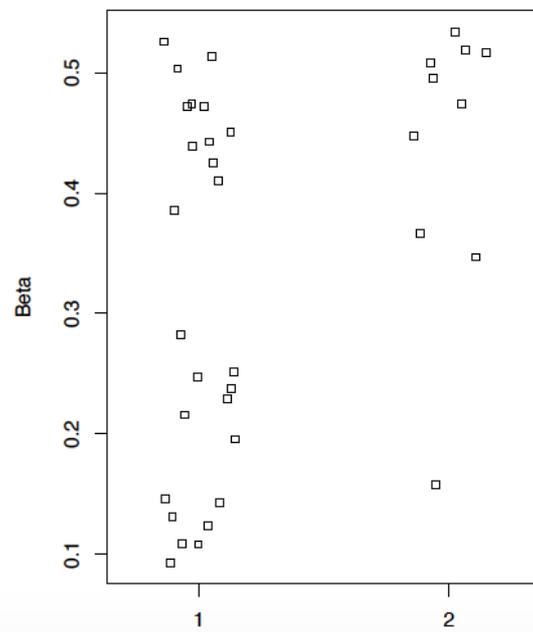
cg15634083



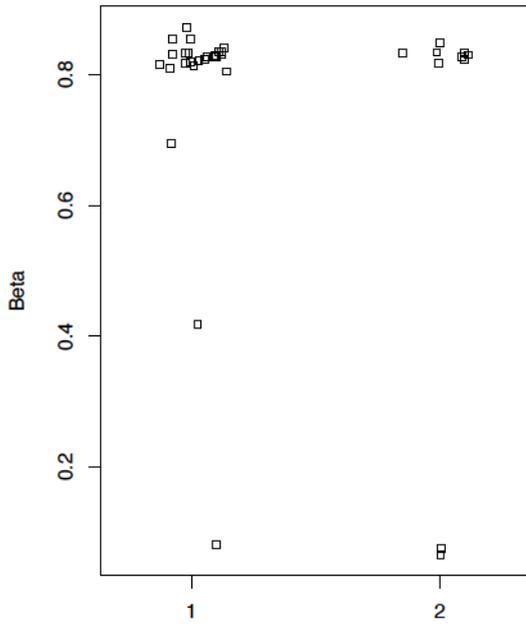
cg15877520



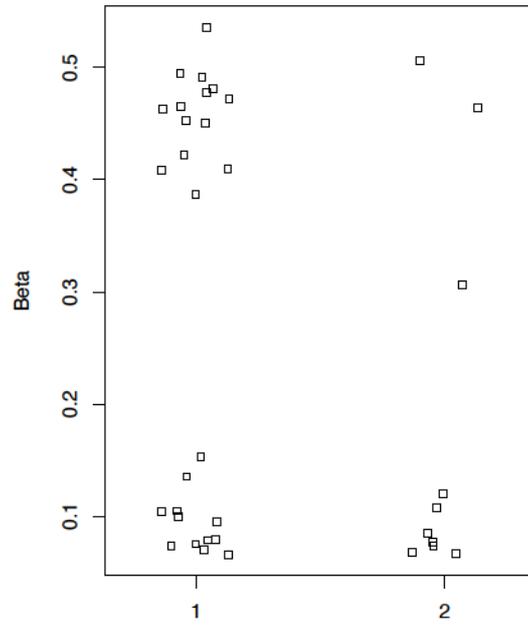
cg15992535



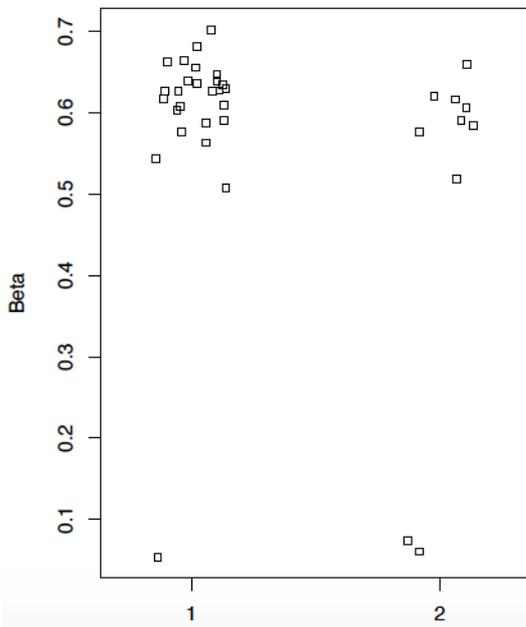
cg19533582



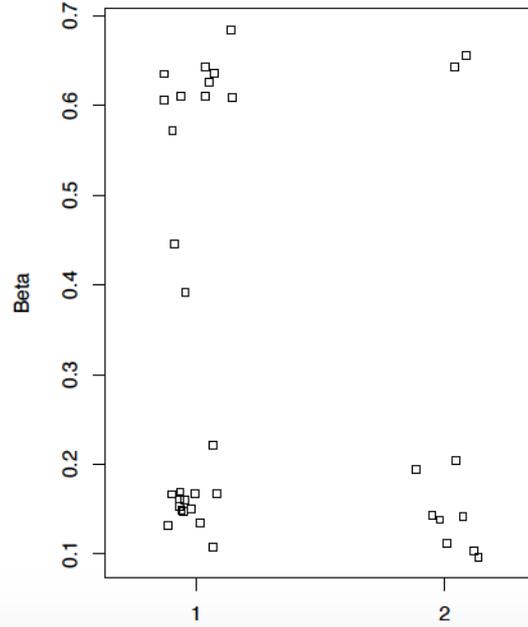
cg21139150



cg21644740



cg21847720



2.2.5. Representación de posiciones con metilación diferencial ($\Delta\beta >15\%$ entre casos y controles)

Grasa subcutánea

Nombre	Cromosoma	Posición	Hebra	Tipo	Relación con la isla	P valor	Media beta controles	Media beta casos	$\Delta\beta$ (casos - controles)	$\Delta\beta$ (%)
cg25134647	chr12	25454990	-	II	OpenSea	0,002375687	0,340284814	0,595286089	0,255001275	25,50012749
cg04926385	chr8	2122339	+	II	OpenSea	0,081971176	0,620730901	0,460894166	-0,159836735	15,98367346
cg05840533	chr20	31755943	+	II	OpenSea	0,005656582	0,763909915	0,605805163	-0,158104752	15,81047519

Tabla 6. Relación de posiciones con $\Delta\beta$ (casos - controles) mayor a 15% en adipocitos de tejido adiposo subcutáneo.

Grasa visceral

Nombre	Cromosoma	Posición	Hebra	Tipo	Relación con la isla	P valor	Media beta controles	Media beta casos	$\Delta\beta$ (casos - controles)	$\Delta\beta$ (%)
cg25134647	chr12	25454990	-	II	OpenSea	0,001907186	0,330923211	0,55102632	0,220103109	22,01031092
cg23804921	chr15	30861172	+	II	N Shelf	0,079345134	0,602785421	0,430705929	-0,172079492	17,2079492
cg27586797	chr5	13664584	-	II	OpenSea	0,003416219	0,490225092	0,320119972	-0,170105121	17,01051206

Tabla 7. Relación de posiciones con $\Delta\beta$ (casos - controles) mayor a 15% en adipocitos de tejido adiposo visceral.

Se remarcan en negrita las posiciones con diferencias estadísticamente significativas

V. Discusión

1. Métodos

En este estudio se ha analizado el patrón de metilación de ADN de adipocitos subcutáneos y viscerales de pacientes con obesidad mórbida, con y sin diabetes mellitus tipo 2, extraídos durante la intervención de cirugía bariátrica. Se analizaron las muestras tisulares de 40 pacientes, 28 de los cuales presentaban DM2 en el momento de la intervención.

El grupo completo consistía en 15 hombres y 25 mujeres. Respecto a la comparación de parámetros antropométricos entre hombres y mujeres, se objetivaron diferencias significativas en el peso 1 mes y 7 días pre-intervención y en el perímetro de cintura 1 mes y 7 días pre-intervención, siendo menor en todos los casos el de las mujeres. No se evidenciaron diferencias significativas entre el grupo de hombres y el grupo de mujeres en el IMC medido 1 mes y 7 días antes de la cirugía. En los parámetros bioquímicos estudiados se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de colesterol total, colesterol LDL y colesterol no HDL.

Comparando a los sujetos del estudio categorizados por la presencia o ausencia de DM2, se hallaron diferencias en la edad y en todos los parámetros antropométricos (peso, perímetro de cintura e IMC) en ambos puntos temporales (1 mes y 7 días pre-intervención quirúrgica). La explicación de este hallazgo está en probable relación con que la indicación quirúrgica de la cirugía bariátrica suele hacerse con IMC más bajo en pacientes que tienen una comorbilidad establecida, como la DM2. De hecho, en pacientes con obesidad mórbida sin otras comorbilidades la indicación quirúrgica suele hacerse con IMC igual o superior a 40, mientras que en pacientes con obesidad y otras comorbilidades puede hacerse con IMC igual o superior a 35. La mediana de años de evolución de diabetes fue de 6 años (rango 0,1 - 20).

Con respecto a los parámetros bioquímicos, lógicamente se encontraron diferencias significativas en la glucemia basal y la hemoglobina glicosilada (HbA1c). Además, también se hallaron diferencias en los niveles de triglicéridos. No se hallaron diferencias en el colesterol total, HDL, LDL, no HDL, creatinina ni albuminuria. Sorprendentemente, tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la insulinemia ni en el HOMA-IR de pacientes con o sin diabetes tipo 2. Este hecho

podría deberse a que la gran mayoría de los pacientes con diabetes estaba en tratamiento con metformina, a la que en algunos se añadían otros antidiabéticos orales y/o insulina. Otra explicación posible es que los pacientes con obesidad mórbida sin diabetes presentaran ya el estado de insulinoresistencia que precede a esta enfermedad.

2. Selección de tejidos a analizar y análisis de las muestras

Seleccionamos como muestras tisulares para nuestro estudio tejido graso subcutáneo y visceral, dado el crucial papel que representa el tejido adiposo en la fisiopatología de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. Varios estudios previos han mostrado que tejidos adiposos de diferentes localizaciones presentan diferentes patrones de metilación, lo cual es comprensible por sus diferentes orígenes ontogénicos, su distinta fisiología, estructura, composición celular, influencias endocrinológicas y expresión génica (52,53). En modelo murino, Sonne et al (54) demostraron que, tanto en obesidad inducida por dieta como en obesidad genética, había más cambios de metilación asociados a la obesidad en los adipocitos epididimales (equiparables a viscerales) que en los adipocitos inguinales (equiparables a subcutáneos). Macartney-Coxon et al (55) analizaron muestras de tejido adiposo subcutáneo y omental en pacientes antes de cirugía bariátrica y observaron 3239 posiciones CpG diferencialmente metiladas entre los dos tipos de tejidos adiposos.

Las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral se procesaron y analizaron de acuerdo al procedimiento estándar. Se utilizó el sistema Illumina® Infinium® HD Methylation Assay, concretamente, los chips de metilación Infinium HumanMethylation 450K Array. Respecto a su antecesor, que estudiaba unos 27 578 dinucleótidos CpG en unos 14 495 genes, la versión utilizada en nuestro estudio analiza más de 480 000 posiciones CpG, con una media de 17 sondas por gen. Además, no solo estudia islas CpG, sino que también se distribuyen las sondas por varios elementos funcionales, entre ellos los “shores” y “shelves” de las islas CpG, regiones 3’UTR y 5’UTR, cuerpos génicos, promotores de miRNA, etc. (56). Estos sistemas permiten estudios EWAS (“epigenome wide association studies” o “estudios de asociación del genoma completo”), en los que se analiza la práctica totalidad del epigenoma en busca

de alteraciones o diferencias en el patrón que puedan explicar la patología. La extracción, purificación, cuantificación y filtrados de calidad de las muestras requieren un procedimiento laborioso y complejo, que debe ser realizado por personal experimentado. En nuestro estudio se han eliminado del análisis las muestras que no cumplían los criterios de calidad y se han realizado todos los ajustes pertinentes para eliminación de ruido de fondo.

3. Resultados obtenidos

Aunque en la bibliografía suele utilizarse como punto de corte $\Delta\beta >20\%$, en nuestro estudio no hemos encontrado sitios que alcanzaran ese umbral. Al comparar los patrones de metilación entre pacientes con y sin DM2, se han hallado 3 posiciones CpG en tejido adiposo subcutáneo y 3 en tejido visceral que muestran $\Delta\beta$ superior al 15%, una de las cuales (cg25134647) es común en los dos tejidos adiposos analizados. Estos hallazgos siguen la línea de un estudio previo en el que se investigó la metilación de LINE-1 (Long Intersped Nucleotide Element 1), que se considera marcador subrogado de la metilación génica global, en una población de pacientes con obesidad mórbida con o sin DM2, antes de ser intervenidos de cirugía bariátrica. El tejido de estudio fue sangre periférica, pero no se encontraron diferencias significativas en la metilación de LINE-1 entre los pacientes con o sin DM2 ni al inicio del estudio ni 6 meses tras la intervención (57). Por otro lado, Nilsson et al (58) seleccionaron 14 pares de gemelos monozigóticos discordantes para el fenotipo diabetes tipo 2 y otras cohortes de sujetos con y sin diabetes tipo 2 y analizaron la metilación de tejido adiposo. No se encontraron diferencias significativas en la metilación global de los gemelos discordantes para DM2, lo que interpretaron como que hay diferencias limitadas o que la metilación del ADN del tejido adiposo es altamente heredable. En cambio, en otra de las cohortes estudiadas, que incluía sujetos con y sin DM2 no relacionados entre si apareados por edad y sexo sí que se hallaron 15 627 sitios con metilación diferencial (6754 hipermetilados y 8873 hipometilados en pacientes con diabetes), relacionados con 7046 genes. Estos sitios diferencialmente metilados se encontraron más representados de lo esperado en el cuerpo génico y el “open sea” y menos representados en los TSS1500, TSS200 y en las islas CpG. De la misma manera, en nuestro estudio, las posiciones con metilación diferencial se han encontrado en open

sea (3), en el cuerpo génico (1) y en CpG shelf (1). Respecto al porcentaje de metilación, 4 de estas 5 posiciones con metilación diferencial han mostrado hipometilación en pacientes con DM2 respecto a pacientes sin DM2.

Respecto al tejido subcutáneo, los dinucleótidos CpG en los que se ha encontrado $\Delta\beta >15\%$ son las siguientes:

-cg04926385: Se localiza en el cromosoma 8, posición 2122339. Su relación con la localización de la isla es “open sea” y se encuentra hipometilado en pacientes con obesidad mórbida y diabetes respecto a pacientes con obesidad mórbida sin diabetes. Hasta el momento, no hay estudios previos que muestren metilación diferencial de este dinucleótido CpG en tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida con o sin diabetes tipo 2. Chhabra et al encontraron metilación diferencial en tejido pulmonar de fetos según la presencia o ausencia de exposición a tabaco, pero no fue significativa tras el ajuste por comparaciones múltiples. (59)

-cg05840533: Se localiza en el cromosoma 20, posición 31755943. Se localiza dentro del gen BPIFA2, “BPI Fold Containing Family A member 2” (Nomenclatura alternativa: PSP; SPLUNC2; C20orf70; bA49G10.1). Este gen codifica un miembro de la familia PLUNC (“Palate, lung and nasal epithelium clone”), de la cual se ha visto que juega un papel en la respuesta antibacteriana local en la nariz, boca y vías respiratorias superiores. Las proteínas salivares solubles codificadas se unen a los lipopolisacáridos bacterianos e inhiben el crecimiento bacteriano. Además, se ha demostrado un efecto antiinflamatorio de péptidos catiónicos diseñados a partir de la estructura de esta proteína (60). BPIFA2 se expresa específicamente en las glándulas parótidas y abunda en las secreciones salivares. En un estudio de Kota et al (61), se halló que en modelo animal esta proteína puede ser un marcador precoz de daño renal agudo.

Su relación con la localización de la isla es “open sea” y se encuentra hipometilado en pacientes con obesidad mórbida y diabetes respecto a pacientes con obesidad mórbida sin diabetes. Hasta el momento, no hay estudios publicados que muestren metilación diferencial de este dinucleótido CpG en tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida con o sin diabetes tipo 2. Al igual que en el cg04926385, en el estudio de Chhabra et al se encontró metilación diferencial en tejido pulmonar de

fetos según la presencia o ausencia de exposición a tabaco, pero no fue significativa tras el ajuste por comparaciones múltiples.

En cuanto al tejido visceral, los dinucleótidos CpG en los que se ha encontrado $\Delta\beta >15\%$ son las siguientes:

-cg23804921: Se localiza en el cromosoma 15, posición 30861172, en una CpG shelf. Por el momento no se ha asociado a ningún gen, ni hay estudios que muestren metilación diferencial en este dinucleótido entre pacientes con obesidad mórbida con o sin diabetes tipo 2. En nuestro estudio se encuentra hipometilado en los casos.

-cg27586797: Se localiza en el cromosoma 5, posición 13664584, en open sea, alejado de islas CpG. Por el momento no se ha asociado a ningún gen, ni hay estudios que muestren metilación diferencial en este dinucleótido entre pacientes con obesidad mórbida con o sin diabetes tipo 2. En nuestro estudio se encuentra hipometilado en casos.

-cg25134647: Se localiza en el cromosoma 12, posición 25454990, en open sea, alejado de islas CpG. En nuestro estudio ha mostrado hipometilación en controles tanto en tejido adiposo visceral como subcutáneo. Además, en el contexto del estudio de investigación que engloba esta tesis, también se realizaron análisis de metilación de linfo-monocitos de sangre periférica de los sujetos del estudio, en los cuales se apreció hipometilación en controles ($\Delta\beta$ 22,99%), coincidente con el patrón de ambos tejidos adiposos. Esta congruencia del patrón de metilación abre un campo de investigación, dado que estudiando un tejido fácilmente accesible como la sangre periférica se puede inferir el patrón de metilación de tejidos más inaccesibles, como el tejido adiposo visceral.

La metilación de este dinucleótido ha mostrado ser significativamente menor en personas de ascendencia caucásica que en aquellos de ascendencia africana (62) y estar relacionada con el SNP rs4963867 (C/T) (63). En esta línea, un artículo de Volkov et al (64) demuestra que según la base que se encuentra en el SNP rs4963867 existe diferente metilación en cg25134647. En este estudio se realizó un análisis mQTL (“methylation quantitative trait locus”) del genoma completo el tejido adiposo de 119 hombres escandinavos, y se relacionó la metilación de 477891 sitios CpG con 592794

SNPs. Muchas de estas parejas SNP-CpG estaban relacionadas con cambios en la expresión génica en el tejido adiposo y rasgos relacionados con la obesidad, con lo que se demuestra la interrelación genética-epigenética-fenotipo. En el estudio citado, el par cg25134647-rs4963867 fue uno de los 101 911 pares en los que la distancia entre el SNP y el sitio CpG fue menor a 500kb corriente arriba o abajo, concretamente se encuentra a 412 pares de bases de distancia. Este SNP no se ha asociado a enfermedad en los catálogos de GWAS que se revisaron en el estudio, tampoco se asoció a aumento de expresión génica ni a fenotipos metabólicos (IMC, índice cintura cadera, glucemia plasmática en ayunas, insulinemia en ayunas, HOMA-B, HOMA-IR, HbA1C, colesterol total, HDLc, LDLc ni triglicéridos en sangre) en los datos de los consorcios MAGIC, GIANT o GLGC. (65–69). En un estudio de Rönn et al (70), en el que se revisó la relación entre metilación de tejido adiposo de 96 hombres y 94 mujeres sin enfermedades conocidas y su edad, HbA1C e IMC, tampoco se encontró relación entre el cg25134647 y estos parámetros. Olsson et al (71) encontraron también diferencias en la metilación de cg25134647 según el SNP en rs4963867 en islotes pancreáticos de 89 donantes sanos, pero no se hallaron diferencias en expresión génica. Nilsson et al (58) no hallaron diferencias en la metilación de cg25134647 en su estudio de metilación de tejido adiposo entre 14 pares de gemelos monozigóticos discordantes para el fenotipo diabetes tipo 2 y otras cohortes de sujetos con y sin diabetes tipo 2.

4. Limitaciones del estudio

Existen limitaciones en nuestro estudio que podrían explicar el menor número de posiciones diferencialmente metiladas respecto a investigaciones previas.

En primer lugar, el tamaño de la muestra estudiada. Los estudios de EWAS, aunque son cada vez más accesibles económicamente, tienen un coste importante, tanto de material fungible como de personal, por lo que tuvimos que limitar los sujetos del estudio a cuarenta individuos. Algunas de las muestras tisulares de estos sujetos tuvieron que ser eliminadas del estudio por material insuficiente o por no cumplir los criterios cualitativos explicados más arriba.

Todos los sujetos se sometieron al programa de pérdida de peso previa a la cirugía, consistente en la dieta de muy bajo contenido calórico y el fomento del ejercicio

durante las cuatro semanas previas a la intervención. Podría ocurrir que la restricción calórica (valor calórico diario de la dieta: 600-800 kcal/día) durante las semanas previas a la extracción de las muestras hubiera atenuado las diferencias en la metilación. Varios estudios han mostrado diferencias en la metilación de tejido adiposo tras la pérdida de peso inducida por cirugía bariátrica (72,73) y por ejercicio (74). Además, la gran mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados estaban recibiendo tratamiento con metformina, que ha demostrado en modelo animal mediar demetilación de ADN en el promotor de *Prdm 16* y favorecer la adipogénesis de tejido adiposo marrón (75).

Por otra parte, los pacientes con diabetes eran metabólicamente muy similares a los pacientes sin diabetes (solamente se hallaron diferencias significativas en glucemia basal, HbA1C y trigliceridemia basal; no hallamos diferencias en HOMA-IR), lo cual podría haber influido en las diferencias esperadas al ser ambos grupos de obesos resistentes a la insulina. No disponíamos de un grupo control de pacientes con obesidad (no mórbidos) o sobrepeso intervenidos por otro motivo con el que poder comparar los resultados, lo cual dificulta la extracción de conclusiones.

Por todas estas razones, el umbral de $\Delta\beta$ seleccionado para el estudio es menor que el utilizado habitualmente en la bibliografía. Con los datos extraídos de las posiciones con valores de $\Delta\beta$ de 5-10% se pretendía explorar las tendencias de metilación entre los grupos de pacientes con obesidad mórbida, con y sin diabetes mellitus. Se ha considerado un $\Delta\beta >15\%$ para mostrar diferencias de metilación que puedan tener impacto clínico y que hayan alcanzado significación estadística en nuestro estudio. El tamaño muestral reducido de este estudio de casos y controles, donde todos los pacientes presentaban la misma característica definitoria (obesidad grave-mórbida), categorizados por la presencia o ausencia de diabetes tipo 2 con similares niveles de insulinoresistencia en ambos grupos ha desembocado en la necesidad de reducir el nivel de exigencia de $\Delta\beta$.

VI. Conclusiones

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio extraemos las siguientes conclusiones:

1. Hemos encontrado diferencias mayores al 15%, que consideramos clínicamente relevantes, en el patrón de expresión de tres CpG en tejido adiposo visceral y subcutáneo en sujetos con obesidad mórbida clasificados según presentaban o no diabetes en el momento del estudio.
2. No hemos encontrado vías metabólicas relacionadas con la diabetes mellitus tipo 2 asociadas a las posiciones diferencialmente metiladas con $\Delta\beta > 15\%$.

VII. Bibliografía

1. Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, Ramos-Carrera N, Lázaro-Masedo S. Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. *Rev Esp Cardiol*. 1 de junio de 2016;69(06):579-87.
2. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes* 2005. septiembre de 2008;32(9):1431-7.
3. Chaveepojnkamjorn W, Thotong R, Sativipawee P, Pitikultang S. Body Mass Index and Breast Cancer Risk among Thai Premenopausal Women: a Case-Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 26 de 2017;18(11):3097-101.
4. Gathirua-Mwangi WG, Monahan P, Song Y, Zollinger TW, Champion VL, Stump TE, et al. Changes in Adult BMI and Waist Circumference Are Associated with Increased Risk of Advanced Colorectal Neoplasia. *Dig Dis Sci*. noviembre de 2017;62(11):3177-85.
5. Kalliala I, Markozannes G, Gunter MJ, Paraskeva E, Gabra H, Mitra A, et al. Obesity and gynaecological and obstetric conditions: umbrella review of the literature. *BMJ*. 26 de octubre de 2017;359:j4511.
6. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA J Am Med Assoc*. 7 de noviembre de 2007;298(17):2028-37.
7. Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med*. 13 de noviembre de 2008;359(20):2105-20.
8. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*. mayo de 2011;69(1):41-9.
9. O’Rahilly S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*. 19 de noviembre de 2009;462(7271):307-14.
10. Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ*. 8 de febrero de 2017;356:j1.
11. Marqueta de Salas M, Rodríguez Gómez L, Enjuto Martínez D, Juárez Soto JJ, Martín-Ramiro JJ. [Relationship between Working Schedule and Sleeping Hours with Overweight and Obesity in Spanish Adult Population According to Data from the National Health Survey 2012]. *Rev Esp Salud Publica*. 1 de marzo de 2017;91.

12. Petrakis D, Vassilopoulou L, Mamoulakis C, Psycharakis C, Anifantaki A, Sifakis S, et al. Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. octubre de 2017 [citado 3 de diciembre de 2017];14(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664782/>
13. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*. 30 de diciembre de 1993;329(27):1988-92.
14. Preis SR, Massaro JM, Robins SJ, Hoffmann U, Vasan RS, Irlbeck T, et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heart study. *Obes Silver Spring Md*. noviembre de 2010;18(11):2191-8.
15. McLaughlin T, Lamendola C, Liu A, Abbasi F. Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. noviembre de 2011;96(11):E1756-1760.
16. Kursawe R, Eszlinger M, Narayan D, Liu T, Bazuine M, Cali AMG, et al. Cellularity and adipogenic profile of the abdominal subcutaneous adipose tissue from obese adolescents: association with insulin resistance and hepatic steatosis. *Diabetes*. septiembre de 2010;59(9):2288-96.
17. Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvisth V, Löfgren P, et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia*. diciembre de 2010;53(12):2496-503.
18. Elbein SC, Kern PA, Rasouli N, Yao-Borengasser A, Sharma NK, Das SK. Global gene expression profiles of subcutaneous adipose and muscle from glucose-tolerant, insulin-sensitive, and insulin-resistant individuals matched for BMI. *Diabetes*. marzo de 2011;60(3):1019-29.
19. Hardy OT, Czech MP, Corvera S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. abril de 2012;19(2):81-7.
20. IDF diabetes atlas - 2017 Atlas [Internet]. [citado 5 de diciembre de 2017]. Disponible en: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>
21. Groop L. Genetics of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. marzo de 2000;83 Suppl 1:S39-48.
22. Association AD. Standards of Medical Care in Diabetes—2017: Summary of

Revisions. *Diabetes Care*. 1 de enero de 2017;40(Supplement 1):S4-5.

23. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. enero de 2013;93(1):137-88.
24. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. junio de 1996;20(6):501-6.
25. Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature*. 6 de abril de 2000;404(6778):644-51.
26. Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, Sharp SJ, Wareham NJ, Loos RJF, et al. Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Front Endocrinol*. 2012;3:29.
27. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet*. julio de 1997;27(4):325-51.
28. Silventoinen K, Jelenkovic A, Sund R, Yokoyama Y, Hur Y-M, Cozen W, et al. Differences in genetic and environmental variation in adult BMI by sex, age, time period, and region: an individual-based pooled analysis of 40 twin cohorts. *Am J Clin Nutr*. agosto de 2017;106(2):457-66.
29. NEEL JV. Diabetes mellitus: a «thrifty» genotype rendered detrimental by «progress»? *Am J Hum Genet*. diciembre de 1962;14:353-62.
30. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*. noviembre de 2010;42(11):937-48.
31. Llewellyn CH, Trzaskowski M, Plomin R, Wardle J. Finding the missing heritability in pediatric obesity: the contribution of genome-wide complex trait analysis. *Int J Obes* 2005. noviembre de 2013;37(11):1506-9.
32. Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med*. 2003;54:453-71.
33. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*. mayo de 2011;69(1):41-9.
34. Ramachandrapa S, Farooqi IS. Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest*. junio de 2011;121(6):2080-6.

35. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 24 de mayo de 2007;447(7143):396-8.
36. Van Speybroeck L. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci*. diciembre de 2002;981:61-81.
37. Feinberg AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA J Am Med Assoc*. 19 de marzo de 2008;299(11):1345-50.
38. Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, et al. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*. 27 de diciembre de 1996;87(7):1261-70.
39. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. 19 de abril de 1996;272(5260):408-11.
40. De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol*. octubre de 2010;20(10):609-17.
41. Cai S, Lee CC, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet*. noviembre de 2006;38(11):1278-88.
42. Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M, Göndör A, Mariano P, Wang S, et al. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet*. noviembre de 2006;38(11):1341-7.
43. Goldman M. CpG Islands. En: Brenner S, Miller JH, editores. *Encyclopedia of Genetics* [Internet]. New York: Academic Press; 2001 [citado 3 de enero de 2018]. p. 477. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227080000286X>
44. Asmar F, Sjøgaard A, Grønbæk K. Chapter 2 - DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cancer. En: Gray SG, editor. *Epigenetic Cancer Therapy* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [citado 29 de enero de 2018]. p. 9-30. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002063000021>
45. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 1 de enero de 2002;16(1):6-21.

46. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* octubre de 2010;28(10):1057-68.
47. Tirado-Magallanes R, Rebbani K, Lim R, Pradhan S, Benoukraf T. Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing. *Oncotarget.* 17 de enero de 2017;8(3):5629-37.
48. Drummond EM, Gibney ER. Epigenetic regulation in obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* julio de 2013;16(4):392-7.
49. Feinberg AP. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease. *Virchows Arch Int J Pathol.* enero de 2010;456(1):13-21.
50. 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.* julio de 2011;136(1):20-9.
51. Wang D, Yan L, Hu Q, Sucheston LE, Higgins MJ, Ambrosone CB, et al. IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. *Bioinforma Oxf Engl.* 1 de marzo de 2012;28(5):729-30.
52. Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med.* febrero de 2013;34(1):1-11.
53. Vohl M-C, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, et al. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res.* agosto de 2004;12(8):1217-22.
54. Sonne SB, Yadav R, Yin G, Dalgaard MD, Myrmel LS, Gupta R, et al. Obesity is associated with depot-specific alterations in adipocyte DNA methylation and gene expression. *Adipocyte.* 03 de 2017;6(2):124-33.
55. Macartney-Coxson D, Benton MC, Blick R, Stubbs RS, Hagan RD, Langston MA. Genome-wide DNA methylation analysis reveals loci that distinguish different types of adipose tissue in obese individuals. *Clin Epigenetics.* 2017;9:48.
56. Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics.* junio de 2012;4(3):325-41.
57. Martín-Núñez GM, Cabrera-Mulero A, Alcaide-Torres J, García-Fuentes E, Tinahones FJ, Morcillo S. No effect of different bariatric surgery procedures on LINE-1

DNA methylation in diabetic and nondiabetic morbidly obese patients. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg.* marzo de 2017;13(3):442-50.

58. Nilsson E, Jansson PA, Perfilyev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* septiembre de 2014;63(9):2962-76.

59. Chhabra D, Sharma S, Kho AT, Gaedigk R, Vyhldal CA, Leeder JS, et al. Fetal lung and placental methylation is associated with in utero nicotine exposure. *Epigenetics.* 18 de noviembre de 2014;9(11):1473-84.

60. Geetha C, Venkatesh SG, Bingle L, Bingle CD, Gorr S-U. Design and validation of anti-inflammatory peptides from human parotid secretory protein. *J Dent Res.* febrero de 2005;84(2):149-53.

61. Kota SK, Pernicone E, Leaf DE, Stillman IE, Waikar SS, Kota SB. BPI Fold-Containing Family A Member 2/Parotid Secretory Protein Is an Early Biomarker of AKI. *J Am Soc Nephrol JASN.* diciembre de 2017;28(12):3473-8.

62. Heyn H, Moran S, Hernando-Herraez I, Sayols S, Gomez A, Sandoval J, et al. DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res.* septiembre de 2013;23(9):1363-72.

63. Kader F, Ghai M. DNA methylation-based variation between human populations. *Mol Genet Genomics MGG.* febrero de 2017;292(1):5-35.

64. Volkov P, Olsson AH, Gillberg L, Jørgensen SW, Brøns C, Eriksson K-F, et al. A Genome-Wide mQTL Analysis in Human Adipose Tissue Identifies Genetic Variants Associated with DNA Methylation, Gene Expression and Metabolic Traits. *PLOS ONE.* 20 de junio de 2016;11(6):e0157776.

65. Heid IM, Jackson AU, Randall JC, Winkler TW, Qi L, Steinthorsdottir V, et al. Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat Genet.* noviembre de 2010;42(11):949-60.

66. Yang J, Loos RJF, Powell JE, Medland SE, Speliotes EK, Chasman DI, et al. FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. *Nature.* 11 de octubre de 2012;490(7419):267-72.

67. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, et al.

New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* febrero de 2010;42(2):105-16.

68. Soranzo N, Sanna S, Wheeler E, Gieger C, Radke D, Dupuis J, et al. Common variants at 10 genomic loci influence hemoglobin A_{1c} levels via glycemic and nonglycemic pathways. *Diabetes.* diciembre de 2010;59(12):3229-39.

69. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, Kanoni S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet.* noviembre de 2013;45(11):1274-83.

70. Rönn T, Volkov P, Gillberg L, Kokosar M, Perfilyev A, Jacobsen AL, et al. Impact of age, BMI and HbA_{1c} levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum Mol Genet.* 1 de julio de 2015;24(13):3792-813.

71. Olsson AH, Volkov P, Bacos K, Dayeh T, Hall E, Nilsson EA, et al. Genome-wide associations between genetic and epigenetic variation influence mRNA expression and insulin secretion in human pancreatic islets. *PLoS Genet.* noviembre de 2014;10(11):e1004735.

72. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, et al. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol.* 22 de enero de 2015;16:8.

73. Dahlman I, Sinha I, Gao H, Brodin D, Thorell A, Rydén M, et al. The fat cell epigenetic signature in post-obese women is characterized by global hypomethylation and differential DNA methylation of adipogenesis genes. *Int J Obes* 2005. junio de 2015;39(6):910-9.

74. Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, et al. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet.* junio de 2013;9(6):e1003572.

75. Yang Q, Liang X, Sun X, Zhang L, Fu X, Rogers CJ, et al. AMPK/ α -ketoglutarate axis dynamically mediates DNA demethylation in the Prdm16 promoter and brown adipogenesis. *Cell Metab.* 11 de octubre de 2016;24(4):542-54.