

[r e v i s i ó n]

Epigenética de la obesidad

Concepción María Aguilera, Augusto Anguita-Ruiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix", Centro de Investigación Biomédica, CIBM. Universidad de Granada. Instituto de Investigación Biosanitaria ibs GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada. CIBEROBN (CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition), Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

Palabras clave

epigenética,
metilación del ADN,
obesidad, tejido
adiposo, humanos

>> RESUMEN

La epigenética se define como las modificaciones heredables en la expresión de genes que no se pueden explicar por los cambios en la secuencia del ADN. Los cambios epigenéticos son modulados por la exposición ambiental (incluyendo la nutrición y la actividad física), por lo que la epigenética se presenta como un posible factor implicado en el desarrollo de enfermedades como la obesidad.

Actualmente, el estudio del epigenoma de la obesidad se centra principalmente en el análisis de los patrones de metilación del ADN, particularmente debido a la estabilidad en el ADN extraído en comparación con otras marcas epigenéticas, tales como modificaciones de histonas. Además, debido a su plasticidad biológica, es un biomarcador atractivo con gran potencial de utilidad clínica. Una de las herramientas que está ayudando a poder conocer las características epigenéticas de los individuos obesos son los estudios tipo *EWAS* (estudios de asociación del epigenoma completo), que se caracterizan por analizar miles o millones de CpGs en un determinado número de individuos. La realización de *EWAS* en sangre periférica de niños y su relación con la obesidad es de gran interés tanto para el estudio de la influencia de la obesidad materna como para la detección de marcadores epigenéticos en la infancia, con el objeto de realizar un diagnóstico precoz del desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones metabólicas. La validez de este tipo de estudios queda de manifiesto en varios trabajos que demuestran la estabilidad de las marcas epigenéticas en forma de metilaciones del ADN a lo largo de los primeros años de vida, así como la influencia de factores ambientales durante el embarazo. Los objetivos de esta revisión son: 1) comprender las bases moleculares de la regulación de la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas; 2) describir los principales resultados de estudios amplios del epigenoma en sangre periférica asociados con la obesidad, tanto en adultos como en niños.

Nutr Clin Med 2018; XII (2): 47-60
DOI: 10.7400/NCM.2018.12.2.5062

Correspondencia

Concepción María Aguilera
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix". Lab. 120. Centro de Investigación Biomédica, CIBM.
Universidad de Granada. Avda. del Conocimiento s/n, 18016 Armilla, Granada.
Email: caguiler@ugr.es

Key words

epigenetic, ADN methylation, obesity, adipose tissue, human

>> ABSTRACT

Epigenetics is defined as heritable modifications in the expression of genes that can not be explained by changes in the ADN sequence. Epigenetic changes are modulated by environmental exposure (including nutrition and physical activity), so that epigenetics is presented as a possible factor involved in the development of diseases such as obesity. Currently the study of obesity epigenome

focuses mainly on the analysis of ADN methylation patterns, particularly due to the stability in the extracted ADN compared to other epigenetic marks, such as histone modifications. In addition, due to its biological plasticity, it is an attractive biomarker with great potential for clinical utility. One of the tools that is helping to know the epigenetic characteristics of obese individuals are studies of type *EWAS* (epigenome-wide association study), which are characterized by analyzing thousands or millions of CpGs in a certain number of individuals. The realization of *EWAS* in peripheral blood of children and its relationship with obesity is of great interest both for the study of the influence of maternal obesity and for the detection of epigenetic markers in childhood in order to make an early diagnosis of development of the disease and its metabolic complications. The validity of this type of studies is evident. Several studies have demonstrated the stability of epigenetic marks in the form of ADN methylations during the first years of life, as well as the influence of environmental factors during pregnancy. The objectives of this review are: 1) to understand the molecular basis of the regulation of gene expression through epigenetic modifications; 2) to describe the main results of epigenome-wide association studies in peripheral blood associated with obesity in both adults and children.

Nutr Clin Med 2018; XII (2): 47-60

DOI: 10.7400/NCM.2018.12.2.5062

INTRODUCCIÓN

La obesidad, ha sufrido una gran evolución en los últimos años, tanto es así que lo que comenzó planteándose como un problema de salud pública a finales del siglo XX, está adquiriendo en la actualidad dimensiones de epidemia. Nos encontramos ante una patología multifactorial, es decir, es el resultado de una alimentación inadecuada (en gran parte de los casos), una vida sedentaria junto con factores genéticos¹. El componente hereditario de la obesidad está ampliamente demostrado mediante estudios realizados en gemelos o en familias. Actualmente se acepta una heredabilidad (proporción de la variación de caracteres biológicos en una población atribuible a la variación genotípica entre individuos) de la obesidad entre el 40 y el 50%. Gracias al desarrollo de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *Genome wide association study*) se han podido identificar algunos de los polimorfismos genéticos relacionados con la obesidad. Aunque son varios los genes que pueden intervenir en el riesgo de padecer la obesidad, como *el FTO*, *LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1* y *MC4R*, entre otros, en su conjunto las variables genéticas descubiertas hasta ahora sólo pueden explicar entre un 2 y un 3 % aproximadamente del componente

genético o heredabilidad de la obesidad². Ante la evidencia incontestable de la participación de factores ambientales, tales como los patrones dietéticos, la ingesta de nutrientes concretos y la actividad física, en la incidencia de la obesidad, la epigenética parece jugar un papel clave en la búsqueda de lo que los investigadores llaman la heredabilidad perdida³.

La epigenética se define como las modificaciones heredables en la expresión de genes que no se pueden explicar por los cambios en la secuencia de ADN. Los cambios epigenéticos son modulados por la exposición ambiental (incluyendo la nutrición y la actividad física), por lo que la epigenética se presenta como un posible factor implicado en el desarrollo de enfermedades como es la obesidad. Entre las marcas epigenéticas están la metilación e hidroximetilación de determinados nucleótidos, la compactación de la cromatina, diversas modificaciones covalentes de las histonas y la expresión de miRNAs. Esta señalización ha permitido constatar que, si existen alteraciones nutricionales y desequilibrios metabólicos en ciertos períodos críticos del desarrollo, las modificaciones epigenéticas generadas pueden inducir cambios estables en la expresión diferencial de determinados genes con efectos sobre la estructura o función los te-

tidos y órganos, predisponiendo así a diversos trastornos fisiopatológicos y enfermedades. El conjunto de modificaciones epigenéticas recibe el nombre de **epigenoma**.

Conocer el epigenoma es un paso clave para entender qué genes deben expresarse y en qué células deben hacerlo. Además, puesto que la alteración del epigenoma está relacionada con múltiples enfermedades humanas, disponer de mapas epigenómicos de los tipos celulares de nuestro organismo supone una herramienta de gran utilidad para estudiar estas enfermedades desde una perspectiva paralela a la genética. Los cambios epigenéticos pueden ser heredables y duraderos. Además, los procesos epigenéticos constituyen una de las vías por la que los agentes ambientales pueden influir sobre la expresión génica y la regulación metabólica a lo largo del ciclo vital, aportando posibles explicaciones etiológicas a enfermedades crónicas típicas de la edad adulta, cuyo origen se puede sustentar en alteraciones fisiológicas en etapas perinatales o en comportamientos alimentarios de los progenitores durante ese periodo. Por otra parte, los fenómenos epigenéticos son potencialmente reversibles, lo que permite pensar en posibles dianas terapéuticas basadas en pautas nutricionales o terapias farmacológicas personalizadas para su control, tratamiento y eventual modificación. La detección temprana de cambios en señales epigenéticas (biomarcadores) puede servir asimismo para un diagnóstico precoz de enfermedades y actuación preventiva individualizada basada en biomarcadores epigenéticos⁴.

El objetivo de esta revisión es: 1) comprender las bases moleculares de la regulación de la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas. 2) describir los principales resultados de estudios de amplios del epigenoma en sangre periférica asociados con la obesidad tanto en adultos como en niños.

BASES MOLECULARES DE LAS MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El término epigenética fue utilizado por primera vez en los años cincuenta con la finalidad de describir el/los mecanismo/s por los cuales los organismos pluricelulares eran capaces de desarrollar distintos tejidos a partir de la misma

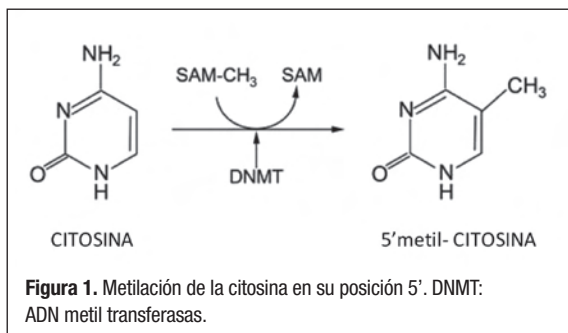
información genética. Se acuñó por primera vez gracias a Conrad Waddington, derivado de la combinación entre “genética” y “epigénesis”. El uso actual del término consiste en indicar cambios heredables en la estructura y organización del ADN que no involucran cambios en la secuencia y que modulan la expresión génica. Actualmente, se reconoce que este proceso se consigue gracias a la existencia de marcadores moleculares detectables; dichas marcas modifican la actividad transcripcional de los genes, favoreciendo o reprimiendo su transcripción, y una vez establecidas son relativamente estables para ser heredados de generación en generación.

En los mamíferos el ADN está empaquetado como cromatina en el núcleo y reorganizada en 2 zonas estructurales diferentes que se denominan heterocromatina silenciosa y eucromatina activa. La heterocromatina está integrada por la mayor parte del material nuclear incluyendo a los telómeros y las regiones con un gran número de secuencias repetitivas con un bajo contenido génico. Por otro lado, la eucromatina es transcripcionalmente activa y contiene a la mayoría de los genes. Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, se trata de 147 pares de bases a los que envuelven un octámero de histonas y constituyen el núcleo del nucleosomas. Las histonas pueden sufrir modificaciones de distinta índole: metilación de los residuos de lisina (clave para la activación o represión transcripcional) y arginina, acetilación en residuos de lisina, ubiquitinación y sumoilación de lisinas y fosforilación de serinas y treoninas.

Las modificaciones del ADN y de las histonas repercuten directamente en el grado de condensación de la cromatina, favoreciendo o no el anclaje de la maquinaria transcripcional y su posterior repercusión sobre el fenotipo. Hasta la fecha, se han identificado unos veinte mecanismos epigenéticos, los cuales son muy importantes en la regulación de la transcripción y por ello, también en la expresión génica. Estos mecanismos incluyen la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de las histonas, cambios que afectan al plegamiento de la cromatina (eucromatina vs heterocromatina) o a la estabilidad de los cromosomas y, en general, aquellos procesos que afectan a los patrones de expresión génica sin alterar o estar mediados por la secuencia del ADN (ARNs no codificantes, transposones y chaperonas entre otros), los complejos de remodelado de cromatina basados en

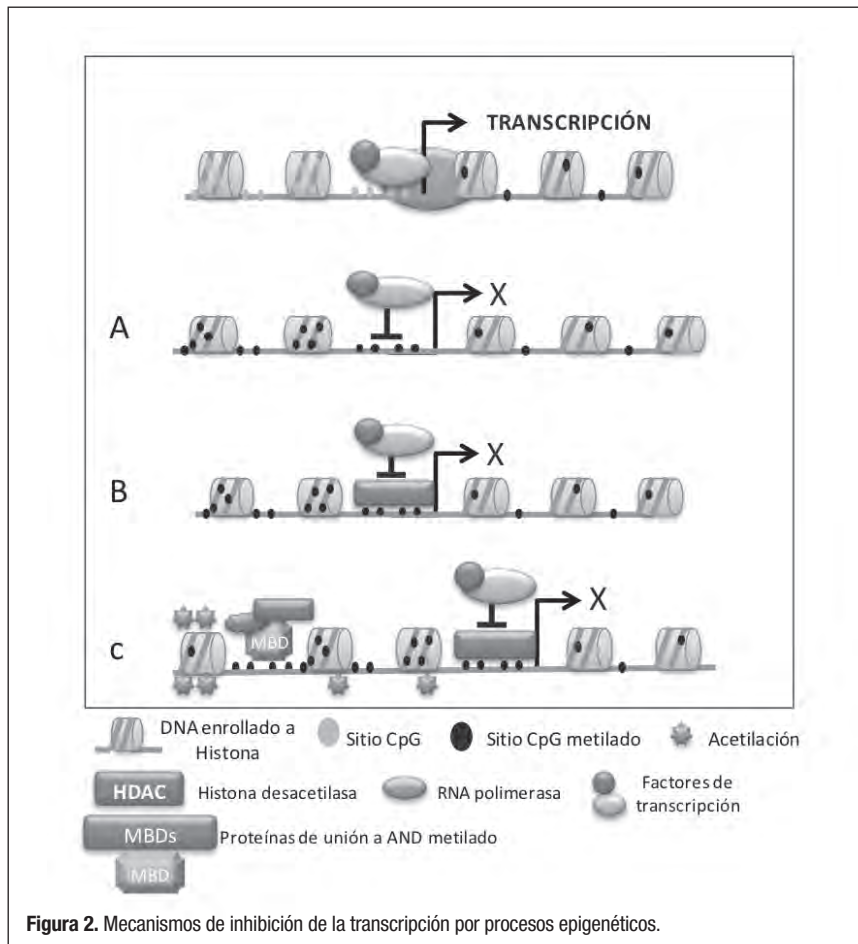
ATP y los complejos proteicos Polycomb y Trithorax^{5,6}. De todos ellos, hay mecanismos que han sido más estudiados que otros y sobre los que los factores ambientales centran más su actuación, los principales son:

Metilación del ADN, se trata de la unión covalente de un grupo metilo en posición 5' a una citosina que se convierte en una 5-metilcitosina por medio de una ADN metiltransferasa (DNMT) seguida de guanina (dinucleótido CpG), lo que da lugar a 2 residuos de citosina metilados dispuestos de forma diagonal y opuestos a las hebras complementarias de ADN (Figura 1). Existen distintas DNMT que pueden participar en este proceso, bien mediante las DNMTs *de novo*, son las que van a incorporar el patrón inicial de grupos metilo sobre una secuencia de ADN sin metilar, o mediante las DNMTs de mantenimiento, que van a copiar el patrón de metilación de una cadena de ADN existente tras la replicación celular. Algunos de estos dinucleótidos CpGs se encuentran en mayor concentración en regiones llamadas islas CpG, con frecuencia en las zonas promotoras y desmetiladas. Existen otros dinucleótidos con la misma estructura pero que no se encuentran en esas islas, éstos suelen encontrarse metilados. Las islas CpG son regiones del ADN entre 0.5 y 5 Kb (un Kb son alrededor de mil pares de bases (Pb). Un Pb equivale a 3.4 Å) que presentan una proporción de dinucleótidos G:C del 55% y suponen alrededor del 1% del genoma humano. Aproximadamente entre el 60 y el 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están. En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas.



Actualmente, no se conoce la función precisa de la metilación en citosinas sobre la expresión génica, a la vez que se sabe que tiene un papel crucial en su control, en la diferenciación celular y el desarrollo embrionario. Algunas investigaciones han sugerido que el grupo metilo tiene la capacidad de interceptar a los factores de transcripción y evitar con ello que se unan al ADN. Se han propuesto varios mecanismos por los cuales la metilación bloquea la transcripción (Figura 2):

- La 5mC inhibe la unión de ciertos factores de transcripción que contienen secuencias CpG en sus sitios de reconocimiento. Por ejemplo, modifica las actividades de unión de factores de transcripción como: E2F, CREB, AP2, cMyc/Myn y NFκB.
- El otro mecanismo es más general e involucra a proteínas o complejos proteicos que se unen específicamente a CpG metilados y bloquean indirectamente la unión de los factores de transcripción al limitar su acceso a los elementos reguladores. Estas proteínas contienen dominios conservados de unión a ADN metilado (MBD, methyl binding domain) y el primer miembro de la familia identificado fue la proteína MeCP2. Posteriormente se caracterizaron otras cuatro proteínas con MBD conservados, MBD1, MBD2, MBD3, implicadas al igual que MeCP2 en la represión transcripcional, y MBD4 que muestra actividad ADN glicosilasa y remueve timinas de sitios T-G mal apareados. Además del dominio MBD, MeCP2 es una proteína que contiene un dominio de represión transcripcional (TRD, Transcriptional Repression Domain), y está codificada por un gen localizado en el cromosoma X que se encuentra mutado en pacientes con síndrome de Rett. La proteína MBD2 es parte de un complejo llamado MeCP1 que muestra baja afinidad por el ADN metilado, lo que sugiere que tiene una función de represión transitoria. Existen isoformas, MBD2a y MBD2b, dependiendo del sitio de inicio de la traducción del gen. De manera interesante, la isoforma MBD2b no ha sido observada in vivo, aun cuando se ha postulado que tiene actividad de desmetilasa. La proteína MBD3 tiene una alta homología con MBD2, aun fuera del dominio de unión a ADN metilado y forma un complejo proteico diferente al de MBD2.



c) Las proteínas MBD median la interacción entre el ADN metilado y los componentes de la cromatina debido a que son capaces de reclutar complejos represores que incluyen a las desacetilasas de histonas. Las HDAC eliminan grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 de manera que la carga positiva resultante facilita la condensación de la cromatina y limita el acceso de los factores de transcripción a los promotores localizados cercanamente. En el siguiente apartado se detallan las distintas modificaciones de la histona, así como su interacción con los procesos de metilación.

Por regla general los genes metilados (sobre todo en la región promotora) suelen ser menos accesibles lo que conlleva una menor expresión génica. Así mismo, la metilación en regiones intragénicas puede modular la expresión al actuar como promotores alternativos, pero este punto no está claro actualmente ya que hay varios estudios contradictorios.

Modificaciones post-traduccionales de las histonas, son modificaciones covalentes que sufren estas proteínas en el nucleosoma. Pueden darse acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, glucosilaciones, ADP-ribosilaciones, etc. y afectarán a la expresión génica favoreciendo o bloqueando el acceso de la maquinaria de transcripción al ADN. Las modificaciones suelen producirse en las colas amino-terminal de las histonas que están en la superficie de los nucleosomas, como también en la región del núcleo globular. Son varias las consecuencias que pueden darse: se puede producir una modificación que afecte a la carga electrostática de la histona lo que afecta a su función cromosómica o bien un modificación que afecte a la estructura lo que repercute directamente en su unión con el ADN. Un punto importante a tener en cuenta, es que ambas modificaciones parecen desarrollarse de forma coordinada. Esta afirmación se fundamenta en la existencia de proteínas de unión a metil-CpG que acarrean a las desacetilasas de histonas hacia regiones de ADN metilado. En la figura 3 se

resumen las principales modificaciones conocidas en las histonas 3 y 4 y su repercusión en la transcripción.

Los RNAs no codificantes, en la literatura científica se describen gran variedad de ellos como por ejemplo: los ARNs largos no codificantes (lncRNA), los ARNs asociados a Piwi (piRNA) o los ARNs circulantes y siendo los más destacados los micro RNAs (miRNAs). Todos tienen en común que no van a codificar para ninguna proteína y muchos de ellos van a llevar a cabo funciones de control de la expresión génica.

Los microRNA son una clase de RNA de pequeño tamaño (18-25 nucleótidos) que se unen por apareamiento imperfecto a sus RNA mensajeros blanco, en la posición 3', bloqueando la síntesis por la desestabilización que generan y represión traduccional. Varios estudios han demostrado que este tipo de moléculas participan

en la incidencia de diversas enfermedades como el cáncer o la obesidad. A su vez, han sido considerados como biomarcadores de alto potencial para diagnóstico o para ser utilizados como diana terapéutica, dado que los nutrientes, la hidratación y la actividad física pueden modular la expresión o bien las acciones de algunos de estos ARNs⁶.

EL EPIGENOMA DE LA OBESIDAD

Actualmente el estudio del epigenoma de la obesidad se centra principalmente en el análisis a gran escala de los patrones de metilación del ADN, particularmente debido a la estabilidad en el ADN extraído en comparación con otras marcas epigenéticas, tales como modificaciones de histonas. Además, debido a su plasticidad biológica, es un biomarcador atractivo con gran potencial de utilidad clínica. Una de las her-

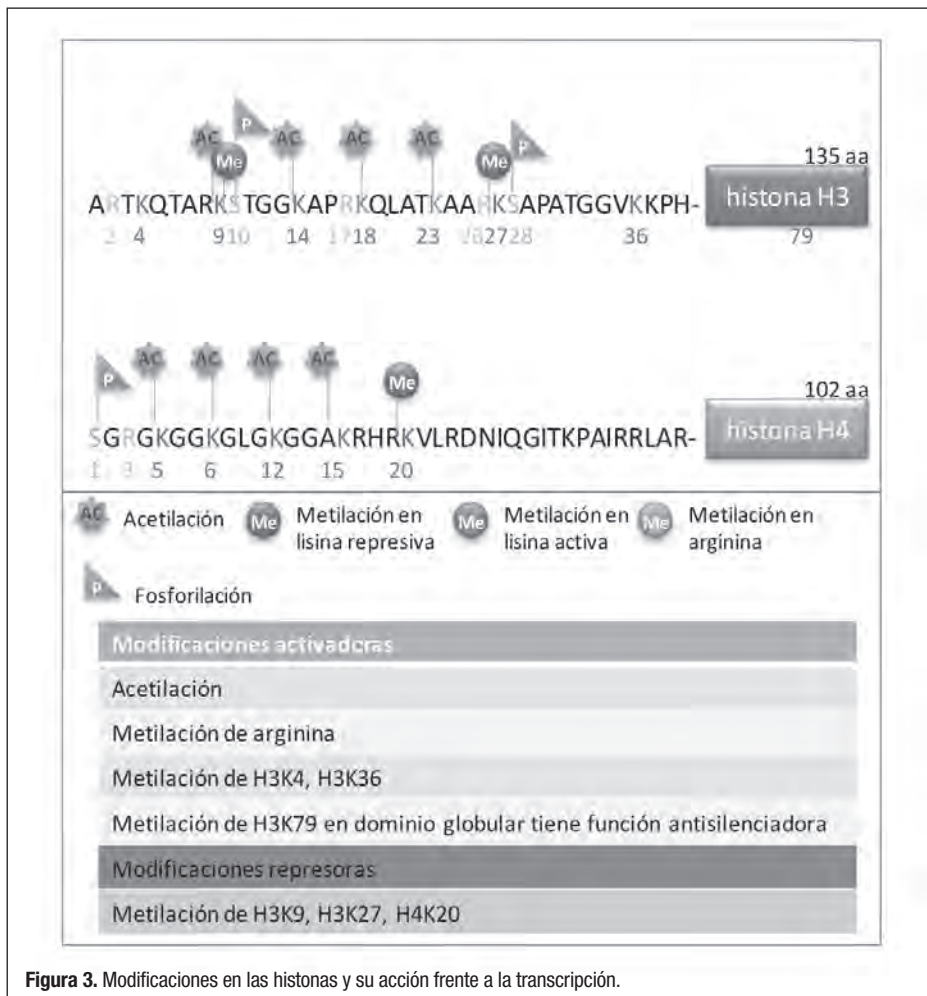


Figura 3. Modificaciones en las histonas y su acción frente a la transcripción.

ramientas que está ayudando a poder conocer las características epigenéticas de los individuos obesos son los estudios de tipo EWAS (*estudios de asociación del epigenoma completo*), similares a los GWAS, que se caracterizan por analizar miles o millones de CpGs en un determinado número de individuos. Estos análisis permiten identificar sitios genéticos diferencialmente metilados (DMPs, del inglés *differentially methylated positions*) según la condición experimental. En los últimos años están aumentando los trabajos realizados en grandes estudios poblacionales en los que se han identificado genes diferencialmente metilados en personas obesas y no obesas a través de EWAS⁷.

A comienzos de la última década, los estudios epigenéticos de obesidad principalmente se centraron en estudio de genes candidatos en lugar de medidas totales del epigenoma, como la metilación del ADN global^{8,9}. Este tipo de estudios en genes concretos puede ser útil en enfermedades como un tipo determinado de cáncer, en el cual la hipometilación es lo suficientemente fuerte como para impulsar la variación global. Sin embargo, el estudio de genes candidatos, en enfermedades complejas, no ha sido particularmente fructífera, con resultados débiles e inconsistentes. A penas se han conseguido validar resultados de algunos genes involucrados en el metabolismo por estudios globales de metilación de todo el genoma.¹⁰ Muchos estudios tempranos por lo tanto necesitan reevaluación a la luz de los hallazgos y conocimientos actuales. Es probable que todos los estudios de metilación del ADN antes de 2012 no hayan tenido en cuenta los efectos de confusión de las proporciones de tipo celular. Además, muchos de estos estudios se han realizados en pequeños tamaños de muestra, con posibles problemas adicionales debido a la heterogeneidad genética. Por lo que en esta revisión solo se tendrán en cuenta estudios de EWAS realizados en sangre periférica de adultos y niños realizados en los últimos años.

EWAS DE OBESIDAD EN SANGRE PERIFÉRICA DE ADULTOS

En 2014, Dick y Cols.¹¹ publicaron uno de los primeros grandes EWAS asociados al índice de masa corporal (IMC) usando un array de 450k. Esto se realizó en ADN de sangre total de individuos de ascendencia europea. Inicialmente se realizó el análisis en 479 individuos, seguido de dos rondas de replicación, primero en 339 muestras y luego en 1,789 muestras. Se identificaron

cinco zonas CpG diferencialmente metiladas en tres *loci* genéticos asociados con IMC. Tres CpGs (cg22891070, cg27146050 y cg16672562) fueron replicados en el primer intrón del gen *HIF3A*, el gen de la subunidad alfa del factor 3 inducible por la hipoxia, que está involucrado en la regulación de la expresión génica inducible por hipoxia.

En estudios posteriores se investigó el estado de metilación de *HIF3A* en diferentes tejidos, se evaluaron muestras de ADN de tejido adiposo tejido (n=635) y de piel (n=395), validándose una metilación diferencial únicamente en grasa. Una posible explicación a esto es el alto nivel de invasión de células sanguíneas inflamatorias en tejido adiposo. Además se estudiaron los efectos genéticos y dos SNP (del inglés, *single nucleotide polymorfism*) (rs8102595 y rs3826795) que se asociaron independientemente con el estado de metilación de ADN de cg22891070 en todos los conjuntos de datos, aunque los SNPs no se asociaron significativamente con el IMC.

Este resultado ha sido replicado en varios estudios en sangre¹²⁻¹⁴, y uno en el tejido adiposo.¹⁵ Además se encontraron resultados similares en la cohorte ALSPAC de Bristol en el Reino Unido.¹⁶ Se analizaron múltiples puntos de metilación de ADN en muestras pareadas de 1000 madres y sus recién nacidos. Se encontraron patrones de metilación del ADN en los hijos que fueron diferenciales según el IMC de la madre. Un análisis adicional por Main y Cols.¹⁷ reveló un nivel relativamente alto de familiaridad (h2 51% -64%) para la metilación del ADN de *HIF3A* en la sangre, que estaba cerca del nivel de heredabilidad de la obesidad en sí. Además se ha propuesto una influencia de los niveles de vitamina B2 y B12 sobre las marcas epigenéticas de *HIF3A*.¹⁷

Otro estudio EWAS de interés es el estudio GOLDN en el que se identificaron 8 regiones diferencialmente metiladas asociadas a IMC y a perímetro de la cintura.¹⁸ Para verificar la consistencia de estas asociaciones, se analizó su metilación en otros dos estudios, "Framingham Heart Study" (n=2.377) y "The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study" (n=2.097). Con los resultados de los tres estudios se realizó un metanálisis y se obtuvo que el mayor locus diferencialmente metilado era el *CPT1A* ($p=2,7 \times 10^{-43}$ para el IMC y $9,9 \times 10^{-23}$ para el perímetro de la cintura). También se obtuvieron asocia-

ciones altamente significativas en el metanálisis para la metilación diferencial en *PHGDH*, *CD38* y un RNA largo no codificante (RNA 00263).

En otro trabajo de 2013, Wahl y Cols.¹⁹ realizaron un análisis mediante un array de 450k en sangre periférica en individuos del sudeste asiático (n=2,680) y europeos (n=2,707) e identificaron 278 sitios CpGs asociados al IMC en un total de 207 *loci* genéticos. Posteriormente se validaron 187 de las 207 asociaciones CpG en 4.874 adicionales sin observar diferencias según la población, a excepción de siete DMP en los que se observó una variación entre asiáticos y europeos (heterogeneidad $P < 10^{-7}$), haciendo alusión a poblaciones específicas o no capturadas por efectos genéticos. Todos los cambios fueron identificados como la consecuencia potencial de la obesidad en lugar de causal, a excepción de un CpG (cg26663590) en *NEATC2IP*. Además se evaluó un conjunto longitudinal de muestras de 1.435 participantes durante un período de 7 años, mostrando una relación constante entre el cambio en la metilación y el cambio en el IMC a lo largo del tiempo en 178 de las 187 CpGs.

Otro EWAS de IMC fue publicado recientemente por Mendelson y Cols.²⁰, nuevamente utilizando un array de 450k en sangre periférica. Se realizó en individuos de ascendencia predominantemente europea, incluidos los de la cohorte de nacimiento de Lothian en Escocia y el estudio del corazón de Framingham en los Estados Unidos. Ciento treinta y cinco CpGs fueron identificados inicialmente como DMP asociados al IMC. Ochenta y tres DMP replicados en al menos una de las tres cohortes de replicación adicionales, ARIC (n=2,096), GOLDN (n=992), y la cohorte de Investigación prospectiva de la Vasculatura en Uppsala Seniors (PIVUS) (n=967).

Según el Gene Ontology la mayoría de las DMP asociadas al IMC pertenecen a genes del metabolismo lipídico y conllevan una expresión diferencial de los mismos. En la tabla I se resumen todos los sitios genómicos diferencialmente metilados y asociados a la obesidad. Estos genes incluyen al *HIF3A*, *ABCG1*, *CACNA2D3*, *CPT1A*, *DHCR24*, *SARS*, *SLC1A5*, and *SREBF1*.²¹ Las DMPs pertenecían predominantemente a zonas de unión a histonas más que a regiones promotoras.²² El gen *SREBF1* (un factor de transcripción del metabolismo lipídico), se ha propuesto como posiblemente el causal; se sabe que induce la conversión de acetil-CoA a triglicéridos, promoviendo así la

glucólisis, la lipogénesis, y adipogénesis. Además se ha demostrado el papel de este gen en la adiposidad, la resistencia a la insulina, la enfermedad de la arteria coronaria y la dislipidemia relacionada con la obesidad tanto en modelos animales como en estudios en humanos.²⁰

En una revisión reciente⁷ se han comparado los resultados de los tres grandes EWAS^{13,19,20} y se han identificaron 10 CpGs como resultados robustos y replicados dentro de cada uno, y comunes en todos los estudios. Estos 10 CpG están ubicados en 10 genes únicos, predominantemente en *loci* intrónicos. Un análisis de enriquecimiento ontológico genético mediante GREAT (Herramienta de Enriquecimiento de Anotaciones de las Regiones Genómicas) para estos 10 CpGs ha identificado procesos biológicos, como la regulación de colesterol y lípidos, fenotipos humanos incluyendo hiperlipidemia, y enfermedades del sistema hepatobiliar. De hecho, muchos de estos mismos CpG se relacionan con rasgos relacionados con el metabolismo lipídico en otros EWAS específicos realizados para estas medidas, presumiblemente debido a su relación con el desarrollo de la adiposidad o cambios epigenéticos que inducen perfiles alterados de lípidos en la sangre. Cuatro de los diez DMP fueron significativamente relacionado con los niveles de triglicéridos en un estudio reciente de Dekkers y Cols.²³, así como en estudios de lípidos anteriores y contemporáneos.²⁴⁻²⁸ Además, un estudio de Kriebel y Cols.²⁹ encontró que cuatro de estos CpGs estaban relacionados con los fenotipos del metabolismo de la glucosa.

Esto muestra claramente el poder de EWAS para identificar fenotipos bioquímicos más precisos y el beneficio de examinar de cerca los distintos aspectos biológicos de cambios asociados a medidas epidemiológicas, tales como IMC. Varias de estas CpG asociadas al IMC también se han encontrado en estudios realizados en árabes,³⁰ asociadas al síndrome metabólico,³¹ a hipertrigliceridemia y circunferencia de cintura en mexicanos estadounidenses.³² Por otro lado es importante destacar, que uno de los CpGs, cg06192883, en *MYO5C* fue identificado y asociado recientemente en un EWAS con el biomarcador inflamatorio proteína C reactiva.³³ Otro, cg09349128, en *CRELD2*, se asoció con el desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal,³⁴ que se sabe que está conectada a anomalías lipídicas.³⁵ Dos genes adicionales, *LGALS3BP* y *SBNO2*, se han identificado en los tres estudios, pero estuvieron representados por diferentes CpGs.

TABLA I. SITIOS DIFERENCIALMENTE METILADOS ASOCIADOS A LA OBESIDAD MEDIANTE ANÁLISIS EWAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE ADULTOS.

Cromosoma	CpG	Gen	Metilación asociada a IMC	Localización	Población	Otros fenotipos
19	cg22891070	<i>HIF3A</i>	+	Intrónica	Europea	
11	cg00574958	<i>CPT1A</i>	-	Intrónica	Europea	CC, TG, VLDL, MetS
15	cg06192883	<i>MYO5C</i>	+	Intrónica	Europea / Árabe	CRP
21	cg06500161	<i>ABCG1</i>	+	Intrónica	Europea	TG, HDL-C, Glu
16	cg06946797	<i>RMI2</i>	-	Intrónica	Europea / Árabe	Glu
17	cg08857797	<i>VPS25</i>	+	Intrónica	Europea / Árabe	TG
22	cg09349128	<i>CRELD2</i>	-	Intergénica	Europea	Glu
17	cg09664445	<i>CLUH</i>	+	Intrónica	Europea / Árabe	
14	cg11024682	<i>SREBF1</i>	+	Intrónica	Europea	TG, Glu
6	cg13123009	<i>LY6G6F</i>	+	Intrónica	Europea / Árabe	
5	cg26403843	<i>RNF145</i>	+	Intrónica	Europea	

CC: circunferencia de cintura; CRP: proteína C reactiva; Glu: glucemia sérica; HDL-C: lipoproteína de alta densidad; IMC: índice de masa corporal; MetS: Síndrome Metabólico; TG: triglicéridos; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; "+" : hipermetilación; "-" : hipometilación.

EWAS DE OBESIDAD EN SANGRE PERIFÉRICA DE NIÑOS

La realización de EWAS en sangre periférica de niños y su relación con la obesidad son de gran interés tanto para el estudio de la influencia de la obesidad materna como para la detección de marcadores epigenéticos en la infancia con el objeto de realizar un diagnóstico precoz de desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones metabólicas. La validez de este tipo de estudios queda de manifiesto en varios trabajos que demuestran la estabilidad de las marcas epigenéticas en forma de metilaciones del ADN a lo largo de los primeros años de vida, así como la influencia de factores ambientales como por ejemplo el tabaquismo de la madre durante el embarazo. Agha y Cols. en 2016³⁶ realizaron un estudio muy interesante realizado en dos etapas de la vida diferentes. Pudieron comprobar cómo las marcas epigenéticas tienen una estabilidad suficiente, en algunos casos, para utilizarse como marcadores medibles para prevenir enfermedades. En este caso, por tanto, se lleva a cabo un EWAS a partir de muestras tomadas del cordón umbilical de los niños nacidos con un peso superior para su edad gestacional, en el

estudio se encontraron 34 CpGs con un alto grado de metilación. Estas islas CpG están relacionadas con genes como *ROCK1*, *PBX1*, *NOS1AP*. Transcurridos unos años, se volvió a tomar muestras al mismo grupo, en esta ocasión en la edad infantil, se obtienen de la sangre y ahí se encontraron 4 CpGs que continuaban teniendo un grado de metilación muy similar al que presentaban en la muestra tomada del cordón umbilical. En concreto, los cg18181229, cg00222472, cg20682146, cg26663636, siendo más fuerte la correlación en los 3 primeros. El último cg está relacionado con el gen *NOS1AP* que a su vez codifica para la enzima (nNOS) que guarda relación con el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular. Los otros 3 cgs codifican para el factor transcripcional *PBX*, el cual interviene en múltiples aspectos del desarrollo embrionario entre los que se encuentra el desarrollo del páncreas.

Por otro lado Rzehak y Cols.³⁷ estudiaron la influencia del hábito tabáquico de las madres durante la gestación, con ello se pretende establecer una relación entre este factor ambiental y su repercusión en los niños sin necesidad de que su información genética se vea alterada. Del estudio

se deriva que existe una afectación del grado de metilación del ADN como consecuencia de este hábito y cómo sobre genes concretos se produce, además esta mayor metilación en comparación con el grupo control es la responsable de los cambios en la transcripción de los genes afectados. También se hace hincapié en este artículo como en otros anteriores en la longevidad y estabilidad de muchas de los cambios epigenéticos.

Estos estudios recientes, entre otros muchos, confirman la idoneidad de llevar a cabo EWAS en la población infantil con el fin de detectar las anomalías que los factores externos producen mediante alteraciones epigenéticas tales como la metilación en determinados genes. Estos

genes pueden ver bloqueada o potenciada su transcripción lo que repercute directamente en las rutas metabólicas de las que sus productos forman parte en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones. En este sentido hemos encontrado varios estudios realizados en niños, en concreto un total de cuatro estudios EWAS en los que usaron arrays de metilación de 450K en sangre periférica. Los resultados más significativos de estos estudios se muestran en la tabla II.

El primer EWAS realizado en estas condiciones se publicó por Huang y Cols.³⁸ que usó un array de metilación de 450K para un pull de muestras de sujetos obesos y otro para muestras de niños normopeso como control. Se encontraron 129

TABLA II. SITIOS DIFERENCIALMENTE METILADOS ASOCIADOS A LA OBESIDAD MEDIANTE ANÁLISIS EWAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE NIÑOS

Cromosoma	CpG	Gen	Metilación asociada a IMC	Estudio
6	cg26846943	FYN	+	Huang <i>et al.</i> ³⁸
11	cg16436762	PIWL4	-	Huang <i>et al.</i> ³⁸
12	cg17627898	TAOK3	-	Huang <i>et al.</i> ³⁸
1	cg27590049	LMX1A	+	Fradin <i>et al.</i> ³⁹
16	cg07944420	ACSF3	+	Fradin <i>et al.</i> ³⁹
2	cg13850887	SNED1	-	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
3	cg01706498	KLHL6	+	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
3	cg08692210	WDR51A	+	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
4	cg14518658	CYTH4-ELFN2	+	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
2	cg26627956	CFLAR	-	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
8	cg00384539	PRDM14	+	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
2	cg04010122	SOS1	+	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
1	cg26401512	ZNF643	-	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
3	cg15026574	ST6GAL1	-	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
3	cg 24332767	C3orf70	+	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
8	cg27038634	LOC101929268	+	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
6	cg08074767	MLLT4	-	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
19	cg1793529	CILP2	-	Rzehak <i>et al.</i> ⁴⁰
1	cg10059324	PER3	-	Samblas <i>et al.</i> ⁴¹
19	cg04757389	PTPRS	-	Samblas <i>et al.</i> ⁴¹

IMC: índice de masa corporal; “+”: hipermetilación; “-”: hipometilación.

DMPs en regiones correspondientes a 80 genes que correspondían a procesos biológicos del desarrollo, la regulación del sistema inmune, la señalización celular y la transducción de señales por GTPasas. Mediante un análisis posterior de validación por pirosecuenciación se confirmó la metilación diferencial en los niños obesos de los genes *FYN*, *PIWLA* y *TAOK3*. El gen *FYN*, forma parte de varios procesos biológicos del organismo, de los cuales muchos de ellos están íntimamente relacionados con la obesidad como por ejemplo el gasto energético. A su vez, la obesidad infantil se asoció con una hipometilación de las zonas CpGs de los genes *PIWLA*, los estudios no son muy concretos aún pero se presupone una íntima relación con patogénesis de la obesidad. *TAOK3* codifica una proteína fundamental en la señalización celular presente en diferentes tejidos del organismo y relacionada con la obesidad asociada a la resistencia a la insulina. Por último, y a partir de distintos modelos estadísticos de regresión determinaron como un incremento sólo del 1% en el grado de metilación en el gen *TAOK3* puede disminuir la posibilidad de ser obeso por 0.91. En cambio, si el grado de metilación se veía aumentado en la zona CpG pertenecientes al gen *FYN*, la posibilidad de ser obeso se multiplicaba por 1.03.

Posteriormente en el año 2017 se publicaron dos estudios EWAS en niños en los que encuentran patrones de metilación diferenciales asociados al desarrollo de la obesidad.^{39,40} En primer lugar Fradin y Cols.³⁹ realizan un estudio de metilación de ADN en sangre periférica de 40 niños obesos y controles entre 3 y 13 años en los que encontraron 31 CpGs diferencialmente metilados en los sujetos obesos y un total de 151 CpGs en niños con obesidad severa, de los cuales un total de 10 CpGs estaban más del 10% metilados. La diferencia más significativa se observó en cg27590049 en el gen *LMX1A* (LIM Homeobox Transcription Factor 1, Alpha) y en cg07944420 ubicado en el cuerpo del gen de *ACSF3* (Acyl-CoA Synthetase Family 3) que mostró una disminución en un 17% del nivel de metilación en los sujetos control en comparación con los niños obesos. Trece de los 151 CpGs fueron comunes al comparar a los niños obesos todos juntos, mientras que 18 fueron específicos para niños moderadamente obesos y 138 para niños severamente obesos. Según un análisis mediante GSEA se observó que al menos siete vías mostraron un enriquecimiento significativo de la vía de IRS1 entre los eventos de metilación asociados a la obesidad.

Unos meses después Rzehak y Cols.⁴⁰ publicaron un EWAS dentro de estudio CHOP (European Childhood Obesity Project) en un total de 374 niños preescolares de cuatro países europeos a los que se les tomaron medidas de composición corporal mediante bioimpedancia. Se identificaron DPMs asociado con el IMC (212), la masa grasa (230), la masa libre de grasa (120), el índice de masa grasa (24) y el índice libre de masa grasa (15). Los principales genes diferencialmente metilados fueron: *SNED1* (*IRE-BP1*), *KLHL6*, *WDR51A* (*POC1A*), *CYTH4-ELFN2*, *CFLAR*, *PRDM14*, *SOS1*, *ZNF643* (*ZFP69B*), *ST6GAL1*, *C3orf70*, *CILP2*, *MLLT4* y *ncRNA LOC101929268*. De esta manera este estudio ha permitido un mayor evidencia científica de la programación epigenética vinculando la metilación del ADN con el metabolismo alterado de lípidos y glucosa, la diabetes y la composición corporal en niños.

Por último este mismo año se ha publicado un EWAS en niños españoles del Grupo Navarro de Obesidad (GENOI).⁴¹ Se trata de un estudio realizado en una muestra más discreta que los anteriores, en el que incluyeron un total 24 niños, 12 obesos y 12 normopeso. El análisis de todo el genoma identificó 734 CpG (783 genes) diferencialmente metilado en los sujetos obesos. Los genes estaban involucrados en el estrés oxidativo y ciclo circadiano, entre los que se encuentran *VIPR2*, *GRIN2D*, *ADCYAP1R1*, *PER3* y *PTPRS* cuyos patrones de metilación se correlacionaron con rasgos de obesidad. Sin embargo sólo se validaron mediante la técnica EpiTyperTM los genes *PER3* y *PTPRS* con correlaciones significativas entre los niveles de metilación y el IMC Zscore.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES PARA FUTUROS ANÁLISIS

En conclusión, tras haber llevado a cabo la revisión bibliográfica y con el fin de sintetizar la información analizada se puede afirmar que las modificaciones epigenéticas, y en concreto la metilación del ADN, repercuten directamente en el ser humano sin necesidad de verse afectada nuestra información genética. Con ello y gracias al mapeo completo del epigenoma, se han podido identificar genes diferencialmente metilados en la sangre periférica que muestran actualmente una relación con el riesgo de padecer obesidad tanto en adultos como en niños.

Bien es cierto que nos encontramos ante un campo relativamente nuevo, sobre el que se está trabajando mucho actualmente, pero que todavía tiene que mejorar algunos aspectos. Es preciso que se instaure un protocolo a la hora de estudiar el grado de metilación del epigenoma, que se siga trabajando sobre los genes que parecen ser los que sufren un mayor grado de afectación y que nos van a permitir evolucionar de forma más segura. Hasta ahora existe una falta de consenso en los resultados arrojados por los distintos EWAS tanto en adultos como en niños. A excepción del gen *HIF3A*, cuya hipermetilación se ha validado en distintos estudios y hoy en día es el único que se acepta con marcas epigenéticas diferenciales asociadas a la obesidad.

Hasta ahora la falta de consenso y validación en los distintos estudios se puede deber a varios motivos como es la falta de control de variables ambientales como la dieta, el ejercicio físico, el tabaquismo, entre otros factores que influyen en las marcas epigenéticas. Por otro lado, en los estudios caso-control realizados hasta ahora existe una gran variabilidad en los criterios de inclusión de los sujetos, y no existe homogeneidad en cuanto a la presencia de Diabetes tipo 2, o síndrome metabólico, incluso en el caso de estudios en niños no se ha considerado el estado puberal de los mismos, incluyendo niños y adolescentes en el mismo estudio. Por tanto se requieren nuevos estudios EWAS en los que no

se tengan este tipo de limitaciones. Serían interesantes estudios longitudinales y de intervención controlados y aleatorizados con dieta o ejercicio físico, en los que se pueda evaluar el impacto sobre las marcas epigenéticas, especialmente en los patrones de metilación del ADN de sangre periférica.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses que afecte al trabajo elaborado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III) Fondos FEDER, proyecto PUPMEP (PI16/00871), la red CIBEROBN y la Fundación Mapfre mediante una Ayuda a la Investigación Ignacio H. De Larramendi 2017.

Este trabajo es parte de la tesis doctoral de Augusto Anguita del Programa de Doctorado Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Granada. Y es contratado i-PFIS (doctorados IIS-empresa en ciencias y tecnologías de la salud de la convocatoria 2017 de la Acción Estratégica 2017-2020 del Instituto de Salud Carlos III.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bray GA, Fruhbeck G, Ryan DH, Wilding JP. Management of obesity. *Lancet*. 2016;387:1947-56.
2. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci*. 2016;130:943-86.
3. Reddon H, Gueant JL, Meyre D. The importance of gene-environment interactions in human obesity. *Clin Sci*. 2016;130:1571-97.
4. Martínez JA, Milagro FI, Martí del Moral A. Nutriepigenética. En Tratado de Nutrición, 3ª Edic. Tomo II. Bases moleculares de la nutrición. Pag: 417-433. Ediotrial Panamericana. Madrid 2017. ISBN: 978-84-9110-191-8.
5. Salto R, Vélchez JD, Girón MD. Bases moleculares de la expresión génica. En Tratado de Nutrición, 3ª Edic. Tomo II. Bases moleculares de la nutrición. Pag: 157-176. Ediotrial Panamericana. Madrid 2017. ISBN: 978-84-9110-191-8.
6. Fontana L, Sáez MJ, Álvarez AL. Regulación de la expresión génica en organismos eucariotas. En Tratado de Nutrición, 3ª Edic. Tomo II. Bases moleculares de la nutrición. Pag: 217-237. Ediotrial Panamericana. Madrid 2017. ISBN: 978-84-9110-191-8.
7. Bell CG. The Epigenomic Analysis of Human Obesity. *Obesity*. 2017;25:1471-81.
8. Arner P, Sinha I, Thorell A, Rydén M, Wright K, Dahlman I. The epigenetic signature of subcutaneous fat cells is linked to altered expression of genes implicated in lipid metabolism in obese women. *Clin Epigenetics*. 2015;7:93.
9. Bell CG. Epigenetic factors in human obesity. En: Tollefsbol TO, ed. Epigenetics in Human Disease. London, UK: Elsevier Academic Press; 2012:273-296.
10. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes*. 2015; 39:85-97.

11. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, *et al.* ADN methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet*. 2014;383:1990-8.
12. Agha G, Houseman EA, Kelsey KT, Eaton CB, Buka SL, Loucks EB. Adiposity is associated with ADN methylation profile in adipose tissue. *Int J Epidemiol*. 2015;44:1277-87.
13. Demerath EW, Guan W, Grove ML, *et al.* Epigenome-wide association study (EWAS) of IMC, IMC change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. *Hum Mol Genet*. 2015;24:4464-79.
14. Huang T, Zheng Y, Qi Q, *et al.* ADN methylation variants at HIF3A locus, B vitamin intake, and long-term weight change: gene-diet interactions in two U.S.cohorts. *Diabetes*. 2015;64:3146-54.
15. Reddonna T, Volkov P, Gillberg L, *et al.* Impact of age, IMC and HbA1c levels on the genome-wide ADN methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum Mol Genet*. 2015;24:3792-813.
16. Richmond RC, Sharp GC, Ward ME, *et al.* ADN methylation and IMC: investigating identified methylation sites at HIF3A in a causal framework. *Diabetes*. 2016;65:1231-44.
17. Main AM, Gillberg L, Jacobsen AL, *et al.* ADN methylation and gene expression of HIF3A: cross-tissue validation and associations with IMC and insulin resistance. *Clin Epigenetics*. 2016;8:89. doi:10.1186/s13148-016-0258-6.
18. Aslibekyan S, Demerath EW, Mendelson M, *et al.*, A Epigenome-wide study identifies novel methylation loci associated with body mass index and waist circumference. *Obesity*. 2015;23:1493-1501.
19. Willmer M, Berglind D, Sørensen TIA, Neaslund E, Tynelius P, Rasmussen F. Surgically induced interpregnancy weight loss and prevalence of overweight and obesity in offspring. *PLoS One*. 2013;8:e82247
20. Mendelson MM, Marioni RE, Joehanes R, *et al.* Association of body mass index with ADN methylation and gene expression in blood cells and relations to cardiometabolic disease: a Mendelian randomization approach. *PLoS Med*. 2017;14:e1002215.
21. Frazier-Wood AC, Aslibekyan S, Absher DM, *et al.* Methylation at CPT1A locus is associated with lipoprotein subfraction profiles. *J Lipid Res*. 2014;55:324-1330.
22. Ziller MJ, Gu H, Muller F, *et al.* Charting a dynamic ADN methylation landscape of the human genome. *Nature*. 2013;500:477-81.
23. Dekkers KF, van Itersen M, Slieker RC, *et al.* Blood lipids influence ADN methylation in circulating cells. *Genome Biol*. 2016;17:138.
24. Frazier-Wood AC, Aslibekyan S, Absher DM, *et al.* Methylation at CPT1A locus is associated with lipoprotein subfraction profiles. *J Lipid Res*. 2014;55:1324-30.
25. Gagnon F, Aissi D, Carrie A, Morange PE, Tregouet DA. Robust validation of methylation levels association at CPT1A locus with lipid plasma levels. *J Lipid Res*. 2014;55:1189-91.
26. Irvin MR, Zhi D, Joehanes R, *et al.* Epigenome-wide association study of fasting blood lipids in the Genetics of Lipid-lowering Drugs and Diet Network study. *Circulation*. 2014;130:565-72.
27. Pfeiffer L, Wahl S, Pilling LC, *et al.* ADN methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:334-42.
28. Braun KVE, Dhana K, de Vries PS, *et al.* Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: the Rotterdam Study. *Clin Epigenetics*. 2017;9:15.
29. Kriebel J, Herder C, Rathmann W, *et al.* Association between ADN methylation in whole blood and measures of glucose metabolism: KORA F4 study. *PLoS One*. 2016;11:e0152314.
30. Al Muftah WA, Al-Shafai M, Zaghlool SB, *et al.* Epigenetic associations of type 2 diabetes and IMC in an Arab population. *Clin Epigen*. 2016;8:13.
31. Das M, Sha J, Hidalgo B, *et al.* Association of ADN methylation at CPT1A locus with metabolic syndrome in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network (GOLDN) Study. *PLoS One*. 2016;11:e0145789.
32. Mamtani M, Kulkarni H, Dyer TD, *et al.* Genome- and epigenome-wide association study of hypertriglyceridemic waist in Mexican American families. *Clin Epigenetics*. 2016;8:6.
33. Ligthart S, Marzi C, Aslibekyan S, *et al.* ADN methylation signatures of chronic low-grade inflammation are associated with complex diseases. *Genome Biol*. 2016;17:255.
34. Ventham NT, Kennedy NA, Adams AT, *et al.* Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that ADN methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat Commun*. 2016;7:13507.

35. Agouridis AP, Elisaf M, Milionis HJ. An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2011;24:181-7.
36. Agha G, Hajj H, Rifas-Shiman SL, Just AC, Hivert MF, Burris HH, Gillman MW. Birth weight-for-gestational age is associated with ADN methylation at birth and in childhood. *Clinical Epigenetics*. 2016;8:118.
37. Rzehak P, Saffery R, Reischl E, Covic M, Wahl S, Grote V, *et al*. Maternal Smoking during Pregnancy and ADN-Methylation in Children at Age 5.5 Years: Epigenome-Wide-Analysis in the European Childhood Obesity Project (CHOP)-Study. *PLoS One*. 2016;11:e0155554.
38. Huang RC, Garratt ES, Pan H, Wu Y, Davis EA, Barton SJ, *et al*. Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood. *Epigenetics*. 2015;10:995-1005.
39. Fradin D, Boëlle PY, Belot MP, Lachaux F, Tost J, Besse C, Deleuze JF, De Filippo G, Bougnères P. Genome-Wide Methylation Analysis Identifies Specific Epigenetic Marks In Severely Obese Children. *Sci Rep*. 2017;7:46311.
40. Rzehak P, Covic M, Saffery R, Reischl E, Wahl S *et al*. ADN-Methylation and Body Composition in Preschool Children: Epigenome-Wide-Analysis in the European Childhood ObesityProject (CHOP)-Study. *Sci Rep*. 2017;7:14349.
41. Samblas M, Milagro FI, Mansego ML, Marti A, Martinez JA and GENOI members. PTPRS and PER3 methylation levels are associated with childhood obesity: results from a genome-wide methylation analysis. *Pediatric Obesity*. 2018;13:149-58.