



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal**

Programa de Doctorado en Medicina 3139

**Estudio de intervención en pérdida de peso y
valores de parámetros metabólicos y
antropométricos y modulación de fenotipos
intermedios y finales tras el seguimiento de una
dieta mediterránea hipocalórica y actividad física**

Tesis doctoral con mención internacional presentada por:

Rebeca Fernández Carrión

Graduada en Nutrición Humana y Dietética

Para la obtención del Grado de Doctora con mención internacional por la Universitat de València

Febrero, 2023

Dirigida por las profesoras:

Dolores Corella Piquer

Paula Carrasco Espí



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

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

Paula Carrasco Espí, Profesora contratada Doctora en la "Unitat Predepartamental de Medicina". Universitat Jaume I

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral con el título: "Estudio de intervención en pérdida de peso y cambios en los valores de parámetros metabólicos, antropométricos y modulación de fenotipos intermedios y la aparición de fenotipos finales tras el seguimiento de una dieta mediterránea hipocalórica y actividad física", ha sido realizada por Rebeca Fernández Carrión, bajo nuestra dirección, y reúne los méritos suficientes para que su autora obtenga el título de Doctora por la Universitat de València.

Y para que así conste, firman el presente certificado en:

Valencia, a 10 de febrero de 2023

**DOLORES
CORELLA
PIQUER**
Firmado digitalmente por
DOLORES(CORELLA)
PIQUER
Fecha: 2023.02.11
23:29:50 +01'00'

Firmado por PAULA CARRASCO ESPI
- NIF:***3840** el día
12/02/2023 con un certificado
emitido por ACCVCA-120

Paula Carrasco Espí

Dedicatoria

A mis padres, M^aCarmen y Gregorio,

a mi compañero de vida, Alejandro

Agradecimientos

Deseo agradecer la estimable colaboración de quienes han contribuido a la realización de este trabajo:

A mis directoras de tesis por haber aceptado dirigirla, a Dolores por enseñarme que, con perseverancia y constancia, los objetivos y sueños se alcanzan. A Paula, por ayudarme y estar ahí en todo este laborioso camino.

A Sorlí por su apoyo diario y ayuda siempre que la he necesitado.

A mis grandes compañeras, a Eva por poder contar contigo siempre y enseñarme a trabajar en el laboratorio como se debe. A Rocío, por nuestros grandes momentos compartidos y ser mi *teacher*. A Caro, por sus clases particulares y enseñarme a usar el tiempo. A Patricia, por su atención y ser una gran compañera. A Nacho, gracias por tu dedicación, amistad y compañerismo, has sido también clave en este proceso. Gracias por vuestra amistad y por todo lo que me enseñáis cada día desde el primer momento que llegué a este departamento, para mí es una segunda casa.

Sin olvidar a mis compañeros y compañeras Eva C, Edurne, Andrea, Paco, Olga, Pepé, Óscar, Gema, Inma, Esther, Marisa, Carmen.

A los médicos y enfermeros de los Centros de Salud y a los participantes de este estudio, sin su colaboración no hubiese sido posible.

Y finalmente, y más necesarios, a mis padres, a quiénes admiro y admiraré. Ojalá todos los padres fueran como vosotros. Si hemos llegado a este día es por vuestro apoyo constante y soporte. Gracias por estar conmigo siempre.

A mis tios, Amparín y Casimiro, mis primas, Amparo y Ana, que son mis hermanas mayores, mi primo Javi, y mis moninas, Anna y Daniella, mi familia.

A mis mejores amigos, Lidia y José Manuel, y mis margaritas, gracias por brindarme vuestra alegría cuando más la necesitaba.

A mi cosmos, Alejandro. Gracias por acompañarme en esta aventura y todas. Siempre.

“No es cuestión de suerte, es estar preparado.”

Gregorio Fernández Fernández

ÍNDICE

SUMMARY	11
TERMINOLOGÍA.....	49
1. INTRODUCCIÓN.....	53
1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CRÓNICAS Y SÍNDROME METABÓLICO.....	53
1.2 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME METABÓLICO.....	63
1.3 GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DEL SÍNDROME METABÓLICO, SNP VINCULADOS A SÍNDROME METABÓLICO.....	78
1.4 FACTORES ASOCIADOS	117
1.5 ASOCIACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO CON EL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	148
1.6 ANTECEDENTES QUE LLEVAN A REALIZAR ESTE ESTUDIO	152
1.7 SALUD Y MEDICINA DE PRECISIÓN	158
2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	161
2.1 HIPÓTESIS.....	161
2.2 OBJETIVOS CONCRETOS	161
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	164
3.1 GENERALIDADES DEL ESTUDIO PREDIMED-PLUS	166
3.2 REALIZACIÓN DE TESTS ESPECÍFICOS DE PERCEPCIÓN DE SABORES	195
3.3 REALIZACIÓN DE TESTS ESPECÍFICOS DE PREFERENCIAS POR SABORES Y ALIMENTOS.....	197
3.4 REALIZACIÓN DE ANÁLISIS GENÓMICOS ESPECÍFICOS	198
3.5 REALIZACIÓN DE ANÁLISIS EPIGENÓMICOS ESPECÍFICOS	199
3.6 ANÁLISIS ESPECÍFICOS DE METABOLÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA	201
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS EN EL ESTUDIO GENERAL Y EN LOS ESTUDIOS ESPECÍFICOS.....	203
3.8 ESTUDIO EAT 2 BE NICE (E2BN) – SUBPROYECTO COGNITION PREDIMED-PLUS.....	211

4. RESULTADOS.....	219
4.1. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, ANTROPOMÉTRICAS, BIOQUÍMICAS, CLÍNICAS, ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA, CONSUMO DE ALIMENTOS Y ACTIVIDAD FÍSICA EN LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO PREDIMED-PLUS VALENCIA Y EL MULTICÉNTRICO PREDIMED-PLUS A NIVEL BASAL.....	221
4.2 ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES DE ESTILO DE VIDA Y FENOTIPOS INTERMEDIOS EN EL ESTUDIO PREDIMED-PLUS-VALENCIA	227
4.3 INFLUENCIA DE LA PERCEPCIÓN DEL SABOR EN VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS, CARDIOMETABÓLICAS Y PATRÓN DE DIETA EN LOS PARTICIPANTES PREDIMED-PLUS VALENCIA	239
4.4 PREFERENCIA POR SABORES, RELACIÓN CON LA PERCEPCIÓN DEL SABOR, PREFERENCIA POR ALIMENTOS, GENÉTICA Y ASOCIACIÓN CON CONSUMO DE ALIMENTOS Y FENOTIPOS INTERMEDIOS	244
4.5 VARIACIONES EPIGENÉTICAS POR CONSUMO DE TABACO EN PACIENTES PREDIMED-PLUS VALENCIA Y EFECTO DE LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA.....	275
4.6 OTRAS ASOCIACIONES CON FENOTIPOS INTERMEDIOS MEDIANTE METILACIÓN DE EPIGENOMA	298
4.7 ASOCIACIONES BASALES OBTENIDAS EN EL ANÁLISIS INTEGRADO DEL NODO DE VALENCIA CON LOS DEMÁS NODOS PREDIMED-PLUS.....	302
4.8 ANÁLISIS LONGITUDINAL TRAS LA INTERVENCIÓN EN LOS PARTICIPANTES PREDIMED-PLUS VALENCIA.....	315
4.9 ANÁLISIS CONJUNTO DE LA INTERVENCIÓN EN LOS PARTICIPANTES PREDIMED-PLUS	329
4.10 RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LAS ESTANCIAS PARA LA MENCIÓN INTERNACIONAL. SUBESTUDIO COGNITION – E2bN	341
5. DISCUSIÓN.....	355
6. CONCLUSIONES.....	397
7. BIBLIOGRAFÍA.....	403
8. ÍNDICE DE FIGURAS.....	503
9. ÍNDICE DE TABLAS.....	509

SUMMARY

Introduction: The metabolic syndrome together with obesity, are undoubtedly the great pandemics of the XXI century. The global prevalence according to the criteria of the World Health Organization (WHO) is greater than 30%, finding variations in this percentage according to the definition used. Clinical and epidemiological studies have indicated that metabolic syndrome begins with central obesity. Because the prevalence of obesity has doubled, the prevalence of metabolic syndrome has increased in parallel (Wang HH et al., 2020). This trend of increase is observed particularly in developed countries and in younger populations (Saklayen MG, 2018), although the need to indicate geography and ethnicity always be considered, since the risk values are different according to these characteristics (Zimmet P et al, 2007; Saklayen MG, 2018).

We understand metabolic syndrome as the set of metabolic alterations that respond to excess adipose tissue arranged in the abdomen area, characteristic of these patients, as well as the decrease in cholesterol concentrations bound to high-density lipoproteins (HDL-c), the elevation of triglyceride concentrations, the increase in blood pressure and hyperglycemia or insulin resistance (O'Neill S et al., 2015). The combination of these factors and their treatment together as a disease increases the atherogenic risk, with the risk being much higher than if each factor is evaluated independently (Sherling DH et al, 2017). Early identification of metabolic syndrome components could lead to specific interventions to prevent metabolic syndrome development and thus reduce the risk of cardiovascular disease in adulthood with greater efficiency and lower costs, since the presence of a component is predictive of metabolic syndrome development (Cheung et al., 2008). Metabolic syndrome is associated with a 5-fold increase in the prevalence of type 2 diabetes and a 2-3-fold increase in the prevalence of cardiovascular disease (Sherling DH et al, 2017). In 2009, after the latest version of the ATP-III definition (2004) and the new criteria proposed by the FDI, different groups and consortia in the field of study and research agreed on the ranges of parameters for the determinations of diagnostic criteria, allowing the definition of metabolic syndrome to be established, in addition to the standardization of recommendations regarding clinical treatment. In the harmonized and current definition, metabolic syndrome is considered when three or more risk factors are suffered, such as

central obesity, measured by waist circumference (differentiating the values and ranges according to ethnicity and geography), dyslipidemia caused by excess triglycerides with values equal to or greater than 150mg/dL (≥ 1.7 mmol/L), HDL-c values below 40mg/dL (< 1 mmol/L) in men and less than 50mg/dL (< 1.3 mmol/L) in women, fasting blood glucose levels > 100 mg/dL (≥ 5.6 mmol/L), and hypertension (Systolic Blood Pressure ≥ 130 mmHg, Diastolic Blood Pressure ≥ 85 mmHg) or if it includes treatment of any of these factors.

Obesity is the main characterization factor of metabolic syndrome. Excess adipose tissue is considered the key risk factor for developing diabetes, dyslipidemias and cardiovascular diseases, in turn, obesity can also promote the evolution of osteoarthritis, some cancers, mental illnesses and increased mortality (van Vliet-Ostaptchouk JV et al, 2014). *Waist circumference* is also a validated method to determine the degree of obesity or excess fat arranged in this area, certainly assessing abdominal obesity. Values greater than 102 cm in the case of men and more than 88 cm in women for Caucasian population are considered, observing differences according to geographical location and ethnicity, which should be considered when designing studies (Alberti KG et al, 2006; WHO, 2020). After observing and determining the excess of adipose tissue in the body, generally, when it presents an abdominal disposition, we go on to assess the other possible alterations resulting from it. Alterations for lipid values are one of the key factors in its diagnosis. High levels of triglycerides and low in the case of high-density cholesterol (HDL-c), are considered the parameters to be evaluated in the definition of metabolic syndrome. And in the metabolic syndrome situation itself, increased levels of VLDL, CETP and hepatic lipase (LH) promote catabolism of HDL-c particles (Rashid S et al, 2003). The role of *triglycerides* as an independent risk factor for heart failure has always been controversial and, although some convincing evidence has been presented, there is some doubt about the independent nature of the observed relationship (Sarwar N et al, 2007). Excess adipose tissue in the abdominal area associated with hyperinsulinemia promotes hepatic synthesis of VLDL molecules and elevated plasma triglycerides levels (Sarwar N et al, 2007; Bergman BC et al., 2018). *Blood pressure* is recognized as measuring the force exerted against the walls of arteries, as the heart pumps blood through the body. Hypertension is the term used to describe high blood pressure with a risky repeat frequency (Bromfield S et al, 2013; Magder S, 2018). It will be recognized that you suffer from high blood pressure when one of the blood pressures values, systolic or diastolic, are too high. Also, when there is an increase in blood glucose continuously and/or permanently due to *insulin resistance* (diabetes when chronic) in which the body is unable to assimilate blood glucose due to the loss of functionality of the pancreas in the production of insulin. Thus, both insulin

resistance and metabolic syndrome itself are considered to be powerful risk factors for the development of cardiovascular diseases.

All these factors that make up the Metabolic Syndrome depend, in addition to diet, on other factors of the environment and characteristics and traits of the same subjects, which also influence the prevalence of obesity and overweight, as well as Metabolic Syndrome and associated characteristics, such as physical activity, socioeconomic level and level of studies carried out, psychological and cognitive traits, lifestyle, habits such as smoking or exercise or physical activity, the preference to consume foods or flavors, as well as the possible association with various characteristics of the genome.

Over the past twenty years, data from the Human Genome Project and the advent of omics sciences have revolutionized biomedical sciences, increasing the potential to investigate the molecular mechanisms of disease (Gibbs RA et al., 2020; Lee C et al., 2021; Lappalainen T et al., 2019). This effort impacted the rules of research, the methodology of biological discovery, and the computerization of biomedical research (November J et al., 2018; Tanjo T et al., 2021; Tong L et al., 2022; Bravo-Merodio L et al., 2021). Therefore, we currently have new genomic tools to investigate new biomarkers to monitor health and disease risk, as well as a great opportunity to translate genomics from the research field to clinical care (Manolio TA et al., 2016; Goddard KAB et al., 2022). This has accelerated progress towards so-called "precision medicine" (Ashley EA et al., 2016; Cutler DM, 2020; Schaffhausen J, 2017). However, additional research is still needed to achieve its predictive and personalized promises. In addition, the term "precision health" encompasses broader approaches that occur outside the clinical setting, such as disease prevention, health promotion efforts, and delivering individualized health interventions to the right people at the right time (Feero WG et al., 2017; Meagher KM et al., 2017; Viana JN et al., 2021). To achieve precision health, it is necessary to conduct thorough research of an individual's conditions and biomarkers using a variety of measurement technologies. In addition, it is important to note that a person's risk of developing a disease is affected not only by their genome (genetic susceptibility) but also by exposure to environmental factors (the so-called exposome in a broad definition) (Corella D et al., 2005; Barouki R et al., 2018; Vineis P et al., 2020).

In terms of DNA biomarkers, in addition to biomarkers based on DNA sequence changes, such as single nucleotide polymorphisms (SNP), epigenomic biomarkers are currently of great interest (Wang KC et al., 2018; Mehrmohamadi M et al., 2021). Among which we find: methylation of DNA regions (CpG sites), histone modification and microRNAs. Recent studies on metabolic aspects show with increasing consistency, that an individual's risk of developing metabolic diseases

not only depends on factors associated with lifestyle, but is also associated with genetic factors, and knowing them allows an increase in the effectiveness and efficiency of diagnosis and treatment (Ingelsson E et al., 2018). Knowledge of these epigenetic mechanisms in germ cells may influence transcriptional regulation, cell development and growth trajectories into adults, and the possibility of determining the risk of disease occurring in offspring. Environmental exposures can influence the risk of metabolic disease, in fact, according to recent studies, those experienced during intrauterine life influence adulthood. It has also been observed that metabolic disease in adult parents could modulate epigenetic regulation in germ cells, influencing the health of subsequent generations (Sales VM et al., 2017). These epigenetic modifications can also have an important effect on gene expression and several of them have been associated with an increased risk of disease (Zhang W et al., 2018; Reichard J et al., 2021). In relation to metabolomics, study of the residual metabolites of the various metabolic processes of the organism, it has also been observed that the presence of elevated or decreased of some of them can be associated with profiles of metabolic syndrome, insulin resistance or diabetes and other alterations of metabolism.

In this doctoral thesis have presented the multiple results obtained after the participation and realization of fieldwork in the study PREDIMED-Plus, study in which 23 groups or research sites participate in the achievement of the same and monitoring of the protocol. In the same way that our participants were part of the results presented as a multicenter study, whose main objective is to determine whether multimodal treatment with hypocaloric Mediterranean diet, promotion of physical activity and behavioral therapy in the prevention of final cardiovascular phenotypes (Salas-Salvadó J et al., 2019). Parallel to the participation as a site in multicenter study, we have also analyzed and studied our sample of participants as our own study, PREDIMED-Plus Valencia, being able to work on the understanding of the interaction between the various factors and variables that can intervene in the presence of metabolic syndrome, as well as the alterations that define it, and in the association with environmental and individual factors (its genome) (Martínez-González MA et al., 2019; Salas-Salvadó J et al., 2019).

Hypothesis and objectives: The elderly population advances with metabolic syndrome and overweight/obesity has a high risk of cardiovascular diseases and other related cardiometabolic phenotypes assuming a high health and social cost. We hypothesize that although this population has an advanced age and unhealthy dietary habits in general, as well as a high percentage of sedentary lifestyle, an intensive intervention with a hypocaloric Mediterranean diet together with an increase in physical activity within a randomized intervention trial, can be effective by changing these habits and achieve weight loss and an improvement of

cardiometabolic parameters that will result in risk reduction. cardiovascular and other related phenotypes, compared to a control group. In addition, we hypothesize that variables less analyzed in nutritional studies such as taste perception and preferences for flavors and foods, among others (impulsivity, cognitive, sleep), may have relevant associations in the determination of anthropometric and cardiometabolic parameters in this population and also influence diet patterns. Likewise, we hypothesize that omics markers (genomic, epigenomic, transcriptomic, metabolomic) need to be incorporated into these studies to obtain new information about their contribution to the different phenotypes and exposures analyzed in these studies and assess their possible application in the so-called precision health.

The general objective of the study addresses the general hypothesis proposed. This general objective is specified in the following specific objectives within the framework of the PREDIMED-Plus study:

1. To assess the feasibility of conducting a randomized intensive intervention trial with a Mediterranean diet reduced in energy and promotion of physical activity with behavioral support compared to a control group without intensive intervention with a hypocaloric Mediterranean diet or promotion of physical activity, in terms of participant recruitment; adherence to interventions; attendance at follow-up visits; completion of questionnaires and measurements; obtaining biological samples and changes in the pattern of adherence to the Mediterranean diet and physical activity in the short, medium and long term in the elderly population, metabolic syndrome and obesity/overweight recruited in the site of Valencia.
2. To know if the intensive intervention with a Mediterranean diet restricted in energy and with increased promotion of physical activity results in a decrease in the total energy ingested in the different follow-up visits and in a decrease in body weight and other anthropometric measures in the elderly population, metabolic syndrome and obesity/overweight of the Valencia site compared to a control group. Additionally, we also know if this intensive intervention is related to improvements in cardiovascular risk parameters such as glycemia, plasma lipid concentrations, blood pressure and other metabolic markers in an integrated analysis of the Valencia site with other sites within the PREDIMED-Plus multicenter study.
3. To analyze the influence of other factors less studied in nutritional and lifestyle clinical trials in their association with anthropometric, cardiometabolic and dietary intake variables, among which we highlight

the intensity of taste perception, preferences for flavors and foods, sleep, cognitive variables, and impulsivity, mainly in the Valencia site and its extension other sites in those variables also analyzed in other subprojects.

4. To investigate the influence of genomic markers on the perception phenotypes of the 5 flavors, taste preferences and explore their possible contribution to weight loss in participants of the Valencia site.
5. To analyze the influence of epigenomic markers based on DNA methylation at the whole epigenome level on several cardiovascular risk exposure factors such as tobacco use, rural/urban environment and diabetes, as well as to explore the effects of intensive intervention with a Mediterranean diet reduced in energy and increased physical activity on changes in methylation at one year in participants of the Valencia site.
6. To know if the intensive intervention with a Mediterranean diet reduced in energy and increased physical activity results in changes in the expression of selected specific genes and at the level of complete transcriptome in samples analyzed at 6 months or at one year.
7. Assess the impact of the COVID-19 pandemic on the planning of the intervention trial in the Valencia site, as well as on the realization of interventions, monitoring and declaration of events.
8. Integrate the results of the previous objectives to have an overall vision that allows future research, generation of new knowledge and potential applications in precision health.

Material and methods: These PhD-study has been carried out within the framework of the PREDIMED-Plus study. The PREDIMED-Plus study is a multicenter intervention trial based on Mediterranean diet and physical activity for primary cardiovascular prevention. This multicenter study involves 23 recruiting centers distributed in different provinces of Spain. A total of 6,874 participants who met the inclusion criteria were included. These participants were randomized to two intervention groups using a computerized program. The general protocol of the PREDIMED-Plus study is followed uniformly by each of the recruiting centers and there is also a manual for the administration of the questionnaires and the tests to be performed, as well as protocols for the extraction of biological samples, realization of aliquots, conservation of samples, referral of biological samples to biobanks. The global PREDIMED-Plus clinical trial was registered in the International Standard Randomized Controlled Trial (ISRCT) international registry

with the Clinical trial identifier: ISRCTN 89898870 ([www.isrctn.com/ISRCTN89898870]). This is a long-term intervention study that is still being completed. The expected end date of completion is December 2024. This entails limitations when analyzing follow-up data or presenting partial results according to intervention groups. The PREDIMED-Plus trial has a Steering Committee of study investigators, as well as an independent international Data and Safety Monitoring Board that periodically monitors the execution and results of the study. Both committees have indicated limitations for site-level analyses for certain phenotypes and follow-up periods, as well as restrictions for partial analyses of final events before the end of the study. These considerations have been considered when carrying out this Thesis.

This work has been made from the data obtained from the participants recruited in the so-called site of Valencia. This site is based in the Faculty of Medicine of the University of Valencia and has recruited participants from the Valencia region between March 2014 and December 2016. The site of Valencia has been the second center that has recruited and randomized more participants ($n = 465$). From the 465 randomized participants in the Valencia site, measurements, questionnaire data and biological samples have been obtained in the visits as established in the study protocol. The doctoral student has actively participated in the recruitment, follow-up and interventions of these participants throughout the 6 years of the study. Each recruiting center was responsible for processing the permits of the corresponding Ethics Committees for the patients recruited in the site. In the site of Valencia, the favorable report of the Human Research Ethics Committee of the University of Valencia was obtained on July 15, 2013 with the protocol number H137325532771. The favorable report for further analysis was also obtained on November 6, 2017 with protocol number H1509263926814. Participants signed written informed consents.

In addition to the common general protocol, the different sites have been able to carry out specific subprojects. Two of the subprojects carried out by the Valencia site focus on the performance of omics analysis including genomics, epigenomics and transcriptomics fundamentally, and also incorporating metabolomic and metagenomic analysis and, on the other hand, in the determination of the perception of the different flavors, as well as the study of preferences for flavors and foods. This thesis has focused on the specific projects of our site in addition to having the objectives of the general project.

The PREDIMED-Plus study is an intensive clinical intervention trial with a Mediterranean diet restricted in energy and promotion of physical activity complemented with behavioral support to demonstrate, compared to a control group, in which a minimal intervention (called "usual care") is performed, that a

high-quality dietary pattern in which weight loss also took place in overweight/obese people. Also setting recommendations on physical activity to minimize sedentary lifestyle, would have an even more favorable effect on cardiovascular risk factors and would achieve an even greater reduction in the risk of hard cardiovascular events, compared to that observed only with a Mediterranean Diet without caloric restriction in high-risk people (Martínez-González MA et al., 2019; Sanllorente A et al., 2021; Estruch R & Ros E, 2020).

Each participant depending on the intervention group to which he is assigned receives a diet and physical activity protocol, as well as assistance in the group and individual intervention. The intervention is maintained 6 years and the follow-up 8 years. In this way, information is obtained on the effects of the intervention at the three levels (food consumption, lifestyle and behavior) on anthropometric and biochemical changes and the possible impact on alterations associated with overweight and obesity. The main characteristics of the study is that it is a parallel group trial, multicenter, randomized and within the framework of primary prevention. The participants were men aged 55-75 years and women between 60-75 years, with a BMI ≥ 27 and < 40 kg/m², who presented at least 3 criteria of Metabolic Syndrome (Alberti KG, et al, 2009), which were: Central obesity: waist circumference > 102 cm in men and > 88 cm in women; Triglyceride levels: ≥ 150 mg/dl or treatment for hypertriglyceridemia; HDL-C values: less than 40 mg/dl in men and 50 mg/dl in women, or specific drug treatment; Elevated blood pressure: SBP ≥ 135 mmHg and DBP ≥ 85 mmHg, or treatment for previously diagnosed hypertension; Increased blood glucose levels: glucose ≥ 100 mg/dl (≥ 5.6 mmol/l) or treatment for type 2 diabetes already diagnosed.

The collection of information on socioeconomic, lifestyle, anthropometric, clinical, biochemical demographic variables, as well as the collection of biological samples was carried out mainly in the primary care centers of the participants. In the site of Valencia, some tests of specific subprojects were carried out in the Faculty of Medicine of the University of Valencia. The obtaining of questionnaires and type of biological sample is distributed according to the protocol in the different visits throughout the total time of the study, which has allowed and allows to know the characteristics of our participating population at a transversal and longitudinal level. But since follow-up has not come to an end, the determination of final phenotypes is currently continuing and will be analyzed when the study has been fully completed. However, with respect to intermediate phenotypes, results have been obtained after the first year of intervention performed (Salas-Salvadó J, et al., 2019). Only those of the 6 months and in the first annuity have been published.

In 2020, after the exceptional situation of confinement caused by the pandemic generated by the COVID-19 virus, it was decided to consider as a subproject the

data referred to by the participants at this time (Paz-Graniel I et al., 2023), since the general health status was conditioned in multiple ways and could pose a problem in the achievement of the main and secondary objectives of the PREDIMED-Plus study. In the case of the E2bN subproject, as it only included a small subsample and it was necessary to give results within the work packages of the European project, authorization was obtained to analyze the intervention up to 3 years.

With respect to the data obtained for the different subprojects of the Valencia site, the taste perception test has been carried out, as well as the determination of preferences for flavors and foods, sleep pattern (chronotype) and quality, and the multiple omics analyses, which include GWAs (Fernández-Carrión R et al., 2021) and EWAs of this sample and some metabolites (GlycA, branched-chain amino acids, choline and derivatives).

Adherence to the Mediterranean diet was assessed by the score achieved on the 17-item energy-restricted Mediterranean diet adherence scale and has also been validated (Schröder, H., et al., 2021). It was scored with 1 point for each item that captures adherence to the Mediterranean diet. Participants were classified into two groups: low (0 to 8 points) and high (9 to 17 points) adherence to the Mediterranean diet. The previously validated 14-item PREDIMED scale was also used (Schröder, H et al., 2011). Total energy expenditure related to leisure-time physical activity was estimated as the sum of frequency, duration, and intensity of each activity divided by 30 days/month (METmin/day) using the abbreviated and validated REGICOR questionnaire (Molina, L et al., 2017).

Another interesting variable in this Doctoral Thesis, was smoking status. This information was obtained through a questionnaire previously described in the PREDIMED-Plus trial (Salas-Salvadó, J., et al., 2019). This questionnaire contained a general question about current and past tobacco use, questions about the type of tobacco smoked (cigarettes, cigars, and pipes), as well as the number of cigarettes/cigars/pipes smoked per day and the average number of years the participant reported smoking. Smoking was analyzed for the first time as an ordinal variable that included 5 levels (never, ex-smoker of >5 years, ex-smoker between 5-1 years, ex-smoker <1 year and current smokers). The second way to study the effect of smoking and methylation of certain genes was to previously define the variable "smoking" in three categories: current smokers, former smokers and non-smokers. And finally, these analyses were also performed comparing two main groups: never smokers and current smokers.

In the choice and preference of foods, different results have also been obtained that show the relevance of certain genetic predispositions. This thesis shows results obtained focused on the influence of sweet taste, in the same way, that reports were made on food preferences and flavors (Coltell O, et al., 2019; Gervis JE, et al., 2021; Fernández-Carrión R, et al., 2021).

In addition to the measurement of weight and other anthropometric and cardiometabolic parameters, throughout the follow-up visits, the fieldwork staff obtains information on possible clinical events that are also reviewed and complemented by the clinical events committee of each site formed by physicians. Intermediate markers are also determined through different types of standardized questionnaires adapted to the Spanish population. Changes in systolic and diastolic blood pressure, serum lipid concentrations, fasting glucose, renal function tests, uric acid, hemoglobin A1c, C-reactive protein, and liver function tests have been evaluated annually during the initiation and intervention period. The proportion of participants in each group requiring medication, ECG outcomes, cognitive function, quality of life, and scores on psychological and neuropsychological scales were also assessed annually. Plasma, serum, *buffy coat*, and urine samples have been collected and stored. In addition, we carried out in our laboratory DNA isolation for genomic and epigenomic analysis (DNA-methylation). We analyzed genetic polymorphisms at the genome-wide level, as well as possible epigenetic modifications (DNA-methylation at specific CpGs) and serum concentrations of selected metabolites. Additionally, we isolated RNA from fresh blood samples in our laboratory and transcriptomics analyses (for selected genes or at the transcriptome-wide level) were conducted. Likewise, we carried out as another specific project from our site the assessment of taste perception tests as well as test for hedonic preferences of the 5 tastes and foods (Barragán R et al., 2018; Coltell O et al., 2019; Fernández-Carrión R et al., 2021). Briefly, for taste perception Briefly, representative tastants was used for each of sweet, salt, sour, and umami (sucrose, NaCl, citric acid, and monopotassium L-glutamate, respectively); for bitter we used phenylthiocarbamide and 6-n-propylthiouracil. Tastants were provided in a standardized order to minimize context effects. Sweet, salt, sour, and umami solutions were provided using a wooden cotton bud applicator and bitter solutions were provided on solution-soaked filter papers. After which, participants rated the intensity of each solution using a categorical scale ranging from 0 to 5: 0 = “no taste”, 1 = “weak”, 2 = “moderate”, 3 = “strong”, 4 = “very strong”, 5 = “extremely strong.” On this basis, higher taste perception scores indicated greater perception intensity of the tastant solutions. The data obtained were analyzed to see if statistically significant relationships were established between the total information collected from the participants.

Regarding genetic and epigenetic analysis, DNA was extracted from leukocytes isolated from peripheral blood and by automated methods. The rest of the necessary instruments and devices (centrifuges, stoves, bathrooms, single-channel and multichannel pipettes) were the usual ones in laboratories.

For the realization of mass genotyping, Infinium OmniExpress-24 version 1.2 BeadChip (Illumina Inc.) massive genotyping chips were used according to the

manufacturer's protocol with the established quality standards. Alleles and genotypes were detected in the Genome Studio (Illumina, Inc.) genotyping program. Data processing was carried out in the Department of Computer Languages and Systems of the Jaume I University through the use of standard analysis pipelines implemented in the Python programming language with the Numpy library programs combined with PLINK v1.9 (Purcell S, et al., 2007; Chang CC, et al., 2015). Data quality controls were applied and genome-wide association studies, known as GWAS, were conducted.

For DNA methylation analysis as the main epigenomic modification. We have analyzed the methylation of complete epigenome for the subsequent realization of EWAS or selected CpGs. For this we have used the Infinium Human Methylation EPIC BeadChip (850K) methylation chips (Illumina, San Diego, California), including more than 90% of the probes in the 450K matrix and additional CpG sites or islands (Pidsley, R., et al., 2016). Further processing of the matrices was performed at the Center for Human Genomics, Erasmus MC, Rotterdam. DNA bisulfite conversion was performed using the Zymo EZ-96 DNA methylation kit (Zymo Research, Irvine, CA) and samples were hybridized to the Illumina EPIC matrix, according to the manufacturer's protocol. The microarrays were scanned with an Illumina HiScan system and ".idat" files were generated and after quality controls the corresponding EWAS analyses were performed as described in the statistical analyses.

Within the specific projects of the Valencia site we have measured the profile of metabolites in serum in about 426 participants at baseline level. For the measurement of the metabolite profile we have used the international platform based on nuclear magnetic resonance (NMR). For this thesis we have focused on the determinations of essential basic branched amino acids (BCAAs for its acronym in English *Branched-Chain Amino Acids*), including valine, leucine and isoleucine (Yamamoto K et al., 2017; Le Couteur DG et al., 2020; Kubacka J et al., 2021). We have also analyzed the concentrations of a novel biomarker of inflammation called GlycA (Lee DH et al., 2016; Mehta NN et al., 2020) and serum choline concentrations (Park J et al., 2022; Bekdash RA, 2023). All of them are included in the metabolite profile provided by this metabolomics platform.

For transcriptomic analyses, RNA from fresh blood samples from study participants was analyzed. The genes selected were PER1 and CLOCK (circadian rhythm); CAT and GPX3 (oxidative stress); DDIT4 (DNA repair) and ARRDC3 (diabetes) in 50 participants, 25 randomized in each group, and expression changes in selected genes related to weight loss, oxidative stress and chronobiology were determined through specific TaqMan probes for the expression of each gene. The relative level of mRNA for each transcript was calculated using standard methods for gene expression and expression changes were quantified as differences in $2^{-\Delta\Delta Ct}$. In contrast, complete transcriptome transcriptomic analyses used RNA samples selected from 36 participants in the intensive intervention group at

baseline and after one year of intervention. The Affymetrix Human Gene chip array 2.0 complete transcriptome array was used. For the analysis, the Partek genomic suite program was used and the *fold change* in expression changes was analyzed in models adjusted for possible confounding variables such as sex, age, diabetes, leukocytes and *batch effect* and the genes that presented the most significant differences in expression changes were identified. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics version 26.0, NY. All tests were two-tailed and $p < 0.05$ values were considered statistically significant for these associations.

The participants recruited at the Valencia site from 2016 were part of the PREDIMED-Plus Cognition substudy. This subproject is part of the Eat2beNice (E2bN) project, the E2bN project corresponds as a consortium based on collaborations of eight overlapping and recognized European consortia (Horizon2020). The birth of this consortium aims to create synergies and international multidisciplinary teams between specialists from different fields of health, including biologists, microbiologists, neurologists, dietitians-nutritionists, psychologists, psychiatrists, nurses, doctors, researchers. Being part of the research and dissemination of the knowledge acquired, and working with the other projects of Horizon2020. Within the framework of E2bN and Cognition subproject, the international mention stays of this thesis were carried out at the Departments of Psychiatry & Human Genetics, Radboud University Medical Centre Nijmegen, The Netherlands under the supervision of Alejandro Arias Vásquez, PhD, Assistant Professor | Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour | Radboud University Medical Centre Nijmegen, IP of the E2bN study. The respective fecal sample and microbiome analyses were performed at this research center and at Wageningen University, The Netherlands.

Results: The results presented in this Doctoral Thesis constitute the research conducted by the doctoral student within the framework of the multicenter study PREDIMED-Plus. Being a multicenter intervention trial that has not yet ended, there are limitations when presenting partial results, both those generated in the site itself and the global ones involving more sites until the end of the clinical trial. A publication and outcome analysis policy approved by all researchers in the multicenter study was carried out and must be strictly followed. Although the doctoral student has carried out the research tasks within the framework of the PREDIMED-Plus Valencia intervention study from the beginning of it to the present (more than 6 years of research dedication including the recruitment of participants, administration of questionnaires, realization of anthropometric and other measurements, processing of biological samples, realization of diet and physical activity interventions, Annual monitoring of the participants and

obtaining the corresponding data and measurements, there are limitations in the general policy of generating results, so despite having generated a lot of data, its analysis at the site level is not relevant, since the sample sizes were calculated for the multicenter study at the global level. Based on this, we will present at the site level the results of specific projects for which we have authorization from the Management Committee, while other results that have to be integrated with those of the other sites to obtain global results, will be presented jointly with other sites. Fundamentally, results will be presented with the 23 sites, or in the case of specific multicenter projects with fewer sites, the results will be presented only with the sites that are part of the specific project. In all the results presented in which the data of the site of Valencia are integrated together with the other sites, these are studies already published in which the doctoral student has participated as an author collaborating in all stages of the preparation of the corresponding article to which reference is made.

Regarding temporality, there is no temporal restriction on the presentation of baseline data. However, for the follow-up and for the analysis of the effect of the interventions, the analyses have been restricted to the first two years, since the publication of more follow-up time has been discouraged by the external data management and monitoring board of the PREDIMED-Plus study. In addition, although the publication of analyses with up to 2 years of follow-up is allowed, it is advisable to analyze the intensive intervention and control groups together by including both interventions with Mediterranean diet and thus not anticipate final results. Only in special cases such as the pilot study and other monitoring studies has it been possible to clearly analyze the interventions in a comparative manner on anthropometric parameters, and intermediate phenotypes of glycemia, lipids, markers of inflammation and day compliance. Exceptionally and for specific projects with the need to present results within the work plans established by the respective calls, 3- and 4-year analyses have been allowed, as will be mentioned later.

The specific projects of the Valencia site are the projects focused on the measurement of taste perception and taste preferences, as well as projects based on omics analysis (genomic, epigenomic, metabolomic and transcriptomic) in the participants of the Valencia site. Additionally, our site in Valencia administered questionnaires of sleep habits and quality of it, together with the determination of the type of chronotype, as well as personality traits, and happiness questionnaires, for which we have also carried out analyses in this thesis. And although the doctoral student, together with the coordinating physician of the declaration of events, has participated for more than 6 years in the detection and declaration of events, these can only be analyzed when the study has ended.

In the Valencia site, 465 participants met all the inclusion criteria and were randomized. 239 (51.4%) participants were randomized to the intensive intervention group with a Mediterranean diet restricted in energy plus physical activity and the so-called control group (non-intensive intervention with Mediterranean diet within the "usual care"), with 226 (48.6%) people randomized into this group. Throughout the years in which the research work of this Doctoral Thesis has been carried out, information has been obtained on lifestyle variables, food consumption, perception and preference of foods and flavors, chronotype and sleep quality, cognitive, psychological-behavioral, clinical, anthropometric, socioeconomic, biochemical, and at the biomolecular level, genetic, epigenetic and metabolomics, of these 465 participants relevant to the PREDIMED-Plus Valencia study. 46.0% men and 54.0% women have been recruited, with an average age of 65 ± 5 years. The mean waist circumference for both sexes was 106.1 ± 0.5 cm (111.2 ± 0.6 cm in men and 102.0 ± 0.6 cm in women). After analyzing the consumption of foods reported by the participants at baseline, statistically significant differences were obtained according to sex in total energy intake (measured in kcal/day) (<0.001), protein (%/day) (<0.001), vegetables ($p=0.013$), legumes ($p=0.040$), cereals (<0.001), dairy ($p=0.006$), biscuits ($p=0.084$) and alcohol (g/day) (<0.001), as well as that women consumed more fruits than men ($p=0.041$). An increase in consumption of whole grains was also observed according to the level of education ($p=0.027$). Regarding cognitive variables and personality traits, depression and sadness were some of the emotions evaluated, as well as cognitive ability and the relationship with the chronotype and the times in which they sleep and wake up and total hours of sleep. In these analyses, it was determined that the evening chronotype was at risk ($\beta = -0.90$; $p=0.047$), since it was associated with symptoms of depression and that the Mediterranean diet could play a key role in reversing this association ($\beta = -0.28$; $p=0.010$). The chronotype also affects the times at which meals are made, statistically significant differences were determined at breakfast and lunch, with women taking these shots a little later ($p<0.05$). However, for the trait of "pecking", no differences were observed by sex, but in the type of food that tends to peck. Men consume more peanuts ($p=0.020$) and olives ($p=0.026$) and women donuts ($p=0.054$). During the pandemic, data from 424 of these participants (42.5% men) were analyzed and it was determined how the chronotype modulated the time patterns of waking up, getting up, going to sleep, and meal times, as well as sleep quality (Roig Espert B et al., 2020). In relation to cognition, it was also assessed whether the presence of certain metabolites in the patients' serum was associated with test results evaluating different aspects of cognition. The metabolites in serum were determined by NMR, the analyzed included in this doctoral thesis were: cholines, branched chain amino acids (BCAA), GlycA, bilirubin. High choline levels were associated with better scores on verbal fluency tests ($p=0.040$ and $p=0.029$ for phonemics and

semantics, respectively) and on performance tests, inversely associated (lower score means better performance) with TMT-A ($p=0.013$) and TMT-B ($p=0.035$). In genetic analysis, we detected several polymorphisms strongly associated with cholines (rs10991629-SLC44A1 with $p<0.005$ and rs8068641-PEMT; $p<0.01$, among others). BCAAs (leucine, isoleucine and valine) were determined with a high-throughput NMR metabolomics platform and the age factor was identified as relevant for the determination of BCAAs as a biomarker of cardiovascular risk. Even so, in our PREDIMED-Plus Valencia population, associations were identified with the diagnosis of diabetes, which was estimated at OR:1.64 (95% CI:1.33-2.03), $p<0.001$. Dyslipidemia was also linked to serum BCAA values ($p<0.05$), after adjusting for sex, age, BMI and tobacco variables. In these analyses, the Mediterranean diet showed some influence close to statistical significance ($p=0.11$). GlycA was analyzed as the hills and its association as a marker of inflammatory state was determined. Global and sex-specific GWAS were performed with bilirubin to analyze associations and gene-diet interaction with total serum bilirubin. A SNP (rs6887452), located on chromosome 5, reached statistical significance at this level ($p=3.14\times 10^{-8}$).

In the achievement of this doctoral thesis has also worked on the determination of the influence of the perception of taste in anthropometric variables, cardiometabolic and diet pattern. After performing the respective taste perception and food preference tests, it was observed that the most obese participants ($p=0.002$) were those who showed lower scores in the taste perception tests. Subsequently, they analyzed whether the perception of the different flavors influenced food consumption. Highlighting the consumption of fruits greater to greater perception of salty taste and specifically, non-citrus fruits ($\beta=0.6$; $p=0.03$). In the GWAS performed on taste perception when analyzing the SNPs associated with the total taste score, we found that the most significant SNP was rs1969772 (intergenic), followed by SNP rs6592657, located in the LRRC32 gene. Accordingly, carriers of the smaller allele (allele 2) would have a lower overall perception of taste, with the means for genotypes 11.12 and 22 of: 11.93 ± 0.43 , 10.57 ± 0.29 and 9.04 ± 0.57 points, respectively, $p<0.001$. A second analysis was performed determining the influence of preference for sweet taste (both alone and in the context of other tastes) on the preference for sugary foods and its modulation by diabetes status and the presence of new genetic factors associated with preference for sweet taste. In this sample, diabetic participants showed significant association in taste preference, taste perception, taste for sugary foods, biochemical and genetic markers ($p=0.021$) than non-diabetic subjects. For taste perception, subjects with diabetes have a slightly lower perception of all tastes ($p=0.026$ for the combined "total taste score"), with the bitter taste statistically lower ($p=0.023$). We also conducted principal component analysis (PCA) to identify latent variables related to preferences for the five flavors. We identified two factors with their own

values, with factor 2 showing the greatest correlation with the preference for sweet taste. Preference for sweet taste was strongly associated with a taste for sugary foods. In SNP-based GWAS, we identified some associated with sweet taste preference, both at the suggestive level and at the genome-wide level, especially a primary SNP in PTPRN2 whose lower allele was associated with a lower preference for sweet taste. The PTPRN2 gene was also one of the best genes obtained in the exploratory gene-based GWAS analysis.

In addition to GWAS analyses, whole epigenome methylation studies (EWAS) were performed analyzing differential CpG methylation sites by smoking status (never, former and current smokers) and modulation by adherence to a Mediterranean diet score was explored. A gene set enrichment analysis was performed for biological and functional interpretation. The predictive value of differentially superior methylated CpG was analyzed using receiver operating curves. We characterized the methylation signature of smoking DNA in this Mediterranean population by identifying 46 differentially methylated CpG at the level of EWAS throughout the population. The strongest association was observed in cg21566642 ($p=2.2 \times 10^{-32}$) in the 2q37.1 region. We also detected other CpG that have been consistently reported in previous research and discovered some new differentially methylated CpG sites in subgroup analyses. In addition, we found different methylation profiles based on adherence to the Mediterranean diet. In particular, we obtained a significant interaction between smoking and diet by modulating methylation cp05575921 in the AHRR gene.

In the process of achieving this doctoral thesis have been carried out more analysis of EWAS with various variables. With high glycemia due to insulin resistance, the most significant methylation sites were identified: cg27024081 ($p=3.4 \times 10^{-14}$); cg06611426 ($p=6.8 \times 10^{-9}$) and cg17385679 ($p=1.1 \times 10^{-8}$). The pathway enrichment analysis identified these pathways as most relevant: base cleavage repair ($p=3.7 \times 10^{-13}$) and mTOR signaling pathway ($p=5 \times 10^{-5}$). In another EWAS analysis, significant associations were obtained between methylation of several genes encoding miRNAs and chronological age. Highlighting the MIR34B (cg26561785; $p=3.9 \times 10^{-8}$; hypermethylation associated with older age; $r=0.28$). One of the associations that was also included in these analyses with EWAS was to identify whether the rural or urban character of the place of birth could influence the level of methylation of certain genes. After performing quality control and standardization, methylation was quantified with the Beta parameter (between 0 and 100% methylation for each CpG) and the M parameter ($\log_2(\text{Beta}/(1-\text{Beta}))$) was used for statistical analysis. Models were adjusted for confounding variables. Pathway or metabolic pathway analyses were applied according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO)

knowledge base. A significant influence of the place of birth, rural-urban, on the DNA methylation profiles was found decades later (adjusting for other confounding variables) and it was observed that the greater the urbanization of the place of birth, the more significant CpG were: cg08364654 (chr-3-intergenic; $p=1.04 \times 10^{-6}$; $r=0.296$), hypermethylated with greater urbanization; CG05407200 (chr-11-intergenic; $p=5.91 \times 10^{-6}$; $r=-0.275$), hypomethylated with more urbanization; cg17081914 (NCKAP5, *Peripheal clock protein gene*, involved in lupus, attention deficit and several cancers; $p=2.31 \times 10^{-5}$; $r=0.258$), hypermethylated with more urbanization.

As a general policy of the PREDIMED-Plus study, multicenter analysis of the data is preferred except for what are specific site projects. In this case, the data from Valencia are analyzed together with the other centers participating in the study and the doctoral student has participated as an author in the most relevant publications. These include publications relevant to the influence of participants' residence according to geographical area and socioeconomic level (Cano-Ibañez N et al., 2018; Cano-Ibañez N et al., 2020), sleep habits, as well as their duration and quality with obesity phenotypes and CV risk parameters (Rosique-Esteban N et al., 2018), fruit consumption (Becerra-Tomás N et al., 2021), water level through water intake (Paz-Graniel I et al., 2019), coffee consumption and whether it is associated with cognitive test results (Paz-Graniel I et al., 2020) and the consumption of other types of foods and supplements, such as folic acid ((Navarrete-Muñoz EM et al., 2020) and fermented dairy (Mena-Sánchez G et al., 2018).

Currently, after the end of December 2022, all participants in the PREDIMED-Plus study have completed the 6-year follow-up with intervention according to protocol. The doctoral student has participated as a main dietitian in the study, in coordination with other researchers in the group, recruiting, intervening and annually following all participants in annual visits. Although data corresponding to all protocolized questionnaires have been collected, the PREDIMED-Plus study is not a completed study. It is still ongoing. Therefore, in this thesis we will present general data up to two years of follow-up in our site (not yet published) and then we will include data from the pilot study that was published in a subsample of participants in a multicenter study, as well as another follow-up study that was published to explore the effect of the intervention on changes in diet, in anthropometry and intermediate phenotypes of cardiovascular risk at 6 months and one year of intervention. The most pronounced weight change is recorded at 6 months, while later each year, weight differences are maintained between the groups, not observing a rebound effect of weight gain in the intensive intervention group, this being an effect that worried at the beginning of the study. Weight differences are statistically significant between the two groups throughout the intervention ($p<0.001$). The presented p value corresponds to the p of the

interaction between the intervention group and time in the repeated measures model adjusted for sex, age and baseline diabetes. Within our specific project in the Valencia site, we also analyzed whether weight loss after the intervention was associated with changes in gene expression. For this we use two approaches. First, use the candidate gene approximation and secondly use the complete transcriptome analysis approach with an expression array (EWAS) as indicated in methods. In the approximation of candidate genes, polymorphisms were analyzed in the selected genes genotyped by the Illumina Human OmniExpress Array. RNA was isolated from peripheral venous blood. As the most rapid weight change took place at 6 months, this time was selected for the study of expression changes. RNA was isolated at baseline and 6M of intervention. Gene expression was validated by individual RT-qPCR and expression changes between the control group and the intervention group were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The statistically significant differences in gene expression were for CLOCK, $p=0.008$; PER1, $p=0.034$; CAT, $p=0.006$; ARRDC3, $p=0.029$ and DDIT4, $p=0.033$ at 6 months in this intervention study. In the complete transcriptome analysis, it was detected that the most significant expression changes (top-ranked) occurred in the EGR2 (early growth response) genes, $p=1.42 \times 10^{-5}$; VIM (vimentin), $p=1.92 \times 10^{-5}$, EGR3 (early growth response 3), $p=1.42 \times 10^{-4}$ and PPM1B (protein phosphatase, Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1B), $p=1.53 \times 10^{-4}$, followed by other genes such as CLP1, DZIP1L, OR1N1, MIR210 and ARHGEF15.

The effect of weight loss as a multicentre study was observed to differ over time. At 6 months, mean weight loss from baseline among participants assigned to the intervention group and control group were -2.4 (-2.7%) and -0.4 kg (-0.5%), respectively, while the respective values at 12 months were -3.2 (-3.7%) and -0.7 kg (-0.8%). The maximum difference between groups in weight loss was reached at 12 months, with a mean difference in weight changes between the intervention group and the control group of -2.5 kg (-3.1 to -1.9). Results were consistent across subgroups of sex, age, BMI, diabetes, insulin use, statin treatment, and education level. Reductions in BMI from baseline to 6 and 12 months were greatest in the intervention group. Biomarkers of cardiovascular risk were also determined, with leptin, IL-18, MCP-1 showing greater decrease in the intervention group. And although the extraordinary situation caused by the COVID-19 pandemic could truncate the follow-up of the study, mitigation strategies were created to enforce the intervention and follow-up of the participants and their success in preserving the integrity of the trial and ensuring its continuation was analyzed, however, the effects found in adiposity variables were small (Paz-Graniel I et al., 2023).

During the stays carried out by the doctoral student, following the framework of research carried out within the PREDIMED-Plus Cognition subproject, in which

participants relevant to the Valencia site also participated, different lines of research were carried out, on the one hand, as part of the stay, various possible gene-diet interactions were studied, since the E2bN study was involved in associating aspects of cognition, behavior and behavior with the way in which we eat and consume food, in the same way that the necessary learning was carried out to achieve the study. A complete review of the literature on Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and the possible interactions and nutrient intake and these disorders in children, adults and the elderly were conducted, as well as their influence on obesity, lipids, taste perception, quality of life, restful sleep, etc. We observed the polymorphisms of the genes indicated by the article by Demontis D et al., and it was the research work we used to see possible associations with different phenotypes in participants of the PREDIMED-Plus Valencia study (Demontis D et al., 2019). Statistically significant interactions were identified for type 2 diabetes, BMI, and sweet taste perception. Together with the other sites, the effect of impulsivity and cognition on weight loss was analyzed within this substudy, indicating that the participants with the highest impulsivity scale scores were those who followed less healthy eating patterns. This substudy also made determinations of the types of bacteria that make up the participants' gut microbiome and were associated with food consumption (It was concluded that there was a decrease in *Butyricicoccus*, *Haemophilus*, *Ruminiclostridium* 5 and *Eubacterium hallii* in the intervention group compared to the control).

Discussion: The results obtained during the achievement of this research work show the need and importance of having these possible effects and modulations in the pattern of treatments of certain chronic pathologies, such as Metabolic Syndrome and the characteristics that make it up, which, in turn, are also chronic diseases over time (comorbidities) (Alberti KG et al., 2009; Brown AE et al., 2016; Choe SS et al., 2016). Success in following a dietary plan lies in providing sufficient energy, being varied and complete (covering needs). Throughout these years, we have tried to analyze and detect the characteristics and possible interactions with various variables and factors of the environment, in the evaluation of the efficiency of a dietary and lifestyle intervention. As well as determining the possible genetic predisposition due to the presence of a polymorphism (SNP) of a specific gene or genes (or several SNPs in different genes) and the degree of methylation of the genes, whether their expression has been modified or not, from the influence to exposure by some external factor, the increase in benefits is even greater (Corella D et al., 2018). Personalized or individualized nutrition is born from these ideas, starting from knowing the specific characteristics of each patient or participant and being able to offer a pattern of food and exercises and activities personalized to their needs (Corella D, 2022).

Within the framework of this doctoral thesis work, knowing the information of various variables and characteristics of patients (ability to perceive flavors and preference for food and flavors, habits and lifestyle, personality traits and behavior, quality and rest associated with sleep, chronotype, mood, etc.) has allowed us to determine if there is an association and interaction between some of them, and that could explain, in turn, if the objectives of weight loss and cardiovascular prevention demanded by the study protocol at the multicenter level are achieved. In this way, it has been analyzed in our sample of participants the variables mentioned, as well as the presence of certain genotypes, epigenetic variations and levels of metabolites, and as intermediate phenotypes such as certain biochemical parameters can be modulated and influence in different way the patient in his objective of being operated and performing a diet.

The development of omic science technology, advances in genomics (genotype association studies), epigenomic aspects (DNA methylation, histone modifications, microRNA and other emerging regulators), transcriptomics (selected genes and complete transcriptome), metabolomics and metagenomics in recent years has allowed to give concise and consistent answers for many pathologies/alterations and tracing-phenotypes (Corella D et al, 2018; Mahajan A et al. 2018).

The study carried out in this type of participants, older Mediterranean subjects with metabolic syndrome, in which, in addition to GWAS, tests were carried out on the perception of different flavors and preference for them and for consuming some foods over others, provides new knowledge about the preference for taste, specifically, sweet and related variables that add more clues to the emerging field of taste perception, taste preferences and dietary intake for personalized nutrition (Rodgers GP et al., 2020; Busch CL et al., 2020). We found that the preference for sweet taste in these subjects is very high, second only to salty taste. In addition, we have observed a strong association between preference for sweet taste and reported preference for sugary foods in this population. However, we did not detect a significant difference in the perception of sweetness and the preference for sweet taste. It is also known that there are age differences in the ability to perceive tastes (Barragán R et al., 2018). In addition to age, the characteristics of the population in terms of the existence or non-existence of pathologies are also important (Diószegi J et al., 2019). Therefore, an important feature may be the presence of subjects with type 2 diabetes in the population studied. Thanks to the realization of this study it was observed that subjects with diabetes have a slightly lower taste perception for all tastes combined in the calculated "total taste score", with bitter taste being the only taste quality that shows statistically significant differences. On the other hand, in the present study we detected a slightly significantly significant preference for sweet taste in subjects with diabetes. Although no associations were detected between preference for

sweet taste and foods analyzed in non-diabetic participants. Therefore, diabetes should be a trait to consider when comparing the results of sweet taste perception, sweet taste preferences, and sugary food intake among different populations and for subsequent personalized nutrition. In a previous GWAS conducted in this population we were able to detect a statistically significant association between the perception of bitter taste and SNPs in the TAS2R38 gene (Coltell O et al., 2019). Although the association between sweet taste preference and genetic factors is not expected to be as strong as the relationship between bitter taste, we obtained a statistically significant result at the genome-wide level. We identified several SNPs in the PTPRN2 gene (located on chromosome 7), significantly associated with the preference for sweet taste. The SNP reached was the rs2091718 SNP, remaining statistically significant at the genome-wide level after adjustment for several factors, including type 2 diabetes ($p=2.28 \times 10^{-8}$), this result after adjusting for several regression models (including a GWAS on the combined Factor 2 linked to sweet taste preference in the context of other tastes) and controlling for population stratification. Similar results were obtained. In addition, we performed additional gene-based GWAS for sweet taste preference and the PTPRN2 gene was the second highest ranked at the suggestive level of significance in this analysis. This gene appears to play a key role in the epigenetic regulation of metabolic diseases, neurodegeneration and cancers. Differential methylation of the PTPRN2 gene and increased risk of obesity in children (Lee S, 2019), type 2 diabetes (Ouni M et al., 2020), cognitive impairment (Chuang YH et al., 2019), future cardiovascular risk (Agha G et al., 2019), and cancer (Lee EJ et al., 2015; Wielscher M et al., 2015). In the present study, the main SNP rs2091718 in the PTPRN2 gene has been significantly associated with the prevalence of type 2 diabetes. Carriers of the minor G allele for this variant had a lower probability of diabetes. Similarly, G carriers had a lower sweet taste preference. This is why understanding individual preferences for sweet taste and factors related to food intake is of increasing interest and importance for personalized nutrition and precision medicine in diverse populations (Vesnina A et al., 2020; Ordovás JM et al., 2018).

Regarding the EWAS performed, we examined the methylation signatures of smoking DNA (including never smokers, former smokers and current smokers) in these same participants, older Spanish Mediterranean population with metabolic syndrome. This is the first study in this population to investigate differentially methylated CpG sites in the blood associated with various smoking exposures using the high-density EPIC 850K methylation matrix. The primary population-wide EWAS considered 5 levels of status for the smoking variable based on years smoked or smoked and revealed quantitative effects on DNA methylation of differentially ranked methylated CpG sites. In this EWAS, we detected 46 differentially methylated CpG at the significance level of the entire epigenome (Mansell G et al., 2019). The strongest association (hypomethylated in smokers)

was observed in the intergenic cg21566642 (represented in the methylation matrices 450K and EPIC 850K) located in the 2q37.1 region, near the ALPPL2 gene. The second highest ranked was cp01940273, also located in the same region. Similar to our results, methylation site cg21566642 was previously reported as the most affected by Christiansen C, et al., (Christiansen C et al., 2021) analyzing subjects from the United Kingdom using the EPIC 850K matrix. Other studies also reported this CpG site as one of the most significant outcomes (Zeilinger S et al., 2013; Sayols-Baixeras S et al., 2015; Cardenas A et al., 2022; Baglietto L et al., 2017). In addition to the statistically significant impact (cg21566642) in our primary IWAS, we detected as statistically significant another 45 additional differentially methylated CpG profiled with the 450K or EPIC methylation matrices. We used the recently updated database "The EWAS Catalog: a database of epigenome-wide association studies" to verify the novelty of these CpG (Battram T et al., 2022). All CpG discovered in our EWAS as statistically significant across the sample had previously been reported in other studies (Breitling, LP et al., 2011; Shenker NS et al., 2013; Philibertm RA et al., 2013; Zeilinger S et al., 2013; Tsaprouni LG et al., 2014; Dogan MV et al., 2014; Reynolds LM et al., 2015; Harlid S et al., 2014; Sayols-Baixeras, S et al., 2015; Li S et al., 2018; Hulls PM et al., 2020; Sun, YQ et al., 2021; Mishra, PP et al., 2020; Barcelona V et al., 2019; Wen, D et al., 2022; Cardenas A et al., 2022; Dugué, PA et al., 2020; Langdon RJ et al., 2021; Christiansen, C et al., 2021; Baglietto L et al., 2017; Battram T et al., 2022; Joehanes R et al., 2016; Domingo-Relloso A et al., 2020), except cg15533935 in the NUDT4P2 gene (only present in the EPIC 850K matrix), which is first described here. This result confirms the high consistency in the effect of smoking on DNA methylation in diverse populations.

Among our results, those obtained in relation to adherence to the Mediterranean diet stood out. Participants who had greater adherence showed increased methylation at site cg05575921 while current smokers, helping to counteract smoking-induced hypomethylation. It is known that diet may have an effect on DNA methylation (Maugeri A 2020; Fareed MM et al., 2022; Ungaro P et al., 2022; Li X et al., 2022), although these effects have not been fully determined and remain poorly understood. And while this is the first study to focus on the effect of the Mediterranean diet on genome-wide DNA methylation, other studies have examined the impact of specific foods/nutrients on methylation in CpG in the AHRR gene depending on smoking status (Tsuboi Y et al., 2022; Shorey-Kendrick LE et al., 2017).

One limitation of our study is that we don't have these disease results to analyze the association. Instead, we performed functional enrichment analyses of differentially methylated CpG and found strong associations with pathways associated with various cancers, inflammation, insulin metabolism, and cardiovascular disease, consistent with previous studies (Christiansen C, et al.,

2021; Joehanes R, et al., 2016). In fact, one of our studies analyzed the signatures and methylation pathways in this group of participants depending on the state of diagnosis of diabetes they presented and the pharmacological treatment they received (Giménez-Alba I et al., 2021). The successive analyses of enrichment of pathways identified repair pathways by excision of bases, mTOR signaling, basal cell carcinoma, and the pathways that were significant when comparing the subjects with those who took various pharmacological treatments were the pathways of dilated and hypertrophic cardiomyopathy, these results coincide with some studies that have found that these routes were associated with different cardiovascular events and intolerance to glucose (Li j et al., 2021; Sun Y et al., 2021; Feng J et al., 2022).

Other research work in the study of obesity finds associations with other factors associated with circadian rhythms, times at which they sleep and wake up, time slots in which food intakes are made, and even times when exercise or physical activity is performed (Stutz J et al., 2019; Moreno-Reyes P et al., 2020; Barragán R et al., 2021; Panagiotou M et al., 2021; Glavin EE et al., 2021). In our study population, PREDIMED-Plus Valencia, multiple analyses and studies have been carried out in relation to these variables linked to sleep and its quality, as well as the identification of the chronotype of the participants and the possible interactions with other parameters present. In these subjects we were able to determine that those who were evening chronotype had higher scores on the depressive symptom response questionnaires (BDI), and that these symptoms with a high adherence to the Mediterranean diet could be reversed. These results were consistent with previous studies (Fang H et al., 2019; Guan Q et al., 2020; McKinnon AC et al., 2019; Kaur S et al., 2019; Song D et al., 2021). In the same way that the set that responds to sleep influences cognitive traits, and some concentrations of metabolites that have been linked to cognitive ability have been detected (Traini E et al., 2013; Parnetti L et al., 2001) and different results in cognition tests (Sheelakumari R et al., 2018; Zhong C et al., 2021), observing in our study population that subjects who had lower levels of choline and derivatives also had lower scores on these cognitive ability assessment tests. With NMR spectroscopy, the measurement of GlycA was also analyzed in our sample PREDIMED-Plus Valencia. GlycA is considered a biomarker of systemic inflammation and cardiovascular risk (Conelly MA et al., 2017; Gruppen EG et al., 2019; Ballout RA et al., 2020; Puig-Jové C et al., 2022), and in our participants, serum GlycA values were associated with various parameters related to cardiovascular disease (risk of diabetes ($p=0.005$)). It was determined by GWAS which genes could be involved in serum GlycA levels and SNPs that were significant were in genes recognized for their association with inflammation states, therefore, in our Mediterranean population with Metabolic Syndrome we could also indicate that GlycA works as a biomarker of cardiovascular risk (Conelly MA et al., 2017; Gruppen EG et al., 2019; Ballout RA et al., 2020; Puig-Jové C et al., 2022). Branched-chain amino

acids (BCAA) are essential amino acids involved in glucose metabolism, are found in serum and were studied in our population and a younger population sample (Yang P et al., 2016; Tobias DK et al., 2018; van den Berg EH et al., 2019; Kubacka J et al., 2021; Orozco-Ruiz X et al., 2022). The results showed that, just as in young people, BCAA values were closely associated with various parameters of obesity (BMI ($p=1.7 \times 10^{-7}$), waist circumference ($p=4 \times 10^{-6}$), obesity risk (OR: 2.34; CI95% 1.60-3.42, $p=1 \times 10^{-5}$), in older subjects, PREDIMED-Plus Valencia patients, the associations with these variables were attenuated, indicating that age influences their usefulness as a biomarker.

The results obtained in our study sample, patients over 65 years of age with obesity or overweight and metabolic syndrome, indicate how weight loss strategies should consider multiple factors that can influence the success and predisposition to their follow-up and realization. Weight loss maintained over time works as a tool for preventing the pathophysiology of cardiovascular disease. In these premises reside the main objectives that led to the design and achievement of the PREDIMED-Plus multicenter study (Salas-Salvadó J et al., 2019; Martínez-González MA et al., 2019). The count of total events as a multicenter sample will be part of the final results of the study when it is completely completed. But, although to be able to see the results of greater magnitude that will derive from the follow-up of this study we must wait some time, throughout these years it has been possible to carry out different analyses of the multicenter computation that have identified some of the variables that could influence the explanation of the final results.

Some of the variables that were identified in the PREDIMED-Plus study subjects at the multicenter level showed the relevance of place of residence, geographical area, socioeconomic level and level of education (Cano-Ibáñez N et al., 2018; Cano-Ibáñez N et al., 2020). Sleep, in the same way that in the participants of our site the evening type was associated with obesity parameters, in the multicenter sample analysis identified that patients who slept fewer hours showed associations with parameters of overweight, obesity and diabetes (Rosique-Esteban N et al., 2018). This same risk profile, of sleeping less time than recommended and presence of this type of parameters has been investigated in several studies with night shift workers, whose risk of developing cardiovascular disease is higher (Lunde LK et al., 2020; Thosar SS et al., 2018; Gohari A et al., 2021; Boivin DB et al., 2014; Gusmão WDP et al., 2022; Wei R et al., 2022). In the total sample of patients, studies were also conducted on dietary patterns and identification of the type of foods that were consumed to a greater extent compared to others, and whether there were associations with certain biochemical parameters in the participants, as well as with other types of variables. It was observed that fruit consumption was associated with lower parameters of Metabolic Syndrome, and that their color could influence the prevention of cardiovascular risk and

Metabolic Syndrome (Becerra-Tomás N et al., 2021). The consumption of fruits has been investigated as a highly effective tool in reducing the appearance of various alterations in different age groups (Esposito K et al., 2004; Giugliano D et al., 2006), not only adults or the elderly, in children it has been determined that it is capable of reducing the symptomatology of the autism spectrum (Dreher ML, 2018). The color of fruits is the physical property that indicates the presence of certain phytochemical components that have beneficial properties for health (Chang SK et al., 2019; Mohammed SG et al., 2020). Beverage consumption was also evaluated as a multicenter study, determining the intake of water (Paz-Graniel I et al., 2019) and coffee, and in the case of the latter, whether there is a relationship between coffee consumption (with caffeine) and cognitive task solving (Paz-Graniel I et al., 2020).

In the same way as, other studies resided in identifying whether the consumption of certain foods was associated with other values of interest (fermented products (Mena-Sánchez G et al., 2018) and the dietary intake of folic acid with characteristics of Metabolic Syndrome (Navarrete-Muñoz EM et al., 2020). Both fermented products and folic acid supplementation have been observed to have benefits after consumption or prescription regimen. The study of fermented foods, especially milk and dairy products, is currently being investigated, since the benefits they provide to the intestinal microbiota are multiple, among them, the reduction of the risk of the appearance of certain types of digestive cancer (Barrubés L et al., 2019) and improvements in Metabolic Syndrome parameters (Mena-Sánchez G et al., 2019), such as hypertension (Aoyagi Y et al., 2017; Yoo D et al., 2020), diabetes (Álvarez-Bueno C et al., 2019) and cardiovascular disease (Fontecha J et al., 2019). Folic acid has been shown to be beneficial in older people with cardiovascular treatment (Tian T et al., 2017), as well as cognitive degenerations such as Alzheimer's (Ma F et al., 2019; Chen H et al., 2016) and states such as depression (Bender A et al., 2016).

Regarding the results obtained as a multicenter trial in weight loss, those of the first year of the intervention were published, showing that the intensive lifestyle intervention is effective in producing clinically significant weight loss among overweight/obese adults with characteristics of Metabolic Syndrome. Weight loss was maximum after 6 months and was maintained at 12 months, when improvements in risk factors were most evident, suggesting a strong relationship between the magnitude of weight loss achieved and changes in cardiovascular risk. In most long-term weight loss studies, maximal weight loss was typically achieved within 6 months of intervention, and weight regain usually occurs thereafter (Knowler WC et al., 2009; Wing RR et al., 2013; Franz MJ et al., 2007; Johnston BC et al., 2014). However, in our study, the advantage over other studies is that the rebound effect of weight recovery does not occur and the tendency is to maintain it in later years as we have shown at 2 years for participants in the site of Valencia.

There was evidence of an increase in adherence to the energy-restricted Mediterranean diet score after 12 months in both groups, with a net increase in favor of the intervention group. These data demonstrate the effect of the intervention by increasing the consumption of typical foods of the Mediterranean diet and decreasing the consumption of those typical of an unhealthy dietary pattern (red and processed meats, soft drinks and refined sugars). Regarding physical activity, compared to control, a significant decrease in time spent watching television and a greater increase in leisure-time physical activity was observed in the intervention group, and these changes were more evident at 12 months. The results indicated that the proportion of participants who met the 2010 World Health Organization recommendations of at least 150 min of moderate-vigorous physical activity/week was highest at 12 months and higher in the intervention group than in the control group. But, although we observed a sustained weight loss effect over time, only a median decrease in body weight of 3.7% was achieved in the intervention group compared to the 8% decrease that was proposed as a target in the study design. In addition, only a 3% difference between groups was observed in weight loss compared to the target of 5%. The modest effect of the PREDIMED-Plus intervention on body weight and waist circumference relative to our a priori goals can be explained in part because our population was aged, had a low level of education (~50% only has primary level), and 45% of participants had diabetes at baseline. All of these factors have been recognized as predictors of adherence and suboptimal efficacy of intervention in weight loss trials (Leung AWY et al., 2014). However, one of the strengths to consider is that there were very few dropouts compared to previous weight loss trials, a fact observed in participants recruited at the Valencia site (<1% dropouts). The high retention in the trial provides strong evidence of the long-term palatability and sustainability of an energy-restricted Mediterranean diet. In PREDIMED-Plus, the intervention group achieved weight loss especially at the expense of total body fat. Participants in the intervention group showed improvements in the ratio of lean body mass/total body fat, which is generally considered a more favorable body composition, suggesting that lifestyle interventions for weight loss should include the use of lean body mass conservation strategies (e.g., physical activity) to prevent or delay sarcopenia by encouraging the production and maintenance of muscle mass. In addition, recent studies also identify that the benefits are possible from the maintenance of that weight loss. Moderate weight loss in our participants had the same beneficial effects on these parameters except for blood pressure. These findings suggest that an intensive weight loss lifestyle intervention based on a Mediterranean diet with energy restriction and increased physical activity is a safe strategy to treat metabolic syndrome and improve some associated cardiovascular risk factors, as well as cardiovascular prevention. These results also demonstrated beneficial effects of intensive intervention on some circulating proinflammatory parameters

related to obesity, such as leptin and IL-18 and MCP-1. By obtaining this series of results in the achievement of the PREDIMED-Plus study during the first year, it is hypothesized that the maintenance of long-term weight loss in response to the PREDIMED-Plus lifestyle program could provide the same or even greater benefit in terms of hard cardiovascular events.

But the results of the first annuity were published some time before the exceptional situation of confinement caused by the SARS-CoV-2 virus pandemic, or as it is known, COVID-19, which endangered the hypothesis of achieving these weight loss goals and the success in maintaining them (Paz-Graniel I et al., 2023). For this reason, it was decided to take information from the participants on different variables related in one way or another with the new patterns marked by the pandemic situation, in this way the effect of confinement and social restrictions could be identified in relation to the provision of interventions in the PREDIMED-Plus study and the follow-up of the participants, as well as their attendance, since many of the sites visited patients in their respective health centers. To mitigate these effects, strategies were designed that were evaluated in their effectiveness, and thanks to this, despite the strict confinement orders imposed in our country, the intervention was not interrupted at any time during the pandemic (Paz-Graniel I et al., 2023). These conditions have affected the fieldwork of PREDIMED-Plus, so the methods of administration of the intervention had to be modified, but the prompt response of the study investigators allowed the trial to continue. Using technology for remote delivery of individual nutrition counseling and physical activity recommendations allowed study staff to reach a large proportion of participants. The use of electronic media has previously been reported as an adequate alternative for nutritional and physical activity promotion and data collection (Singh JA et al., 2020; Orkin AM et al., 2021; FDA, 2020), in Spanish adults (Mignogna C et al., 2020), and the preferred strategy for older participants (Fitzgibbon M et al., 2021).

Regarding weight loss goals, interestingly, dietary changes during the pandemic were beneficial in participants in the PREDIMED-Plus study, as an increase in adherence to the planned intervention with the energy-restricted Mediterranean diet was observed. Although an increase in the consumption of certain "unhealthy" food groups (Ammar A et al., 2020) or alcohol (Vanderbruggen N et al., 2020) has also been reported, and an increase in the prevalence of eating behaviors such as snacking or excessive consumption of ultra-processed foods (Mignogna C et al., 2020, Papandreou C et al., 2020; Bonaccio M et al., 2022). Physical activity was another of the most studied indicators in the time of confinement, since during the first quarter of severe confinement outdoor sports were prohibited and patients could not go out to perform their physical activity pattern. During the transition phase, there was an increase in the number of people,

more than usual, on the streets doing physical activity. In addition, half of the PREDIMED-Plus participants were receiving a physical activity promotion program and tips to increase exercise in their homes, which is why when they were able to go outside, they were motivated and increased this physical activity (Paz-Graniel I et al., 2023).

Within the PREDIMED-Plus study, a subproject, PREDIMED-Plus Cognition, was developed, which in turn was part of the set of trials that are part of the E2bN study. The doctoral student chose this subproject to carry out her international stay in the laboratory of Dr. Alejandro Arias in Holland. Dr. Arias is the coordinator of the E2bN project in Europe. In addition to the stay that was carried out in two consecutive years, subsequently we have continued to collaborate on various articles as indicated. The objectives of E2bN lie in associating aspects of cognition, behavior and behavior with the way we eat and consume food. Results that are described in the work presented by Soldevila-Domenech N et al., where the cognitive profiles that were associated with the objective of achieving a weight loss of at least 8% were evaluated and study the impact of weight reduction on the cognition of the participants. Among the results, only one-third of participants in the intervention group achieved the goal of weight reduction after 1 and 3 years of follow-up. The highest odds of reaching the 8% weight reduction goal were among people with better performance in verbal memory, reaction time and decision-making skills at baseline. To maintain the effects of the intervention, were the people who showed greater praxis and visuoconstructive attention and less impulsivity. Several cognitive skills were also observed to improve after 1 and 3 years of follow-up in the general population, including short- and long-term verbal and visuospatial memory, selective and sustained attention, inhibition, and visuoconstructive praxis. Cognitive improvements showed interindividual differences and adherence to the Mediterranean diet, gender, age and diagnosis of diabetes. We also found evidence of correlated changes between cognition and some intervention outcomes; specifically, associations of greater improvements in cognition with greater reductions in BMI and greater improvements in blood pressure and quality of life questionnaire scores (SF36). These results coincide with trials showing how moderate weight reductions improve in addition to multiple metabolic factors, such as blood pressure, glucose tolerance, insulin sensitivity, lipid profile, oxidative stress and inflammation, also have a positive impact on mental health and quality of life (Ryan DH et al., 2017; Veronese N et al., 2017). In dietary intervention treatments it is plausible to detect that the ability to adhere to a healthy lifestyle and achieve weight loss maintenance is influenced by psychological and cognitive factors (Varkevisser RDM et al., 2019). Patients who show self-regulation, ability to direct attention and behavior autonomously, are those who usually achieve the

maintenance of long-term goals (Fagundo AB et al., 2012; Valls-Pedret C et al. 2015; Cheke LG et al., 2017; Sellbom KS et al., 2012). As such, cognitive performance could influence the skills needed to maintain a healthy lifestyle, but more research is needed to identify key cognitive predictors of weight loss maintenance. Studies such as PREDIMED-Plus are beneficial in their realization in this regard for the participants of the intervention group, since there is evidence that indicates adherence to specific healthy dietary patterns such as the Mediterranean diet (Veronese N et al., 2017; Okubo H et al., 2017; Siervo M et al., 2011) and physical activity (Daimiel L et al., 2020; Xu L et al., 2011), have been associated with slower rates of cognitive decline, reduced risk of dementia, and improvements in some cognitive functions. In addition, weight loss has been associated with improvements in executive functioning/attention and memory (Siervo M et al., 2011). Moreover, adherence to the intervention with Mediterranean diet showed results of neuroprotective effects superior to those obtained with Metformin treatment in diabetic people with metabolic syndrome and overweight or obesity (Soldevila-Domenech N et al., 2021).

In addition to cognitive skills, the PREDIMED-Plus Cognition subproject also evaluated personality traits and behavior patterns (Gómez-Martínez C et al., 2022), longitudinal analysis of the results of the different years in the participants identified that impulsivity was negatively associated with several healthy diet scores and was positively related to adherence to an unhealthy dietary pattern (Uribarri J et al., 2010; Lumley J et al., 2016; Gómez-Martínez C et al., 2022). And although there are not many studies that have investigated whether there is a relationship between dietary patterns and impulsivity, the results of those that have been published are similar to those obtained in our study population (Benard M et al., 2019). This is explained by recalling the traits that define impulsivity, which is characterized by a tendency to act rashly under positive or negative emotions, lack of perseverance and premeditation, and the pursuit of experiences and feelings (Moeller FG et al., 2001; Lynam DR et al., 2006). Therefore, the impulsivity trait may be a risk factor for health diseases through decision-making related to food consumption (Gómez-Martínez C et al., 2022) of participants.

In the Cognition subproject, sharing objectives with the E2bN study, the analysis of fecal samples began as part of the study of the intestinal microbiota and the possible interactions between the way in which we behave, diet and lifestyle and the microorganisms that make it up. Early research has shown evidence of a considerable impact of eating, and consequently, nutrition on behaviors such as impulsivity and compulsivity. Therefore, we work on understanding how dietary components (including sugar, fat and protein content, vitamin and mineral supplements, food additives and probiotics) and lifestyle factors (including exercise) influence people's overall health, brain function and behaviour. In this

way, by identifying the impulses associated with the way we eat and the variations in lifestyle that could prevent the harmful effects linked to traits such as impulsivity and compulsivity, as well as the type of microorganisms that inhabit our intestine and promote metabolic effects, we could understand the relationship of the gut-brain axis (Wang HX et al., 2016). In the participants of the PREDIMED-Plus Cognition study, fecal samples were collected and analyzed from the participants of the different sites that agreed to participate and signed, therefore, the respective informed consent (Muralidharan J et al., 2021).

These results were recently published by Muralidharan J et al., in which they reported on the effect of a large long-term lifestyle-based weight loss intervention with a Mediterranean diet with dietary restriction and increased physical activity on the gut microbiota. Several changes in the relative abundance of genera within and among participants in the intervention group were observed that can be attributed to weight loss, diet, and physical activity. Observed changes in gut microbiota profile were also associated with changes in some cardiovascular disease risk factors. Significant changes in the relative abundance of members belonging to the phylum Firmicutes (decreasing: *Butyricoccus*, *Ruminiclostridium* 5 and *E. hallii*; increasing: *Ruminococcaceae* NK4A214, *Copro bacter*) and the significant increase in B/F in the intervention group compared to the control group, may be partly explained by the greater weight loss in the intervention group compared to the control group. Although widely debated, it has been reported that, during weight loss, B/F increases, suggesting that it may respond to energy restriction (Crovesy L et al., 2020; Remely M et al., 2015; Fragiadakis GK et al., 2020). An increase in B/F has also been reported with increased adherence to the Mediterranean diet, as well as low animal protein intake (Garcia-Mantrana et al., 2018). We also observed that some genera producing short-chain fatty acids (*Lachnospira*, *Lachnospiraceae* group NK4A136 and *Alistipes*) changed in the same direction within both intervention groups, reflecting in general the effect of the Mediterranean diet on the intestinal microbiota. Increases in proteins, polyphenols, and unsaturated fats have shown inhibitory activities of certain bacterial genera (Zhao J et al., 2019; Duda-Chodak A et al., 2012; Wolters M et al., 2019). In parallel, in the intervention group, participants consumed more protein, polyphenols and unsaturated fats compared to those in the control group, possibly leading to selective fortification in certain producers of short-chain fatty acids compared to others that could be inhibited by a synergy of the aforementioned components. Changes in *Copro coccus* 3 were positively associated with changes in weight, total cholesterol and triglycerides and negatively with HDL cholesterol in the general population. According to our results, enrichment of the genus *Copro coccus* has been associated with a high lifetime risk profile of cardiovascular disease in participants of the Bogalusa Heart study, as well as with the obese phenotype (Castaner O et al., 2018). Not only *Copro coccus*, but also other genera

belonging mainly to the family Lachnospiraceae (*Blautia*, *Dorea*, *Roseburia*, *Coprococcus* 3) and *Ruminococcus* 1 were observed changing in opposite directions in the intervention group and the control group. We observed a positive association for changes in the relative abundance of *Coprococcus* 3 and *Dorea* with significant changes in weight in the general population and not significantly in both intervention groups, according to a Swedish study (Ottosson F et al., 2018). This study also reported a positive association of these genera with plasma BCAAs, which are generally increased in diabetes and metabolic syndrome (Floegel A et al., 2013; Würtz P et al., 2012) and serves as an indicator of cardiovascular risk (Vanweert F et al., 2022). Given these findings, we suspect that BCAAs are one of the pathways for the regulation of glucose in the large intestine through weight loss associated with Mediterranean diet and corresponding changes in gut microbiota (Newgard CB et al., 2009; Karusheva Y et al., 2019). These results could also indicate that, even following the same dietary pattern, factors such as energy restriction and physical activity could play an additional beneficial role in overweight/obese people by altering glucose regulation through BCAAs (Pedersen HK et al., 2016). In the intervention group, they also observed changes in some bacteria previously associated with bile acids, such as *Lachnoclostridium* (containing members with 7 α dehydroxylation capacity) and *Bilophila* (taurine-bile acid deconjugator), which have been shown to control lipid and glucose metabolism in studies in mice (Li F et al., 2013; Parseus A et al., 2017). Similarly, a positive (not significant) association between *Lachnoclostridium* and glucose was identified (Cerdeira B et al., 2016). Adherence to the Mediterranean diet has also shown its interaction with the microbiome after analyzing the association between genetic variants related to relevant microbiomes (Mi-RSNP) and fasting glucose values and presence of diabetes (Asensio EM et al., 2022). Metagenomic functions differ between adults with different body weight and health status. Bacteria adapt their functions to energy restriction by increasing biosynthesis pathways, especially carbohydrate and nucleotide biosynthesis. In the participants analyzed, as the intake of proteins and fats increased in the intervention group, a decrease in amino acid and lipid biosynthesis was detected, indicating an adaptation to the diet. These results are of special interest as it has been reported that calorie restriction could alter the gut microbiota and its functionality independently of a dietary regimen (Fabbiano S et al., 2018; Wu J et al., 2016).

The significant differences observed between the groups of participants in all components of the intervention (weight loss, adherence to Mediterranean diet and physical activity) in the expected direction, allowed to test the potential effects of the intervention on the intestinal microbiota for a Mediterranean population with Metabolic Syndrome and overweight/obesity.

The exponential growth of metagenomics and studies of analysis of genetic information of bacteria that are part of our digestive system has allowed us to

expand knowledge in terms of intestinal microbiota and its relationship with different pathologies. And in all of them, recent studies have suggested an important role of the gut-brain axis (GBA) and the gut microbiota in modulating their risk (Cryan JF et al., 2019; Mörk S et al., 2020).

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a common neurodevelopmental disorder characterized by inattention, impulsivity, and hyperactivity. It is one of the alterations or cognitive disorders studied within the E2bN study, allowing to elucidate the possible beneficial effects, as well as control in the episodes of worse symptomatology. The etiology of ADHD is multifactorial, with a primary focus on genetic factors, although emerging research shows the involvement of changes and imbalances in the gut microbiota (Bundgaard-Nielsen C et al., 2020; Kalenik A et al., 2021), as well as others identify the type of diet or eating pattern in this possible interaction and effect on symptom types (Konikowska K et al., 2012; Pelsser LM et al., 2017; Cenit MC et al., 2017).

During the stays carried out at the Radboud UMC research center, together with the research group of Dr. Arias Vásquez, PI of the E2bN study, we learned and studied both ADHD and other disorders of similar genetic spectrum and how to carry out their research, since in the PREDIMED-Plus study, as part of E2bN, different questionnaires are attended that answer cognitive aspects and behavioral and personality traits of the participants and their possible interaction with the Type of feeding they make or dietary pattern follow in greater shape. We were able to observe that, despite the differences in central behavioral symptoms between some of these disorders, many of them overlap with others, indicating that there could be a shared etiology. For example, in the case of autism spectrum (ASD) and ADHD, there are indications of this overlap. In fact, research indicates that these disorders are highly comorbid (Thapar A et al., 2016; Frazier JA et al., 2001; Holtmann M et al., 2007; Hattori J et al., 2016; Simonoff E et al., 2016; Pelsser LM et al., 2010). Genetic studies have provided information by showing a common genetic etiology in both disorders (Rommelse NNJ et al., 2010; Lichtenstein P et al., 2010). Although the etiology of ASD and ADHD remains largely unknown, a complex interplay of genetic and environmental factors is thought to contribute to the development of both (Thapar A et al., 2016; Mandy W et al., 2016; Sandin S et al., 2014). And within this set of environmental factors we find as one of the most relevant, diet (Bale TL et al., 2010). Nutrition has an impact on neurodevelopment, cognition and behaviour and could therefore play an important role in neurodevelopmental disorders (Hôtel-Dieu, 2004; Dauncey MJ et al., 2009; Goyal MS et al., 2015).

Altered microbiome composition or dysbiosis has been associated with inflammatory bowel diseases, cancer, obesity, metabolic syndrome, and

neurological disorders (Dicksveld J et al., 2008; Frank DN et al., 2007; Lupton JR, 2004; Louis P et al., 2014; Ley RE et al., 2006; Turnbaugh PJ et al., 2016; Zhang C et al., 2009; Gonzalez A et al., 2011). Current evidence from animal studies convincingly shows that microbiome composition has an impact (co-)determining mood, stress response, and various aspects of behavior (Mayer EA, 2011; Neufeld KM et al., 2011; Neufeld KM et al., 2011; Bercik P et al., 2016). Therefore, diet is an important determinant of the composition and functioning of the gut microbiota that is strongly related to psychopathological responses (Sharma S et al., 2013; Li W et al., 2009; Bruce-Keller AJ et al., 2015), suggesting that there is a link between diet, gut microbiome composition, and mental disorders. The effects of the microbiome on brain function, behavior, and diseases may be mediated by different pathways of the so-called microbiome-gut-brain axis, which involves neural, metabolic, immunological, and endocrine mechanisms (Mayer EA, 2011; Borre YE et al., 2014; Diaz-Heijtz RD et al., 2011; Rogers GB et al., 2016). In addition, the fact that complete colonization occurs in early childhood has allowed parallels to be drawn between microbiome and central nervous system development, suggesting that some neurodevelopmental problems may be related to microbiome colonization (Borre YE et al., 2014; Rogers GB et al., 2016). Both in people with ASD and ADHD, increases in bacterial genera other than healthy people, without pathology, have been described, but more studies are still required to identify all colonies and genera of bacteria that can modulate the pathophysiology of the disease or cognitive disorder (Adams JB et al., 2011; Finegold SM et al., 2002; Song Y et al., 2004; Kang DW et al., 2013; Williams BL et al., 2011; Song Y et al., 2004; Finegold SM et al., 2010; Parracho HMRT et al., 2005; Verlaet AAJ et al., 2014; Borre YE et al., 2014).

In ADHD, impulsivity stands out as one of its characteristic behavioral traits. Among the results indicated in this doctoral thesis work, it has been commented above, that the most impulsive subjects are those who show worse adherence to healthy eating patterns such as following the Mediterranean diet, and more easily adhere to unhealthy patterns, such as the consumption of sweeter, fattier foods, with high glycemic indexes and enhanced flavors. Therefore, during the stay we were able to investigate in our sample of patients PREDIMED-Plus Valencia, if there was interaction of SNPs of genes identified in ADHD and some of the characteristics of our participants, as well as with study variables unique to our group, such as data on perception of flavors and food preference. To do this, we made use of the data recently published by Demontis D et al., from the ADHD GWAS meta-analysis that allows the use of referenced genes as candidate genes in the study of this cognitive disorder (Demontis D et al., 2019). Several of the loci identified are located in or near genes involving neurodevelopmental processes that are likely to be relevant to ADHD, such as *FOXP2*, *SORCS3* and *DUSP6*. But this work also detected strong associations at each locus, especially the leader locus on

chromosome 1, which is complicated by the broad LD and substantial heterogeneity between the main ADHD meta-analysis and self-reported ADHD status analysis. Identifying 12 loci relevant to ADHD. In our sample of patients analyzed PREDIMED-Plus Valencia, patients with overweight or obesity and Metabolic Syndrome, and the vast majority of them have hyperglycemia or have been diagnosed with diabetes, whose genotyping was performed at the beginning of our study with the GWAS chip of Genotyping Illumina Array Human OmniExpress, it was observed if these 12 loci of the ADHD GWAS were significant before some possible variables of our Mediterranean population with cardiovascular risk. And although only 1 SNP and 5 proxies with LD-supported support were found in our population, it was observed that carriers of the lowest frequency allele with the FOXP2 gene were associated with a lower prevalence of diabetes ($p=0.024$). For BMI and ADHD, two SNPs were identified, one intergenic ($p=0.057$) and another in the DUSP6 gene ($p=0.077$), located on chromosome 12, which were significantly associated with increases in BMI. Carriers of the less frequent allele are associated with higher BMI values. In the analysis of association between ADHD SNP and the perception of sweet taste, we identified that a SNP in the SORCS3 gene is associated with the lowest perception of this taste. Carriers of the lower frequency allele show reduced perception (or lower perception assessment scores) than carriers of the frequent allele ($\beta=-0.26$; $p=0.016$). These results become relevant when we look at different studies conducted on behavioral disorders, both ADHD and schizophrenia (Mitchell AJ et al., 2011; McWhinney SR et al., 2022), autism (Bădescu GM et al., 2016; Hill AP et al., 2015), bipolar disorder (Miola A et al., 2022; Beyer JL et al., 2015; Liu YK et al., 2022), depression (Milaneschi Y et al., 2018; Luppino FS et al., 2010; Jantaratnotai N et al., 2016), etc. All of them with polygenic construction that explains the multiple factors that influence the construction of the architecture of the disease and the variability of the symptomatology, between patients and throughout the life of the same patient (Martin J et al., 2014; Schweren LJS et al., 2021).

Although research on Metabolic Syndrome has grown exponentially in recent decades, many aspects of this clinical entity are still not fully understood, and many questions remain unanswered to date, so research should continue to be encouraged in this type of patients at cardiovascular risk (Yanai H et al., 2021; Hill MA et al., 2021; Fahed G et al., 2022). In addition, the fact of being a Mediterranean population in which not much omic research has been carried out compared to other countries in Europe or North America, increases the need to continue working on the design and achievement of analysis studies with omics methods that allow to adequately characterize this population to provide in a valid way more personalized recommendations adapted to its characteristics. In addition, the work done in this Doctoral Thesis has an important continuation in future

research both with greater incorporation of omics and with the generation of new monitoring results and final phenotypes assuming a great opportunity in precision health and in the incorporation of the gender perspective

All the results presented in this doctoral thesis are part of the body of evidence that have been demonstrated and corroborate that the Metabolic Syndrome forms a group of metabolic dysregulations that include insulin resistance, atherogenic dyslipidemia, central obesity and hypertension, therefore, the pathogenesis of Metabolic Syndrome comprises multiple genetic and acquired entities that fall under the cascade of interactions that occurs in situations of insulin resistance and in the Chronic low-grade inflammation. If not treated correctly and in a timely manner, Metabolic Syndrome is significantly associated with the risk of developing T2DM and CVD (Bovolini A et al., 2021; Yanai H et al., 2021; Hill MA et al., 2021; Silveira Rossi JL et al., 2022; Fahed G et al., 2022). Given that cardiovascular diseases are the main cause of global morbidity and mortality, it has become essential to investigate the role played by this state of pathological alteration to reduce the burden of disease in all aspects (in the quality of life of the patient himself and in the health cost of his pharmacological treatment and medical care). Therefore, the scope of research on Metabolic Syndrome has grown exponentially in recent decades. However, many aspects of this clinical entity are not yet fully understood, and many questions remain unanswered to date, so research should continue to be encouraged in this type of patients at cardiovascular risk (Yanai H et al., 2021; Hill MA et al., 2021; Fahed G et al., 2022).

Conclusions:

1. The feasibility of conducting a randomized trial consisting of an intensive intervention with a Mediterranean diet reduced in energy and promotion of physical activity with behavioral support in elderly people with metabolic syndrome and overweight/obesity in comparison to a control group without intensive intervention with hypocaloric Mediterranean diet or promotion of physical activity in the Valencia site was very good. The exhaustive recruitment effort resulted in a large participation, placing second among the 23 sites of the multicenter trial in terms of randomized patients. Similarly, participation in the study's annual follow-up visits has been very good, and the intervention strategies, as well as the completion of questionnaires, the collection of biological samples, and other measures carried out in the longitudinal study, have worked for each of the groups in accordance with the protocol. The analysis of changes in adherence to the energy-restricted Mediterranean diet using the protocolized instrument (the 17-point scale) revealed that the intensive intervention group scored higher than the control group, with statistically significant differences in the period of follow up.

Similarly, the measurement of physical activity with the validated questionnaire revealed that the intensive intervention group performed better in total physical activity than the control group, with significant differences at each follow-up time analyzed, contributing to the increased feasibility of the randomized clinical trial in our site.

2. The intensive intervention with an energy-restricted Mediterranean diet and increased promotion of physical activity in the intervention group, compared to the control group in the Valencia site, has resulted in statistically significant differences in total energy intake measured through the food frequency questionnaires. This decrease in the energy contribution from the diet in the intensive intervention group was quickly confirmed at the 6-month visit, and was generally maintained, with some small reduction in subsequent years. Decreases in caloric intake, together with the increase in physical activity, have also been associated with a decrease in body weight at follow-up. The most rapid weight loss between the intensive intervention group and the control group occurred at the 6-month visit, maintaining the statistically significant differences in weight between the two groups throughout the annual follow-up studied. Likewise, decreases in waist circumference and body mass index have been detected. Although the weight loss in the participants in our site has been inferior than the theoretically expected (observation that took place in a similar way in other sites), these changes in anthropometric parameters have been favorably associated with decreases in cardiovascular risk factors in the multicenter pilot study one year after the intervention, highlighting the decreases in blood glucose, plasma lipid concentrations (significant decreases in triglycerides and increases in HDL-C), and significant improvements ($p<0.05$) in other metabolic markers of risk factors such as leptin, interleukin-18, and monocyte chemotactic protein-1 concentrations ($p<0.05$).
3. The analysis of other less studied factors in nutritional clinical trials has allowed us to characterize the taste perception profile in the participants in the Valencia site and to demonstrate that there are important associations between the intensity of perception of the different taste qualities (sweet, salty, bitter, acid and umami) and adiposity parameters at baseline, differing between them. Moreover, the so-called "total taste score" as an indicator of the global taste perception capacity has allowed us to know that it has a strong inverse association with adiposity ($p<0.001$). The analysis focused on taste and food preferences was more associated with diet profiles and the prevalence of diabetes. Additionally, selected metabolites such as serum branched-chain amino acid concentrations and GlycA concentrations at baseline were significantly associated with classical cardiovascular risk parameters and are

powerful indicators for further longitudinal analysis. The chronotype and sleep parameters were also relevant variables that were associated with several intermediate phenotypes of relevance to the clinical trial. Likewise, cognitive variables and personality traits such as impulsivity have presented significant associations along with other nodes, highlighting that greater impulsivity was associated with a less healthy eating pattern and less decrease in cardiometabolic risk parameters.

4. The GWASs conducted to investigate the influence of genomic markers on the perception of the 5 tastes in the participants of the Valencia site, have confirmed the strong genetic influence on the ability to perceive bitter taste, detecting as statistically significant at the GWAS level ($p < 5 \times 10^{-8}$) various polymorphisms in the TAS2R38 gene. For the other taste qualities, the genetic influence is less strong, with no SNP exceeding the GWAS threshold of statistical significance. However, several SNPs have reached suggestive levels of statistical significance ($p < 1 \times 10^{-5}$), which need replication in further studies. Among them we want to highlight for its novelty a SNP (rs6592657) in the LRRC32 gene associated with the total taste perception score. In the GWAS to detect genetic variants associated with preferences for different tastes, we have obtained the most relevant results with the sweet taste. For this taste preference, we have identified several SNPs in the PTPNR2 gene (rs2091718, among them), exceeding statistical significance at the GWAS level. This is the first time that this gene has been described related to sweet taste preference and our post-GWAS analyzes of possible functionality (high expression in the brain, consistency between different analysis approaches) indicate that it is a good candidate to continue being analyzed and assess its influence on the phenotypes of the study in the long term. Other GWAS performed with intermediate phenotypes in this population have identified significant associations such as the SNPs associated with bilirubin. However, in the pilot study to explore genes associated with weight loss, more statistical power is required at the GWAS level.
5. We have detected an important influence of exposomic factors on the DNA methylation of the participants of the Valencia sites, so it is interesting to deepen the analysis of epigenomic markers in future studies. Specifically, we have found a very strong association between smoking status and DNA methylation, characterizing the methylomic signature of tobacco exposure (smokers, ex-smokers, and never smokers) in this population using EWAS and identified 46 differentially methylated CpGs at the EWAS statistical significance. The strongest association was observed with the cg21566642 locus ($p = 2.2 \times 10^{-32}$) on chromosome 2. Furthermore, we have described for the first time that a greater adherence to the Mediterranean diet can counteract the

hypomethylation of the main CpG loci associated with the tobacco use. Likewise, but with less statistical significance, we have found differentially methylated CpG sites according to the rural/urban place of birth and according to profiles of variables related to diabetes. In the analysis of methylation changes after one year in a subsample of the intensive intervention group, we have detected important differences in the percentage of methylation at specific CpGs that need confirmation with a larger sample size.

6. Regarding gene expression, we have observed that the intensive intervention with a Mediterranean diet reduced in energy and increased physical activity resulted in significant changes ($p < 0.05$) in the expression of specific selected genes (PER1, CLOCK, CAT, DDIT4 and ARRDC3). In addition, in a pilot analysis of the genome-wide transcriptome, we were observed that the intensive intervention with a Mediterranean diet and physical activity after one year with associated with statistically significant changes in several genes related to adiposity, diabetes and metabolism. Among them the most significant were: EGR2, VIM, EGR3 and PPM1B.
7. The COVID-19 pandemic that took place during the follow-up visits of this clinical trial had an impact at the beginning of the confinement since the interventions and follow-up visits could not be carried out in our site as planned. However, at a general level in the PREDIMED-Plus study, contingency measures were proposed to carry out online interventions and other successful alternatives that have been able to mitigate the impact of the pandemic. All of this has been presented in detail in a recently published article in the multicenter trial. After overcoming the pandemic, it has been possible to continue the clinical trial without incident and to continue collecting events, which, in addition to the primary and secondary outcomes initially planned in the protocol, have included the declaration of COVID-19 events.
8. The analyzes conducted to achieve each of the specific objectives have revealed the importance of integrating the knowledge derived from each of them, as well as the great interest in continuing analyzing omics data (genomics, epigenomics, metabolomics, transcriptomics, and metagenomics factors), not only at baseline but also during follow-up using more complex computational strategies, both for intermediate cardiovascular risk phenotypes and for final outcomes (when the clinical trial ends and they can be analyzed). With the assistance of a recently funded project, completing these analyses with a larger sample size and incorporating the gender perspective will allow us to generate new results for improved cardiometabolic prevention in future precision heal

TERMINOLOGÍA

Las abreviaturas utilizadas en esta Tesis doctoral son las siguientes:

A:	Adenina
AACE:	American Association of Clinical Endocrinologists
ACC:	Colegio Americano de Cardiología
ACV:	Accidentes cerebrovasculares
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AG:	Ácido graso
AGCC o SCFA:	Ácido graso de cadena corta o short-chain fatty acids
AGM o MUFA:	Ácido graso monoinsaturado o monounsaturated fatty acid
AGPI:	Ácido graso poliinsaturado o polyunsaturated fatty acid
AGS:	Ácido graso saturado
AHA:	Asociación Americana del Corazón
ALA:	Ácido alfa-linolénico
ARIC:	Atherosclerosis Risk in Communities
ARN:	Ácido ribonucleico
ATP-III:	Adult Treatment Panel III
C:	Citosina
CC:	Circunferencia cintura
CH:	Carbohidratos
c-HDL:	Lipoproteína de alta densidad unida a colesterol
CIE-10:	Clasificación Internacional de Enfermedades-ed.10
c-LDL:	Lipoproteína de baja densidad unida a colesterol
CPE:	Células progenitoras endoteliales

CpG:	Pares de Citosina-Guanina
CV:	Cardiovascular
DE:	Desviación estándar
DietMed:	Dieta Mediterránea
DM2:	Diabetes Mellitus 2
DMA:	Dimethylamine
DNMT:	Metiltransferasas de ADN
ECV:	Enfermedad cardiovascular
EGIR:	European Group for the Study of Insulin Resistance
EWAS:	Epigenome Wide Analysis – Estudios asociación de epigenoma completo
FA:	Fibrilación auricular
FC:	Frecuencia cardíaca
FDI:	Federación Internacional de Diabetes
FFA:	Free fatty acid
FXR:	Farnesoid X receptor
G:	Guanina
GCS:	G-glutamylcysteine synthetase
GGT:	G-glutamyltransferase
GPBAR1:	G protein–coupled bile acid receptor 1
GPR43:	G protein–coupled receptor 43
GRS:	Genetic Risk score – puntuaciones de riesgo genético
GS:	Glutathione synthase
GS-SG:	Oxidized glutathione
GWAS:	Genome Wide Analysis – Estudios de asociación de genoma completo
GxE:	Gen x Entorno
HbA1c:	Hemoglobina glicada
HETE:	hydroxyeicosatetraenoic acid
HTA:	Hipertensión arterial
IAM:	Infartos agudos de miocardio
IC:	Intervalo de confianza

IDL:	Lipoproteína de densidad intermedia
IL:	Interleucina
IMC:	Índice masa corporal
INE:	Instituto Nacional de Estadística
LH:	Lipasa hepática
LPS:	Lipopolysaccharide
MHO:	Metabolically Healthy Obese
miARN:	micro-Ácido ribonucleico
NAFLD:	Hígado graso no-alcohólico
NCEP:	National Cholesterol Education Program
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OR:	Odds Ratio
PA:	Presión arterial
PAD:	Presión arterial diastólica
PAS:	Presión arterial sistólica
pb:	Par de bases
PCR:	Proteína C reactiva
PCR:	Reacción cadena de polimerasa
PPAR:	Gen de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas
PRS:	Polygenic Risk score – puntuaciones de riesgo poligénico
PTGO:	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
QM:	Quilomicrón
R^2 (r^2):	Coefficiente de determinación (modelos de regresión lineal)
RAS:	Sistema renina angiotensina
RI:	Resistencia a la insulina
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
SAT:	Tejido adiposo subcutáneo
SM:	Síndrome Metabólico
SMP:	Síndrome Metabólico Premórbido

SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Polimorfismo Nucleótido Simple
T:	Tiamina
TAARs:	Trace amine-associated receptors
TCA:	Tricarboxylic acid cycle
TG:	Triglicérido
TIC:	Test de Inferencia Causal
TLRs:	Toll-like receptors
U:	Uracilo
VAT:	tejido adiposo visceral
VLDL:	Lipoproteína de muy baja densidad
WHO:	World Health Organization.

1

INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de las enfermedades crónicas y síndrome metabólico

El Síndrome metabólico junto a la obesidad, son sin duda, las grandes pandemias del siglo XXI. La prevalencia global según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es superior al 30%, encontrando variaciones en este porcentaje según la definición utilizada, el sexo, la edad, el nivel socioeconómico y el origen étnico de las cohortes de estudio. Los estudios clínicos y epidemiológicos han indicado que el Síndrome metabólico comienza con la obesidad central. Debido a que la prevalencia de la obesidad se ha duplicado en todo el mundo durante los últimos 30 años, la prevalencia del Síndrome metabólico ha aumentado en paralelo (Wang HH et al., 2020). Esta tendencia de aumento, se observa particularmente en los países desarrollados y en las poblaciones más jóvenes (Saklayen MG, 2018). Existen publicaciones recientes en nuestro país que indican que la prevalencia de síndrome metabólico en la población general oscila entre 22,6-42,1% únicamente dependiendo de los criterios o factores que se utilicen en el diagnóstico. Un ejemplo de ello lo vemos en las diferencias de cifras en el trabajo de Rodríguez-Bernardino A, que constató que el porcentaje de pacientes con Síndrome metabólico variaba en función de los criterios de diagnóstico que, utilizados, siendo de 38,9% (OMS/WHO), 33,6% (NCEP-ATP III) y 30,1% (FDI) (Rodríguez Bernardino A et al., 2010). Tras el consenso de los distintos consorcios, asociaciones y grupos de profesionales, la Federación Internacional de Diabetes (FDI) estima que en torno a un 25% de la población mundial tiene Síndrome metabólico (O'Neill et al., 2015) aunque de nuevo, esta estimación varía ampliamente por factores de edad, origen étnico y género de la población estudiada (Kaur Y, et al., 2017). Por lo que en estudios de prevalencia de Síndrome metabólico es necesario indicar la diferencia según geografía y raza siempre (Zimmet P et al, 2007; Saklayen MG, 2018).

Por otro lado, distintos estudios han mostrado como cuando un componente de Síndrome metabólico empieza a estar ligeramente elevado a una edad más joven aumenta el riesgo de aparición de Síndrome metabólico (Gündogan K et al., 2009). Por lo tanto, la importancia de poder establecer la prevalencia de los componentes Síndrome metabólico en los distintos grupos de edad, incluyendo niños y adolescentes, puede ser una estrategia clave en la prevención de aparición de la Síndrome metabólico y de la enfermedad cardiovascular en la etapa adulta, ya que Síndrome metabólico aumenta su prevalencia con la edad de forma específica, encontrando diferencias según el sexo: mientras que por debajo de los 50 años es ligeramente superior en los hombres, se revierte a partir de los 50 años, y se observa más en mujeres (Pucci G et al., 2017). La identificación temprana de los componentes de Síndrome metabólico podría conducir a la realización de intervenciones específicas para prevenir el desarrollo del mismo y, por lo tanto, reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular en la edad adulta con una mayor eficiencia y menores costes.

La prevención del desarrollo del primer componente Síndrome metabólico puede tener importantes beneficios para la salud pública, ya que la presencia de un componente es predictiva del desarrollo de Síndrome metabólico (Cheung LP et al., 2008). Hay un amplio rango de prevalencia para cada componente de Síndrome metabólico. Las diferencias en la prevalencia para el perímetro de la cintura pueden explicarse parcialmente mediante el uso de umbrales étnicos específicos en las definiciones armonizadas y de FDI, pero las diferencias en la prevalencia de colesterol HDL, presión arterial y niveles de glucemia en ayunas no pueden explicarse por meros problemas de definición. Por ello, en la actualidad se trabaja en valorar cómo estas observaciones pueden indicar que los adultos jóvenes de diferentes etnias son más propensos a desarrollar diferentes componentes de Síndrome metabólico. Por tanto, tener acceso y llegar a conocer todos los umbrales de los componentes Síndrome metabólico permitirá desarrollar umbrales étnicos específicos para cada componente que define Síndrome metabólico y será posible evaluarlo con mayor precisión. Este hecho es similar a las recomendaciones actuales de usar umbrales étnicos específicos para perímetro de la cintura (Saklayen MG, 2018; Sigit FS et al, 2020). Se estima que el Síndrome metabólico ha alcanzado rango de 12–37% en población asiática y 12–26% en población europea, alcanzando en la globalidad el porcentaje próximo al 30% (Saklayen MG, 2018; Sigit FS et al, 2020).

Si observamos los valores en población infantil, Síndrome metabólico sigue siendo un tema controvertido. Ya que, si el Síndrome metabólico fue difícil de consensuar su definición en adultos, en poblaciones pediátricas es aún más confuso la determinación de los valores de riesgo para los distintos parámetros que componen su definición. El Síndrome metabólico en adultos consiste en un

subconjunto de al menos 3 de 5 factores de riesgo, y la presencia de ellos se correlaciona con la posible predicción de enfermedad cardiovascular y diabetes. En niños y adolescentes, sin embargo, se han propuesto muchas definiciones diferentes de Síndrome metabólico en la última década (Tabla 1.1). En el año 2007, el grupo de consenso de la International Diabetes Federation (FDI) propuso una definición de Síndrome metabólico en la infancia y adolescencia de fácil aplicación en la práctica clínica, intentando superar los conflictos generados por las diferentes definiciones (tabla 1.2.) (Zimmet P et al., 2007; Nematy M et al., 2014; Muntner P et al., 2017).

Además, que la gran mayoría de los casos con Síndrome metabólico en la infancia y adolescencia están vinculados a la obesidad haciendo que se cuestione la necesidad de su definición en estos grupos de edad o si en cambio sería de mayor utilidad profundizar en la obesidad infantil y el estudio y tratamiento de sus causas (Magge SN et al, 2017). El problema de consensar su definición en esta etapa de la vida suscita que se presenten prevalencias más bajas (0,3-9,5%) si se utilizan los criterios de la FDI, mientras que la clasificación de Grundy SM et al., establece prevalencias más elevadas (4,0-26,4%).

Tabla 1.1. Comparación de las definiciones clave publicadas de Síndrome metabólico para poblaciones pediátricas y adultas

	Pediatric Definitions		Adult Definitions		
	Cook et al ¹³	de Ferranti et al ¹⁴	Zimmet et al ⁹ (IDF Definition Ages 10–16)	Alberti et al ¹⁵ (IDF Definition Ages 16+)	Grundy et al ¹⁶ (AHA/NHLBI Consensus Statement)
Defining criterion	≥3 criteria	≥3 criteria	Obesity and at least 2 of remaining 4 criteria	Obesity and at least 2 of remaining 4 criteria	≥3 criteria
Obesity	WC ≥90th percentile (age and sex specific, NHANES III)	WC >75th percentile	WC ≥90th percentile or adult cutoff if lower	WC ≥94 cm for white men and ≥80 cm for white women	WC ≥102 cm (≥40 in) in men and WC ≥88 cm (≥35 in) in women
Glucose intolerance	Fasting glucose ≥110 mg/dL (≥6.1 mmol/L)	Fasting glucose ≥110 mg/dL (≥6.1 mmol/L)	Fasting glucose ≥100 mg/dL (>5.6 mmol/L) or known type 2 diabetes mellitus	Fasting glucose ≥100 mg/dL (>5.6 mmol/L) or known type 2 diabetes mellitus	Fasting glucose ≥100 mg/dL or drug treatment of elevated glucose
Dyslipidemia (triglycerides)	Triglycerides ≥110 mg/dL	Triglycerides ≥100 mg/dL	Triglycerides ≥150 mg/dL	Triglycerides ≥150 mg/dL (1.7 mmol/L) or treatment of elevated triglycerides	Triglycerides ≥150 mg/dL (1.7 mmol/L) or treatment of elevated triglycerides
Dyslipidemia (HDL-C)	HDL-C ≤40 mg/dL (1.03 mmol/L; all ages and sexes, NCEP)	HDL-C ≤50 mg/dL (1.3 mmol/L)	HDL-C <40 mg/dL (1.03 mmol/L)	HDL-C <40 mg/dL (1.03 mmol/L) in men and <50 mg/dL (<1.29 mmol/L) in women or specific treatment of low high-density lipoprotein	HDL-C <40 mg/dL (1.03 mmol/L) in men and <50 mg/dL (1.3 mmol/L) in women or on drug treatment of reduced HDL-C
High BP	BP ≥90th percentile (age, sex, and height specific)	BP >90th percentile	Systolic BP ≥130 mm Hg or diastolic BP ≥85 mm Hg or treatment of previously diagnosed hypertension	Systolic BP ≥130 mm Hg or diastolic BP ≥85 mm Hg or treatment of previously diagnosed hypertension	Systolic BP ≥130 mm Hg or diastolic BP ≥85 mm Hg or treatment of previously diagnosed hypertension

BP: Blood pressure – presión arterial. HDL-c: high-density lipoprotein cholesterol – lipoproteína de alta densidad colesterol; WC: waist circumference – circunferencia cintura (Nematy M et al., 2014; Muntner P et al., 2017).

Por tanto, en su investigación es necesario tener en cuenta las consecuencias a largo plazo de los factores de riesgo, como la obesidad abdominal, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la dislipidemia (Grundy SM et al., 2019; Reisinger C et al., 2020). La obesidad de la infancia se considera un factor de riesgo independiente para la de la edad adulta, esto quiere decir que, un niño obeso tiene un 80% de posibilidades de seguir siéndolo a los 35 años (Guo SS et al., 2002), por lo que reside un gran interés en su tratamiento y solución. Además, el adolescente con exceso de peso, incluso en el caso de que adelgace, tiene un riesgo relativo de 1,8 de mortalidad de cualquier causa y de 2,3 de mortalidad de causa cardiovascular en la edad adulta con respecto al adolescente con normopeso (Speiser PW et al., 2005). Un ejemplo de ello es el trabajo presentado por Kjellberg (Kjellberg E et al., 2019) en *Acta Paediatrica* donde informa sobre los factores de riesgo metabólico en una cohorte poblacional de más de 200 niños suecos sanos de seis años nacidos a buen término. Los datos demuestran que el 26% de los niños investigados tenían al menos un factor de riesgo y que el 7% tenían dos o más en un nivel que requería de tratamiento. En este trabajo se observó una mayor proporción de niños con sobrepeso u obesidad que tenían a su vez resistencia a la insulina y altos niveles de triglicéridos, en comparación con aquellos que tenían un normopeso. En el mismo estudio, Kjellberg E y col. demostraron que todos los niños de la cohorte con al menos dos factores de riesgo metabólico tenían una circunferencia de cintura superior. Por tanto, uno de los resultados concluyentes que mostraron es que la circunferencia de la cintura era mejor indicador de la resistencia a la insulina que el índice de masa corporal (IMC) (Gustafsson J, 2019; Kjellberg E et al., 2019).

Tabla 1.2. Criterios de Síndrome metabólico en infancia y adolescencia de Federación Internacional Diabetes (FDI)

Edad (años)	Obesidad (perímetro abdominal)	Triglicéridos (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	Presión arterial (mmHg)	Glucosa en ayunas (mg/dl)
6-10	≥P90	-	-	-	-
10-16	≥P90	≥150	<40	PAS: >130 PAD: >85	>100 o diagnóstico DM2
>16 (adultos)	Hombres: ≥94cm Mujeres: ≥80cm	≥150	Hombres: <40 Mujeres: <50	PAS: >130 PAD: >85	>100 o diagnóstico DM2

El diagnóstico requiere la presencia de obesidad central mediante determinación de cintura abdominal y como mínimo dos de los criterios restantes DM2: Diabetes Mellitus 2; HDL-c: Lipoproteína de alta densidad-colesterol; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica (Nematy M et al., 2014; Muntner P et al., 2017).

Según la OMS, en todo el mundo, el número de lactantes y niños (de 0 a 5 años) que padecen sobrepeso u obesidad aumentó de 32 millones en 1990 a 41 millones en 2016. observándose una prevalencia similar a la obesidad y Síndrome metabólico en población adulta, es decir, sobre el 30%. Si se mantienen las tendencias actuales, el número aumentará a 70 millones para 2025 (WHO, 2020). Existiendo diferencias destacadas según zonas geográficas, etnias y nivel económico y desarrollo de los países. La presencia de obesidad en la infancia se vincula con la presencia de los factores de riesgo mencionados en la edad adulta, por lo que la prevención en estos grupos de edad resulta clave para la mejora de las tasas en población general adulta y envejecida.

En España, el estudio “EnKid” que recogía información de 3534 niños y jóvenes de 2 a 24 años de todas las comunidades autónomas, arrojaba una idea sobre los datos de prevalencia en niños con obesidad, siendo del 6,3% y respecto al sobrepeso, del 18,1%, siendo mayor en las regiones del sur (Serra Majem L et al., 2003). Así fue corroborado con una muestra representativa de la población de 2 a 16 años de Almería (Andalucía), donde las cifras registraban 9,5 y 22,4%, para obesidad y sobrepeso respectivamente, es decir, un tercio de los niños y adolescentes españoles tienen exceso de peso (García-García E et al., 2013; Fornari E et al., 2019).

En adultos jóvenes, el trabajo de Vliet-Ostaptchouk y col. en 2014, partiendo de una muestra de 163.517 sujetos entre los 18 y 80 años originarios de países europeos (Alemania, Italia, Estonia, Finlandia, Holanda, Noruega y Reino Unido) permitió determinar cifras actualizadas sobre la prevalencia del Síndrome metabólico y su asociación con la obesidad. La proporción de sujetos con un IMC $> 30 \text{ kg/m}^2$ afectaba al 17% de la muestra, presentando un rango de variación entre el 11,6% en la cohorte italiana de Tirol y el 26,3% en la cohorte alemana de la región de Augsburgo (Vliet-Ostaptchouk JV et al, 2014; Rincón Mancheño I, 2017). La prevalencia del Síndrome metabólico en Latino-América obtuvo rangos entre 14% y el 27%, de acuerdo a las ciudades consideradas en el estudio CARMELA (Cardiovascular Risk Factor Multiple Evaluation in Latin America) que evaluó a 11.550 sujetos de ambos sexos de entre 25 y 64 años. La prevalencia fue mayor en México DF (27%) y la más baja en la ciudad de Quito (14%). La prevalencia de este síndrome fue mayor en las mujeres (22%) que en los hombres (20%). Del mismo modo que se observó que la prevalencia de Síndrome metabólico se incrementaba con la edad (Escobedo J et al. 2009; Rincón Mancheño I, 2017).

En cuanto a la prevalencia en los países asiáticos, presentan un rango de prevalencia del Síndrome metabólico similar (10-15%). Sin embargo, es mucho más bajo (alrededor del 5%) en las áreas rurales, además de diferir en cuanto a los diversos grupos étnicos que forman la zona asiática. En la India, la prevalencia es mayor en comparación con el resto de Asia, acercándose a valores de la población

estadounidense (Pan WH et al. 2008; Rincón Mancheño I, 2017). Las diferentes prevalencias obtenidas para Síndrome metabólico según los países y continentes a observar indicaban la necesidad de determinar cuán importante era conocer la influencia de la etnia en la determinación del riesgo. Si bien es cierto, algunos estudios previos y consecuentes a estas fechas indicaban que las complicaciones cardio-metabólicas se desarrollan con menores cantidades de tejido adiposo en poblaciones de origen asiático que en las occidentales (Sniderman DA, et al, 2007). Como resultado de ello, los puntos de corte recomendados para el IMC y la circunferencia de la cintura son más bajos para las poblaciones asiáticas, en función de su relación con el mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes (AHA/NHLBI, IDF, OMS) (Alberti KG et al, 2009; Sigit FS et al, 2020). Otro estudio que examinó las diferencias entre europeos, asiáticos y afro-caribeños mostró que los sudasiáticos tenían más y los afro-caribeños menos tejido adiposo visceral que los europeos (Eastwood SV et al, 2015). El exceso de tejido adiposo visceral está fuertemente asociado con complicaciones cardio-metabólicas y, por lo tanto, puede explicar las diferencias cardiometabólicas entre las poblaciones étnicas (Sniderman DA et al, 2007; Sigit FS et al, 2020).

Respecto a datos relevantes en nuestro país, hay pocos estudios que describan la distribución del Síndrome metabólico según la definición armonizada o Síndrome metabólico premórbido (SMP), sin embargo, destacan el Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA) (Guallar Castellón P et al. 2014) y el estudio sobre dislipemia, riesgo aterosclerótico, PCR incrementada y estado inflamatorio y oxidativo (Estudio DARIOS) (Fernández-Bergés D et al. 2012) que sí que muestran resultados en población española. En el citado estudio ENRICA llevado a cabo entre 2008 y 2010 a partir de una muestra 12.883 individuos se obtuvo una prevalencia de Síndrome metabólico del 22,7%, mientras que la prevalencia del SMP fue del 16,9% si bien la frecuencia de ambos síndromes Síndrome metabólico y SMP aumentó con la edad y resultó mayor en los varones hasta los 65 años y a partir de esa edad fue mayor entre las mujeres. Algo más elevados fueron los resultados derivados del estudio DARIOS donde la prevalencia de Síndrome metabólico según criterio de la OMS fue del 32% en varones y del 29% en mujeres (Fernández-Bergés D et al. 2012), predominando en varones hasta la edad de 55 años y en las mujeres a partir de los 65 años. La mayor prevalencia en el país corresponde a Canarias e Islas Baleares. Por el contrario, otros estudios como el de *Prevalencia del Síndrome metabólico en población laboral española* (Registro MESYAS) refieren unos datos más bajos. En concreto, una prevalencia bruta de Síndrome metabólico del 10,2%, pero debemos tener en cuenta que este estudio se realizó con una media de edad de $45,4 \pm 9,8$ años, siendo diagnosticado el Síndrome metabólico mediante los criterios modificados del ATP-III. Los resultados refieren que uno de cada 10 trabajadores activos tiene Síndrome metabólico y la prevalencia aumenta con la edad y el sexo masculino. Además de

observó que los empleados de trabajos con requerimientos físicos altos eran el colectivo con mayor prevalencia de Síndrome metabólico (11,8%) con independencia de la edad y del sexo. Las personas con Síndrome metabólico presentan un patrón homogéneo de la distribución de criterios, observando diferencias evidenciadas en función al sexo y/o dimorfismo sexual: glucemia y trigliceridemia son más frecuentes en varones, mientras obesidad abdominal y c-HDL lo son en mujeres (INE, 2019).

Lo que muestra evidencia significativa, es que actualmente las enfermedades crónicas, incluidas la obesidad, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer, son causas cada vez más importantes de discapacidad y muerte prematura tanto en países desarrollados como en países en vías de transición, y suponen una carga adicional para los presupuestos sanitarios nacionales. Los datos reflejan que las enfermedades crónicas tasan aproximadamente un 60% del total de las muertes notificadas en el mundo y un 46% de la carga mundial de morbilidad. Por ello, representan un gran desafío para la Salud Pública, poniendo de manifiesto la necesidad de intensificar los esfuerzos en investigación para mejorar la prevención primaria y su tratamiento. En la actualidad, se reconoce a la obesidad como eje central de aparición o promoción de muchas de estas patologías crónicas (OMS, 2020). En España la prevalencia de obesidad (IMC superior a 30 Kg/m²) pasó del 9,1% en 1993 al 15% en 2006 (Rodríguez-Rodríguez E et al. 2011). Este problema afecta en mayor medida a los hombres (62,8%), sin embargo, a medida que envejecemos, la brecha disminuye y son las mujeres a partir de los 65 años las que aumentan en mayor medida el peso (INE, 2019). Aunque si bien es cierto, a pesar de que el sobrepeso u obesidad esté presente en el género masculino en edades más tempranas, en todos los grupos de edad los hombres afirman tener mejor salud que las mujeres, y esta brecha de valoración positiva del estado de salud según sexo se acentúa con la edad (INE, 2019).

Gracias a los estudios DARIOS y ENRICA, se pudo establecer conocimientos sobre prevalencia y factores de riesgo vinculados a las enfermedades crónicas asociadas al Síndrome metabólico (obesidad central, dislipemias, resistencia a la insulina o hiperglucemias, hipertensión), el Síndrome metabólico en sí mismo y la influencia de otros posibles factores: sexo, etnia, edad, características socio-demográficas, nivel educativo, nivel económico, etc.

El diseño del estudio DARIOS, así como los resultados obtenidos, permitieron realizar un sistema virtual con el fin de facilitar la estimación de la prevalencia de distintas combinaciones de niveles de factores de riesgo cardiovascular en España (Grau M et al., 2011; Fernández-Bergés D et al., 2012). Basados en el análisis de datos agregados de 11 estudios poblacionales realizados en 10 comunidades autónomas, determinando los parámetros vinculados al Síndrome metabólico, pudiendo mostrar los avances de la obesidad y la diabetes en España durante la

primera década del presente siglo respecto a décadas precedentes (figura 1.1). El estudio DARIOS mostraba la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en personas de 35-74 años y como se realizaba en 10 comunidades autónomas (CCAA) podía determinarse el grado de variabilidad geográfica en la distribución de los factores de riesgo cardiovascular. Algunos de los resultados que obtuvieron indicaron que las CCAA de las islas Canarias, Extremadura y Andalucía eran las que presentaban mayor número de factores de riesgo cardiovascular significativamente más prevalentes. Esta es una tendencia mundial puesto que el aumento de la obesidad ha sido evidente en todas las regiones del planeta durante los últimos 30 años y la DM le sigue inseparablemente. Tal epidemia trae consigo un incremento de Síndrome metabólico, pero no todos los individuos con este síndrome presentan la misma combinación de criterios diagnósticos, y se ha comprobado que el riesgo de enfermedad cardiovascular es diferente según cuál sea la combinación.

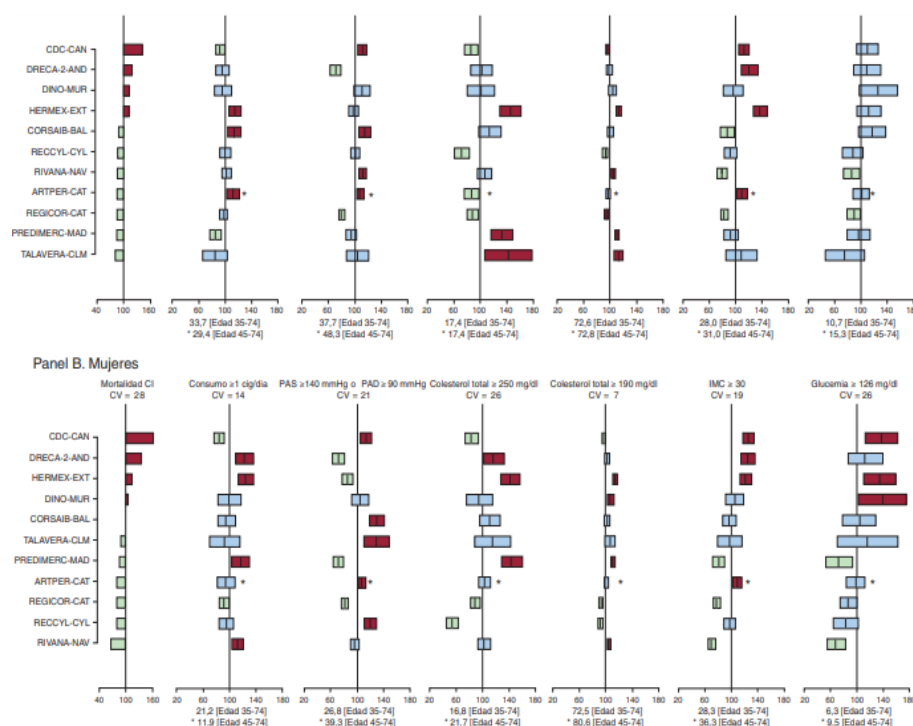


Figura 1.1. Mortalidad por cardiopatía isquémica estandarizada por la población europea por comunidad autónoma y razón estandarizada de prevalencia.

En cuanto a los datos obtenidos a través del estudio ENRICA, más focalizado en la determinación del Síndrome metabólico, cuyo tiempo de duración comprendió de 2008-2010, revelaba datos destacados respecto a la prevalencia de esta alteración (Guallar-Castillón P et al., 2014). Estudiando una muestra representativa de la población española de 11.149 personas, con edades superiores a los 18 años. Indicando la prevalencia (intervalo de confianza del 95%) para síndrome metabólico fue del 22,7% ($21,7 \pm 23,7$), cuya frecuencia aumentaba con la edad y era mayor en hombres que en mujeres hasta los 65 años; a partir de esa edad, era mayor entre las mujeres. Las comunidades del sur de España y las insulares fueron las que mostraron datos de mayor prevalencia.

Respecto a la relación de la prevalencia de Síndrome metabólico con la enfermedad cardiovascular, debemos mencionar que las enfermedades cardiovasculares son la causa más frecuente de muerte en el mundo en el siglo XXI. Y su tasa de prevalencia va comprometida con la de Síndrome metabólico, obesidad y la resistencia a la insulina. Los países occidentales, continúan teniendo una tasa absoluta de morbilidad y mortalidad cardiovascular superior al resto de países, pero en los países en vías de desarrollo, la prevalencia también está aumentando considerablemente, considerándose una epidemia encubierta pero cada vez más clara (WHO, 2020). En cambio, se ha observado que la incidencia de la enfermedad coronaria es más baja en algunos países desarrollados como España, Francia, Grecia, Italia y Portugal, lo que conlleva que tengan una esperanza de vida mayor que los países del Norte de Europa o Estados Unidos (Tunstall-Pedoe H et al., 1999). Estas diferencias se explican sobre todo por el patrón de alimentación propio de los países mediterráneos, que se conoce como Dieta Mediterránea (Martínez-González MA et al., 2015).

Casi la mitad del total de las muertes por enfermedades crónicas son atribuibles a las enfermedades cardiovasculares, constituyendo un problema de Salud Pública de gran magnitud. Bajo el epígrafe de enfermedad cardiovascular se agrupa un conjunto de fenotipos diversos. En la Clasificación Internacional de Enfermedades 10ª Revisión (C.I.E.-10), las enfermedades cardiovasculares se encuentran especificadas y codificadas en el capítulo IX como enfermedades del sistema circulatorio. Comprenden las siguientes afecciones o grupo de enfermedades: 1) Fiebre reumática aguda; 2) Enfermedad cardíaca reumática crónica; 3) Enfermedad hipertensiva; 4) Enfermedad isquémica del corazón; 5) Enfermedad cardiopulmonar y enfermedad de la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón; 6) Enfermedades cerebrovasculares; 7) Enfermedades de las arterias, arteriolas y capilares; 8) Enfermedades de las venas y de los vasos y ganglios linfáticos no clasificadas en otra parte; 9) otros trastornos y los no especificados del sistema circulatorio (WHO, 2020).

Este conjunto de enfermedades supone la primera causa de mortalidad a nivel mundial, provocando un 30% del total de muertes anuales. La más importante es la

cardiopatía isquémica (CI) puesto que causa el 43% de las muertes provocadas por enfermedad cardiovascular, seguido de las enfermedades cerebrovasculares (33%) y otros tipos (24%). No obstante, no toda enfermedad cardiovascular es causa de fallecimiento, al menos 20 millones de personas al año sobreviven en el mundo a infartos agudos de miocardio (IAM) y accidentes cerebrovasculares (ACV), y una proporción muy importante de los mismos requieren atención sanitaria constante, lo cual supone una enorme carga, a largo plazo, sobre los recursos sanitarios (WHO, 2020).

En España, según los datos publicados el 19 de diciembre de 2019 sobre la tasa de mortalidad de 2018, el Instituto Nacional de Estadística (INE) marca a las enfermedades del sistema circulatorio como la primera causa de fallecimiento (con el 28,3% del total (y una tasa de 258,6 fallecidos por cada 100.000 habitantes), seguida de los tumores, con el 26,4% del total (y una tasa de 241,2), y de las enfermedades del sistema respiratorio, con el 12,6% (y una tasa de 114,9). Respecto al año anterior, los fallecimientos debidos a enfermedades del sistema respiratorio aumentaron un 4,0%. Por el contrario, los debidos a enfermedades del sistema circulatorio y los originados por tumores disminuyeron un 1,3% y un 0,5%, respectivamente. También se observa que las enfermedades del sistema circulatorio fueron la primera causa de mortalidad en el caso del género femenino (272,5 muertes por cada 100.000) y la segunda entre los varones (244,3), la primera fueron los tumores, con 297,8 fallecidos por cada 100.000 hombres. Según las estadísticas de 2018, las enfermedades del sistema circulatorio ocasionaron 120.859 muertes, lo que supone aproximadamente el 28,3% del total (INE, 2019). Es en entre los mayores de 79-80 años donde las enfermedades del sistema circulatorio se muestran como las causantes de mayor mortalidad (32,3% del total). Más detalladamente, dentro de las enfermedades circulatorias, las isquémicas del corazón (infarto, angina de pecho...) volvieron a ocupar el primer lugar en número de defunciones, aunque con un descenso del 3,6% respecto al año anterior. Le siguieron las enfermedades cerebrovasculares, que también descendieron (en este caso un 1,9%). Por sexo, las enfermedades isquémicas del corazón fueron la primera causa de muerte en los hombres, causando un 3,7% menos de muertes que en 2017. Entre las mujeres fueron las enfermedades cerebrovasculares (con una disminución del 2,6%) (figura 1.2).

El Informe presentado este año también indicó que las mayores tasas brutas de mortalidad por enfermedades del sistema circulatorio se registraron en Principado de Asturias (379,0 fallecidos por 100.000 habitantes), Galicia (357,6) y Castilla y León (341,8). Si se consideran las tasas estandarizadas, Andalucía registró la mayor tasa de mortalidad por enfermedades del sistema circulatorio (300,4), seguida de las ciudades autónomas de Melilla y Ceuta (277,9 y 273,5, respectivamente).

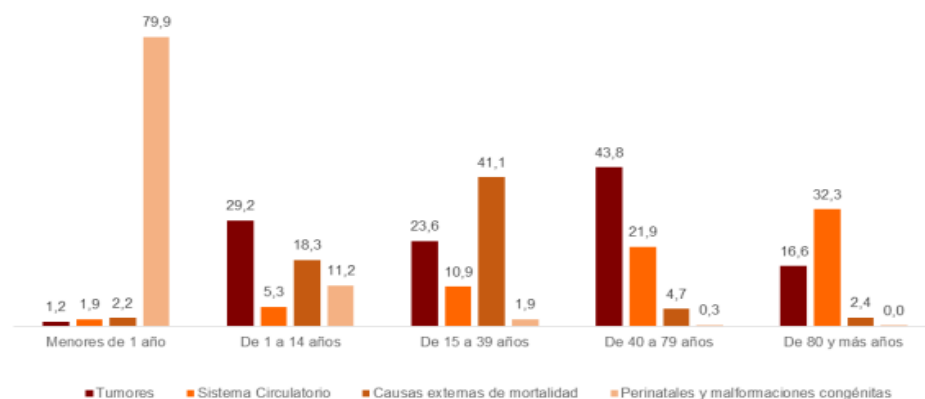


Figura 1.2. Principales causas de muerte según edad. Año 2018 Porcentaje sobre el total de fallecidos (INE, 2019)

En cambio, para los tumores, las mayores tasas de defunciones se dieron en Principado de Asturias (355,5 fallecidos por 100.000 habitantes), Castilla y León (322,9) y Galicia (312,9). Por supuesto, debemos tener presente que los datos mostrados por el Instituto Nacional de Estadística definen la causa de defunción a la enfermedad o lesión que inició la cadena de acontecimientos patológicos que condujeron directamente a la muerte. Cuando la causa es una lesión traumática, se considera causa básica las circunstancias del accidente o violencia que produjo la lesión fatal (INE, 2019). Debido a la persistencia de aparición de la enfermedad cardiovascular como principal causa de muerte, ya bien por las repercusiones que acarrear, tanto económicas y sociales como de impacto en el sistema sanitario. Por tanto, prevenir la aparición de las enfermedades cardiovasculares desde la atención primaria se ha convertido en una prioridad de política sanitaria.

1.2 Definición y características del síndrome metabólico

Entendemos por síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas que responden al exceso de tejido adiposo dispuesto en la zona del abdomen, caracterizando el término obesidad, propia de estos pacientes, así como la disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), la elevación de las concentraciones de triglicéridos, el

aumento de la presión arterial y la hiperglucemia o resistencia a la insulina (O'Neill S et al., 2015). La combinación de estos factores y su tratamiento en conjunto como enfermedad aumenta el riesgo aterogénico, siendo mucho mayor el riesgo que si se evalúa independientemente cada factor (Sherling DH et al, 2017).

El Síndrome metabólico se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. Asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia de diabetes tipo 2, aunque esta prevalencia presenta variaciones en función de la definición utilizada, el intervalo de edad examinado, la población estudiada e incluso el momento analizado (Hollman G et al, 2008), y de 2-3 veces en la de enfermedad cardiovascular, se considera que el Síndrome metabólico es un elemento clave en la epidemiología actual para diabetes y enfermedad cardiovascular, de manera que se ha convertido en un problema de salud pública con necesidad de ser abordado (Sherling DH et al, 2017). No se trata de una enfermedad nueva; sus primeras descripciones y definiciones tuvieron lugar en la década de los años veinte, concretamente, en 1923 el Dr. Eskil Kylin, de Goteburgo publicó un trabajo de título muy parecido a la descripción actual del Síndrome Metabólico: “Síndrome de hipertensión, hiperglucemia e hiperuricemia”, concentrando la atención en un grupo de pacientes enfermos que, además de tener la presión arterial elevada, también presentaban intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina, así como otras alteraciones metabólicas., definiendo la asociación entre hipertensión, hiperglucemia y gota (Alberti KG et al, 2005; Ehrenwald M et al., 2019). Gregorio Marañón, el fundador de la endocrinología moderna en España, señaló de manera explícita que la hipertensión arterial podía considerarse un estado de prediabetes y que este concepto también era aplicable a la obesidad y debía haber alguna forma de predisposición de carácter general para la asociación de la diabetes (del adulto) con la hipertensión arterial, la obesidad y quizá también con la gota o hiperuricemia (Alberti KG et al, 2005).

De esta forma empezaba a establecerse la idea de que otros factores tales como la presencia o no de sobrepeso u obesidad podían desempeñar un papel esencial en la aparición de la enfermedad. En este sentido, la dieta, empezaría a tomar un papel clave, convirtiéndose en un punto de inicio y donde debería residir especial atención para el tratamiento tanto de Síndrome metabólico como las alteraciones que lo definen. Entre 1947 y 1956, Jean Vague publicó un artículo en el que demostraba que las personas con obesidad de distribución androide (acumulación excesiva de tejido adiposo en la parte superior del cuerpo) presentaban una mayor predisposición a la aparición de patologías tales como diabetes, aterosclerosis, gota o hiperuricemia, así como cálculos renales y enfermedad cardiovascular. Veinte años después, Avogaro y Crepaldi documentaron la aparición simultánea de obesidad, hiperinsulinemia,

hipertrigliceridemia e hipertensión, mediante el estudio de seis pacientes con signos moderados de obesidad, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, los cuales mejoraron tras seguir un tratamiento dietético hipocalórico y bajo en carbohidratos. Años más tarde, en 1977, Herman Haller acuñó el término “Síndrome metabólico” al estado de diabetes mellitus combinado con un exceso de grasa, proteinuria y ácido úrico, al mismo tiempo, aumentando el riesgo de enfermedad cardiovascular, así como el riesgo de aterosclerosis. Haller confirmó el descubrimiento realizado por Vague, usaba el término de Síndrome metabólico para referenciar la relación entre el estado de obesidad, diabetes mellitus, niveles elevados de ácido úrico y de lípidos en sangre y la esteatosis hepática. A su vez, el Dr. Pierre Singer añadió a este conjunto de alteraciones metabólicas la hipertensión, así como la posible asociación a determinadas enfermedades cardíacas, tales como el infarto de miocardio (Sosnowska B et al, 2017). Aunque la importancia clínica del Síndrome metabólico fue destacada y realmente relevante años más tarde. En 1988, el Dr Gerald Reaven, argumentó que el conjunto de alteraciones metabólicas propias de este síndrome respondía a una respuesta central mediada por la resistencia a la insulina, indicando de esta forma su estrecha vinculación al estado de diabetes mellitus, así como aparición de enfermedad cardiovascular. Este descubrimiento permitió abordar el Síndrome metabólico con otros posibles tratamientos, siendo tal la relevancia, que el mismo Síndrome metabólico pasó a ser reconocido también como “Síndrome de Reaven” (Parikh RM et al., 2012; Samson SL et al, 2014).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia de obesidad se ha triplicado desde 1975, habiendo al menos un 39% de los adultos con sobrepeso y un 13% con obesidad, sobre 650 millones de personas son obesas. Por esta misma causa, la prevalencia de Síndrome metabólico también se ve aumentada en paralelo, ya que como hemos visto, el estado de obesidad representa una de las alteraciones del organismo características que forma parte de la definición de Síndrome metabólico. También son datos preocupantes que la mitad de las personas diabéticas y una cuarta parte de los pacientes que sufren patologías de tipo cardiovascular, estrechamente asociado a las alteraciones progresivas a la resistencia a la insulina (Samson SL et al, 2014; WHO, 2020).

Más tarde, el Grupo de Trabajo de la OMS, iniciada en 1998 y finalizada en 1999, elaboró la primera definición oficial del Síndrome metabólico, sin embargo, se fueron proponiendo diversos valores para los parámetros, complicando el poder realizar comparaciones y estimaciones epidemiológicas al no haber claramente un consenso respecto al diagnóstico y clasificación, como era el caso para la diabetes mellitus tipo II. Este hecho causó que surgieran definiciones alternativas. Un año después, el consorcio European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) matizó sus propios criterios de definición y valoraron si la resistencia a la insulina siempre debía estar presente o no en la definición de

Síndrome metabólico. En 2001, el National Cholesterol Education Program (NCEP) crea el Adult Treatment Panel III (ATP-III) como guía terapéutica para dislipemias y prevención de enfermedad coronaria. Esta guía alcanzó gran popularidad por su sencillez en la práctica, así como en la aplicación de su modelo. No obstante, la definición ATP-III no incorporaba variables proinflamatorias ni protrombóticas como parte de una definición ampliada. Por ello, la American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), en 2003, efectuó una modificación de la definición ATP-III. Esta nueva definición estaba basada en la consideración de que la resistencia a la insulina constituía el problema básico. La AACE recogió cuatro factores como «alteraciones identificativas» del Síndrome metabólico: elevación de la concentración de triglicéridos, disminución de la concentración de c-HDL, incremento de la presión arterial y aumento de las concentraciones de glucosa, tanto en ayunas como después de la administración de glucosa. Sin embargo, fue bastante criticada por excluir la obesidad como componente del Síndrome metabólico, ya que consideraban que la obesidad central era un factor que contribuye a la aparición de resistencia a la insulina, más que una consecuencia de ésta a pesar de la gran cantidad de datos que sugieren que la obesidad es un factor de riesgo importante para la diabetes y la enfermedad cardiovascular (Alberti KG et al, 2005; Samson SL et al, 2014). Un año más tarde, tras las críticas ofrecidas por la ADA/EASD, la American Heart Association y el National Heart, Lung and Blood Institute publicaron declaraciones científicas acerca del Síndrome metabólico en las que se recoge una clasificación ATP-III actualizada. En esta actualización no se considera necesario el criterio del incremento del perímetro de la cintura en los pacientes en que hay otros tres factores de riesgo.

La definición ATP-III nueva también contempla una disminución del valor umbral del perímetro de la cintura en lo relativo al riesgo, sobre todo en las personas de origen asiáticoamericano (Alberti KG et al, 2005). Esta última presentación fue seguida de la propuesta por la FDI, que destacaba el estado de obesidad como punto de inicio para las alteraciones metabólicas que se producen. Estas distintas definiciones también presentaban diferencias en los valores umbral utilizados para definir cada uno de los componentes, y esta ha sido la causa principal de confusión a la hora de diagnosticar, de la misma forma que justificaba la imposibilidad de poder comparar la incidencia del Síndrome metabólico en los distintos grupos de población. La gran variación en los datos de prevalencia cuando se utilizan diferentes criterios, sirvió para subrayar la necesidad de una definición estandarizada-armonizada internacional. La FDI señaló la necesidad urgente de racionalizar las definiciones desarrolladas sobre el Síndrome metabólico permitiendo aumentar la calidad, efectividad y eficiencia en el tratamiento del síndrome (FDI, 2005). Así, mediante un comité de expertos en el tema, se consensuaron las directrices para compensar las diferencias en el perímetro de la

cintura y la distribución del tejido adiposo entre los distintos grupos de población (por vez primera se indicarían valores umbral para definir la obesidad, que es diferente según el grupo étnico), así como el resto de parámetros que se han ido mencionando (Alberti KG et al., 2005).

La definición de la FDI tuvo en cuenta la cantidad de datos que indican que la adiposidad central (abdominal) es común a todos los componentes del Síndrome metabólico. El aumento del perímetro de la cintura, que es un parámetro bien aceptado de la adiposidad abdominal, se considera en la actualidad un requisito necesario para establecer el diagnóstico de Síndrome metabólico. Esta consideración tiene la ventaja añadida de que la simple determinación del perímetro de la cintura representa una primera prueba de detección del síndrome que se puede realizar de manera sencilla y muy económica en cualquier lugar del mundo. En la definición armonizada se han incorporado los valores umbral del perímetro de la cintura referidos a los distintos grupos étnicos, ya que en los estudios de investigación se ha demostrado que los grados de obesidad para los cuales comienza a aumentar el riesgo de otras complicaciones son distintos según el grupo de población (Cameron AJ et al., 2004). El perímetro de la cintura junto con el IMC son criterios de diagnóstico básicos en la determinación del riesgo del Síndrome metabólico (Zimmet P et al., 2007). La FDI considera que la definición de Síndrome metabólico persigue el objetivo útil de identificar a las personas que presentan un riesgo elevado de presentar enfermedad cardiovascular y diabetes (Alberti KG et al., 2005; Zimmet P et al., 2007). La creciente epidemia de estas patologías en todo el mundo (especialmente en los países desarrollados) parece una razón suficiente para identificar y tratar a las personas que presentan el Síndrome metabólico.

Durante suficiente tiempo, los criterios de la FDI que fueron publicados en *The Lancet*, fueron los más utilizados en la identificación de las personas que mostraban un riesgo aumentado, pudiendo prevenir y controlar la sintomatología y prolongar la calidad de vida, haciendo más eficaz el diagnóstico y, por consiguiente, ahorrando costes en el tratamiento (Eckel RH et al., 2005). De este modo, se abordaban necesidades clínicas y de investigación, siendo una herramienta diagnóstica asequible e idónea para su aplicación en los distintos grupos de población de todo el mundo, aunque la posibilidad de consensuar las diferencias en los criterios diagnósticos emergía como una necesidad ya que ciertos tratamientos y datos epidemiológicos variaban considerablemente y dificultaban el conocimiento de la etiología propia del Síndrome metabólico (Zimmet P et al., 2005; FDI, 2015). Si bien es cierto que las alteraciones y/o patologías que comprenden el Síndrome metabólico se diagnostican y tratan por separado, es el conjunto de al menos tres de los criterios de diagnóstico los que se necesitan para hablar de Síndrome metabólico. Generalmente aparecen paulatinamente según

envejecemos y frecuentemente se asocia la degeneración natural del organismo o el seguimiento de hábitos inadecuados, teniendo el posible exceso de peso como el factor clave en el desarrollo.

Finalmente, en el año 2009, tras la última versión de la definición ATP-III (2004) y los nuevos criterios propuestos por la FDI, distintos grupos y consorcios del campo de estudio e investigación consensuaron los rangos de parámetros para las determinaciones de los criterios de diagnóstico, permitiendo establecer la definición de Síndrome metabólico, además de la estandarización de las recomendaciones respecto al tratamiento clínico. En la definición armonizada y vigente en el diagnóstico y tratamiento de Síndrome metabólico en la actualidad, se considera Síndrome metabólico cuando se sufren tres o más factores de riesgo, tales como la obesidad central, medido por el perímetro de la cintura (diferenciando los valores y rangos según etnia y geografía), dislipemias producidas por el exceso de triglicéridos con valores iguales o superiores a 150mg/dL ($\geq 1,7\text{mmol/L}$), valores de c-HDL inferiores a 40mg/dL ($< 1\text{mmol/L}$) en hombres e inferiores a 50mg/dL ($< 1,3\text{mmol/L}$) en el caso de mujeres, niveles de glucemia en ayunas $> 100\text{mg/dL}$ ($\geq 5,6\text{mmol/L}$), e hipertensión (PAS $\geq 130\text{mmHg}$, PAD $\geq 85\text{mmHg}$ o si incluye el tratamiento de alguno de estos factores. En la siguiente tabla se observan las diferencias en los rangos y criterios de diagnóstico para los distintos factores de riesgo que se incluyen en la definición de Síndrome metabólico (tabla 1.3).

La **obesidad** es el principal factor de caracterización del Síndrome metabólico. El exceso de tejido adiposo se considera el factor de riesgo clave para desarrollar diabetes, dislipemias y enfermedad cardiovascular, a su vez, la obesidad también puede promover la evolución de osteoartritis, algunos tipos de cáncer, enfermedades mentales y aumento de la mortalidad (van Vliet-Ostapchouk, J. V., et al, 2014). Tanto la obesidad como el sobrepeso, se clasifican con el cálculo del índice de masa corporal (IMC), que corresponde a peso dividido talla al cuadrado. Se considera presencia de obesidad los valores son superiores o iguales a 30 Kg/m^2 y sobrepeso cuando son superiores o iguales a 25 Kg/m^2 , indicando que el peso de una persona es superior a lo que se piensa que es saludable para su estatura (WHO, 2020). Sin embargo, una persona puede tener sobrepeso por músculo o agua extra, al igual que por tener demasiada grasa y dependiendo de dónde provenga el riesgo de aparición de Síndrome metabólico y/o enfermedad cardiovascular varía. Por tanto, debemos tener precaución en cuanto al uso del valor de IMC, puesto que su valor únicamente refleja el peso total en función de la altura. (O'Neill S, 2015). Por otro lado, actualmente se ha postulado el término *Obeso u Obesidad Metabólicamente Saludable*

(Metabolically Healthy Obese, MHO), que refiere a un subgrupo de población (10-30%) de obesos que metabólicamente están saludables, sin alteraciones de otros parámetros a pesar del exceso de grasa o tejido adiposo acumulado en el organismo (Denis GV et al., 2013; van Vliet-Ostaptchouk JV et al, 2014). Este concepto es importante, ya que, por consiguiente, ni todas las personas obesas sufren Síndrome metabólico, ni todos los Síndrome metabólico son clasificados como obesos, aunque si hay siempre cierta presencia de sobrepeso, sobretudo dispuesto en la zona abdominal o central del organismo. Aunque si bien es cierto, algunos autores consideran que el estado MHO es una fase temprana de desarrollo de un posible Síndrome metabólico (Mongraw-Chaffin M et al., 2018; Telle-Hansen VH et al., 2020).

Tabla 1.3. Declaración conjunta de FDI, AHA/NHLBI, Federación Mundial del Corazón, Sociedad Internacional de Aterosclerosis y Asociación Internacional para Estudio de la Obesidad

	WHO	EGIR	NCEP/ATPIII	AACE	AHA/NHLBI/ADA updated NCEP/ATPIII	FDI	Definición armonizada	Definición armonizada + actualización AHA/ACC
Año	1999	1999	2001	2003	2004	2005	2009	2017
Número de factores de riesgo	IFG/IGT/T2DM o Rla la insulina además de 2 factores	Rla la insulina mas 3 factores de riesgo	3 o más factores de riesgo	IGT/IFG con ninguno de los siguientes facotes	3 o más factores de riesgo	Obesidad y dos de los siguientes	3 o más factores de riesgo	3 o más factores de riesgo
Obesidad	Ratio cintura/cadera >0,9 hombres y >0,85 en mujeres o IMC > 30kg/m ²	Circunferencia de la cintura ≥94 cm en hombres y ≥80cm en mujeres	Circunferencia de la cintura ≥102 cm en hombres y ≥88cm en mujeres	IMC ≥25 kg/m ²	Circunferencia de la cintura ≥102 cm en hombres y ≥88cm en mujeres	Circunferencia de la cintura ≥94 cm en hombres caucásicos y ≥90 cm asiáticos y ≥80cm en mujeres	Circunferencia de cintura específica por geografía y etnia	
Dislipemia	HDL-c <0.91 mmol/L hombres (35 mg/dL) <1.0 mmol/L mujeres (<39 mg/dL)	HDL-c <1.0 mmol/L (39 mg/dL)	HDL-c <1.0 mmol/L hombres (40 mg/dL) <1.3 mmol/L mujeres (50 mg/dL)	HDL-c <1.0 mmol/L hombres (40 mg/dL) <1.3 mmol/L mujeres (50 mg/dL)	HDL-c <1.0 mmol/L hombres (40 mg/dL) <1.3 mmol/L mujeres (50 mg/dL)	HDL-c <1.0 mmol/L hombres (40 mg/dL) <1.3 mmol/L mujeres (50 mg/dL)	HDL-c <1.0 mmol/L hombres (40 mg/dL) <1.3 mmol/L mujeres (50 mg/dL)	
Hipertrigliceridemia	TG ≥1.7 mmol/L (150 mg/dL)	TG ≥2.0 mmol/L (177 mg/dL) o tratamiento	TG ≥1.69 mmol/L (150 mg/dL)	TG ≥1.69 mmol/L (150 mg/dL)	TG ≥1.69 mmol/L (150 mg/dL) o tratamiento	TG ≥1.7 mmol/L (150 mg/dL) o tratamiento	TG ≥1.7 mmol/L (150 mg/dL) o tratamiento	
Insulinemia	DM2 FPG >6.1 mmol/L (110mg/dL) 2h OGT >7.7 mmol/L (140mg/dL)	Not T2DM FPG >6.1 mmol/L (110mg/dL)	FPG ≥110mg/DI (>6.1 mmol/L)	Not T2DM FPG ≥110mg/DI (>6.1 mmol/L) 2h OGT >7.7 mmol/L (140mg/dL)	DM2 FPG ≥5.6 mmol/L (>100mg/dL)	DM2 FPG ≥5.6 mmol/L (>100mg/dL)	FPG ≥5.6 mmol/L (>100mg/dL) o tratamiento	
Hipertensión arterial	PAS ≥ 140 mmHg PAD ≥ 90 mmHg	PAS ≥ 140 mmHg PAD ≥ 90 mmHg	PAS ≥ 130 mmHg PAD ≥ 85 mmHg	PAS ≥ 130 mmHg PAD ≥ 85 mmHg	PAS ≥ 130 mmHg PAD ≥ 85 mmHg o tratamiento	PAS ≥ 130 mmHg PAD ≥ 85 mmHg o tratamiento	PAS ≥ 130 mmHg PAD ≥ 85 mmHg o tratamiento	PAS ≥ 130 mmHg PAD ≥ 80 mmHg o tratamiento
Componentes adicionales	Microalbuminuria PAS ≥ 20µg/min Albumina/creatinina ≥ 30mg/g			resistencia a la insulina (historia familiar (antecedentes), DM2, edad, etnia, sedentarismo, estilo de vida, PCOS				

AHA, American Heart Association; FDI, Federación Diabetes Internacional; IMC: índice de masa corporal; PAD, PA diastólica; PAS, PA sistólica; F, mujer; DM2, diabetes mellitus 2; FPG, glucosa plasmática en ayunas; IFG, glucosa en ayunas alterada; IGT: intolerancia a glucosa; M, hombre; NHLBI, Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre; OGT, prueba de tolerancia oral a la glucosa; PCOS, síndrome de ovario poliquístico; TG, Triglicérido

La **circunferencia de la cintura** también es un método validado para determinar el grado de obesidad o exceso de grasa dispuesto en esta zona, valorando ciertamente la obesidad abdominal. Se consideran los valores superiores a 102 cm en el caso de hombres y más de 88 cm en mujeres para población caucásica, observando diferencias según localización geográfica y etnia (tablas 1.4 y 1.5) (Alberti KG et al, 2006; WHO, 2020).

Tabla 1.4. Recomendaciones combinadas sobre valores de IMC y perímetro de cintura en relación al exceso de peso y su asociación a riesgo de enfermedad

	Índice de masa corporal (kg/m ²)	Clasificación de obesidad	Riesgo de enfermedad (en relación a un perímetro de cintura y peso adecuados)	
			hombres < 102cm mujeres < 88cm	hombres < 102cm mujeres < 88cm
infrapeso	<18,5			
normopeso	18,5-24,9			
sobrepeso	25,0-29,9		aumentado	alto
obesidad	30,0-34,9	I	alto	muy alto
	35,0-39,9	II	muy alto	muy alto
obesidad mórbida	>40,0	III	extremadamente alto	extremadamente alto

Tabla 1.5. Criterios establecidos por la FDI para las diferencias entre sexo en perímetro de la cintura en los distintos grupos étnicos

País o etnia	Sexo	Valores de perímetro de cintura (cm)
Europeos	Hombre	>94
	Mujer	>80
Sudasiáticos	Hombre	>90
	Mujer	>80
Orientales	Hombre	>90
	Mujer	>80
Sudafricanos	Hombre	>100
	Mujer	>90
Americanos	Hombre	>100
	Mujer	>93

La medición se realiza en el punto medio entre la última costilla y el margen superior de la cresta iliaca, el dato presenta una gran correlación con la grasa

abdominal y tiene una asociación directa con un mayor riesgo de diabetes tipo 2, cardiopatía y accidente cerebrovascular. Las personas con cuerpos con forma andrógina, o referida comúnmente como “manzana” tienden a sufrir de estas enfermedades ya que almacenan mayor cantidad de grasa alrededor de su cintura y las extremidades en cambio, se mantienen más bien delgadas (caderas, piernas, muslos) (Alberti KG, et al, 2006).

Tanto el IMC como el perímetro de la cintura son dos herramientas, que combinadas, permiten iniciar el diagnóstico del Síndrome metabólico, así como la evolución del mismo una vez se ha iniciado su tratamiento, que necesariamente comporta un cambio de estilo de vida, tanto en referencia a la dieta como a la actividad física (Kaur Y et al, 2017; Campbell Am LV, 2017). Tras observar y determinar el exceso de tejido adiposo en el organismo, generalmente, cuando presenta una disposición abdominal, pasamos a valorar las otras posibles alteraciones resultantes del mismo. Las **alteraciones para valores lipídicos** son uno de los factores clave en su diagnóstico. Los niveles altos de triglicéridos y bajos en el caso de colesterol de alta densidad (c-HDL), se consideran los parámetros a evaluar en la definición de Síndrome metabólico. Ya en 1953, Ancel Keys describió una asociación entre las concentraciones de colesterol y la mortalidad por insuficiencia cardíaca en diversas poblaciones. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que la concentración sérica elevada de c-HDL constituye un potente e independiente predictor de menor riesgo de enfermedad cardiovascular (Sharret AR et al., 2001), así como su disminución supone un factor de riesgo. Los niveles bajos de c-HDL son un referente distintivo de la diabetes tipo 2 y la dislipidemia mixta o combinada (Vollenweider P et al, 2015). Algunos estudios han sugerido que existe una correlación inversa entre el c-HDL y la grasa hepática (Adiels M et al, 2008). Y en la propia situación de Síndrome metabólico, el aumento de los niveles de VLDL, CETP y lipasa hepática (LH) promueven el catabolismo de las partículas de c-HDL (Rashid S et al, 2003). Algunos autores consideran que cifras bajas de c-HDL puede predecir mejor el riesgo de enfermedad cardiovascular que las elevadas de c-LDL, colesterol total o triglicéridos (Sacks FM, 2002), es por ello, que la determinación de sus niveles se utiliza para el diagnóstico de Síndrome metabólico. También, se ha observado, en el estudio Framingham, que aquellos participantes con concentración de c-HDL elevadas presentaban un 50% menos de riesgo de sufrir un evento cardiovascular en comparación con los de baja concentración de c-HDL. Además, en el estudio *Prospective Cardiovascular Munster* (PROCAM), participantes con niveles de c-HDL ≥ 35 mg/dL mostraban 4 veces menos riesgo que aquellos con c-HDL ≤ 35 mg/dL, tras 6 años de seguimiento (Assmann G et al, 1996). También, en el estudio *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) se observó un fuerte y

continua asociación entre el incremento progresivo de los niveles de c-HDL y la paralela reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular tanto en hombres como en mujeres, sin enfermedad cardiovascular inicial, y tras 10 años de seguimiento (Sharret AR et al., 2001). Aunque se observó que un aumento de 1 mg/dL en la concentración de c-HDL se asocia a una disminución del riesgo coronario de 2% en los varones y 3% en las mujeres.

De este modo, el aumento de las concentraciones de c-HDL ha pasado a ser una posible estrategia terapéutica para reducir la tasa de incidencia de enfermedad coronaria (Kontush A et al., 2006, Puntoni M et al., 2006). Existen múltiples mecanismos mediante los cuales el c-HDL puede proteger frente al desarrollo de la aterosclerosis (Ikenaga M et al, 2016): 1) participación en el transporte inverso del colesterol (Zhang Y et al, 2003); 2) efecto antioxidante, que inhibe la oxidación de las LDL por lo que podrían interferir con la internalización de LDL oxidado (Assmann G et al, 2004, Kontush A et al, 2006); 3) propiedades antiinflamatorias, al inhibir la adhesión de leucocitos a la pared arterial mediante la atenuación de la expresión de moléculas de adhesión inducida por citocinas como ICAM, VCAM y selectina E (Cockerill GW et al, 2001, Barter PJ, 2002); 4) efectos antiplaquetarios y anticoagulantes reduciendo el desarrollo de trombosis (Griffin JH et al, 2001), 5) además de reducir la disfunción endotelial y la cadena de procesos vinculados (Spieker LE et al, 2002; Norata GD, et al., 2005). Aunque según han mostrado algunos trabajos recientes, situaciones de hiperlipidemia producen cambios cuantitativos y cualitativos en el lipidoma y proteoma de las partículas de HDL, causando una situación disfuncional para la molécula, explicando la razón de la desaparición de sus numerosos efectos protectores, pero sin duda, la gran noticia es que la mayoría de estos efectos beneficiosos se recuperan al reducir el estado de hipercolesterolemia e/o hiperlipidemia (figura 1.3.) (Padró T et al, 2017).

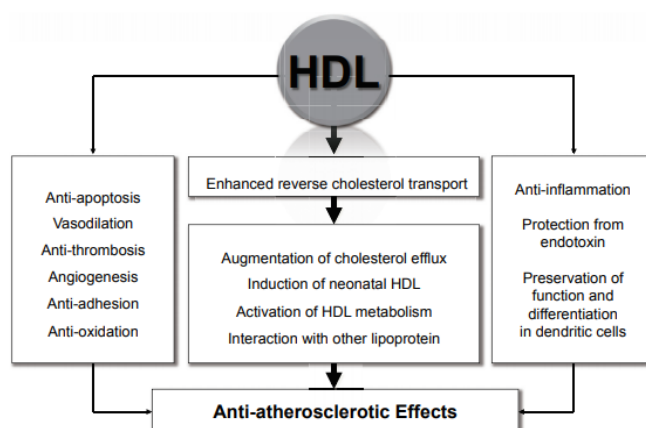


Figura 1.3. Mecanismos y efectos antiaterogénicos del c-HDL
(Padró T, et al, 2017)

El papel de los **triglicéridos (TG)** como factor independiente de riesgo de insuficiencia cardíaca ha sido siempre controvertido y, aunque se ha presentado alguna evidencia convincente, hay algunas dudas acerca del carácter independiente de la relación observada (Sarwar N et al, 2007). El exceso de tejido adiposo en la zona abdominal vinculado a hiperinsulinemia promueve la síntesis hepática de moléculas VLDL y elevación de los niveles plasmáticos de triglicéridos (Sarwar N et al, 2007; Bergman BC et al., 2018). Se produce una movilización de los ácidos grasos almacenados como triglicéridos en el tejido adiposo por la incapacidad de la insulina para suprimir la lipólisis, que lleva al aumento de ácidos grasos libres en el organismo, habiendo necesidad de producir moléculas remanentes de colesterol. Es decir, en el hígado de los pacientes con resistencia a la insulina, la síntesis y almacenamiento de triglicéridos aumentan y el exceso de triglicéridos se secreta como moléculas de VLDL (Foster MC et al, 2010). Los niveles elevados de triglicéridos se corresponden con las elevaciones de remanentes de VLDL, IDL y quilomicrones, y éstos a su vez, han mostrado actividad aterogénica (NCEP, 2001). Además, elevados niveles plasmáticos de triglicéridos también se han asociado con otros factores de riesgo cardiovascular como sobrepeso u obesidad, además de la hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y/o diabetes. También con factores ambientales como inactividad física, tabaquismo, ingesta de alcohol o dietas ricas en carbohidratos (más del 60% del total de la energía) (figura 1.4). Las concentraciones para triglicéridos superiores a 150 mg/dL tienen significación clínica en el diagnóstico de Síndrome metabólico (NCEP, 2001).

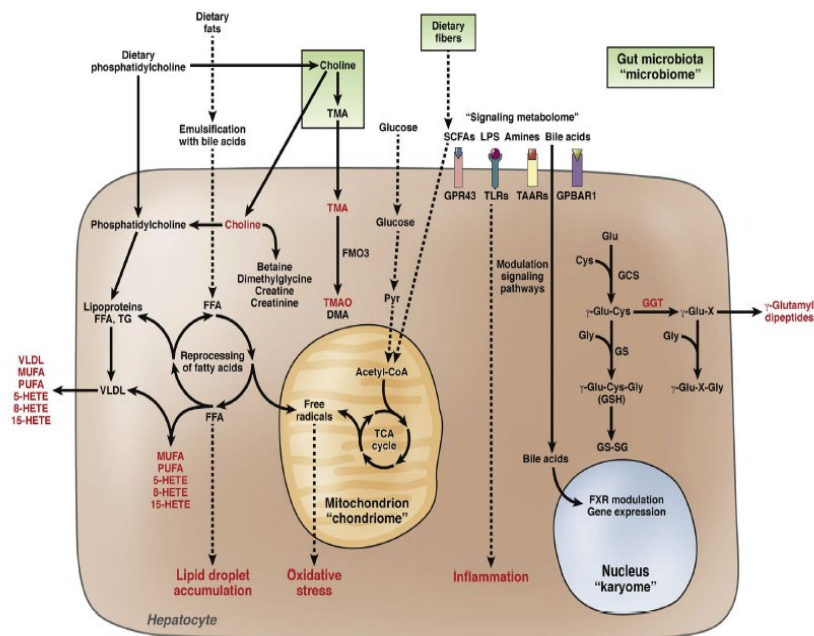


Figura 1.4. Marcadores metabólicos de la dislipemia

DMA, dimethylamine; FFA, free fatty acid; FXR, farnesoid X receptor; GCS, g-glutamylcysteine synthetase; GGT, g-glutamyltransferase; GPBAR1, G protein-coupled bile acid receptor 1; GPR43, G protein-coupled receptor 43; GS, glutathione synthase; GS-SG, oxidized glutathione; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; LPS, lipopolysaccharide; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SCFAs, short-chain fatty acids; TAARs, trace amine-associated receptors; TCA, tricarboxylic acid cycle; TG, triglyceride; TLRs, Toll-like receptors; VLDL, very-low-density lipoprotein (NCEP, 2002).

La **presión arterial** es el tercer parámetro considerado en el diagnóstico de Síndrome metabólico, la presión arterial se reconoce como la medición de la fuerza ejercida contra las paredes de las arterias, a medida que el corazón bombea sangre a través del cuerpo. La hipertensión es el término empleado para describir la presión arterial alta con una frecuencia de repetición que supone un riesgo (Bromfield S et al, 2013; Magder S, 2018). Las lecturas de la presión arterial generalmente se dan como dos números. El número superior se denomina presión arterial sistólica y el número inferior, presión arterial diastólica. Y se reconocerá que se sufre de PA elevada cuando uno de estos números o ambos están demasiado altos. Según la última guía para pacientes con hipertensión publicada por el Colegio Americano de Cardiología (ACC) y la Asociación Americana del Corazón

(AHA) en 2017 (Whelton PK et al, 2017; Whelton PK et al, 2018; Whelton PK, 2019), los valores para PA sistólica y diastólica son:

- La presión arterial sistólica (PAS) se encuentra igual o mayor a 130 mmHg
- La presión arterial diastólica (PAD) es igual o superior a 80 mmHg

Muchos factores son reconocidos como posibles causas que pueden afectar a la presión arterial, entre ellos encontramos:

- La cantidad de agua y de sal que fluctúa por nuestro organismo
- El estado de los riñones, el sistema nervioso y/o los vasos sanguíneos
- Alteraciones de los niveles de hormonas que producimos

Es muy probable que conforme envejecemos nos indiquen que la presión arterial empieza a estar elevada o sus niveles superan los valores ideales. Esto se debe a que los vasos sanguíneos se vuelven más rígidos con la edad, provocando el aumento de los niveles. La hipertensión arterial aumenta la probabilidad de sufrir un accidente cerebrovascular, un ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal o muerte prematura (Muntner P et al, 2017). Además del factor natural del envejecimiento, encontramos otros factores que tiene relación directa con sufrir un riesgo superior a tener hipertensión arterial: etnia afroamericana, presencia de obesidad, estar estresado o ansioso con frecuencia, beber demasiado alcohol (>1 copa mujeres/día y >2 copas hombres/día), exceso de sal en las comidas, antecedentes de hipertensión arterial, presencia de diabetes, ser fumador (Magder S, 2018).

Y finalmente, también cuando se produce **el incremento de la glucemia** en sangre de manera continuada y/o permanente debido a la **resistencia a la insulina** (también diabetes) en el que el organismo se ve incapaz de asimilar la glucosa de la sangre por la pérdida de la funcionalidad del páncreas en la producción de insulina. Está es, por tanto, la última característica en la definición armonizada de síndrome metabólico por consenso de todos los grupos profesionales vinculados, y tal como consideran las últimas investigaciones, posiblemente sea el factor detonante de la patología metabólica en sí misma (Brown AE y Walker M, 2016). Así pues, se considera que tanto la resistencia a la insulina, como el propio Síndrome metabólico son poderosos factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. La resistencia a la insulina suele ir acompañada de muchas otras condiciones clínicas, como la obesidad, lipidostrofia o dislipemias y exceso de glucocorticoides. De ahí a que en la definición de Síndrome metabólico tres de los factores que lo diagnostican se interrelacionen entre sí mismos, tal como ocurre

con la obesidad, dislipemias e hiperglucemias. La diabetes es considerada una enfermedad crónica derivada principalmente de la resistencia a la insulina por tiempo prolongado. Es reconocida por haber niveles elevados de glucemia en la sangre. La diabetes es la forma más común de esta enfermedad y se desarrolla consecuentemente en el tiempo. La diabetes viene provocada por el fallo en la actividad normal de las células β -pancreáticas. La insulina es una hormona producida en el páncreas por células especiales, las llamadas beta o β -pancreáticas. La insulina transporta las moléculas de glucosa del torrente sanguíneo hasta el interior de las células. Dentro de las células, las moléculas de glucosa pueden ser almacenadas y posteriormente utilizadas como fuente de energía. Cuando se sufre de diabetes, los adipocitos, los hepatocitos y las células musculares no responden de manera correcta a dicha insulina. De ahí a que se mencione continuamente la resistencia a la insulina, por ello, la diabetes siempre implica resistencia a la insulina sin su correspondiente tratamiento, pero no implica que todas las resistencias a la insulina son en sí diabetes. En este sentido, la molécula de glucosa no podrá pasar al interior de las células produciéndose una acumulación de la glucosa en el torrente sanguíneo, respondiendo al concepto de hiperglucemia.

Los antecedentes familiares y los genes juegan un papel importante en la capacidad de heredabilidad de resistencia a la insulina y de diabetes. Además de la importancia creciente en la última década de mantener estilos de vida saludables, que promuevan la actividad física, así como una dieta adecuada, variada y suficiente, previniendo el exceso de tejido adiposo en el organismo y demás alteraciones metabólicas vinculadas (Rosen ED, 2016). Para confirmar el diagnóstico, se recomienda la realización de exámenes de sangre, así como pruebas determinadas. Dentro de los exámenes de sangre encontramos: 1) Nivel de glucemia en ayunas. Se diagnostica diabetes si el resultado es mayor a 126 mg/dL en dos momentos diferentes. 2) Examen de hemoglobina A1c. Se diagnostica diabetes si el resultado del examen es 6,5% o superior. 3) Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). Se diagnostica diabetes si el nivel de glucosa es superior a 200 mg/dL 2 horas después de ingerir una bebida azucarada especial. Para la definición del Síndrome metabólico se considerará el valor de la glucemia siempre que es superior a 100 mg/dL ($\geq 5,6$ mmol/l) (Rosen ED, 2016). Una vez descritos los valores considerados en el síndrome metabólico y su interrelación, valoraremos el papel del estilo de vida y hábitos de nuestro día a día que pueden ser determinantes en la aparición, evolución y tratamiento del propio Síndrome metabólico y sus factores de riesgo. Por supuesto, el tratamiento a sugerir incluirá variables de estilo de vida, como el control de la ingesta calórica y realizar actividad física. Sin embargo, el tratamiento farmacológico es frecuentemente necesario (Fox CS, et al, 2015).

1.3 Genética y epigenética del síndrome metabólico, SNP vinculados a síndrome metabólico

En los últimos veinte años, los datos del Proyecto Genoma Humano y el advenimiento de las ciencias ómicas han revolucionado las ciencias biomédicas, aumentando el potencial para investigar los mecanismos moleculares de las enfermedades (Gibbs RA et al., 2020; Lee C et al., 2021; Lappalainen T et al., 2019). Este esfuerzo impactó las reglas de la investigación, la metodología del descubrimiento biológico y la informatización de la investigación biomédica (November J et al., 2018; Tanjo T et al., 2021; Tong L et al., 2022; Bravo-Merodio L et al., 2021). Por lo tanto, actualmente tenemos nuevas herramientas genómicas para investigar nuevos biomarcadores para monitorear la salud y el riesgo de enfermedad, así como una gran oportunidad para traducir la genómica del campo de investigación a la atención clínica (Manolio TA et al., 2016; Goddard KAB et al., 2022). Esto ha acelerado el progreso hacia la llamada "medicina de precisión" (Ashley EA et al., 2016; Cutler DM 2020; Schaffhausen J, 2017). Sin embargo, todavía se necesita investigación adicional para lograr sus promesas predictivas y personalizadas. Además, el término "salud de precisión" abarca enfoques más amplios que ocurren fuera del entorno clínico, como la prevención de enfermedades, los esfuerzos de promoción de la salud y la entrega de intervenciones de salud individualizadas a las personas apropiadas en el momento adecuado (Feero WG et al., 2017; Meagher KM et al., 2017; Viana JN et al., 2021).

Para lograr una *salud de precisión*, es necesario realizar una investigación exhaustiva de las condiciones y biomarcadores de un individuo utilizando una variedad de tecnologías de medición. Además, es importante tener en cuenta que el riesgo de una persona de desarrollar una enfermedad se ve afectado no solo por su genoma (susceptibilidad genética) sino también por la exposición a factores ambientales (el llamado exposoma en una definición amplia) (Corella D et al., 2005; Barouki R et al., 2018; Vineis P et al., 2020). En términos de biomarcadores de ADN, además de los biomarcadores basados en cambios en la secuencia de ADN, como los polimorfismos de nucleótido único (SNP), los biomarcadores epigenómicos son actualmente de gran interés (Wang KC et al., 2018; Mehrmohamadi M et al., 2021). No implican cambios en la secuencia de ADN, sino más bien una serie de marcas epigenéticas de diferentes tipos (Kronfol MM et al., 2017; Corella D et al., 2017). Estas modificaciones epigenéticas también pueden tener un efecto importante sobre la expresión génica y varias de ellas se han asociado con un mayor riesgo de aparición de enfermedad (Zhang W et al., 2018; Reichard J et al., 2021).

Estudios recientes sobre aspectos metabólicos muestran cada vez con mayor consistencia, que el riesgo de un individuo de desarrollar enfermedades metabólicas no sólo depende de factores asociados al estilo de vida, sino que también está asociado a factores genéticos, y conocerlos permite un aumento en la eficacia y en la eficiencia del diagnóstico y tratamiento (Ingelsson E et al., 2018).

1.3.1. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)

Los primeros estudios genéticos familiares proporcionaron pruebas sólidas de una base genética tanto para la resistencia a la insulina como para los componentes individuales del Síndrome metabólico (Lehtovirta M et al, 2005; Lin HF et al, 2005; Bellia A et al, 2009), y desde entonces, los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) y la identificación de las variantes, tanto comunes (definidos por una frecuencia de alelos menores (MAF) $>5\%$ como raras (MAF $<0,5\%$), permitiendo vincular dichas variantes genéticas con rasgos asociados a la enfermedad. Los últimos hallazgos mediante GWAS y más recientemente, los estudios de asociación del epigenoma completo (EWAS) realizados en relación con el Síndrome metabólico permiten abordar esta patología desde varios enfoques. Modificaciones en la dieta y el estilo de vida, además de otros factores, se identifican como las primeras herramientas a utilizar para el abordaje del Síndrome metabólico, pudiendo promover modulaciones beneficiosas en los fenotipos que lo componen.

Los fenotipos de riesgo o propias patologías pueden ser de origen monogénico, definiéndose como el resultado de una sola mutación genética, es decir, un cambio en un gen o una región cromosómica más grande que abarca varios genes (Rohde K et al., 2019), pudiendo clasificarse en sindrómico o no sindrómico, dependiendo de si presenta conjuntamente a su anomalía otro fenotipo o es consecuente del mismo, (Kaur Y et al., 2017), o de si afecta a la regulación de vías metabólicas clave (Saeed S et al., 2018; Ingelsson E et al., 2018). La mayor parte de las enfermedades genéticas comunes en la población no presentan un modo de herencia mendeliano, no son monogénicas, es decir, no existe un único gen responsable de la enfermedad, sino que suelen ir moduladas por factores ambientales (interacción gen-ambiente) o por diversos genes (interacción gen-gen), siendo los modelos genéticos más realistas aquellos que consideran que uno o varios genes con uno o varios polimorfismos o SNPs tienen un efecto sobre el riesgo de aparición de una enfermedad, pudiendo haber una interacción entre ellos y entre factores no genéticos. Se hablará de que un rasgo es poligénico cuando hay diversos genes que contribuyen a un fenotipo, y se considera multifactorial cuando

los genes interaccionan con factores ambientales a su vez (Ordovás JM et al., 2004).

1.3.2. Estudios de asociación de epigenoma completo (EWAS)

Si bien las perturbaciones genéticas juegan un papel importante en la determinación de la susceptibilidad individual a la obesidad, el papel del medio ambiente y las interacciones Gen x Ambiente/Entorno (GxE) están recibiendo una atención exponencial en los últimos años, la epigenética empieza a alcanzar los niveles esenciales en la explicación y conocimiento del desarrollo del Síndrome metabólico, obesidad y comorbilidades relacionadas. En este sentido, los mecanismos epigenéticos son modificaciones previas o posteriores a la traducción que regulan la actividad génica sin cambiar la secuencia genómica (Morris JR, 2001; Wu CT et al., 2001; Rohde K et al., 2019).

La epigenética ofrece una explicación lógica para la creciente epidemia de obesidad y de Síndrome metabólico en las últimas décadas si hablamos del genoma. En organismos multicelulares como los humanos, el código genético es homogéneo en todo el cuerpo, pero la expresión del código puede variar en los diferentes tipos de células. La epigenética es el estudio de los cambios regulatorios heredables en la expresión genética sin alteraciones en la secuencia de nucleótidos (Jaenisch R et al., 2003; Thaker VV, 2017; Rajamoorthi A et al., 2022).

Como modificaciones epigenéticas encontramos:

- a) El empaquetamiento diferencial del ADN que permite o silencia la expresión de ciertos genes a través de los tejidos,
- b) Los factores ambientales y dietéticos o la microbiota intestinal que pueden influir en la programación epigenética de los gametos parentales, el feto y el desarrollo postnatal temprano,
- c) A través de los diversos períodos de la vida para influir en la programación epigenética

Los mecanismos epigenéticos conocidos actualmente que modulan los cambios epigenéticos mencionados incluyen (Lopomo A et al., 2016; Corella D et al., 2018): A. la metilación; B. las modificaciones de histonas; C. la regulación mediada por microARN. El conocimiento de estos mecanismos epigenéticos en las células germinales puede influir en la regulación transcripcional, las trayectorias de desarrollo celular y crecimiento hasta ser adultos y la posibilidad de determinar el riesgo de ocurrir una enfermedad en la descendencia. Las exposiciones ambientales

pueden influir en el riesgo de enfermedad metabólica, de hecho, según recientes trabajos, las experimentadas durante la vida intrauterina influyen en la edad adulta. También se ha observado que la enfermedad metabólica en los padres adultos podría modular la regulación epigenética en las células germinales, influyendo en la salud de las siguientes generaciones (Sales VM et al., 2017). Estas modificaciones epigenéticas también pueden tener un efecto importante sobre la expresión génica y varias de ellas se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad (Zhang W et al., 2018; Reichard J et al., 2021).

A. Metilación

La marca epigenética que más se ha estudiado es la metilación del ADN (transferencia de un grupo metilo de S-adenosil metionina a residuos de citosina en la posición de carbono 5 (5-metilcitosina [5-mC]), que ocurre principalmente en el contexto de dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina (CpG) (Mattei AL et al., 2022). Además, la metilación del ADN en varias CpG es un cambio epigenético dinámico (Luo C et al., 2018; Xiao FH et al., 2019). Varios estudios han demostrado que estas marcas de metilación del ADN son reguladores importantes de funciones relevantes y están relacionadas con el riesgo de enfermedad (Jin Z et al., 2018). Numerosos estudios epidemiológicos han reportado asociaciones entre varios sitios de metilación del ADN y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes, obesidad, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Zhong J et al., 2016; Ahmed SAH et al., 2020; Mahmoud AM, 2022; Nishiyama A et al., 2021; Sanchez-Mut JV et al., 2016; Delgado-Morales R et al., 2017; Wielscher M et al., 2022). A pesar de esto, los resultados de los sitios de CpG encontrados en los diversos estudios siguen siendo no concluyentes; indicando que se necesita más investigación.

Además del riesgo de enfermedad, la metilación diferencial del ADN se ha relacionado con exposiciones ambientales (Prunicki M et al., 2021; Schrott R et al., 2022; Martin EM et al., 2018). Entre las exposiciones del entorno, destacan los resultados causados por el tabaquismo, ya que, al fin y al cabo, es una exposición prolongada a más de 4.600 compuestos, incluidos muchos carcinógenos probados o sospechosos (Paumgartten FJR et al., 2017). En el apartado de variables de estilo de vida, que incluye tabaquismo, se comentan algunos ejemplos de los cambios de metilación producidos al fumar.

B. Modificaciones de histonas

Las histonas son las proteínas responsables del empaquetamiento del ADN, formadas por un dominio globular y un dominio de cola N-terminal. Las colas N-terminales sobresalen y están expuestas a las modificaciones posttraduccionales: la

metilación, la acetilación, la ubiquitinación y la fosforilación. Dependiendo de la combinación de estas reacciones, el ADN estará disponible para los procesos de traducción, reparación, replicación y recombinación (Bannister AJ et al., 2011). Entre las diferentes formas de modificación de histonas, la acetilación se asocia generalmente con la transcripción activa de genes (Xu F et al., 2005), mientras que el papel de la metilación depende específicamente del sitio y de grados (es decir, mono, di o tri-metilación) (Ruthenburg AJ et al., 2007; Wang Y et al., 2009). Aunque cada modificación de histona individual tiene su propia función, diferentes modificaciones también funcionan en combinación para ajustar la expresión génica. Las modificaciones de histonas están involucradas en la regulación epigenética de numerosos procesos celulares, destacando su papel en el desarrollo de la obesidad y comorbilidades asociadas (Sharma S et al., 2010).

Dentro de los mecanismos epigenéticos que modifican las histonas, la metilación del ADN adquiere una importancia clave, ofreciendo la medición cuantitativa (entre 0 y 100%) en casi 30 millones de sitios en todo el genoma. Esta característica explica en parte la popularidad de la metilación del ADN en los estudios genéticos más recientes (Allum F et al., 2020). En la metilación del ADN, las metiltransferasas de ADN (DNMT) pueden agregar un grupo metilo a una citosina con una guanina como el siguiente nucleótido (islas CpG). Estas islas CpG se encuentran con frecuencia en las regiones promotoras de los genes, y la adición de un grupo metilo actúa como un obstáculo estérico para la unión de los factores de transcripción y la expresión del gen: por lo general, la hipermetilación está asociada con la represión transcripcional y la hipometilación con la activación (Thaker VV, 2018). Los cambios de metilación de genes candidatos se han visto implicados en las situaciones de obesidad, de control del apetito y del metabolismo, de la capacidad de señalización de la insulina, la inmunidad, la inflamación, el crecimiento y la regulación del reloj circadiano (Lopomo A et al., 2016).

En la actualidad, los tipos de análisis de metilación del ADN se clasifican en función del tamaño y/o cantidad del genoma en el que se centra el análisis, por ello, encontramos análisis que se vinculan al genoma completo o a variantes genéticas y/o genes candidatos en fenotipos de riesgo de Síndrome metabólico (Allum F et al., 2020). El objetivo es combinar toda la información que aporta la variación genética, la expresión génica y la metilación del ADN pudiendo llegar a comprender mejor las relaciones potencialmente causales con la presencia de ciertos rasgos clínicos (Rohde K et al., 2019).

C. Regulación mediada por microARN

Los micro-ARN (miARN) son secuencias cortas de ARN no codificantes de 18 a 25 nucleótidos de largo capaces de regular las expresiones génicas mediante

silenciamiento génico y cambios postranscripcionales (Pasquinelli AE, 2012). Se sabe que los procesos vitales críticos como el crecimiento rápido, la replicación celular, la diferenciación y la maduración de los órganos ocurren desde la concepción hasta el nacimiento, por tanto, las perturbaciones durante este período crítico de desarrollo pueden tener efectos duraderos en la descendencia (Bansal A et al., 2018). Estas perturbaciones o modificaciones que influyen en el linaje y en la expresión de genes específicos de tejido, son biológicamente estables y generalmente se mantienen durante toda la vida. Aunque, algunas de estas modificaciones pueden verse influenciadas por distintos factores y reprogramarse. Estos factores se clasifican en extrínsecos (como la dieta, actividad física, ambiente intrauterino, exposición química y estrés) e intrínsecos (determinados genéticamente) (Ling C et al., 2019).

1.3.3. Interacciones Gen X Entorno/Ambiente (GxE)

Debido a la genética, los individuos responden de manera diferente al mismo estímulo ambiental. La interacción gen-ambiente se refiere a los diferentes efectos fenotípicos de ambientes diversos sobre individuos con el mismo genotipo, o bien, a los efectos discrepantes del mismo ambiente sobre individuos con diferente genotipo (Hunter DJ, 2005). Es necesario comprender las interacciones entre los polimorfismos asociados con la patología y los moduladores ambientales del riesgo para dicho fenotipo o rasgo de estudio. Tanto en Síndrome metabólico como en sus criterios de definición y/o factores que lo definen, también existe cierta modulación por factores de confusión como la edad, el sexo, la actividad física, la dieta, el estado socioeconómico, el educativo y el origen étnico. La determinación de variaciones genéticas desfavorables puede compensarse con cambios de comportamiento, como la mejora de la dieta y la actividad física y otros parámetros de estilo de vida (Huang T et al., 2015), permitiendo una mejor comprensión en la etiología de la enfermedad. Y aunque es poco probable que las interacciones GxE contribuyan significativamente a la predicción del riesgo (Aschard H et al., 2012), sí que parecen explicar algunas de las líneas de herencia faltantes, lo que subraya la importancia de la epigenética como mediador potencial para GxE (Kaprio J, 2012). Si consideramos la diversidad metabólica de la obesidad, es muy probable que las modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN representen uno de los factores determinantes y puedan constituir otro nivel de regulación en la mediación del riesgo de enfermedad (Rohde K et al., 2019).

1.3.4. Genética de síndrome metabólico

En la última década, hemos avanzado en el desarrollo de la genética humana, hemos pasado de los estudios basados en genes candidatos que generaban pocas asociaciones genotipo-fenotipo replicadas consistentemente, a la determinación de múltiples loci fuertemente asociados con resultados médicos. Esto es gracias a los cada vez más completos metanálisis de estudios de GWAS y a la evolución de programas matemáticos y análisis estadísticos. Los estudios de asociación de todo el genoma o GWAS proporcionan información transformadora sobre la genética de Síndrome metabólico y otros rasgos complejos relacionados como la resistencia a la insulina, destacando el alcance de la poligenidad y los pequeños tamaños de efecto de muchos alelos de riesgo comunes (Ingelsson E, 2018). 300 loci se han asociado sólidamente con diabetes y más de 500 con IMC, relación cintura-cadera y otros rasgos propios de la obesidad y de la diabetes. Se sabe que la genética de los fenotipos complejos se caracteriza por una gran cantidad de variantes causales, la mayoría de ellas con solo un pequeño efecto aditivo sobre el riesgo. Esta poligenicidad extrema (u omnigenicidad) de rasgos complejos no significa necesariamente que los hallazgos de GWAS no puedan traducirse en nuevas terapias, pero aumenta sustancialmente el esfuerzo requerido para establecer y caracterizar las causas variantes, genes y vías (Ingelsson E, 2018). La mayoría de los GWAS hasta la fecha han examinado asociaciones de variantes con los componentes individuales del Síndrome metabólico, con al menos 56 loci asociados de forma reproducible con la obesidad, 157 con lípidos y más de 90 loci asociados con hipertensión, así como los numerosos loci asociados con la propia diabetes o resistencia a la insulina (Stancakova A et al., 2014).

1.3.4.1 GWAS en síndrome metabólico

El primer GWAS que examinó la variación genética común en el Síndrome metabólico no pudo determinar las bases genéticas comunes para el Síndrome metabólico, posiblemente por tratarse de muestra con origen indio-asiático (Zabaneh D et al., 2010). Posteriormente se realizó un nuevo GWAS en una población europea que examinaba la asociación de aproximadamente 2,5 millones de SNP con el Síndrome metabólico en su conjunto o con pares de rasgos/fenotipos específicos. Se identificaron distintas variantes cerca de BUD13, ZNF259, APOA5, LPL y CETP en una muestra de 22.161 individuos. Estas variantes se

asociaban a Síndrome metabólico y otras 27 se asociaron con combinaciones de pares de rasgos (Kraja AT et al., 2011). Trabajos posteriores adoptaron un enfoque diferente que implicaba la agrupación de rasgos metabólicos en seis dominios fenotípicos que abarcaban 19 rasgos cuantitativos. Utilizando datos de 19.486 individuos europeos y 6287 afroamericanos, identificaron tres nuevos loci asociados con más de un dominio de fenotipo, APOC1, BRAP y PLCG1, así como confirmando asociaciones de variantes cerca de GCKR, ABCB11, LPL, HNF1A, FTO y SUGP1 con múltiples dominios fenotípicos (Avery CL et al., 2011). Un estudio en cuatro cohortes finlandesas que abarcó a 11,616 individuos identificó un SNP, rs964184, cerca del grupo de genes APOA1/C3/A4/A5 en el cromosoma 11 como asociado con el Síndrome metabólico que confirma un fuerte componente del gen lipídico a la genética del Síndrome metabólico (Kristiansson K et al., 2012). Es posible las ligeras discordancias que residen en la definición de Síndrome metabólico para su uso en GWAS genere diferencias en algunos resultados haciendo uso de los GWAS, pero claramente muchos de los genes que han sido identificados están asociados con rasgos comunes. Por ejemplo, las variantes cercanas a ZNF259, APOB, LPL, APOA5, CETP y GCKR han sido asociadas previamente con colesterol LDL, HDL o triglicéridos, así como con la resistencia a la insulina (Waterworth DM et al., 2010; Brown AE et al., 2016).

1.3.4.2 EWAS en síndrome metabólico

Los miARN juegan un papel importante en varios procesos biológicos, como en la adipogénesis, y se ha demostrado que están asociados con características de Síndrome metabólico, como la resistencia a la insulina y la inflamación de bajo grado que se observa en las personas con obesidad (Cruz KJC et al., 2017). Por tanto, el Síndrome metabólico o enfermedad metabólica surge de la confluencia de factores genéticos y ambientales, como la nutrición y/o dieta, el ejercicio, la exposición química, el comportamiento y el microbioma (Sales VM et al., 2017). Aunque sólo entre el 5 y el 10% del riesgo puede atribuirse a los factores genéticos, siendo necesario determinar la predisposición heredada a padecer la patología. Parte de los orígenes del desarrollo de la enfermedad del adulto proponen que, durante la vida intrauterina, el feto sufre adaptaciones al medio, lo que confiere cierta resistencia a exposiciones similares experimentadas después del nacimiento (Barker DJ, 2000). Destacando el estado nutricional y de salud de los progenitores posibilitando cierta predisposición al Síndrome metabólico (Rodgers AB et al., 2015; Stanford KI et al., 2015; Stanford KI et al., 2015; Chambers TJ et al., 2016; Hanafi MY et al., 2016). También diversos estudios trataron la evidencia de que la célula germinal aislada puede mediar el grado de enfermedad, pudiendo

transmitir fenotipos metabólicos a la descendencia a partir de distintos nutrientes (Huypens P et al., 2016). Aunque todos estos datos deben interpretarse con precaución ya que deben realizarse números estudios que permitan visualizar los resultados necesarios sobre los niveles de expresión génica, así como la medición de la influencia de las modestas diferencias de metilación del ADN (<10%), que en la actualidad son observadas en poblaciones de células mixtas en la mayoría de trabajos de investigación (Bansal A et al., 2018). Necesitamos integrar estos conocimientos para comprender los posibles efectos y/o consecuencias que derivan del epigenoma, ya que formula la base para la transmisión del riesgo de patología metabólica. En este conjunto de patologías asociadas al Síndrome metabólico, la metilación diferencial del ADN se ha relacionado con exposiciones ambientales y el aumento del riesgo de aparición de las mismas (Prunicki M et al., 2021; Schrott R et al., 2022; Martin EM et al., 2018).

1.3.5. Genética de la obesidad

La obesidad se define como un estado patológico caracterizado por el exceso o acumulación excesiva de tejido adiposo. Este exceso de tejido adiposo puede ser debido por el aumento del tamaño de los adipocitos (obesidad en adultos) o bien por el aumento del número de adipocitos (obesidad infantil) (Rosen ED et al., 2014; Choe SS et al, 2016). Los adipocitos permiten que se produzcan funciones biológicas como la homeostasis energética y la reproducción. La grasa proporciona nutrientes y señales y activación de mecanismos hormonales que regulan el eje hipotálamico-pituitario-gonadal tanto en hombres como en mujeres; además de la evidencia de que tras el bloqueo de la reproducción aumenta la adiposidad en muchas especies (Michalakis K et al., 2013). El tejido adiposo también tiene importantes propiedades mecánicas, como la protección de órganos delicados y la amortiguación de partes del cuerpo expuestas a estrés mecánico (los talones). Aunque la función más importante es la de regular el metabolismo energético y la homeostasis nutricional (Rosen ED et al., 2014).

La idea de que la obesidad puede ser un estado endógeno del organismo fue presentada a principios del siglo XX, en la que la mayoría de resultados provenían de estudios realizados en gemelos, y de ahí a la idea inicial de que la *obesidad* es en parte condicionada por la genética. En una revisión sistemática que abarcaba los resultados obtenidos en gemelos, se detectaron heredabilidades variables respecto al peso a lo largo de la vida con un efecto general entre 45-90% (Silventoinen K et

al., 2010). Aunque en la actualidad, el aumento de la prevalencia de Síndrome metabólico y obesidad son las pruebas irrefutables de que las variaciones en el ambiente influyen en las adaptaciones con las que responde el organismo. No obstante, siempre existe la variación individual, ya que la propia adiposidad está influenciada por interacciones complejas entre las influencias genéticas, de desarrollo, de comportamiento y del propio ambiente (Thaker VV, 2017).

Los avances en ciencias ómicas han permitido definir de manera precisa lo que suponen los cambios de un solo nucleótido en cuanto a mecanismos moleculares de la regulación del peso y factores relacionados. La secuenciación de alto rendimiento con exoma completo, genoma y secuenciación dirigida de manera individualizada, así como en cohortes de distintos rangos de edad con obesidad severa ha posibilitado la identificación de aberraciones genéticas raras o poco comunes. Además de aportar información sobre la fisiopatología de la regulación del peso, permitiendo que algunas de las etiologías tengan el potencial de tratamiento para individuos seleccionados. A su vez, estudios recientes en organismos modelo han definido con mayor consistencia las modificaciones epigenéticas que pueden desempeñar un papel en la modulación del peso. Esta serie de hitos recientes ha permitido que sea posible indicar que las causas genéticas de la obesidad podrían ser clasificadas en monogénicas y poligénicas, dependiendo del número de mutaciones asociado al fenotipo. Los genes identificados para la obesidad monogénica interrumpen el sistema regulador del apetito y del peso. La mayoría de las mutaciones requieren 2 copias disfuncionales del gen en forma homocigótica o heterocigótica compuesta para manifestar el fenotipo. En la siguiente tabla (tabla 1.6) se puede encontrar un resumen de los genes reconocidos en la actualidad cuya mutación se ve relacionada con unas consecuencias y desarrollo de características o fenotipos específicos (Thaker VV, 2017).

Tabla 1.6. Genes vinculados a la obesidad

Nombre completo	GEN	Nº MIM	MODO de HEREDABILIDAD	POSICIÓN CROMOSÓMICA
Leptina	LEP	164160	AR	7q32.1
Receptos de Leptina	LEPR	601007	AR	1p31.2
Proopiomelanocortina	POMC	176830	AR	2p23.2
Receptor 4 de Melanocortina	MC4R	155541	AD/AR	18q21.32
Single-minded Homólogo-1 (Drosophilla)	SIM1	603128	AD	6q16.3

Nombre completo	GEN	Nº MIM	MODO de HEREDABILIDAD	POSICIÓN CROMOSÓMICA
Receptor Neurotrófico de Tirosina Quinasa Tipo 2	NTRK2	600456	AD	9q21.33
Supresor quinasa de Ras2	KSR2	610737	AD	12q24.22-q24.23
Carboxypeptidasa	CPE	114855	AD	4q32.3
Proconvertasa 1	PCSK1	162150	AR	5q15
Factor Neurotrópico derivado del cerebro	BDNF	113505	AD	11p14.1
Proteína adaptadora SH2B	SH2B1	608937	AD	16p11.2
<i>Tubby</i> , Homólogo de ratón	TUB	601197	AR	11p15.4

AD= Autosómica dominante, AR = Autosómica recesiva

La mayoría de las personas obesas desarrollan la obesidad poligénica u "obesidad común", reconocida por su origen multifactorial, que se atribuye a la interacción entre múltiples loci (poligénicos), aunque cada uno con efectos bastante pequeños por sí mismos sobre el entorno "obesogénico". Entre el 2-3% de la obesidad común se atribuye principalmente a mutaciones codificantes heterocigotas en los genes mencionados y el fenotipo de obesidad y su nivel de relevancia es dependiente del grado de influencia y adaptación a los factores ambientales por parte del individuo (Huvenne H et al., 2016; Rohde K et al., 2019).

1.3.5.1 GWAS en obesidad

La evolución y rápido progreso de los GWAS ha llevado al descubrimiento de más de 870 SNPs fuertemente asociados con el IMC, como variable de selección para discernir los grados de obesidad (Rohde K et al., 2019). Los resultados indicaron que a pesar de la identificación de cientos de loci asociados con la obesidad, únicamente son capaces de explicar el 5% de la varianza del IMC (Yengo L et al., 2018). Sin embargo, los últimos avances han demostrado

claramente que los loci asociados con la obesidad conllevan genes involucrados en las vías que afectan los neurocircuitos de la regulación del apetito y la saciedad (BDNF, MC4R y NEGR) (Boender AJ et al., 2012; Horstmann A et al., 2013; Ho EV et al., 2016; Rohde K et al., 2019), secreción de insulina y acción (TCF7L2, IRS1) (Kilpeläinen TO et al., 2011; Locke AE et al., 2015), adipogénesis (Shungin D et al., 2015) y el metabolismo energético y lipídico (FTO, RPTOR, MAP2K5) (Frayling TM et al., 2007; Kilpeläinen TO et al., 2011; Locke AE et al., 2015). Además, los análisis de ontología génica en genes que se superponen con enfermedades relacionadas con la obesidad (diabetes, hipertensión, enfermedad coronaria) han revelado "módulos genéticos" que proporcionan vías comunes de ontología génica compartida (GO) para estas enfermedades (Su LN, et al., 2017). También debemos mencionar, que varios polimorfismos comunes en genes como PCSK1, MC4R y POMC han sido fuertemente asociados con la obesidad poligénica en poblaciones étnicamente diversas (Benzinou M et al., 2008; Choquet H et al., 2013; Rouskas K 2011; Ho EV et al., 2016).

Los GWAS revelan las variantes en común que contribuyen a la determinación de los rasgos de origen poligénico, pero evaluar el nivel de relevancia de los propios SNPs en la presencia del fenotipo es complicado. La mayoría de los SNP de "obesidad" se asignan dentro de regiones no codificantes que contienen elementos que son esenciales para la regulación génica. Aunque los genes que actúan como objetivo para la determinación de estas variantes no son necesariamente los genes a los que se les ha atribuido ese rasgo (simplemente por función de la ubicación dentro del gen). Un buen ejemplo es el caso de FTO. Se tardaron sobre 7 años en aclarar el circuito regulador y la base mecanicista de las asociaciones entre las variantes de FTO y la obesidad. Finalmente, se demostró que la FTO intrónica cuyo SNP asociado con el IMC reside dentro de un elemento potenciador para el gen ARID5B que, a su vez, regula la expresión de IRX3 e IRX5, afectando a la termogénesis, la acumulación de lípidos y la adipogénesis (Claussnitzer M et al., 2015). Se continúa trabajando y ampliando los conocimientos mediante este tipo de estudios funcionales sofisticados, bien diseñados, que permitan comprender los mecanismos moleculares subyacentes de los genes asociados con la obesidad revelados mediante los GWAS y su contribución en la comprensión de la etiología de la obesidad y de sus rasgos relacionados (figura 1.5) (Rohde K et al., 2018; Vogelezang S et al., 2020).

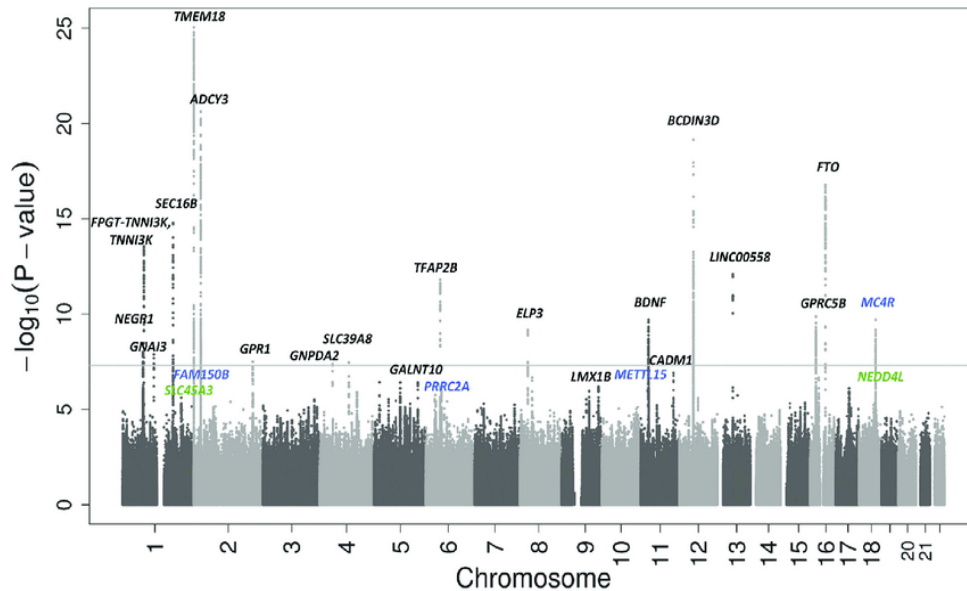


Figura 1.5. Manhattan plot de los resultados del meta-análisis de descubrimiento de 26 GWAS de estudio único

En el eje x se muestran los cromosomas. En el eje y, se muestra el log 10 del valor P . Los nuevos SNP se muestran en verde. Los SNP independientes se muestran en azul. Los SNP conocidos se muestran en negro. El límite de significación de todo el genoma de 5×10^{-8} está representado por la línea punteada gris (Vogelezang S et al., 2020).

En el caso de la obesidad, el papel de los factores genéticos y ambientales (especialmente la actividad física y la dieta) se ha abordado en numerosos estudios genéticos y epidemiológicos. El principal objetivo ha residido en comprender las interacciones entre los SNPs asociados con la obesidad y los moduladores ambientales del riesgo para dicho fenotipo, como la edad, el sexo, la actividad física, la dieta, el estado socioeconómico y educativo y el origen étnico. Por ejemplo, se ha demostrado que la actividad física reduce la predisposición genética a la obesidad por FTO (Andreasen CH et al., 2008; Ahmad T et al., 2011; Li S et al., 2010), pero también por una combinación de 12 SNP asociados a la obesidad (Li S et al., 2010). Además, los hábitos alimenticios se han estudiado ampliamente en el contexto de GxE. En el estudio “Nurses’ Health Study” (NHS) se demostró como las asociaciones genéticas con la obesidad basadas en 32 variantes de IMC fueron más fuertes entre los sujetos con mayor ingesta de bebidas azucaradas que entre aquellas con menor ingesta. Del mismo modo, que la asociación genética con la adiposidad parecía ser más pronunciada con un mayor consumo de alimentos

fritos. En la misma línea de la interacción descrita con la actividad física, este estudio demostró que la asociación genética con el IMC se fortalecía con el estilo de vida sedentario, como lo representa el aumento de las horas de mirar televisión, pero se debilitaba en los participantes con mayor actividad física (Qi Q et al., 2012; Campbell SDI et al., 2018; Rohde K et al., 2019). Se ha demostrado que las variantes individuales en FTO interactúan con los distintos tipos de dieta. Una dieta alta en proteínas tuvo efectos beneficiosos sobre la pérdida de peso y la mejora de la composición corporal en los portadores del alelo de riesgo de obesidad FTO rs1558902 (Zhang X et al., 2012). Además, los sujetos con el alelo FTO rs9939609 lograron un mejor resultado metabólico en respuesta a la pérdida de peso después de una dieta hipocalórica baja en grasas (de Luis DA et al., 2012). Indicando como desfavorables variaciones genéticas pueden compensarse con cambios de comportamiento, como los cambios en el estilo de vida (Huang T et al., 2015), permitiendo una mejor comprensión en la etiología de la enfermedad. Y aunque es poco probable que las interacciones GxE contribuyan significativamente a la predicción del riesgo (Aschard H et al., 2012), sí que parecen explicar algunas de las líneas de herencia faltantes, lo que subraya la importancia de la epigenética como mediador potencial para GxE (Kaprio J, 2012).

1.3.5.2 EWAS en obesidad

En la adipogénesis, se observa una relación entre las alteraciones de las histonas y el desarrollo de la obesidad y comorbilidades asociadas, destacando la modulación de cinco genes clave. El factor pre-adipocito-1 (Pref-1), la proteína de unión al potenciador de CCAAT β (C/EBP β), C/EBP α , PPAR γ y la proteína 2 de adipocito (aP2) son regulados por modificaciones de histonas en la fase de diferenciación de los adipocitos (Zhang Q et al., 2012; Lee JE et al., 2014; Lee JE et al., 2019). La familia de proteínas histona-desacetilasa (HDAC) juega un papel importante en la regulación de la transcripción génica en respuesta al estrés y al metabolismo energético. Un estudio sobre los distintos perfiles de expresión de cromatina de las células hepáticas en animales alimentados con una dieta rica en grasas *versus* animales alimentados con dieta de control mostró que la remodelación de la cromatina por HDAC promueve cambios en el perfil de expresión de los factores de transcripción hepática HNF α , CCAAT/proteína de unión al potenciador α (CEBP/ α) y FOXA1 (Leung A et al., 2014). También demostraron que estos cambios pueden ser irreversibles, aunque los animales vuelvan a la dieta habitual, mientras que en otras son transitorios, recalcando los matices genéticos (Leung A et al., 2016). También se ha observado una expresión

diferencial de las proteínas HDAC en el hipotálamo en los estados de ayuno/normo-alimentado/exceso-alimento u obesidad inducida por una dieta alta en grasas (Funato H et al., 2009; Thaker VV, 2017), así como un aumento y/o detrimento dependiente de la restricción calórica en la modificación de histonas para genes relacionados con la esperanza de vida (Molina-Serrano D et al., 2019). En este sentido, conocer los procesos de modificación de las histonas podría permitir una evolución en el tratamiento de las alteraciones metabólicas (Cristancho AG et al., 2011; Inagaki T et al., 2016). En la actualidad, la modulación epigenética para distintas patologías empieza a ser conocida. En obesos se detecta un aumento de la metilación de ciertos genes, así como una disminución de su expresión. El gen HIF3A (factor 3a inducible por hipoxia) se encuentra sobreexpresado en personas obesas, proporcionando evidencia directa de que la perturbación de la señalización HIF juega un papel importante en el metabolismo (Dick KJ et al., 2014; Thaker VV, 2017). De manera similar, tanto los genes LEP como POMC, prominentes en la vía de regulación del peso corporal tienen islas CpG, donde la metilación puede afectar su expresión. En un estudio para el gen LEP se encontró un aumento en la metilación en los casos con obesidad pre-embarazo (Lesseur C et al. 2013; Thaker VV, 2017). También se observó un aumento de la metilación LEP en hombres nacidos después de la exposición prenatal a la hambruna en tiempos de guerra (holandeses) en 1944-45 en comparación con sus hermanos del mismo sexo no expuestos (Thaker VV, 2018). Otros genes investigados en el contexto de obesidad y Síndrome metabólico incluyen: ADIPOQ (adiponectina), PGC1 α (coactivador del receptor activado por proliferador de peroxisoma 1 α), IGF-2 (factor de crecimiento similar a la insulina 2), IRS-1 (sustrato receptor de insulina 1) y LY86 (antígeno linfocitario 86) (Lopomo A et al., 2016).

Los marcadores epigenéticos también se han utilizado como predictores para la pérdida y/o recuperación de peso a largo plazo. En un estudio de 18 hombres que se sometieron a una pérdida de peso $\geq 5\%$ con una intervención nutricional de 8 semanas, pudo observarse que había unos niveles más altos de metilación de POMC antes de la intervención y una menor metilación de NPY en las personas que mantuvieron la pérdida de peso (Crujeiras AB et al., 2013; Yoo JY et al., 2013; Thaker VV, 2018). En los últimos años, los análisis de metilación del ADN en sitios CpG se han dado para un nivel amplio de genoma, y poder ver la posible relación la obesidad poligénica y las variables fenotípicas relacionadas con la distribución del tejido adiposo y la propia obesidad.

A pesar de la evidente relación entre los patrones epigenéticos y ciertos rasgos clínicos, la interpretación de la relación causal entre las alteraciones observadas en la metilación del ADN y la obesidad sigue sin estar clara. Las variantes genéticas pueden introducir o eliminar puntos de metilación en los grupos CG, lo que induce

cambios en la metilación del ADN en el lugar del polimorfismo o SNP. Además, los SNPs ubicados en cis o trans del sitio CpG pueden alterar la acción de las enzimas propias de la metilación. Los análisis de locus de rasgos cuantitativos de metilación (meQTLs) son una de las herramientas más valiosas para comprender si los cambios en la metilación del ADN representan:

- a) Una mediación entre la predisposición genética y las variables clínicas;
- b) las consecuencias de la interacción entre el genotipo y el fenotipo;
- c) y/o, que los efectos entre el genotipo y la metilación son independientes de las asociaciones genotipo-fenotipo

Un estudio reciente utilizó la aleatorización mendeliana y una escala de puntos para dar valor numérico a la expresión para el riesgo genético ponderado (GRS), generado por el cálculo de los SNPs que se sabe que afectan el IMC, permitiendo dilucidar si los cambios en la metilación del ADN en la sangre son causa o consecuencia de la adiposidad. Los autores encontraron una fuerte correlación entre los efectos pronosticados y observados de la puntuación de riesgo genético del IMC en la metilación ($R^2=0,65$; $p=4,7 \times 10^{-44}$) (Wahl S et al., 2017). Además, mostraron una asociación entre la escala de puntos para medir el riesgo y la metilación del ADN de ABCG1, coincidiendo con otros trabajos que sugieren que la pérdida de peso influye en la metilación, expresión y actividad proteica de ABCG1 (Johansson LE et al., 2011). Aunque se ha demostrado mediante el uso de una prueba o test de inferencia causal (TIC), que las variantes genéticas interfieren con diferentes rasgos metabólicos como el IMC, HbA1c y el colesterol HDL a través de la metilación del ADN alterado en el tejido adiposo humano (Volkov P et al., 2016). Otro estudio realizado en población europea observó que había asociación entre el aumento del IMC con una mayor metilación en el locus HIF3A en las células sanguíneas y en el tejido adiposo (figura 1.6) (Dick KJ et al., 2014). También se encontró que una variante SNP en ADCY3 estaba relacionada con la metilación del sitio CpG proximal en sangre, pero también en tejido adiposo subcutáneo (Grundberg E et al., 2013; Voisin S et al., 2015).

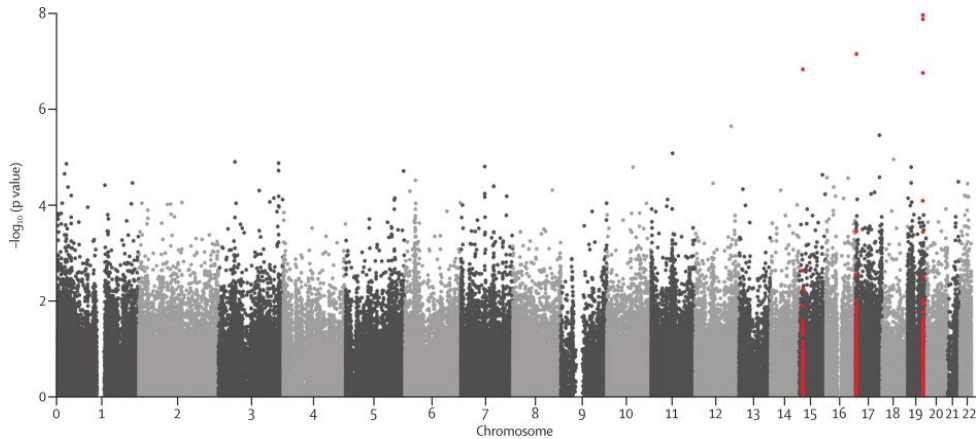


Figura 1.6. Manhattan plot que muestra la distribución de los valores de p de la asociación de sondas de metilación con el índice de masa corporal en la cohorte de descubrimiento.

Los puntos rojos indican sondas que caen dentro de KLF13 (cromosoma 15), CLUH (cromosoma 17) y HIF3A (cromosoma 19) (Dick KJ et al., 2014).

Numerosos estudios proporcionan información sobre la metilación del ADN que contribuye a la obesidad y al Síndrome metabólico principalmente a través de vías involucradas en el comportamiento alimentario y el ritmo circadiano, pero también el metabolismo de los lípidos. Las adipocinas, leptina y adiponectina, median el hambre y la saciedad, respectivamente, y la metilación del ADN en los genes LEP (en sangre) y ADIPOQ (en tejido adiposo subcutáneo o SAT, sus siglas en inglés) se asocia con niveles de colesterol, c-LDL e IMC (Houde AA et al., 2015). Además, también se ha demostrado que la masa grasa del organismo está relacionada con la metilación del ADN de estos genes (Hjort L et al., 2017). Distintos estudios también han mostrado como genes candidatos involucrados en la obesidad monogénica como POMC también están sujetos a cambios epigenéticos que contribuyen a la obesidad común o poligénica (Millington GW 2007; Kühnen P et al., 2016; Rohde K et al., 2019). Los niveles de metilación del ADN en sangre de POMC se vincularon con el IMC con niveles más altos en obesos en comparación con adultos y niños con peso normal. Además, la recuperación de peso se asocia con un aumento de la metilación de POMC, pero con niveles más bajos de metilación en sangre de NPY, siendo NPY gen relacionado con el hambre y la saciedad que controlan los péptidos leptina y grelina. También se ha detectado que en personas obesas la metilación de POMC también es mayor en las neuronas positivas para MSH (hormona estimulante de melanocitos), sugiriendo cierta

capacidad reguladora de la metilación en las distintas líneas metabólicas en las que interactúa POMC (Crujeiras AB et al., 2013; Rohde K et al., 2019).

Se ha observado que la presencia de diferentes nutrientes también se ve correlacionado con los cambios en la metilación del ADN para una variedad de genes asociados a obesidad, incluidos TNFA, IGF2/H19, LEP y genes circadianos CLOCK, BMAL1, PER2, HSD2, MCHR1, LY86 (Milagro FI et al., 2012; Hermsdorff HH et al., 2013; Drake AJ et al., 2012; Obermann-Borst SA et al., 2013; Perfilyev A et al., 2017; Su S et al., 2014).

La metilación difiere significativamente según la selección de tejidos del organismo que se vayan a analizar (Keller M et al., 2018). La mayoría de los estudios sugieren que los cambios en la metilación del ADN en el tejido adiposo subcutáneo (SAT) adquieren especial relevancia para valorar la gravedad de la comorbilidad vinculada al Síndrome metabólico con obesidad, un ejemplo de ello es el caso de TMEM18, mientras que la metilación del ADN en su región promotora es mayor en tejido adiposo visceral (VAT) que en SAT, los niveles de metilación en SAT son los que se asocian positivamente con IMC, porcentaje de masa de grasa visceral y también con parámetros metabólicos (Rohde K et al., 2014). Además, la metilación de ADIPOQ y LEP en SAT se correlacionó con un aumento de IMC, circunferencia de cintura y/o nivel de c-LDL y MCHR1 (Houde AA et al., 2015; Perfilyev A et al., 2017; Rohde K et al., 2017). Estos estudios sugieren que las diferencias de metilación de ADN específicas de genes en SAT y VAT contribuyen a la fisiopatología de la obesidad y subrayan la importancia de la regulación genética de tejidos específicos. Por tanto, la metilación del ADN específico para genes vinculados a la obesidad es específica según el tejido de estudio y parece estar muy afectada por los metabolitos lipídicos y otros factores dietéticos, existiendo también correlaciones con el desarrollo de comorbilidades como diabetes o dislipidemia (Rohde K et al., 2019).

1.3.6 Genética de la resistencia a la insulina

Una de las principales características a las aberraciones consecuentes del exceso de tejido adiposo es la resistencia a la insulina (Choe SS et al, 2016). Los niveles elevados de glucemia son debidos a la disfunción de las células beta-pancreáticas, disminuyendo la secreción de insulina y por la resistencia de los tejidos periféricos (el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo) a la propia insulina (Rosen ED et al., 2016; FDI, 2020).

La resistencia a la insulina o diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica compleja, poligénica, cuya prevalencia se estima que a nivel mundial 415 millones de personas tienen diabetes (FDI, 2020). Los múltiples estudios sobre Síndrome metabólico han demostrado como los factores de riesgo asociados a Síndrome metabólico también lo están a la diabetes. El sobrepeso u obesidad, estilos de vida poco saludables, alteraciones metabólicas, y diagnósticos previos de diabetes gestacional o antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular y de diabetes en sí, además de la propia susceptibilidad genética, deben tenerse en cuenta, con estimaciones de heredabilidad que oscilan entre el 20% y el 80% (Kwak SH et al., 2016; Walaszczyk E et al., 2018). Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) han identificado sobre 300 loci asociados con la diabetes a día de hoy (Ingelsson E, 2018). Sin embargo, estas variantes genéticas explican sólo el 10-15% de la heredabilidad de la enfermedad, lo que sugiere un papel importante de los factores ambientales y del estilo de vida (Kriebel J et al., 2016). Para identificar el componente faltante de la patogénesis de la diabetes, los investigadores han comenzado a examinar el papel de la epigenética, además del de la propia genética para comprender la etiología de la resistencia a la insulina en su totalidad.

1.3.6.1 GWAS en resistencia a insulina

En un esfuerzo por identificar nuevas variantes asociadas con la resistencia a la insulina, se realizaron metanálisis a gran escala de GWAs utilizando múltiples cohortes que tienen medidas de sensibilidad, procesamiento y secreción de insulina. Gracias a este enfoque se han confirmado asociaciones de muchos loci con rasgos glucémicos específicos, así como la identificación de nuevos loci (Voight BF et al., 2012; Brown AE et al., 2016).

Definir los mecanismos que subyacen a la resistencia a la insulina comienza a ser posible cuando se centra la atención en el marco celular de la señalización alterada, así como el estrés del retículo mitocondrial y endoplásmico, teniendo presente los distintos mecanismos nucleares relacionados con la resistencia a la insulina, incluyendo los efectos transcripcionales y epigenómicos (Ling C et al., 2019). Según estudios recientes deberían considerarse tres niveles de control que involucrarían a los factores de transcripción, a los cofactores transcripcionales y a las enzimas modificadoras de la cromatina. Ejemplos conocidos son el gen PPAR γ en tejido adiposo y como receptor de glucocorticoides y FoxO1 en una variedad de tejidos sensibles a la insulina. Estas proteínas funcionan en conjunto con cofactores

como PGC-1 α y CRTC2, y junto enzimas modificadoras de la cromatina (metiltransferasas de ADN y las acetiltransferasas de histona), pueden regular genes clave que promuevan la captación de glucosa estimulada por insulina, la gluconeogénesis u otras vías que afectan la insulina de acción sistémica. Además, la variación genética asociada con un mayor riesgo de diabetes a menudo se relaciona con la unión alterada del factor de transcripción, ya sea al afectar el factor de transcripción en sí mismo, o más comúnmente al cambiar la afinidad de unión de una región reguladora no codificante (figura 1.7) (Ling C et al., 2019; Schlauch KA et al., 2020).).

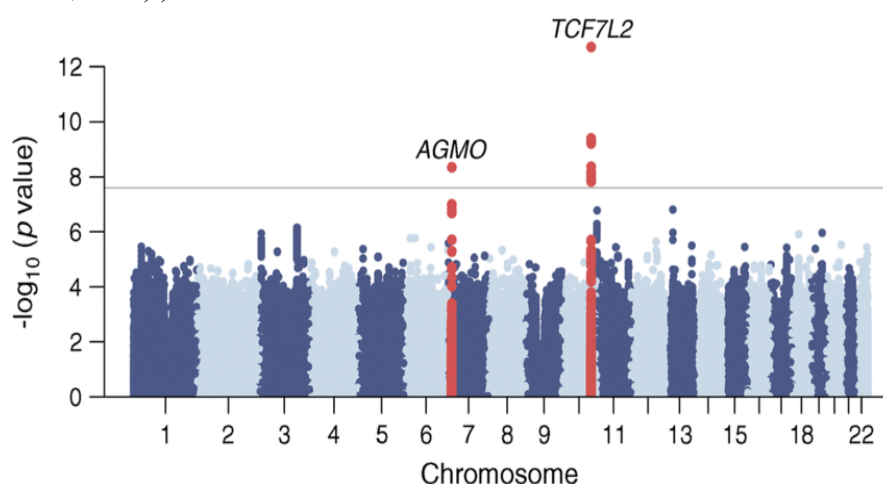


Figura 1.7. Manhattan plot de los resultados del metanálisis de diabetes tipo 2.

La línea gris horizontal corresponde a $p=2.5 \times 10^{-8}$ y los loci que alcanzan ese umbral de significación (variantes dentro de la distancia de 500 kb de aquellos con $p < 2.5 \times 10^{-8}$) se muestran en rojo. Las etiquetas de genes corresponden al gen más cercano / biológicamente plausible (Chen J et al., 2019).

1.3.6.2 EWAS en resistencia a insulina

La desregulación epigenética ha surgido como un mecanismo clave que sustenta la patogenia de la diabetes y sus complicaciones, así como su efecto dentro del marco de síndrome metabólico (Dhawan S et al., 2019). Los patrones epigenéticos son específicos de las células, siendo esencial estudiar los tejidos de importancia, siendo en el caso de diabetes, el tejido pancreático, músculo esquelético, tejido adiposo y el hígado (Ling C et al., 2019).

Los estudios realizados que examinaban el impacto de los factores de riesgo genéticos y no genéticos en la metilación del ADN en humanos identificaron cambios epigenéticos en tejidos de sujetos con diabetes versus controles no diabéticos o individuos “sanos”, demostrando que factores no genéticos asociados con la diabetes como la edad, la obesidad, las dietas ricas en energía, la actividad física y el entorno intrauterino, que impactan en el epigenoma de los seres humanos. Además de las interacciones entre la genética y la epigenética que influyen en la patogenia de la diabetes (Davegårdh C et al., 2018). Por ello, una vez hemos identificado estas alteraciones, es necesario determinar si las causan o si son secundarias a la enfermedad (Ling C et al., 2019).

Los primeros estudios epigenéticos para la resistencia insulina se realizaban en tejido pancreático y musculoesquelético de pacientes con diabetes, hecho que permitió analizar la metilación del ADN de genes candidatos o partes del genoma seleccionadas (Barres R et al., 2009; Ling C et al., 2008).

En la actualidad, se han realizado distintos estudios transversales que han proporcionado la evidencia de una asociación entre la metilación del ADN y la diabetes. En el músculo esquelético, el coactivador-1 alfa del receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma (PPARGgamma) (PGC-1 alfa) está hipermetilado en pacientes con diabetes en comparación con los individuos tolerantes a la glucosa (Barres R et al., 2009). Además, también se observó un aumento de la metilación del ADN en el haplotipo de susceptibilidad a la obesidad FTO al comparar la sangre entera humana de mujeres con y sin diabetes (Bell CG, et al., 2010). Posteriormente, otro estudio más amplio que comprendió 710 casos de diabetes y 459 controles observó un exceso de metilación en las regiones genómicas que están asociadas con la diabetes (Toperoff G et al., 2012). Otros estudios de metilación del ADN de genes candidatos para diabetes detectaron diferencias de metilación en los genes: INS (que codifica insulina), PDX1, PPARGC1A (que codifica PGC1 α) y GLP1R (que codifica el receptor GLP-1) del tejido pancreático de pacientes con y sin diabetes (Ling C et al., 2008; Yang BT et al., 2011; Yang BT et al., 2012; Waugh NR et al., 2013). El aumento de la metilación del ADN y la menor expresión de estos genes, se asociaba con una secreción de insulina alterada. Además, la glucosa alta y la hemoglobina glicosilada (HbA1c) parece que son capaces de aumentar directamente la metilación del ADN de estos mismos genes (Yang BT et al., 2011; Yang BT et al., 2012; Shimobayashi M et al., 2018). Los últimos avances en matrices de Illumina hicieron posible analizar la metilación de numerosos sitios CpG simultáneamente. La medición de la metilación del ADN debe realizarse en los tejidos diana para el factor de riesgo a estudiar, en el caso de diabetes, se analizarían muestras de tejido adiposo humano, hígado y músculo esquelético de sujetos con diabetes y con controles no-diabéticos. Estos estudios permiten

identificar numerosos sitios de CpG con metilación alterada en los pacientes con la patología y/o fenotipo. Aunque el tamaño del efecto de cada sitio de CpG puede dar resultados modestos ya que dependiendo del tipo de tejido que se estudie puede variar el grado de metilación (Abderrahmani A et al., 2018, Kirchner H et al., 2016, Nilsson E et al., 2014, Nilsson E et al., 2015, Nitert MD et al., 2012, Ribel-Madsen R et al., 2012).

Recientemente se han podido analizar $\sim 2.4 \times 10^7$ sitios CpG (83% de todos los sitios CpG en el genoma humano) en tejido pancreático de diabéticos y de controles, identificando 25.820 regiones metiladas diferencialmente (RMD) en los islotes pancreáticos de pacientes con diabetes (Volkov P et al., 2017). Dos de las RMD más significativas cubrieron *PDX1*, factor clave de transcripción en la regulación de la expresión de insulina. También existe una superposición entre genes candidatos a diabetes y los RMD de islotes asociados a diabetes, como ocurría con *ADCY5*, *TCF7L2* y *KCNQ1* (Scott RA et al., 2017). Además, 457 genes, incluidos *NR4A3*, *PARK2*, *PID1* y *SOCS2*, tenían tantas RMD como cambios de expresión en los islotes diabetes (Volkov et al., 2017). El trabajo de Hidalgo B et al., también identificó cambios en la metilación de un sitio CpG en *ABCG1* en el cromosoma 21 se asoció significativamente con la insulina ($p=1.83 \times 10^{-7}$) y HOMA-IR ($p=1.60 \times 10^{-9}$). Otro sitio en el mismo gen fue significativo para HOMA-IR y de importancia limítrofe para la insulina ($p=1.29 \times 10^{-7}$ y $p=3.36 \times 10^{-6}$, respectivamente). Asociaciones con las dos señales principales replicadas para insulina y HOMA-IR ($p=5.75 \times 10^{-3}$ y $p=3.35 \times 10^{-2}$, respectivamente) (Hidalgo B et al., 2013). Los recientes estudios en epigenética de la diabetes muestran cambios específicos a gran escala en el metiloma de los islotes pancreáticos, que se traducen en una expresión diferencial de loci críticos para la secreción, adaptación y supervivencia de insulina. La desregulación de las líneas transcripcionales de los islotes pancreáticos afecta a la línea celular de las células beta-pancreáticas provocando su pérdida de funcionalidad (Dhawan S et al., 2019).

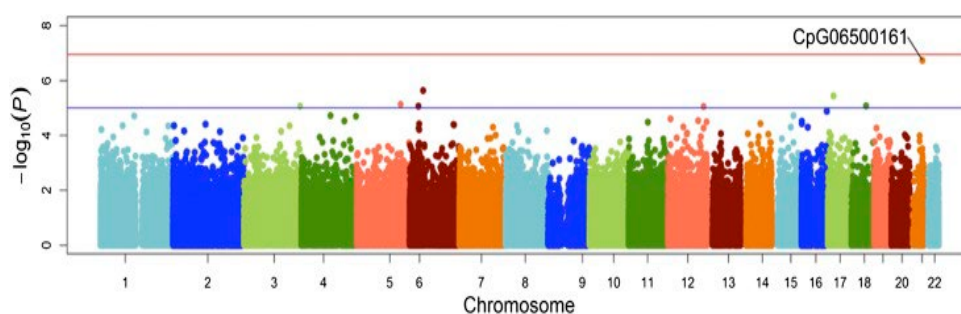


Figura 1.8. Manhattan plot de pruebas de resultados de todo el epigenoma para la asociación y el estado de metilación de la insulina en ayunas.

El eje x muestra el cromosoma en el que se encuentra la CpG, y el eje y muestra $-\log_{10}$ (valor P). (Una representación en color de alta calidad de esta figura está disponible en la edición en línea) (Hidalgo B et al., 2013).

El nivel de relevancia que adquiere la metilación también ha sido estudiado en sangre total de estudios en animales. Por ejemplo, en los osteoblastos de ratones, la expresión transgénica del *antígeno 2 similar a FOS* (*Fosl2*) conduce a una disminución del peso corporal y aumento de la masa ósea, junto con una disminución de los niveles séricos de glucosa, una mejor sensibilidad a la insulina y una mejor tolerancia a la glucosa, indicando que la *expresión de Fosl2* juega un papel en la regulación positiva del metabolismo de la insulina y la glucosa (Bozec A et al., 2013; Ahmed SAH et al., 2020). Una nueva investigación sobre la asociación entre la susceptibilidad a diabetes y el estado de metilación del ADN del gen *PTPN1* encontró una correlación significativa entre el riesgo de diabetes y la hipermetilación de los ocho CpG en el promotor *PTPN1*.

La proteína tirosina fosfatasas no receptora tipo 1 (*PTPN1*) que actúa inactivando la transducción de la cascada de señales de insulina (Ahmed SAH et al., 2020). Para el gen del factor de transcripción 7-like 2 (*TCF7L2*) también se han obtenido distintos resultados que muestran su papel en el metabolismo de la glucosa (como la activación de genes diana en la vía de señalización Wnt, la proliferación de células β pancreáticas y la homeostasis de la glucosa). Además, ciertos SNPs de *TCF7L2* se asocian con un mayor riesgo de diabetes (Zhu L et al., 2017).

1.3.7 Genética de las dislipemias

La dislipidemia responde al exceso y o alteración de los niveles de lípidos en la circulación sanguínea. Es una enfermedad compleja, resultado de múltiples etiologías biológicas y conductuales, como la predisposición genética, la capacidad metabólica, la ingesta alimentaria y la actividad física (Bamba V, 2014). Niveles elevados de lípidos en sangre durante periodos prolongados funcionan como fuertes predictores de enfermedad cardiovascular (Carroll MD et al., 2017).

1.3.7.1 GWAS en dislipemias

El desequilibrio lipídico actúa como factor desencadenante de alteraciones en la cascada metabólica, también influenciada por factores genéticos y ambientales. Las anomalías lipídicas (alteraciones en lipoproteínas tanto aterogénicas como antiaterogénicas) se reconocen por el aumento de partículas VLDL y triglicéridos, la presencia de LDL pequeñas y densas, aumento de la expresión de apolipoproteínas B (apoB), disminución de apolipoproteína A (apoA-I) y deterioro de la homeostasis sanguínea, por el aumento de la producción de fibrinógeno y PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno). La hipertrigliceridemia promueve el intercambio de triglicéridos de lipoproteínas VLDL por ésteres de colesterol de partículas LDL y HDL, creando pequeñas partículas con poca concentración lipídica. El HDL es más susceptible a la degradación, hecho que explica las bajas concentraciones de HDL que se observan en los sujetos dislipémicos (Després JP et al, 2006). En las dislipemias clásicas, el contenido de HDL disminuye y el de LDL y VLDL aumenta, debido a la oxidación alterada de los ácidos grasos en los distintos tejidos funcionales (hígado, tejido adiposo y muscular), así como algunos mecanismos del organismo mediados por ácidos grasos de cadena larga (AGCL), donde el hipotálamo es el que responde a la homeostasis energética y a las alteraciones relacionadas con los rasgos de obesidad y Síndrome metabólico (Reaven GM, 2006; Aguilera CM et al, 2008). La dislipemia también puede estar presente por la deficiencia de la lipoproteína *lipasa sensible a la insulina*, que reduce la capacidad de aclaramiento y/o eliminación de lipoproteínas ricas en triglicéridos (Iqbal J et al., 2018). Los triglicéridos elevados se correlacionan además con parámetros no lipoproteicos potencialmente causantes como la obesidad abdominal, la resistencia a la insulina, la hipertensión, la hepatoesteatosis, la inflamación de bajo grado, un estado procoagulante y la función endotelial alterada. Siendo difícil discernir los niveles elevados de triglicéridos de esta compleja red de variables de confusión para poder definir su nivel de implicación (Dron JS y Hegele RA, 2017).

Las dislipemias o hipertrigliceridemias también se reconocen con el término de “quilomicronemias” (Dron JS y Hegele RA, 2017). La quilomicronemia, al igual que ocurre con la obesidad, se puede identificar como monogénica (la mutación se encuentra en el gen que produce modulación de la vía lipídica causando distintas alteraciones en el transporte, asimilación y uso de los lípidos en sí, (tabla 1.7) o poligénica (es el sumatorio de SNPs las que confieren la gravedad del fenotipo). Esta última es más común, y se asocia con el aumento de quilomicrones, VLDL y restos de ambos, además de IDL. El HDL está reducido, y es en estos casos donde el riesgo de enfermedad cardiovascular aumenta (Dron JS y Hegele RA, 2017).

Tabla 1.7. Tabla adaptada de JS Dron y RA Hegele.

Fenotipo	Trastorno	Gen	Predominio
LDL alto	Hiperlipoproteinemia tipo 2 ^a Hipercolesterolemia autosómica dominante	LDLR PCSK9, APOE	0,2% 0,5%
HDL bajo	Enfermedad de Tánger Deficiencia familiar de LCAT	ABCA1 LCAT	<100 casos reportados en el mundo 70 casos reportados
TG alto	Quilomicronemia familiar Hipertrigliceridemia severa	LPL, APOC2 APOA5, LMF1	<0,0001 <0,5%

Trastornos monogénicos principales que afectan a las concentraciones de lípidos en la sangre (Dron JS y Hegele RA, 2017).

En los últimos años, los análisis realizados mediante GWAs han permitido dilucidar algunos de los genes, y variantes de los mismos. Se detectaron ocho SNPs de distintos genes asociados a Síndrome metabólico pero que también estaban involucrados en el metabolismo de los lípidos (Povel CM et al., 2011). Se determinó que los alelos de menor prevalencia para rs9939609 (FTO), rs7903146 (TCF7L2), C56G (APOA5), T1131C (APOA5), C482T (APOC3), C455T (APOC3) y 174G>C (IL6) tenían una mayor prevalencia en los sujetos con Síndrome metabólico, mientras que para el gen CETP, era menor la prevalencia del alelo menos frecuente en los pacientes con Síndrome metabólico (Povel CM et al., 2011).

En la quilomicronemia poligénica es necesario determinar la carga de SNPs comunes asociados con los niveles de triglicéridos, ya que algunas de estas variantes son comunes en la población general y tienen pequeños efectos fenotípicos reconocidos, con influencias leves sobre los niveles de triglicéridos. Mediante GWAS se han identificado 185 loci de SNP asociados con niveles circulantes de lípidos y lipoproteínas; de estos SNPs, más de 30 tienen una asociación primaria con triglicéridos (Willer CJ et al., 2013; Dron JS y Hegele RA, 2017). Varios SNP identificados por GWAS se encuentran dentro de loci ya conocidos por la bioquímica clásica y la biología celular, y se reconoce su papel en el metabolismo de los triglicéridos, incluidos *LPL* y *APOA5* (Kuivenhoven JA et al., 2014). Otros se encontraron muy cerca de genes que en ese momento no eran

relevantes, pero posteriormente sí (el caso de GCKR), y muchos SNP son intergénicos y pueden ser importantes en determinados mecanismos reguladores (Willer CJ et al., 2013; Dron JS y Hegele RA, 2017). Al considerar los SNP asociados a triglicéridos en pacientes con quilomicronemia poligénica en comparación con individuos normolipidémicos, se ha observado y cuantificado un aumento marcado en la acumulación de SNP en estos pacientes utilizando puntuaciones de riesgo poligénico (GRS) (Johansen CT et al., 2011). Individualmente, cada SNP tiene una ligera influencia sobre los niveles de triglicéridos; sin embargo, cuando una carga sustancial de múltiples variantes de efectos pequeños está presente en un individuo, puede contribuir sinérgicamente a un gran efecto fenotípico. Además, a estos SNPs también debemos sumar el efecto coadyuvante de SNPs o variantes heterocigóticas adicionales cuyas influencias fenotípicas son más grandes, produciendo la acumulación excesiva de variantes comunes diseminadas por todo el genoma, agravando los efectos de la hipertrigliceridemia (Dron JS y Hegele RA, 2017).

Los niveles de distintos metabolitos lipídicos se ha demostrado que son capaces de inactivar la vía de señalización de la insulina, existiendo un aumento en los niveles de lípidos en los individuos con resistencia a la insulina (Holland WL et al., 2007). Diversos trabajos también han mostrado cómo la alteración del metabolismo lipídico precede a la diabetes por varios años (Taskinen MR 2003; Ginsberg HN et al., 2006). Además de la sobreproducción hepática de VLDL que se produce en los pacientes con dislipemia y diabetes, existiendo un aumento del tiempo de residencia plasmática de las lipoproteínas debido a la disminución de la captación hepática, contribuyendo a los niveles elevados de triglicéridos en plasma (Chan DC et al., 2002; Adiels M et al., 2006). La resistencia a la insulina contribuye a una mayor producción de quilomicrones debido al aumento de la síntesis y secreción de apolipoproteína B48 (apoB48) que contienen en su interior lípidos y lipoproteínas (Veilleux A et al., 2014). Sin embargo, la asociación causal entre la resistencia a la insulina y la acumulación de lípidos es controvertida (Iqbal J et al., 2018). Algunos estudios han sugerido que se requiere resistencia a la insulina para el desarrollo de hígado graso ya que las vías metabólicas que impulsan la biosíntesis de ácidos grasos hepáticos son relativamente sensibles a niveles elevados de insulina en sangre (Chen L, et al., 2015; Iqbal J, et al., 2018), aunque otros estudios han demostrado que la inflamación propicia a la obesidad y la acumulación de lípidos, pueden ser responsables de la resistencia a la insulina hepática, sugiriendo que la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática pueden ser manifestaciones separadas del mismo Síndrome metabólico (Iqbal J et al., 2018).

En los sujetos con exceso de tejido adiposo y/o Síndrome metabólico se produce el aumento de AGS o ácidos grasos de cadena corta o NEFA (*Non-*

Esterified Fatty Acids o ácidos grasos no esterificados) en sangre, que inhibirá la absorción de glucosa por el músculo (Belfort R et al, 2005). Aunque el páncreas fabrica insulina adicional, no hay suficiente para contrarrestar la hiperglucemia, es decir, se produce la resistencia a la insulina. En estas circunstancias, la falta de insulina para suprimir la actividad lipasa sensible a hormonas (HSL) estimula la liberación de NEFA de la grasa visceral lipolíticamente activa. Este aumento del flujo de NEFA estimula la síntesis hepática de triglicéridos, la formación de apoB100 y el ensamblaje y la secreción de VLDL (Aguilera CM et al, 2008). Las concentraciones elevadas de NEFA son tóxicas para las células β pancreáticas, induciéndoles apoptosis, acelerando la disfuncionalidad del páncreas y favoreciendo la progresión a la diabetes (Hellmuth C et al, 2013). En algunos casos, el aumento de la secreción de insulina dirigida a mantener los niveles de glucemia en la sangre de manera adecuada puede provocar una disminución funcional en las células β , pudiendo producir un deterioro irreversible, evidenciando parte de la interrelación entre los factores que definen el Síndrome metabólico (Aguilera CM et al, 2008).

También se identifica el estado de inflamación de las personas con Síndrome metabólico como resultado de la acumulación de lípidos en los adipocitos, activando las vías moleculares responsables del aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias, promoviendo los efectos aterogénicos en el organismo (Shoelson SE et al., 2006; Adiels M et al., 2008). Estructuralmente, las partículas de LDL ingresan a la pared arterial y se unen a los proteoglicanos de la pared arterial y sufren modificación oxidativa, lo que lleva a la absorción de los macrófagos, aumentando la aterogénesis (Grundy SM et al, 2005). La sobreproducción de VLDL se ve aumentada con las anomalías en los niveles de glucosa plasmática, al mismo tiempo también dependen la disponibilidad de triglicéridos almacenados en el citosol y regulan la cantidad de proteína apoB. El aumento ácidos grasos provenientes de la dieta y los niveles elevados de lípidos intracelulares estimulan el ensamblaje y la secreción de VLDL, que se muestra dependiente de la proteína MTP (proteína de transferencia de triglicéridos microsomal) (Hussain MM et al., 2012). Las mutaciones en el gen MTP se caracterizan por una ausencia de lipoproteínas que contienen apoB en el plasma (abetalipoproteinemia), por lo que la secreción de VLDL depende del mantenimiento de la actividad de la enzima MTP y de que exista un equilibrio en los lípidos disponibles y su consumo en el hígado (Iqbal J, et al., 2018). La sobreproducción de VLDL promueve la formación aumentada de LDL mediante la transferencia de triglicéridos de VLDL a LDL por la CETP (proteína de transferencia de éster de colesterol) que aumenta la lipólisis de las LDL ricas en triglicéridos (Verges B, 2005). Otra de las características de las dislipemias asociadas a Síndrome metabólico son los niveles bajos de colesterol HDL (Cooney MT et al., 2009). La CETP y la lipasa hepática mejoran el catabolismo de las

partículas de HDL que conducen a la formación de más partículas de HDL. Diversos estudios han demostrado que los niveles bajos de HDL se asocian a mayores riesgos de diabetes, Síndrome metabólico y patología cardiovascular. Las partículas de HDL ayudan a mantener los niveles normales de glucosa en sangre a través de la insulina dependiente y los mecanismos independientes de la insulina (Drew BG et al, 2012; Vollenweider P et al, 2015). HDL también es capaz de inhibir la muerte de las células β pancreáticas inducida por el estrés y mejora la secreción de insulina estimulada por glucosa para ejercer sus funciones antidiabéticas (Klancic T et al, 2016).

La producción de HDL está controlada por factores genéticos. Un ejemplo claro lo encontramos en ciertas familias japonesas, en la que la deficiencia genética en las proteínas CETP se asociaba a niveles altos de colesterol HDL. Sin embargo, los factores ambientales también tienen un impacto significativo en sus niveles. Algunos de los factores que se ha determinado que pueden elevar las concentraciones de HDL incluyen: alcoholismo crónico, tratamiento con terapia de reemplazo de estrógenos orales, ejercicio aeróbico prolongado en el tiempo y tratamiento farmacológico con niacina, estatinas o fibratos. Por otro lado, otros factores de estilo de vida como fumar reduce los niveles de HDL, mientras que dejar de fumar conduce a un aumento en el plasma de estas lipoproteínas. El componente principal de HDL, la apolipoproteína A-I (apo A-I), es en gran parte responsable del transporte inverso de colesterol. Apo A-I puede ser dañada por mecanismos oxidativos, que hace que la proteína sea menos capaz de promover la fluctuación de colesterol. La molécula de HDL también contiene otras proteínas que se ven afectadas por el mismo entorno oxidativo. La modificación de los componentes proteicos de HDL pueden convertirlo de una partícula antiinflamatorio a una proinflamatoria. Por tanto, se ha demostrado que niveles excesivamente elevados de HDL pueden actuar como moléculas aterogénicas (Ginter E et al, 2017).

En Síndrome metabólico también se produce una elevación de los niveles plasmáticos de apoC-III. ApoC-III es una proteína que inhibe a LPL, favoreciendo la acumulación de lipoproteínas ricas en TAG. Estudios recientes han mostrado que algunos polimorfismos o SNPs de genes de ApoC-III y LPL pueden tener efectos sobre los niveles de apoB en la población caucásica con dislipemia asociada a Síndrome metabólico (Stancakova A et al, 2012; Rhee EJ et al., 2019). Del mismo modo, gracias a la realización de GWAs en sujetos con Síndrome metabólico, en el metabolismo de lipoproteínas se ha observado que, la PCSK9 (proteína convertasa subtilisina/kesina tipo 9) indicaba tener una fuerte correlación con lipoproteínas ricas en triglicéridos, HDL bajo y resistencia a la insulina (Ferri N et al., 2016). PCSK9 regula la homeostasis del colesterol LDL modulando la expresión de los receptores de LDL. Esta proteína se une a los receptores de LDL para evitar su reciclaje y promover su degradación, conduciendo al aclaramiento del colesterol

LDL (Ferri N et al., 2016; Iqbal J, et al., 2018). Además del colesterol LDL, los estudios también han demostrado que PCSK9 también se asocia con el metabolismo de otras lipoproteínas y metabolitos relacionados con los lípidos, como los triglicéridos, las lipoproteínas ricas en triglicéridos y el colesterol HDL (Lakoski SG et al., 2009; Chan DC et al., 2016; Iqbal J et al., 2018). También se ha visto asociada a varios factores patológicos (Le BM et al., 2013; Li S et al., 2014) y a la aterosclerosis (Li S et al., 2014). Recientes trabajos han mostrado que PCSK9 podría ser una diana terapéutica para el tratamiento de dislipemias severas en pacientes que muestran intolerancia al tratamiento con estatinas (Mostaza JM et al., 2014). Además de los ácidos grasos y triglicéridos, el mismo colesterol también influye en el ensamblaje de los quilomicrones. La proteína NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1), cuya expresión se ha visto aumentada en sujetos diabéticos, posee un papel esencial en la captación de colesterol a nivel intestinal. Por otro lado, se observa una expresión reducida de las proteínas ABCG5 y ABCG8 (ATP-binding cassette transporter family G protein 5 or 8) en los sujetos con diabetes, disminuyendo la capacidad de regular la eliminación de las moléculas de colesterol en el intestino (Lally S et al., 2006; Wang DQ 2007; Iqbal J et al., 2018).

Respecto al metabolismo de las lipoproteínas y la propia regulación de los lípidos, distintas proteínas son capaces de modular la expresión de los genes. Los factores de transcripción juegan un papel importante en la regulación tanto de la síntesis como de la secreción de lípidos y recientes estudios han demostrado que la insulina alterada de personas diabéticas y con Síndrome metabólico puede disminuir la secreción de lipoproteínas al atenuar la actividad del factor de transcripción Foxa2 (forkhead box A2) (Wolfrum C et al., 2003). Foxo1 (forkhead box-O1) es otro de los factores de transcripción clave, vinculado a AKT, juega un papel crucial en el control del ciclo celular, la apoptosis, el metabolismo y la diferenciación de adipocitos. Foxo1 regula la diferenciación de los adipocitos mediante el control del ciclo celular y la lipogénesis a través de PPAR γ y el ciclo celular de los adipocitos a través de p21 y p27. Tanto el ciclo celular como la lipogénesis están influenciados por la translocación de Foxo1, que determina su actividad y también será dependiente de posibles modificaciones postraduccionales e interacciones con 14-3-3 y SIRT, etc. (Chen J et al., 2019). Otros estudios también han demostrado que este gen también está regulado por la restricción de nutrientes (Lettieri Barbato D et al., 2013). SREBP-1c (sterol response element binding protein-1c) es un factor de transcripción que regula positivamente la transcripción de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, aumentando así la lipogénesis (Iqbal J et al., 2018). El receptor LXR α es otro factor de transcripción que juega un papel importante en la modulación del metabolismo de los ácidos grasos y las lipoproteínas mediante la regulación de la lipogénesis por el aumento de la expresión de genes lipogénicos como SREBP-1c, FAS, acil-CoA

carboxilasa (ACC) y estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1) (Mak PA et al., 2002; Repa JJ et al., 2002; Repa JJ et al., 2000; Iqbal J et al., 2018).

Estudios recientes han descubierto que ciertos miARN actúan controlando el metabolismo celular de lípidos y lipoproteínas. Indicando nuevos conocimientos sobre el mecanismo molecular de la etiología de la hiperlipidemia, la obesidad y la diabetes (Christian P et al., 2014). Un estudio reciente ha demostraron que miR-30c se dirige al ARNm de MTP hepático y modula la disponibilidad de sustrato lipídico para la biogénesis de VLDL (Soh J et al., 2013). La disponibilidad de sustratos lipídicos para el ensamblaje de VLDL también puede reducirse inhibiendo la síntesis de lípidos y aumentando la oxidación de los ácidos grasos a través de la inhibición de miR-122 (Tsai WC et al., 2012). La reducción de la secreción de VLDL en la circulación también puede lograrse por la inhibición de la expresión de miR-33a/b en el hígado, disminuyendo la síntesis y aumentando la oxidación de ácidos grasos (Rayner KJ et al., 2011). Los datos de estos estudios implican que los miARN regulan el metabolismo de las lipoproteínas modulando la disponibilidad de los lípidos y diferentes proteínas. Los microARN también juegan un papel en el metabolismo del HDL y ejercer actividades de control de los niveles de colesterol total circulante mediante la regulación de la biogénesis de HDL, la secreción de colesterol HDL y total y la captación *de novo* en el hígado.

En personas con obesidad y Síndrome metabólico se han detectado los perfiles lipídicos donde los ácidos grasos saturados se encuentran más elevados y los niveles de n-3 PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) más bajos. En pacientes con obesidad, las diferencias más notables se encuentran en la disminución de los contenidos relativos a ácido linoleico y ácido linolénico, que se ha asociado negativamente con las concentraciones de apoB y positivamente con el diámetro de LDL (Aguilera CM et al, 2008). Se produce un aumento de los niveles de ácido palmítico, que se ha asociado de forma positiva con los niveles de insulina en ayunas y los valores de presión arterial sistólica y diastólica. Un estudio de sobrepeso en adolescentes mostró como tener niveles de ácidos grasos saturados más elevados y niveles reducidos de ácido docosahexanoico, se asociaban positivamente con HDL, mientras que la misma relación se asociaba inversamente con IL-6 (interleucina-6) y con la proteína C reactiva (PCR), sugiriendo que una alta ingesta de n-3 PUFA puede proteger a los sujetos obesos contra el Síndrome metabólico y el estado de inflamación asociado a la obesidad (Klein-Platat K et al, 2005; Aguilera CM et al, 2008).

En recientes estudios se ha determinado que la disposición de la grasa también puede modificar y/o alterar el perfil o relación entre ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados con los AGS, por tanto, aunque la cantidad y la calidad de la grasa en la dieta contribuyen claramente a los cambios en la composición de ácidos grasos, también pueden estar involucrados otros factores hormonales o genéticos (Aguilera CM et al, 2008; Iqbal J et al., 2018).

1.3.7.2 EWAS en dislipemias

Los recientes estudios genéticos sobre dislipemias han mostrado como determinados genes desempeñan un papel en el metabolismo de los lípidos, siendo capaces de inducir cambios en la metilación del ADN y, a su vez, alteraciones en la propia metilación que pueden afectar a los genes que modulan la ruta lipídica, pudiendo ser claves en el desarrollo de la obesidad y las comorbilidades asociadas (Dekkers KF et al., 2016; Braun KV et al., 2017).

De los muchos contribuyentes conductuales a la dislipidemia, la dieta ofrece uno de los enfoques conductuales más eficaces para la prevención de enfermedades, y es un determinante crucial del mantenimiento de la salud durante toda nuestra vida (Kusmann M et al., 2017). Los ácidos grasos que provienen de la dieta se consideran un grupo heterogéneo de macronutrientes, y sus propiedades moleculares variables, así como la matriz alimentaria en la que residen, ejercen efectos diferenciales sobre los lípidos en la sangre (Hannon BA et al., 2018). En los últimos años se han realizado múltiples estudios de intervención para determinar el impacto de diferentes dietas en el epigenoma humano. Estas intervenciones incluyen estudios de sobrealimentación y ayuno con una dieta alta en grasas, así como un ensayo de control aleatorio de AGS *versus* AGPI (Houde AA et al., 2015; Hjort L et al., 2017; Jacobsen SC et al., 2012; Jacobsen SC et al., 2014; Perfilyev A et al., 2017). Algunos de los resultados más destacados mostraron como una sobrealimentación de 5 días con una dieta alta en grasas, que imitaba la dieta de muchas personas obesas, cambió la expresión génica y los patrones de metilación en el músculo esquelético humano y tejido adiposo (Romaguera D, et al., 2009; Ribel-Madsen R, et al., 2012; Rönn T, et al., 2015). Aunque debemos destacar que parecía más fácil inducir cambios de metilación sobrealimentando a los individuos que revertiendo con una dieta de control. El consumo de ciertos lípidos se han relacionado con cambios en la metilación del ADN, como la ingesta de alimentos con alto contenido en PUFA n-6 para el gen *TNFA*, componentes en el aceite de *avellana* para *ADRB3*, así como otros ácidos grasos para *CLOCK* y si nos referíamos a los triglicéridos nos encontramos con que esta misma correlación también se observa con la metilación de *ABCG1*, *ABCA1*, *PHGDH*, *TOMM20* (Milagro FI et al., 2012; Hermsdorff HH et al., 2013; Lima RP et al., 2017; Pfeiffer L et al., 2015; de Toro-Martin J et al., 2016; Guay SP et al., 2014; Truong V et al., 2017).

La lipogénesis está modulada por varios factores dietéticos y hormonales que controlan la expresión de las enzimas lipogénicas y proporcionan sustrato para la biosíntesis de ácidos grasos. La lipogénesis está regulada transcripcionalmente por factores de transcripción clave: el receptor X del hígado (LXR), la proteína de unión al elemento regulador de colesterol 1c (SREBP-1c) y la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (CHREBP) (Wang Y et al., 2015). La regulación positiva de la lipogénesis de estos factores de transcripción explicaría la inducción de la expresión de SCD1 durante los ciclos de ayuno-realimentación (Li Y et al., 2011; Wang Y et al., 2015). La esteroil CoA desaturasa 1 (SCD1) es una enzima lipogénica central que representa un objetivo potencial para el control de la lipogénesis. Su actividad como regulador central del metabolismo energético, catalizando la síntesis de AGMI, principalmente oleato y palmitoleato, importantes para controlar el aumento de peso en respuesta a la alimentación con dietas altas en carbohidratos. Además de funciones estructurales, los AGMI tienen funciones de señalización y pueden regular el metabolismo sistémico y modular las enfermedades metabólicas crónicas vinculadas a la obesidad, incluida la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la resistencia a la insulina y la hiperlipidemia (Puri P et al., 2009; ALJohani AM et al., 2017). Diversos estudios también han demostrado que la SCD1 posee un papel esencial en la regulación de los procesos celulares, incluida la síntesis y oxidación de lípidos, la termogénesis, la señalización hormonal y la inflamación (Sampath H et al., 2014; Yew Tan C et al., 2015), cuyas alteraciones derivarán en diversos problemas crónicos vinculados a patologías metabólicas. La deficiencia de SCD1 en tejidos diana, como el hígado y la piel, protege contra los efectos de una dieta elevada en carbohidratos y en grasa, respectivamente, indicando que SCD1 lleva a cabo funciones metabólicas distintas dependiendo del tejido, además de considerar que los productos SCD1, oleato y palmitoleato, tienen diferentes propiedades metabólicas.

Gracias a los resultados obtenidos en los recientes estudios de epigenética en prevención con estilos de vida y valoración del tipo de dieta, se ha observado que las personas con características de Síndrome metabólico podrían beneficiarse más si siguen una dieta baja en carbohidratos, pero con mayor proporción de grasas, teniendo en cuenta la composición cualitativa de las grasas, ya que este perfil puede ser clave para la evolución y desarrollo del propio Síndrome metabólico. Las dietas ricas en grasa del tipo saturado y trans, así como las dietas ricas en carbohidratos, favorecen un aumento agudo de la resistencia a la insulina, independiente al volumen de tejido adiposo (Bednarski T et al., 2016). Aunque diversos estudios recientes sobre perfiles alimentarios han sugerido que los AGPI n-3 de la dieta, presentes en pescado, poseen propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas, que pueden promover ciertos cambios y/o modulación en la expresión de genes relacionados a estos fenotipos, pudiendo beneficiar a las personas con Síndrome metabólico, aunque parece que no influye en la resistencia a la insulina de forma directa (Stern JH et al., 2016). Del mismo modo, los

compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra reprimen la expresión *in vivo* de varios genes proinflamatorios, cambiando así la actividad de las células mononucleares de sangre periférica a un perfil inflamatorio menos perjudicial y con menor propensión a la placa de ateroma (Camargo A et al., 2010).

1.3.8 Genética de la hipertensión

La hipertensión o valores de presión arterial elevados y/o alterados es uno de los factores de riesgo principales en pacientes con Síndrome metabólico. Muestra una estrecha relación con los otros factores y características que definen el Síndrome metabólico, como es la obesidad o la resistencia a la insulina. Las estimaciones para el riesgo según el estudio de Framingham muestran que aproximadamente el 80% de la hipertensión en los hombres y el 65% en las mujeres puede atribuirse directamente a estar obesos (Nerenberg KA et al., 2018), indicando la relación multifactorial que presenta este criterio de Síndrome metabólico.

1.3.8.1 GWAS en hipertensión

Dentro del marco del Síndrome metabólico, los niveles de presión arterial alta están fuertemente asociados con la obesidad visceral y la resistencia a la insulina. Se ha informado que alrededor del 50% de los pacientes con hipertensión esencial son resistencia a la insulina (Grundy SM, 2016; Jahandideh F et al., 2020). El sistema renina angiotensina (RAS), bien conocido por su importante papel en la regulación de la presión arterial, también desempeña un papel clave en la aparición y desarrollo de la resistencia a la insulina (Marcus Y et al., 2013). La hiperinsulinemia exagera la secuencia de eventos que finalmente pueden conducir al desarrollo de diabetes. Los individuos con Síndrome metabólico tienen el doble de riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular durante los próximos 5 a 10 años y aproximadamente cinco veces el riesgo de diabetes en comparación con aquellos sin el síndrome (Prasad H et al., 2012; Jahandideh F et al., 2020).

El tratamiento del Síndrome metabólico requiere modificaciones en el estilo de vida, la participación en la actividad física y una dieta equilibrada y adaptada en energía al gasto calórico diario, en el caso de Síndrome metabólico

normalmente deben ser más reducidas en energía (Grundy SM, 2016). La adherencia a estas intervenciones en el estilo de vida es generalmente baja y los pacientes deben recibir tratamientos farmacológicos. Se demostró que la terapia antihipertensiva disminuye los eventos cardiovasculares alrededor del 25% (Psaty BM et al., 2009). Las pautas actualizadas tienen como objetivo la reducción del riesgo cardiovascular general, ya que la hipertensión generalmente ocurre en asociación con otros factores de riesgo importantes. Sin embargo, los pacientes hipertensos tratados de forma óptima todavía tienen un 50% más de riesgo de sufrir cualquier episodio cardiovascular. Se ha demostrado que tratamientos multifactoriales intensivos prolongados logran aumentar los niveles de células progenitoras endoteliales (CPE) circulantes en los pacientes hipertensos (Maroun-Eid C et al., 2018), si tenemos en cuenta que la reducción o disfunción de las CPE se ha asociado inversamente con los factores de riesgo cardiovasculares y se ha revelado como un nuevo biomarcador para futuras investigaciones y evaluación de tratamientos para la enfermedad cardiovascular (Vasa M et al., 2001; Hill JM, 2003; Maroun-Eid C et al., 2018). Los mecanismos subyacentes para el desarrollo de hipertensión y Síndrome metabólico son complicados y aún no se han definido por completo, aunque sí que se reconocen la obesidad visceral, la resistencia a la insulina, la hiperactividad simpática, el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, el EAR activado y la inflamación como factores determinantes (Mendizábal Y et al., 2013; Jahandideh F, et al., 2020).

Respecto a la la hiperactividad simpática, hay 3 condiciones clásicas del estado patológico que supone el Síndrome metabólico que pueden causar una exacerbación del tono simpático (hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hiperlipidemia). Pudiendo aumentar concentraciones en hormonas como la noradrenalina, que provoca en sí misma el aumento de la presión arterial. Estos efectos simpatoexcitadores también producen alteraciones en la absorción de insulina (hiperinsulinemia), habiendo un aumento de la misma que también induce una reabsorción mayor de sodio favoreciendo la expansión del volumen de líquido extracelular, lo que puede predisponer a la hipertensión (Mendizábal Y et al., 2013). En el caso de la hiperleptinemia, además de un efecto sobre el apetito y el metabolismo, la leptina actúa en el hipotálamo también aumentando la presión arterial (Carlyle M et al., 2002). Del mismo modo que los niveles elevados circulantes de ácidos grasos libres en individuos con obesidad visceral pueden participar en la activación del SNS. El aumento de la liberación de ácidos grasos a partir de la lipólisis en los depósitos de grasa visceral podría explicar la fuerte asociación entre la obesidad visceral y el aumento de la actividad del nervio simpático (Mendizábal Y et al., 2013).

El estrés oxidativo, que resulta de la generación excesiva y/o desregulada de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente), es un factor importante que contribuye a las patologías de la enfermedad. El

desequilibrio entre la producción de ROS/RNS y la capacidad antioxidante celular conduce al desarrollo de estrés oxidativo. El estrés oxidativo daña los ácidos nucleicos, las proteínas y los ácidos grasos insaturados, agravando el daño celular (Lu JM et al., 2012; Brieger K et al., 2012).

La hipertensión relacionada con la disminución de la biodisponibilidad de Óxido de Nitrogeno (NO) y/o la exageración de ROS mediada por ácidos grasos libres en plasma se considera un factor de riesgo principal para el Síndrome metabólico (Vona R et al., 2019). Se ha informado que las características del Síndrome metabólico afectan a la morfología de las mitocondrias y las funciones de fosforilación oxidativa, aumentando el estrés oxidativo mitocondrial, pudiendo inducir a la mitofagia y apoptosis de las células. La acumulación de ácidos grasos en plasma aumenta la producción de ROS, lo que altera las funciones de las células endoteliales y del músculo liso (Matsuda M et al., 2013). Los ácidos grasos libres desencadenan aún más la producción de ROS en el tejido adiposo, lo que conduce al desarrollo del estado inflamatorio sistémico que contribuye a la vasculopatía asociada a la obesidad y al riesgo cardiovascular (Jahandideh F et al., 2020). Se ha informado de una reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes mitocondriales, junto con un aumento de los marcadores de oxidación de proteínas y lípidos, en los tejidos adiposos de las personas obesas (Chattopadhyay M et al., 2015). Los trastornos del colesterol, incluida la acumulación de colesterol libre, LDL oxidado y HDL glucosilada, también deterioran la función mitocondrial y aumentan la liberación de citocinas proinflamatorias que también pueden conducir a disfunción endotelial (Chowdhury SKR et al., 2010; Jahandideh F et al., 2020). El aumento del estrés oxidativo en el MetS debido a mayores cantidades de LDL oxidadas, productos de proteína carbonilo y actividad de NADPH oxidasa conduce a un mayor riesgo de aterosclerosis e infarto de miocardio en pacientes con MetS (Holvoet P et al., 2004). Destacando la evidencia de los beneficios de consumir antioxidantes en la dieta, que permite el mantenimiento del equilibrio del estado oxidante/antioxidante del cuerpo, mejorando la función endotelial, la presión arterial y el perfil lipídico (Jahandideh F et al., 2020).

Las anomalías en la estructura y función de los vasos sanguíneos en términos de disfunción endotelial, estrés oxidativo y remodelación vascular pueden conducir al desarrollo de hipertensión. El endotelio, una monocapa de células que recubre la luz de los vasos sanguíneos, es el regulador clave de la homeostasis vascular. El endotelio sano responde a señales físicas y químicas produciendo varios factores que regulan el tono vascular, la adhesión celular, la proliferación de células del músculo liso y la inflamación de la pared vascular. La lesión endotelial, el estrés oxidativo, la inflamación y la alteración de la función y biodisponibilidad del NO son los mecanismos por los cuales estos factores de riesgo afectan la función endotelial en el Síndrome metabólico. El NO y la prostaciclina son factores

hiperpolarizantes derivado del endotelio y vasodilatadores, mientras que la endotelina I, el tromboxano y la Ang II son los compuestos vasoconstrictores derivados del endotelio (Deanfield JE et al., 2007; Jahandideh F et al., 2020). Un cambio en las acciones del endotelio hacia una vasodilatación deteriorada, aumento de la inflamación y condiciones protrombóticas se conoce como disfunción endotelial (Rajendran P et al., 2013). El NO juega un papel clave en el mantenimiento de la pared vascular en un estado inerte mediante la inhibición de la inflamación, la proliferación celular y la trombosis. El deterioro del metabolismo de la glucosa, la obesidad, la dislipidemia y la hipertensión están asociados con la disfunción endotelial. Las acciones metabólicas de la insulina sobre la promoción de la eliminación de la glucosa aumentan por las acciones vasculares de la insulina en el endotelio para estimular la producción de NO con propiedades vasodilatadoras. La resistencia a la insulina se caracteriza por el deterioro de las vías de señalización dependientes de PI3K sin ningún efecto sobre otras vías dependientes de la insulina. Por tanto, el desequilibrio entre la producción de NO y la secreción de endotelina-1 en el endotelio (también características de la disfunción endotelial) conduce a una disminución del flujo sanguíneo, lo que empeora la resistencia a la insulina (Jahandideh F et al., 2020).

En el caso de la inflamación, entendiéndola como la respuesta del cuerpo a una lesión no letal, es un componente esencial de la respuesta inmunitaria para resistir las infecciones microbianas y la cicatrización de lesiones. Sin embargo, los cambios inflamatorios excesivos e incontrolados a menudo conducen al desarrollo de enfermedad vascular, aterosclerosis y complicaciones. El endotelio vascular se encarga de regular la extravasación de leucocitos clave en la inflamación. Las interacciones entre una variedad de células inflamatorias, la matriz extracelular, las células endoteliales y las células del músculo liso vascular están involucradas en la respuesta inflamatoria vascular (Sprague AH et al., 2009). Cuando las células endoteliales experimentan la activación inflamatoria, aumenta la permeabilidad endotelial y la expresión de moléculas de adhesión. La expresión mejorada de las moléculas de adhesión promueve la adhesión de las células inflamatorias seguida de su migración a través de la barrera vascular y el reclutamiento de citocinas y factores de crecimiento adicionales (Poher JS et al., 2007). La hiperglucemia, la acumulación de ácidos grasos en plasma y los productos finales de la glicación avanzada, así como la resistencia a la insulina sistémica, aumentan la inflamación crónica en el Síndrome metabólico (Stefano GB et al., 2016; Akoumianakis I et al., 2019). La liberación de leptina, proteína C reactiva (PCR), TNF- α e IL-6 conduce a la activación y disfunción endotelial (Esser N et al., 2014; Stefano GB et al., 2016; Jahandideh F et al., 2020). El TNF- α y la IL-6 también aumentan la lipogénesis hepática y estimulan la respuesta de fase aguda. IL-6 aumenta los niveles plasmáticos del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), fibrinógeno y PCR. Los niveles elevados de PCR se asocian con adiposidad, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, colesterol HDL bajo y diabetes tipo 2 (Jahandideh F et al.,

2020). Se ha demostrado que esta asociación es acumulativa al aumentar el número de características definitorias del MetS (Mirhafez SR et al., 2016).

La sobreproducción de RAS, incluida la Ang II, la activación del AT1R y el aumento de la producción de aldosterona, altera la señalización de la insulina, lo que exacerba aún más la resistencia a la insulina (Paul M et al., 2006; Olivares-Reyes JA et al., 2009). Un nivel elevado de Ang II en plasma disminuye la sensibilidad a la insulina debido a la formación de ROS (Cooper SA et al., 2007). La producción de ROS activa quinasas de señalización que conducen a la inactivación de IRS-1 (Olivares-Reyes JA et al., 2009). La acumulación de grasa visceral conduce al desarrollo de resistencia a la insulina (Samuelsson AM et al., 2006) y una lipólisis no regulada que contribuye directamente a las cascadas de inflamación, dislipidemia, hipertensión e hiperglucemia (Hsueh WA et al., 2011). La Ang II producida localmente también puede reducir el suministro de sangre a los depósitos adiposos, reduciendo el aclaramiento de los ácidos grasos libres liberados y aumentando la inflamación local (Marcus Y et al., 2013). Por otro lado, la resistencia a la insulina también regula al alza los componentes del RAS (Samuelsson AM et al., 2006), así, se forma un círculo vicioso que podría explicar las disfunciones renales y cardiovasculares observadas en los individuos diabéticos.

Los efectos beneficiosos del bloqueo de RAS sobre el Síndrome metabólico y las complicaciones de la diabetes se han atribuido a una variedad de factores que incluyen niveles reducidos de citocinas inflamatorias, niveles elevados de adiponectina, función endotelial restaurada, captación de glucosa mediada por insulina, restauración de la estructura y función de los islotes pancreáticos y mayor almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo (Cooper ME et al., 2004; Segura J et al., 2007; Sharma AM et al., 2006) aunque muchos de estos tratamientos farmacológicos para el bloqueo del RAS están asociados con efectos secundarios (Jahandideh F et al., 2020) (figura 1.9).

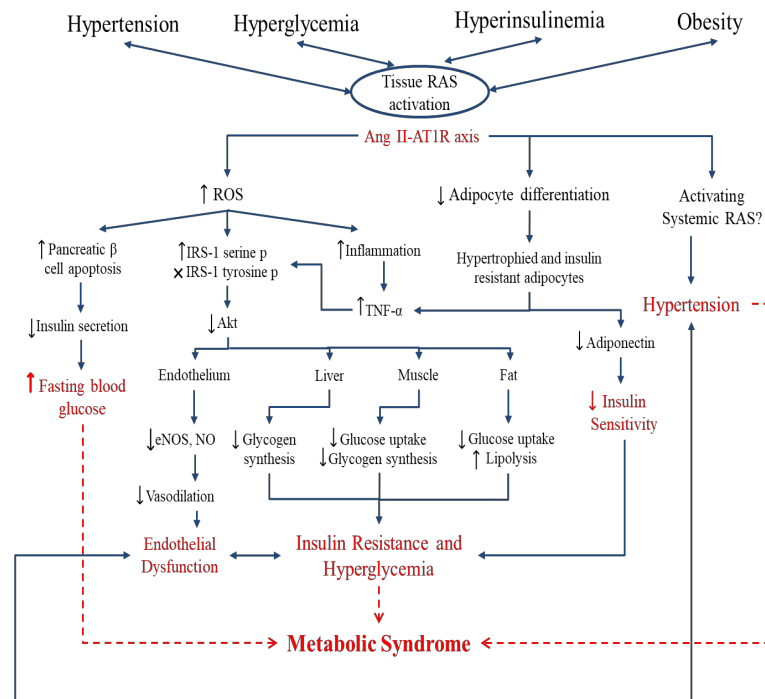


Figura 1.9. Vínculo entre el SRA, el estrés oxidativo y el síndrome metabólico.

Las características de Síndrome metabólico potencian la expresión de los componentes locales de SRA, especialmente el eje Ang II-AT1R, en tejidos específicos. La Ang II retrasa la diferenciación de los adipocitos, lo que causa su disfunción y la reducción de la sensibilidad a la insulina debido a la menor secreción de adiponectina y el aumento de las adipocinas proinflamatorias. La Ang II mejora aún más la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que afecta varias vías en diferentes tejidos del cuerpo. El aumento de la inflamación y la alteración de la señalización de la insulina en el endotelio, el hígado, los músculos y el tejido adiposo provocan disfunción endotelial y resistencia a la insulina. Además, el estrés oxidativo daña las células β pancreáticas que disminuyen la secreción de insulina y aumentan la glucosa en sangre en ayunas (Jahandideh F et al., 2020).

1.3.8.2 EWAS en hipertensión

En los últimos años, la epigenética nos muestra que existen regiones metiladas diferenciadas asociadas a la presión arterial y que muestras que existen

diferencias étnicas en estas asociaciones (Kazme N et al., 2020). La metilación del ADN es una muestra de la respuesta al ambiente, estable mitóticamente, considerada una marca epigenética que se asocia a situaciones o marcos biológicos determinados, como sucede en un infarto o en un cáncer (Smolarek I et al., 2010). Los análisis realizados por medio de genes candidatos en líneas celulares y estudios en animales han demostrado el rol de la metilación en la fisiopatología de la hipertensión arterial (Kazme N et al., 2020). La metilación del gen HSD11B2 se asoció a valores de presión arterial elevados en humanos (Friso S et al., 2008). Se detectó una asociación entre presión arterial diastólica con la metilación de las islas CpG cerca del gen OR5AP2, una variante genética cercana a los receptores olfatorios. Estos receptores olfatorios y sensitivos se ha demostrado que juegan un importante papel en la regulación de la presión arterial (Pluznick JL, 2013). También para presión arterial diastólica en europeos, el gen C12orf44 (cg00006122) que codifica la proteína 101 relacionada con la autofagia, también conocida como ATG101. ATG101 es de relevancia para presión arterial porque la propia autofagia juega un papel clave en la remodelación vascular pulmonar mediante la regulación de la apoptosis y la hiperproliferación de las células endoteliales arteriales pulmonares (Du J et al., 2017). CEBPD (cg16241714) que codifica la proteína CCAAT (proteína de unión potenciadora delta) también se asoció a presión arterial diastólica (Kazme N et al., 2020). El CEBPD participa en la regulación de la apoptosis y la proliferación celular y existen pruebas de que podría actuar como supresor de tumores (Gery S et al., 2005). Mediante la determinación de los niveles de metilación global del ADN se encontraron niveles más bajos para presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y/o hipertensión arterial. Dieciocho de los estudios de genes candidatos informaron sobre 16 genes metilados diferencialmente, incluyendo genes relacionados con el sistema renina-angiotensina (RAS) (ACE y AGTR1) y genes involucrados en la homeostasis del sodio y del sistema de mantenimiento del volumen de líquido extracelular (NET, SCNN1A y ADD1). Entre los tres estudios de asociación de todo el epigenoma identificados (EWAS), se encontraron niveles más bajos de metilación de SULF1, EHMT2 y SKOR2 en pacientes hipertensos en comparación con sujetos normotensos, y niveles más bajos de metilación de PHGDH, SLC7A11 y TSPAN2 se asociaron con presión arterial sistólica y presión arterial diastólica elevados. En resumen, a día de hoy, la evidencia más convincente para presión arterial se ha determinado gracias a los estudios de genes candidatos, que muestran cambios epigenéticos reproducibles en el RAS y vías metabólicas inflamatorias interconectadas (González-Jaramillo V et al., 2019).

1.4 Factores asociados

1.4.1 Estilo de vida

La dieta, la actividad física y el seguimiento de ciertos hábitos como el tabaquismo, se consideran variables influyentes en el estado de salud, sobretodo en patologías de etiología cardiovascular, que se cronifican en el tiempo.

1.4.1.1 La dieta

La dieta es una variable de compleja medición en la epidemiología nutricional. En la actualidad, la investigación se centra en conocer los alimentos y/o nutrientes asociados a los distintos patrones dietéticos. Los patrones dietéticos son el consumo total de alimentos de la dieta, es decir, es la observación de la dieta en su conjunto mediante un enfoque holístico, permitiendo poder estudiar los elementos que la forman y que están altamente interrelacionados e influyen en el impacto sobre el riesgo de aparición de enfermedades cardiometabólicas (D'Alessandro A et al., 2015). Las características de los patrones dietéticos en los distintos países, culturas y etnias han sido investigados y definidos (Harriden B et al., 2022; Bhawra J et al., 2023), identificando los patrones que se consideran saludables y adecuados para su recomendación. Han sido definidos en distintos informes de organismos oficiales teniendo en cuenta las características y costumbres de cada población, pero como características principales comparten la recomendación de ser el consumo elevado en frutas, verduras, granos integrales, lácteos bajos en grasa y proteína animal magra con mayor frecuencia que otros tipos de proteína de procedencia animal. Otras características de los patrones dietéticos saludables son que son bajos en grasas saturadas y trans, sodio y azúcares refinados. La preponderancia de la evidencia hasta la fecha sugiere que los patrones dietéticos saludables reducen el riesgo de las principales enfermedades cardiometabólicas actuales como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Neuhouser ML, 2019; Harriden B et al., 2022).

La descripción y definición de la Dieta Mediterránea surge del patrón dietético común de las comunidades en los países de la región mediterránea a principios de la década de 1960 (Keys A et al., 1986), comprendiendo parte de la expresión de raíces culturales e históricas comunes, así como un conjunto compartido de estilo de vida y hábitos alimenticios, entendiendo que se trata de un

cómputo de características más que una mera variedad de micronutrientes y macronutrientes específicos (Trichopoulou A et al., 2014). Esta zona geográfica tiene en común su clima, las temperaturas suaves y las horas diurnas, hecho que permite que la mayoría de alimentos se consuman frescos, poco procesados y pertinentes a su temporada. El resto de características también permiten el mantenimiento de hábitos tradicionalmente mediterráneos, como es el realizar siestas, disfrutar de las comidas principales con familia y amigos, es decir, en un ambiente sociable, y manteniendo un elevado nivel de actividad física (Serra-Majem L et al, 2006, Martínez-González MA et al, 2008; Salas-Salvadó J et al., 2019).

Respecto a la definición de dieta mediterránea los estudios difieren en consensuar todos los detalles que debería incluir, aunque en la actualidad, entendemos como dieta mediterránea (Psaltopoulou T et al., 2004; Serra-Majem L et al., 2006; Sofi F et al., 2008; Trichopoulou A et al., 2014), el patrón dietético que incluye: una alta ingesta de alimentos vegetales (principalmente por parte del consumo diario de frutas y verduras), cereales y panes con grano completo o íntegro, legumbres, frutos secos como las nueces, almendras y pistachos. Los alimentos no deben estar muy elaborados ni procesados, siempre serán frescos y de temporada, cultivados en áreas locales. El consumo de dulces y azúcares es muy reducido, así como el consumo de carnes rojas y embutidos. El consumo de carne blanca y pescado se ve fomentado, así como el consumo moderado para los derivados lácteos y si existe consumo de bebidas alcohólicas es por consumo de vino tinto, que suele acompañar las comidas principales. Pero sin duda, la característica principal de la dieta mediterránea reside en su palatabilidad, que es gracias al aceite de oliva como ingrediente principal para cocinar y fuente de grasa de todos los platos elaborados, así como aliño en productos frescos. Si además se trata de su variedad primaria, es decir, sin ningún grado de refinamiento, conservará todos sus micronutrientes y compuestos fenólicos esenciales, que tienen capacidad antioxidante (Ley SH et al., 2014; Patel H et al., 2017), que protegen de la patología cardiovascular, demostrando que se trata de una alternativa más saludable que la dieta baja en grasas (Estruch R, 2010). Se consensuó que se trataba de una dieta saludable a partir de los estudios y observaciones realizadas en la misma Grecia, donde se detectó una incidencia menor de arteriosclerosis (Rumawas ME et al., 2009), enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas inferior a la media general, así como una acreditación a una mayor esperanza de vida (Ramírez-Tortosa MC et al, 1999; Salas-Salvado J et al, 2011; Juanola-Falgarona M et al, 2013).

Las características de la dieta mediterránea haciendo referencia a los alimentos que se asocian y a la forma en que se consumen, se relacionan directamente con la prevención de alteraciones metabólicas crónicas y en la forma

que puede evolucionar y desarrollarse la gravedad de los factores que conjugan el Síndrome metabólico. Por su bajo contenido en ácidos grasos saturados y alto en monoinsaturados, así como en carbohidratos complejos y fibra, y por supuesto, su alto contenido en sustancias antioxidantes proveniente del alto consumo de vegetales, la dieta mediterránea se convierte en el patrón de consumo alimentario potencialmente adecuado para pacientes con este perfil metabólico, aunque también se han asociado sus beneficios en otros grupos de edad (Archer F et al., 2018; Jiménez-Boraita R et al., 2020). El uso de diferentes especias, conduce directamente a un menor consumo de sal, y manteniendo la tradición de técnicas culinarias clásicas reconocidas como saludables: el sofrito (Fundación Dieta Mediterránea, 2015). La elevada ingesta de aceite de oliva virgen extra, que, no habiendo sufrido ningún tipo de refinamiento, contendrá todos los compuestos fenólicos y otros nutrientes en su estado natural (Gorzynik-Debicka M et al., 2018), además del elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados que lo caracteriza, los cuales se conoce su relación con la reducción tanto de colesterol total y LDL como el aumento del HDL (Foscolou A et al., 2018; Mazzocchi A et al., 2019). Además de un aporte directo de vitamina E, o tocoferol, al que se le reconocen propiedades antioxidantes. Así como las técnicas culinarias que usen este aceite como base a la condimentación, también tiene asociaciones beneficiosas a su consumo (Ramírez-Tortosa MC et al, 1999; Nocella C et al., 2018; Hurtado-Barroso S et al., 2019).

El alto consumo de frutas y verduras asegura un consumo diario de niveles adecuados de antioxidantes, así como la baja ingesta de carnes rojas (Sotos-Prieto M et al, 2011; Salas-Salvado J et al., 2019) y grasas de consumo como la mantequilla o la margarina. Reduciendo de esta forma el consumo de ácidos grasos saturados y la alta densidad calórica que suele ir acompañándolos (Baratta F et al., 2017).

El consumir cereales integrales asegura un consumo apropiado de fibra, que actualmente es inferior a lo recomendado en la población general (EUFIC, 2018), y es sabido que el consumo adecuado de fibra predispone a una buena regulación del tránsito y equilibrio del microbioma y funcionamiento intestinal (Barko PC et al., 2018).

La ingesta de pescado y frutos secos aportan los niveles de ácidos grasos insaturados (omega-3,6 y 9), reconocidos como beneficiosos y por ello, se estudia su relación con la prevención en cuanto a enfermedades degenerativas a nivel cognitivo (Sala-Vila A, et al., 2016; Martínez-González MA, 2016; Sánchez-Villegas A, et al., 2018).

El consumo moderado de vino tinto (2 copas en hombres y una copa en mujeres (100ml)) aporta una cantidad considerable de antioxidantes destacados, bajo estudio en la actualidad, como es el caso de resveratrol, o los clásicos taninos (Giacosa A et al, 2014). A su vez, el consumo moderado de vino se asocia con la prevención a nivel cardiovascular, no obstante, su contenido en alcohol lo obliga a

ser un consumo reducido), llegando a ser comprometida y muy calculada o restringida su recomendación (Soriano del Castillo JM, 2006; Farinetti A et al., 2017; Román GC et al., 2019; Ditano-Vázquez P et al., 2019).

La reducción de sal y de técnicas culinarias como frituras o rebozados, permitirán un control de los valores de presión arterial por la reducción del sodio total incorporado a través de la dieta. Así como la baja ingesta de alimentos con un alto contenido en ácidos grasos saturados aseguran un control de los valores lipídicos en el organismo, mejorando los valores generales en dislipemias y su evolución (Bonaccio M et al, 2011; De Pergola G et al., 2018; Chauveau P et al., 2018).

El estudio de los Siete Países (Keys A et al, 1986) demostró los posibles efectos beneficiosos de seguir el patrón dietético mediterráneo. El estudio de los Siete Países incluía una cohorte de 13.763 hombres de entre 40-59 años, pertenecientes a siete países, catalogados como: mediterráneos y no mediterráneos. Los no-mediterráneos: Estados Unidos, Japón, Finlandia, Holanda; y los mediterráneos: Yugoslavia, Italia y Grecia. Así pues, se realizaron varias evaluaciones transversales, y tras 15 años de seguimiento los resultados indicaron que la dieta consumida era un punto clave en cuanto a mejoras saludables pertinentes a este contexto, ya que quedó constancia de que la esperanza de vida en estos países era mayor y la mortalidad coronaria era menor (Keys A et al, 1986). Mientras el estudio iba tomando forma y se reunían los resultados se pudo observar que los beneficios principales residían en la diferencia de la relación entre ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos saturados (AGM/AGS) respecto a otras dietas, entendiéndose que a mayor consumo de AGM y menor consumo de AGS, menor mortalidad cardiovascular. En relación a ello, también se obtuvieron como resultados destacables, que los países con una menor ingestión de grasas de origen animal tenían una tasa de mortalidad más baja por enfermedad coronaria, así como en la prevalencia de la obesidad, hábitos tabáquicos y actividad física. Además de poder observarse que el colesterol dietético en los países mediterráneos tenía un efecto hipercolesterolemizante menor que el de los AGS. De esta forma, A. Keys realizó su propia definición de Dieta Mediterránea como: *“Aquella dieta que se caracteriza por un elevado consumo de pan, de legumbres, de arroz, frutas y verduras. Siendo fundamental la utilización del aceite de oliva, así como el típico consumo moderado de vino en las comidas. Abundante en frutos secos y pescado, la Dieta Mediterránea es escasa en carnes rojas y grasas de la leche”*. Además de reconocer la importancia de esta dieta dentro de un marco de *“hábitos mediterráneos o estilo de vida mediterráneos”*, que del mismo modo se caracteriza por: la realización de siesta de manera frecuente, el alto de apoyo social, así como las tradiciones culinarias de realizar las comidas en casa, junto a la familia y amigos, en sociedad, convirtiendo el hábito de comer en un hábito social, el alto

grado de ejercicio físico, y el suave clima mediterráneo, que favorece los paseos o hábito de caminar durante todo el año. Por tanto, quizá, en lugar de hablar de Dieta Mediterránea deberíamos hablar de “*vida mediterránea*”, puesto que se trata de una forma de vida, con costumbres saludables, que permiten la observación de una asociación entre este tipo de vida y una mayor longevidad y menor incidencia de aparición de enfermedades de tipo crónico. Se ha observado evidencia que respalda los posibles mecanismos para explicar el efecto beneficioso sobre la salud cardiovascular (Serra-Majem L et al., 2006). Se han demostrado efectos favorables sobre la resistencia a la insulina y la vasorreactividad dependiente del endotelio, así como los efectos antioxidantes y antiinflamatorios, obtenidos tanto en su conjunto como con sus componentes individuales (Estruch R, 2010; Sayón-Orea C et al., 2019; Rees K et al., 2019; Tresserra-Rimbau A et al., 2019; Cano-Ibáñez N et al., 2020). Además, el patrón dietético mediterráneo se ha asociado con efectos beneficiosos sobre muchos factores de riesgo de Síndrome metabólico, incluidas las dislipemias, la obesidad, la diabetes y la hipertensión (Salas-Salvadó J et al., 2019; Konieczna J et al., 2019). Los efectos protectores de una dieta de estilo mediterráneo sobre los resultados de salud probablemente se deriven de interacciones sinérgicas entre diferentes componentes como un patrón dietético completo más que de los efectos relativos de grupos específicos de alimentos (Grosso G et al., 2017). Los objetivos de esta revisión fueron sintetizar la evidencia de los ensayos clínicos aleatorizados (ECA) para determinar la efectividad del consejo para seguir una dieta de estilo mediterráneo o la provisión de alimentos relevantes para una dieta de estilo mediterráneo, o ambos, sobre los criterios de valoración clínicos y los factores de riesgo cardiovascular para el primario y prevención secundaria de enfermedad cardiovascular (Sánchez-Taínta A et al., 2008; Rees K et al., 2019).

1.4.1.2 Actividad física

La alimentación y el estilo de vida han sido objeto de numerosos estudios dedicados a la nutrición y la salud, por su relación directa con la aparición de distintas patologías. Sin embargo, es ahora cuando se presta la suficiente atención a la frecuencia con la que practicamos ejercicio físico y mantenemos un estilo de vida activo, evitando el sedentarismo, como una de las herramientas principales para el tratamiento de múltiples alteraciones metabólicas, originadas en su mayoría, por un desequilibrio energético continuado en el individuo. En la actualidad, cada vez existe más evidencia sobre los beneficios del ejercicio y de cómo es capaz de potenciar el bienestar del cuerpo y la mente y reducir el riesgo de contraer enfermedades crónicas en los distintos grupos de edad y etapas de la vida (Díaz

KM et al., 2013; Galloza J et al., 2017). Los resultados de recientes estudios muestran como la intervención es más eficaz cuando se realiza actividad física de forma moderada en la prevención de la cronicidad, y, en muchos casos, tratar las enfermedades crónicas es posible por medio de la adopción de un estilo de vida activo, aunque los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la actividad física y el ejercicio producen sus efectos beneficiosos siguen investigándose (Turner JE et al., 2017). En un informe sobre los beneficios de la actividad física publicado recientemente por el Consejo Europeo de Información sobre Alimentación (European Food Information Council, EUFIC), muestran que las personas relativamente activas, en especial durante la edad adulta y la vejez, tienen el doble de probabilidades de evitar una muerte prematura o una enfermedad grave. Para ello, promocionan los beneficios más identificados obtenidos tras realizar actividad física y se potencia su comunicación en los medios con el fin de llegar a la gran mayoría de la población (Warburton DE et al., 2017; Swift DL et al., 2018).

Así pues, cada vez se pone más de manifiesto la relación entre la reducida (o incluso inexistente) actividad física, como una de las principales causas del aumento de la obesidad y de síndrome metabólico. De la misma forma podemos hablar del riesgo de enfermedad cardíaca asociado a estos factores y, por tanto, a la inactividad del individuo. La práctica de ejercicio es una de las herramientas más eficaces para prevenir la miocardiopatía. Los mecanismos incluyen procesos sistémicos de todo el cuerpo (marcadas mejoras en los perfiles de compuestos inflamatorios y metabólicos), pero también ciertas alteraciones inducidas por el ejercicio que son intrínsecas al tejido cardíaco (Turner JE et al., 2017). Recientes trabajos han demostrado que las personas con un estilo de vida activo tienen la mitad de probabilidades de desarrollar una enfermedad cardíaca que las personas que llevan una vida sedentaria (Warburton DE et al., 2017; Swift DL et al., 2018). Las personas obesas que practican ejercicio, tienen menor riesgo de padecer una enfermedad cardíaca, así como un control mayor entre los niveles de glucemia, disminuyendo la probabilidad de padecer diabetes. De esta forma la probabilidad de que personas muy activas padezcan diabetes es de un 33 a un 50% menor. Asimismo, se ha demostrado que el ejercicio físico ayuda a los diabéticos a controlar los niveles de azúcar en la sangre (Salas-Salvadó J et al., 2019). También encontramos una relación directa con un menor riesgo de cáncer. Una pauta de actividad física moderada o intensa reduce el riesgo de contraer cáncer de colon, colorrectal, de pulmón y de mama, según han demostrado distintos estudios en los últimos años (Nilsen TI et al., 2001; Ancellin R, 2019). Además, llevar un estilo de vida activo y/o moderadamente activo también previene el deterioro muscular y óseo. La práctica de ejercicio físico con regularidad fortalece los músculos, los tendones y los ligamentos, y aumenta y/o mantiene la densidad ósea. Se ha descubierto que los distintos ejercicios y/o actividades en los que debemos soportar nuestro propio peso corporal (correr, patinar y bailar, son algunos ejemplos)

mejoran la densidad ósea durante la adolescencia, ayudan a mantenerla durante la edad adulta y retrasan la pérdida de masa ósea que se produce cuando envejecemos (osteoporosis) (Eckstrom E et al., 2020). La práctica de ejercicio físico de manera regular es la forma más eficaz de evitar la reducción de las capacidades funcionales asociadas a la degeneración propia de la edad de las condiciones musculoesqueléticas, ya que aunque gran parte de la población envejecida es funcionalmente independiente y participa en muchos tipos de programas de fomento de distintos ejercicios, parte de esta misma población sufre de enfermedades crónicas y comorbilidades asociadas que promueven un decline en su calidad de vida y produce limitaciones en sus habilidades, tanto psicomotrices como cognitivas (Lee PG et al., 2017; Tari AR et al., 2019).

Así mismo, también se han visto asociados al ejercicio activo distintos beneficios psicológicos y respuestas cognitivas. Son varios los trabajos que demuestran que la actividad física mejora el bienestar psíquico general, tanto la forma en que afrontamos el estrés como las funciones mentales, es capaz de reducir los efectos producidos por la ansiedad y regula el sueño (Biddle SJH et al., 1998; Biddle SJH et al., 2011). La realización de ejercicio físico moderadamente reduce el riesgo de contraer enfermedades y mejora la calidad de vida (preservando la salud mental y aumentando la flexibilidad y la resistencia) (Lee IM et al. 2001; Eckstrom E et al., 2020).

Por tanto, la evidencia actual indica que la forma más segura, eficaz y saludable de bajar de peso es mantener y/o fomentar un estilo de vida activo, junto con una alimentación adecuada, segura y suficiente para nuestras necesidades energéticas y de micronutrientes (EUFIC, 2020). Por lo que debe recomendarse la práctica del mismo en todos los estadios y rangos de edad y, por ello, será la mejor forma de evitar la aparición de las alteraciones crónicas, así como el emergente Síndrome metabólico. Aunque debemos de tener en cuenta que, en la sociedad actual, la creciente urbanización y el desarrollo de las nuevas tecnologías, han producido una disminución considerable en la actividad y movilidad humana, siendo sustituidos por sus versiones mecanizadas y desarrollo del transporte urbanístico. De hecho, se estima que la reducción del gasto energético diario atribuible a todos estos factores en los últimos 50 años podría ser del orden de 250-500 kcal/día (Fox KR et al, 2007). En este sentido, estudios epidemiológicos han demostrado que, en adultos, el grado de obesidad se encuentra directamente relacionado con las horas que el individuo permanece sentado (Campbell SDI et al., 2018; Salas-Salvado J et al., 2020). Por ello, la realización de 300 minutos por semana, de 60 a 30 minutos por día durante 5-7 días, de una actividad moderada, es una de las recomendaciones generales para la población dado que el ejercicio físico es uno de los hábitos con más influencia en el control de la obesidad (Akbarbartoori M et al., 2008; Aranceta-Bartrina J et al., 2019). Estudios recientes han mostrado como la determinación del tiempo de sedentarismo se

asocia con una peor salud cardiometabólica (figura), aumentando la incidencia de diabetes y obesidad (figura 1.6) (Patterson R et al, 2018; Campbell SDI et al., 2018), así como con la pérdida muscular (Gianoudis J et al., 2015) y una mayor mortalidad (Ekelund U et al., 2019).

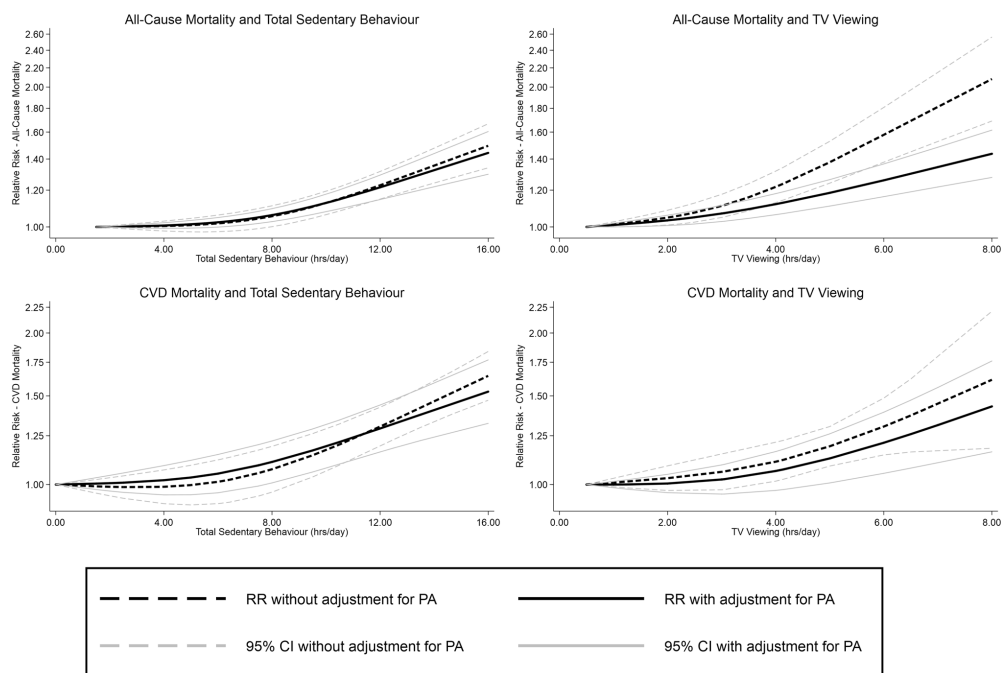


Figura 1.10. Asociaciones no lineales entre el comportamiento sedentario y los resultados de salud presentados con y sin ajuste de actividad física (Patterson R, et al., 2018)

Es por ello que uno de los objetivos principales de la población de estudio que forma parte de esta tesis es que los sujetos aleatorizados en el grupo de intervención reciban recomendaciones y se les fomente la realización de actividad física. La estrategia consistirá en ir aumentando el nivel de actividad progresivamente, pasando de sedentarios a moderadamente activos y éstos a activos, lo que se corresponderían con recomendaciones en evolución hasta alcanzar el objetivo final de 60min/día dedicados a caminar de manera continua, es decir, unos 10.000-11.000 pasos diarios seguros (Salas-Salvadó J et al., 2019).

La evolución de los niveles partirá del nivel 1, en los que debe realizarse 30min/día de caminar 3-4 veces a la semana, con series de al menos 10min consecutivos (2500-3000 pasos/día). Si esta recomendación se cumple durante tres meses consecutivos se evolucionará al siguiente nivel de actividad, nivel 2a, en el que se deben caminar 30min/día durante seis días a la semana, y tras los siguientes 3 meses más podremos pasar al siguiente nivel, el 2b, en el que el tiempo aumenta a los 40min/día para 6 días a la semana, cumpliendo la recomendación de 8.000-9.000 pasos diarios. De nuevo, tras tres meses cumpliendo este nivel de recomendación se evolucionará al siguiente nivel, 3a, en el que la recomendación aumenta a los 60 min/diarios de caminar 5 días semanalmente, alcanzando los 10.000-11.000 pasos/día, una vez cumplida esta recomendación por 6 meses pasaríamos al último nivel de recomendaciones para nuestra población de estudio, siendo los 7 días de la semana los que deben realizarse un mínimo de 60 min de caminar, alcanzando los 10.000-11.000 pasos, 70.000-77.000 semanales. El cumplimiento de estas recomendaciones, existiendo la correcta evolución permitirá que los sujetos puedan ser clasificados e intervenidos de ser sedentarios a pasar a ser moderadamente activos y una vez alcanzado este nivel, seguir la recomendación hasta llegar al nivel de máxima actividad recomendada, los 10.000 pasos y serán reconocidos como activos (Salas-Salvadó J et al., 2019). Aunque la recomendación establecida por la Organización Mundial de la Salud de los 10.000 pasos para prevenir los datos sobre obesidad y comorbilidades asociadas sufre de muchas discrepancias por las distintas áreas especializadas (WHO, 2010), recientes estudios si han mostrado que realizar un mayor número de pasos diarios se asocia significativamente con una menor mortalidad por todas las causas, a pesar de no haber asociación estadísticamente significativa entre la intensidad del paso y la mortalidad después de ajustar por el total de pasos por día (Saint-Maurice PF et al., 2020).

Un programa de ejercicio apropiado debe incluir una combinación de ejercicios aeróbicos, de resistencia, de flexibilidad y de equilibrio (Galloza J et al., 2017). Los cambios fisiológicos que ocurren en el envejecimiento pueden limitar la función y la calidad de vida en general, además a medida que envejecemos pueden ocurrir a un ritmo más rápido. Estudios recientes han mostrado evidencia de que la actividad física tiene muchos beneficios favorables en esta etapa de la vida, permitiendo aumentar la calidad de vida y con ella, la esperanza de vida. El programa de ejercicio ideal en adultos mayores debe incluir entrenamiento aeróbico, de resistencia, flexibilidad y equilibrio. Las recomendaciones de ejercicio deben adaptarse individualmente a las habilidades, precauciones y objetivos de cada persona, teniendo en cuenta las particularidades de cada sujeto a medida que transcurren los años en él y envejece. También es importante que el tipo de ejercicios pautado tenga la suficiente intensidad, volumen y duración para lograr los máximos beneficios posibles. Es por ello, que el grupo de intervención también recibirá recomendaciones de realización de ejercicios de equilibrio y de fuerza, que

complementarán la parte aeróbica alcanzada con los pasos diarios ejecutados (Galloza J et al., 2017; Lee PG et al., 2017; Salas-Salvadó J et al., 2019).

Las cuatro categorías principales de actividades físicas se basan en el tipo de movimiento corporal que se realiza con la respectiva contracción de músculos esqueléticos y aumento de gasto energético y se clasifican en: 1) ejercicios aeróbicos/ resistencia; 2) ejercicios de resistencia/fuerza; 3) ejercicios de equilibrio y; 4) ejercicios de flexibilidad (tabla 1.8.):

Tabla 1.8. Descripción de los cuatro tipos de ejercicios que se recomiendan en población adulta-envejecida (Lee PG et al., 2017)

Tipo de actividad física	Descripción de tipos de actividad física y/o ejercicio:
A. Ejercicio aeróbico / de resistencia (p. Ej., Caminar, andar en bicicleta estacionaria, ejercicio acuático)	Ejercicio en el que los músculos grandes del cuerpo se mueven de manera rítmica durante periodos prolongados.
B. Entrenamiento de equilibrio (por ejemplo, caminar hacia atrás, hacia los lados, caminar con los talones o los dedos de los pies; tai chi)	Una combinación de actividades diseñadas para aumentar la fuerza de la parte inferior del cuerpo del individuo y reducir la probabilidad de caídas.
C. Ejercicio de flexibilidad (p. Ej., Estiramiento de isquiotibiales, pantorrillas o tríceps)	Actividades diseñadas para preservar o extender el rango de movimiento alrededor de una articulación
D. Ejercicios de resistencia/fuerza (p. Ej., Ejercicios que utilizan bandas de resistencia, máquinas de pesas, pesas de mano; excavar, levantar y transportar como parte de la jardinería; llevar comestibles)	Ejercicio que hace que los músculos trabajen o se mantengan contra una fuerza o peso aplicado

A. Los ejercicios aeróbicos/de resistencia

Los ejercicios aeróbicos tienen numerosos beneficios en la población anciana y durante el envejecimiento en sí. El entrenamiento con ejercicios de resistencia es la única terapia conocida por mejorar de manera constante la masa muscular, fuerza, potencia y calidad, así como la función física general (Liu CJ et al., 2009; Lee PG et al., 2017). El envejecimiento se asocia con una disminución en fuerza muscular y potencia muscular, que es una combinación de fuerza y velocidad. Estos cambios pueden identificarse por la calidad del músculo, que puede ser medido por la fuerza producida por unidad de masa muscular activa, que estima la contribución de la masa muscular, funciones neuromuscular y mecánica, contráctil, y propiedades arquitectónicas del músculo (Lee PG et al., 2017). El ACSM (The American

College of Sports Medicine) recomienda que los adultos mayores realicen lo siguiente cada semana: un mínimo de 150 minutos de actividad aeróbica de intensidad moderada o 75 minutos de actividad aeróbica de intensidad vigorosa, y dos días o más no consecutivos de fortalecimiento de actividades de intensidad moderada.

B. El entrenamiento del equilibrio y propioceptivo

El entrenamiento del equilibrio y propioceptivo debe ser una parte regular del ejercicio para todos los adultos mayores para prevenir caídas, especialmente en personas con mayor riesgo de caídas (Gillespie LD et al., 2012). El entrenamiento del equilibrio implica practicar para controlar los movimientos de la posición del cuerpo mientras está de pie, pero con una base de apoyo reducida (por ejemplo, pararse sobre un pie). El entrenamiento de equilibrio debe practicarse al menos dos horas por semana, debe ser continuo para lograr un efecto de prevención de caídas duradero y puede realizarse en grupo o en el hogar (Sherrington C et al., 2011). Para minimizar el riesgo de caídas durante el ejercicio, el entrenamiento del equilibrio debe supervisarse de cerca al principio y comenzar con posturas menos desafiantes. Los ejercicios de equilibrio (por ejemplo, tai-chi, yoga) pueden mejorar o mantener la función física y reducir las caídas en los adultos mayores con riesgo de caída

C. Los ejercicios de flexibilidad

Los adultos mayores con flexibilidad articular reducida pueden tener dificultades para realizar actividades diarias como vestirse y alcanzar objetos en un estante. Los ejercicios de flexibilidad o estiramiento mejoran el rango de movimiento de la articulación después de tres a cuatro semanas de estiramiento regular de dos a tres veces por semana, pero se logran ganancias aún mayores con los ejercicios de flexibilidad diarios (Garber CE et al., 2011). Los ejercicios de flexibilidad son más efectivos cuando se realizan después de ejercicios leves a moderados ejercicio aeróbico o de resistencia. Los pacientes con lesiones articulares recientes o cirugía deben consultar con sus médicos antes de realizar ejercicios de flexibilidad para evitar que las lesiones empeoren o perjudiquen la curación de las heridas quirúrgicas. Los ejercicios de flexibilidad mejoran y mantienen el rango de movimiento de las articulaciones en los adultos mayores.

D. El entrenamiento con ejercicios de fuerza

Recientes trabajos han mostrado como la frecuencia de 1 a 6 sesiones por semana, con un volumen de entrenamiento específico para cada paciente de 1-3 series de 6-15 repeticiones y con una intensidad variable del 30-70%, dependiendo de las capacidades de cada individuo intervenido, promueven mejoras significativas en la fuerza muscular, la potencia muscular y los resultados funcionales. Por ello, se indica que el entrenamiento de fuerza supervisado y controlado representa una intervención eficaz en el tratamiento de la fragilidad y la prevención de la sarcopenia en población adulta-envejecida (López P et al., 2018).

Todas las prescripciones comentadas de ejercicio para adultos mayores deben tener en cuenta el estado de salud y la capacidad funcional del individuo para ser efectivas y no causar dolencias físicas asociadas a una mala práctica y/o comprensión de los mismos. Se ha indicado que cualquier cantidad de ejercicio es mejor que ser sedentario, incluso si el estado de salud impide que una persona logre los objetivos específicos recomendados en su totalidad (Lee PG et al., 2017). Para la mayoría de las variables vinculadas a la salud, se obtienen más beneficios a medida que aumenta la intensidad de la actividad física, así como si hay una mayor frecuencia o mayor duración. De ahí a la necesidad de mantener ciertos niveles de actividad diaria una vez se hayan alcanzado los objetivos pautados. Los componentes clave de la prescripción incluyen establecer objetivos de actividad alcanzables, identificando barreras y proporcionando posibles soluciones, y proporcionando recomendaciones específicas sobre el tipo, frecuencia e intensidad de las actividades. Los adultos mayores obtienen distintos beneficios del ejercicio aeróbico, el entrenamiento de fuerza o resistencia, los ejercicios de flexibilidad o estiramiento y el entrenamiento del equilibrio (Lee PG et al., 2017; Mora JC et al., 2018).

1.4.1.3 Tabaquismo

Actualmente, se ha estimado que, de todas las exposiciones ambientales comúnmente investigadas, fumar tabaco es una de las que más impacto significativo en la metilación del ADN (Smith IM et al., 2007; Breitling LP et al., 2011). Múltiples estudios realizados en diferentes poblaciones han encontrado que la exposición al humo del tabaco se asocia con la hipometilación de varios sitios de CpG, con diferencias estadísticamente significativas entre fumadores y no fumadores (Shenker, N.S et al., 2013; Philibert RA et al., 2013; Zeilinger S et al., 2013; Tsaprouni LG et al., 2014; Dogan MV et al., 2014; Reynolds LM et al., 2015; Harlid S et al., 2014; Sayols-Baixeras S et al., 2015; Li S et al., 2018; Hulls PM et al., 2020; Sun YQ et al., 2021; Mishra PP et al., 2020; Barcelona V et al.,

2019; Wen D et al., 2022; Cardenas A et al., 2022). Además, se ha demostrado repetidamente que los ex fumadores son capaces de recuperar la desmetilación causada por el consumo de tabaco (Shenker NS et al., 2013; Tsaprouni LG et al., 2014; Dugué PA et al., 2020; Langdon RJ et al., 2021). A pesar de las diferencias en la metodología, los resultados de estas investigaciones han sido muy consistentes en la identificación de docenas de genes con sitios CpG hipometilados en fumadores (Shenker NS et al., 2013; Langdon RJ et al., 2021). Los siguientes genes son los más prominentes en variaciones en la metilación diferencialmente: F2RL3 (F2R como trombina o tripsina receptor 3), AHRR (represor del receptor de arilo-hidrocarburos), PRSS23 (serina proteasa 23), RARA (receptor de ácido retinoico alfa), LRRN3 (repetición neuronal rica en leucina 3), GFII1 (represor transcripcional independiente del factor de crecimiento 1) y GPR15 (receptor acoplado a proteína G 15). Aunque es cierto que la clasificación de otros genes significativamente metilados o sitios CpG intergénicos metilados diferencialmente varía entre los estudios en función de las características de la población y la cobertura de la tecnología empleada para evaluar la metilación del ADN (Wilhelm-Benartzi CS et al., 2013; Chatterjee A et al., 2017; Rauluseviciute I et al., 2019).

La mayoría de las investigaciones citadas analizaron el metiloma utilizando microarrays de metilación de ADN de todo el epigenoma (Wilhelm-Benartzi CS et al., 2013; Christiansen C et al., 2021). En las últimas décadas, la cobertura de estos microarrays de ADN ha aumentado dramáticamente. La matriz inicial de Illumina Human midió la metilación a aproximadamente 27,000 CpGs (27K). Más tarde, la comunidad epigenética utilizó la matriz Human Methylation 450 (450K) para la gran mayoría de los estudios publicados sobre el tabaquismo (Wilhelm-Benartzi, CS et al., 2013). Más recientemente, la cobertura genómica se ha incrementado a más de 850,000 sitios CpG con la matriz Methylation EPIC (850K) (Moran S et al., 2016). A pesar de la consistencia en la detección de hipometilación en fumadores, ha habido informes de diferencias étnicas (Elliott HR et al., 2022) que sería interesante investigar más a fondo para identificar biomarcadores más específicos de la población, especialmente cuando se consideran las poblaciones subrepresentadas del sur de Europa (Salas LA et al., 2021; Fatumo S et al., 2022). Además, aunque se sabe que la dieta podría afectar la metilación del ADN (Maugeri A, 2022; Fareed MM et al., 2022; Ungaro P et al., 2022; Li X et al., 2022), ninguno de los grandes estudios epidemiológicos citados ha evaluado el efecto de los patrones dietéticos sobre las diferencias de metilación del ADN entre fumadores y no fumadores a nivel de todo el epigenoma (Shenker NS et al., 2013; Philibert RA et al., 2013; Zeilinger S et al., 2013; Tsaprouni LG et al., 2014; Dogan MV et al., 2014; Harlid S et al., 2014; Sayols-Baixeras S et al., 2015; Li S et al., 2018; Hulls PM et al., 2020; Sun YQ et al., 2021; Mishra PP et al., 2020; Cardenas A et al., 2022; Dugué PA et al., 2020; Langdon RJ et al., 2021).

1.4.2 Percepción de sabores

En los últimos años, el sentido del gusto y la forma en la que se perciben los sabores ha sido foco de estudio y de interés, ya que se ha observado que, en ciertas patologías y alteraciones del organismo, nuestra capacidad de percepción cambia. Se han documentado variaciones en la percepción de sabores en pacientes con como obesidad, diabetes, hipertensión, inflamación, etc. (Deepankumar S et al., 2019), que han cambiado o modificado su estilo de vida como variando su tipo de dieta (Coltell O et al., 2019), por alteraciones del estado de ánimo y del buen estado de salud, o como efecto secundario de ciertos tratamientos farmacológicos específicos (Turner L et al., 2022; Lin JY et al., 2013) o por diferencias asociadas al propio sexo y dimorfismo sexual (Gaillard D et al., 2021; Mosinger B et al., 2013). El sistema gustativo hace referencia a la detección, reconocimiento y percepción de los diferentes estímulos externos que entran en el organismo mediante la ingesta de los alimentos y sustancias (Joseph PV et al., 2016). Es por ello, que entendemos que un correcto sistema gustativo, que actúa como sistema sensorial es necesario para el mantenimiento de la salud, dado que la percepción del sabor influye en la elección de los alimentos y ayuda a mantener la correcta homeostasis fisiológica (Parkes SL et al., 2017).

Esta capacidad de percibir los distintos sabores de los alimentos y sustancias y su asociación con determinadas características y propiedades es uno de los sentidos que muestra más variabilidad dentro de nuestra propia especie, no sólo en el nivel de percepción de cada sabor, sino también en la preferencia por los mismos, y, por tanto, por los distintos alimentos (Parkes SL et al., 2017). El sistema gustativo muestra que existe variabilidad en la propia percepción, en un mismo sujeto, la percepción a un sabor puede variar por diversos factores y etapas de la vida, indicando, a su vez, que pueden afectar a la salud de muchas formas diferentes (Wilkie LM et al., 2014). Por este motivo, en los últimos años, van en aumento los estudios que tratan de investigar la interrelación entre las moléculas de los alimentos o productos consumidos, el sentido del gusto y factores externos que pueden verse vinculados (Williams JA et al., 2016; Ruiz F et al., 2019).

En Síndrome metabólico y patologías crónicas asociadas, los estudios sobre percepción de sabores realizados en los últimos años muestran cierta vinculación con el nivel o grado de percepción disminuido de los distintos sabores (y en su conjunto) (Coltell O et al., 2019). Del mismo modo que la preferencia por ciertos sabores también se ha visto asociada a la capacidad de percibirlos y de la propia

percepción de alimentos en su totalidad (Fernández-Carrión R et al., 2021). El sistema gustativo, permitiendo detectar, reconocer y percibir los diferentes estímulos externos que entran en el organismo mediante la ingesta de los distintos alimentos y sustancias (Loper HB et al, 2015) es clave en la selección y decisión de ingerir diversos alimentos frente a otros, influyendo en patrones físicos y bioquímicos del individuo (Fischer ME et al, 2014; Robino A; 2015).

En la actualidad, hay cada vez mayor número de personas con disfunción del gusto, este tipo de disfunción puede pasar a ser un problema grave, sobretodo en etapas de envejecimiento (Coltell O et al., 2019). Además, en este tipo de investigaciones es dificultoso la reproducibilidad, debido a que las estimaciones poblacionales de los trastornos quimiosensoriales varían ampliamente entre los estudios, ya que existe un muestreo diferencial de las variables, así como variedad en las metodologías de pruebas sensoriales que se emplearon y la elección de puntos de corte para definir los resultados. Aunque existe unanimidad entre los estudios en el sentido en que los trastornos quimiosensoriales son muy comunes en los países donde se han recopilado datos epidemiológicos, además, los estudios poblacionales han identificado o confirmado observaciones de casos y controles y otros estudios, múltiples factores que influyen en la percepción y preferencia de sabores (Hoffman HJ et al., 2016 ; Liu G et al., 2016; Doty RL, 2019).

Recientemente, diversos trabajos han mostrado correlaciones fuertes entre la percepción de los distintos sabores en conjunto y de forma individual, coincidiendo con otros estudios que reportaron que los participantes que percibían más el sabor amargo, distinguían de manera significativa el resto de sabores (Ooi SX et al, 2010; Coltell O et al., 2019; Fernández-Carrión R et al., 2021). Es por ello que su grado de percepción juega un papel crucial en la preferencia de consumo, frecuencia y cantidad que se ingiere en los distintos estadios y condiciones fisiológicas de las personas (Doty RL, 2019), por ejemplo, un estudio actual mostró como en pacientes con Síndrome metabólico la percepción de la intensidad del sabor salado no se veía vinculado, mientras que el gusto o nivel de preferencia sí que se veía asociado con Síndrome metabólico (OR = 1,85; IC del 95%: 1,02-3,35) (Veček NN et al., 2020). Otro trabajo en pacientes con sobrepeso y/u obesidad pudo detectar que los sujetos con diabetes tenían una percepción ligeramente más baja de todos los gustos ($p=0,026$ para la "puntuación total del gusto", es decir, la suma de las puntuaciones de cada sabor), siendo la percepción del sabor amargo la que mostraba percepciones estadísticamente más bajas ($p=0,023$) (Fernández-Carrión R et al., 2021).

1.4.2.1 Sabor amargo

El sabor amargo ha sido el más estudiado, posiblemente por ser el más sencillo de detectar. Las personas normalmente identifican este sabor como desagradable, y normalmente son los alimentos más amargos, como ciertos vegetales o sustancias como el café, son algunos de los que más se rechazan. El gusto y percepción del sabor amargo se analiza a partir de la identificación y sensibilidad a las distintas disoluciones elaboradas con los compuestos sintéticos, estos son feniltiocarbamida (PTC) y propiltiouracil-6-n (PROP) (García-Bailo B et al, 2009; Dotson CD et al, 2010), siendo esta percepción, una habilidad heredada (Coltell O et al., 2019). Aproximadamente el 75% de la población son catalogadas como catadoras, mientras que el resto de la población necesita una concentración muy alta para detectarlo (Colares-Bento FCJ et al, 2012; Loper HB et al, 2015).

1.4.2.2 Sabor dulce

Al contrario que la percepción del sabor amargo, el sabor dulce es percibido como placentero o agradable, siendo el sabor favorito en la mayoría de grupos de edad, viéndose favorecido su sensación de placer por conductas sociológicas asociadas, como el consumo de pasteles y dulces en festividades o como premio tras alcanzar logros.

Algunos trabajos muestran a la evolución del sabor dulce como una adaptación evolutiva frente a la escasez de alimentos para seleccionar aquellos con alto contenido energético. En la actualidad, esta capacidad parece estar convirtiéndose en una desventaja, ya que la gran disponibilidad de alimentos de todo tipo en los países occidentales, la tendencia de aumento de inactividad y sedentarismo, hecho que se vincula a trabajos más informatizados que requieren un menor consumo de energía física por parte del individuo, promueven que la preferencia por el dulce sea rechazada culturalmente (Keskitalo K et al, 2007; García-Bailo B et al, 2009). Aunque los factores que contribuyen a una mayor ingesta de alimentos dulces son muchos y variados, se cree que el sabor puede ser un determinante importante (Gutierrez R et al., 2020; Murray RD et al., 2017; Mennella JA et al., 2016; Tan SY et al., 2019). En varios estudios realizados en poblaciones de diferentes edades, los participantes afirmaron que el sabor de los alimentos era uno de los factores que más influía en su ingesta (Kershaw KN et al., 2019; Lee KE et al., 2019; Islam MR et al., 2019; Lee KH et al., 2019; Bartkiene E et al., 2019; Kamphuis CBM et al., 2015; Reed DR et al., 2019) y buscaban sabores agradables.

1.4.2.3 Sabor salado

Son numerosos los cationes que identifican o provocan diversas respuestas por el sabor salado, pero normalmente se habla del cloruro sódico como excedente a este sabor, ya que está presente en prácticamente todos los tipos de alimentos de nuestra dieta (Coltell O et al., 2019). La variabilidad en la percepción del sabor salado se ha estudiado durante décadas, aunque el mecanismo molecular general de percepción para este sabor permanece desconocido (García-Bailo B et al, 2009). Aunque la percepción del sabor salado puede indicar cierto componente hereditario, la exposición ambiental es la que influye de manera importante en la variabilidad observada en la percepción de este sabor (Keskitalo K et al, 2007). La preferencia por contenidos elevados en sal induce una percepción inferior a productos o alimentos con contenidos en sal inferiores a los rangos normalmente consumidos, aunque si bien existe una adaptación, y el sabor y percepción por el salado es capaz de verse modificado y poder llegar a identificar niveles reducidos que tras otras circunstancias podían no haberse detectado.

1.4.2.4 Sabor ácido

La percepción del sabor ácido es rechazada por la mayoría de los mamíferos pudiendo ayudar a prevenir el consumo de alimentos en mal estado o servir como indicar de la madurez de la fruta (Lindemann B, 2001; García-Bailo B et al, 2009). Los resultados de distintos estudios muestran que existen diferencias en la percepción de este sabor para sexo y edad, siendo los más mayores los que menos perciben este sabor (Drewnowski A et al, 2001; ElSohemy A et al, 2007), así como una menor sensibilidad por parte de las personas obesas. También se ha detectado una relación inversa entre el consumo de número de cigarrillos y la percepción al sabor ácido, coincidiendo con los resultados obtenidos respecto al sabor salado (Mullings EL et al, 2010).

La variación en la percepción del sabor ácido se debe en un 50% al factor genético (Wise PM et al, 2007), se han propuesto dos receptores potenciales transitorios de los canales iónicos en la percepción del sabor ácido, PKD2L1 y PKD1L3 (Huang AL et al, 2006; Ishimaru Y et al, 2006; López-Jimenez ND et al, 2006). Sin embargo, no existen amplios conocimientos sobre las variaciones interindividuales y la percepción al sabor ácido (García-Bailo B et al, 2009). Por ello, recientes trabajos acreditan importancia en las diferencias fenotípicas de la percepción del sabor ácido en situaciones de alteración fisiológica como la obesidad y Síndrome metabólico y factores relacionados.

1.4.2.5 Sabor umami

El término sabor umami es reconocido como el sabor sabroso de la carne o la sopa (Kim UK et al, 2004), y la sustancia que lo provoca es un aminoácido no esencial, el L-glutamato, clásico de las proteínas y otros alimentos (Bachmanov AA et al, 2009; Chen QY et al, 2009). Los humanos difieren en la percepción del sabor umami, sugiriendo la existencia de variantes genéticas. T1R1 y T1R3 funcionan como receptores del sabor umami en humanos. Sin embargo, poco se conoce sobre la relación entre diferentes polimorfismos en estos genes y la percepción al sabor umami. Los resultados de diferentes estudios no muestran asociación con el sexo, pero sí con la edad, siendo los sujetos más jóvenes (Drewnowski A et al, 2001; El-Sohemy A et al, 2007) y los que no presentan obesidad perciben en mayor grado el sabor umami. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otro estudio en el que el umbral de detección del sabor umami en mujeres obesas fue mayor. Sin embargo, la habilidad para discriminarlo de la sal fue similar a la de los sujetos con normopeso (Kim UK et al, 2004; Pepino MY et al, 2010; Mennella JA, et al., 2011). La hipótesis manifiesta que las personas catadoras para el sabor umami tendrían una mayor tendencia a ingerir menos grasa y serían más delgadas que las no catadoras para este sabor (Kim UK et al, 2004). Debido a la importancia de los alimentos con sabor umami y a su contenido energético, proteico y graso, sería necesario realizar más estudios que valoren la percepción y el consumo con la obesidad y otros factores de riesgo cardiovascular (Coltell O et al., 2019).

A pesar de que existe un creciente consenso sobre la influencia del gusto en la selección de los alimentos consumidos (Drewnowski A et al., 1997; Jayasinghe SN et al., 2017; Mennella JA et al., 2015; Kavaliauskienė I et al., 2021; Van Langeveld AWB et al., 2018), todavía existen muchas dudas sobre cómo se ejerce esta influencia. Muchos estudios han analizado la percepción de los sabores preferentes, como el sabor dulce (incluyendo un rango de medición (es decir, pruebas de umbral o intensidad del sabor dulce) y lo han relacionado con la ingesta de alimentos o con variables relacionadas con la obesidad (Tan SY et al., 2019; Petty S et al., 2020; Jayasinghe SN et al., 2017; Low JYQ et al., 2016; Cicerale S et al., 2012; von Molitor E et al., 2021).

Sin embargo, los estudios que analizan la asociación entre la percepción del sabor dulce y la ingesta de alimentos han reportado resultados inconsistentes. Otro tema relevante es medir la preferencia por los sabores y por el sabor dulce, que es el que

más se asocia a problemas de sobrepeso y obesidad (Tan SY et al., 2019; Drewnowski A et al., 1997). Se ha informado que, en general, es más probable que la preferencia por el sabor dulce se asocie con la ingesta dietética que con la percepción del sabor dulce (Tan SY et al., 2019), a pesar del grado de heterogeneidad entre los métodos para evaluar la preferencia por el sabor dulce (Drewnowski A et al., 2012; Ventura AK et al., 2011; Beauchamp GK et al., 2016; Reed DR 2010; Drewnowski A et al., 1997; Jayasinghe SN et al., 2017). Además, la relación entre la puntuación de percepción de una cualidad gustativa y la preferencia por ella no está clara. Algunos autores afirman que cuanto mayor es la capacidad de percibir el sabor dulce, menor es la preferencia por este, lo que se traduce en una menor ingesta de alimentos dulces (Jayasinghe SN et al., 2017; Ciccerale S et al., 2012). Sin embargo, pocos estudios han analizado tanto la capacidad de percibir el sabor dulce como su preferencia. Además, se han descrito cambios longitudinales en las preferencias de sabor dulce en humanos (Petty S et al., 2020; Desor JA et al., 1987) (en general, lo que indica que los niños y adolescentes prefieren concentraciones de sacarosa más altas que los adultos).

Por otro lado, se sabe que existe una importante influencia genética en la percepción del gusto (von Molitor E et al., 2021; Diószegi J et al., 2019; Bachmanov AA et al., 2014; Nolden AA et al., 2020). Se han informado varios polimorfismos en los receptores del gusto y en los genes relacionados con la transducción del gusto periférico y el procesamiento del gusto central (von Molitor E et al., 2021; Diószegi J et al., 2019; Smail HO et al., 2019; Yang L et al., 2021). Aunque los receptores de sabor para dulce y umami [T1R (receptor de sabor, tipo 1)], así como para amargo [T2R (receptor de sabor, tipo 2)] se han caracterizado en humanos (Diószegi J et al., 2019; Jang JH et al., 2021), la influencia genética a nivel de la población, es especialmente conocida para el sabor amargo, donde los polimorfismos comunes en el gen TAS2R38 (miembro 38 del receptor del gusto 2) se han asociado fuertemente con la percepción del sabor amargo (Smail HO et al., 2019). Sin embargo, para la percepción de los otros sabores (dulce, salado, ácido y umami), la influencia genética a nivel de la población es menos conocida. Para el sabor dulce, la primera subunidad relacionada con el dulce clonada fue T1R2 y, más tarde, se identificó la subunidad T1R3 (von Molitor E et al., 2021). Además, se han caracterizado varias vías independientes del receptor del sabor dulce (von Molitor E et al., 2021; Diószegi J et al., 2019; Yang L et al., 2021; Jang JH et al., 2021). Con base en el enfoque del gen candidato, los polimorfismos en varios genes relacionados con el sabor dulce (TAS1R1, TAS1R2, TAS1R3, GRM1, SLC2A2, DRD2, OPRM1, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SCNN1D, TRPV1 y GNAT3, entre otros) se han asociado con percepción del sabor dulce o con preferencias de sabor dulce en algunos estudios, pero la consistencia entre las investigaciones es muy baja (Reed DR et al., 2010; Diószegi J et al., 2019; Bachmanov AA et al., 2014; Nolden AA et al.,

2020; Yang L et al., 2021; Jang JH et al., 2021) En la era del genoma completo, se llevaron a cabo algunos estudios iniciales de asociación de todo el genoma (GWAS), destinados a identificar nuevos genes relacionados con la percepción del gusto, principalmente para el sabor amargo (Diószegi J et al., 2019; Ledda M et al., 2014; Hwang LD et al., 2018; Hwang LD et al., 2019; Coltell O et al., 2019). Estos GWAS identificaron consistentemente los SNP en el gen TAS2R38 como fuertemente asociados con la percepción del sabor amargo (Ledda M et al., 2014; Hwang LD et al., 2018; Coltell O et al., 2019), pero se han realizado muy pocos estudios centrados en los GWAS para la percepción del sabor dulce (Hwang LD et al., 2019; Coltell O et al., 2019), aparte de nuestro GWAS anterior para la percepción del sabor dulce en sujetos mediterráneos (Coltell O et al., 2019).

Además, menos conocida es la influencia genética en las preferencias gustativas (Diószegi J et al., 2019; Bachmanov AA et al., 2011; Park S et al., 2020) a nivel de GWAS. Aunque se han publicado algunos GWAS recientes sobre las preferencias por el sabor dulce y la preferencia por la ingesta de alimentos azucarados (Hwang, LD et al., 2019; Suzuki T et al., 2021; Kawafune K et al., 2020; Zhong VW et al., 2019), en general, solo podemos decir que los genes que determinan la preferencia por el sabor dulce son muy poco conocidos. Uno de los factores que contribuyen a esta falta de conocimiento es que muy pocas de estas cohortes han medido la preferencia por el sabor dulce (Hwang LD et al., 2019; Kawafune K et al., 2020) antes de realizar GWAS sobre el consumo de alimentos azucarados, como proxy de la preferencia por el sabor dulce. Incluso cuando se ha medido la preferencia por el sabor dulce en los GWAS mencionados, se ha detectado heterogeneidad en este fenotipo: Hwang et al. (Hwang LD et al., 2019) analizó el gusto por la sacarosa en 686 individuos (gemelos y familias de los Estados Unidos), mientras que Kawafune et al. (Kawafune K et al., 2020) obtuvo la preferencia por el sabor dulce de más de 12.000 japoneses mediante el uso de un cuestionario basado en Internet, lo que resultó en una escala de preferencia de cinco puntos. Usando el consumo de alimentos como indicador de la preferencia por el sabor dulce, Hwang LD et al. (Hwang LD et al., 2019) analizó la ingesta de azúcares y dulces en los europeos; Suzuki et al. (Park S et al., 2020) se centró en la ingesta de dulces en japonés; y Zhong VW et al. (Zhong VW et al., 2019) analizó bebidas de sabor dulce en sujetos europeos del Biobanco del Reino Unido. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de los fenotipos analizados, no sorprende la inconsistencia de los resultados obtenidos en los GWAS publicados. Por lo tanto, se necesitan más GWAS que analicen un fenotipo de preferencia de sabor dulce medido, en lugar de utilizar la ingesta de alimentos como un proxy.

Del mismo modo, para la medicina de precisión, es muy importante considerar las características de la población. La ascendencia genética es importante en la medicina de precisión y, en la actualidad, hay escasez de GWAS realizados en poblaciones mediterráneas europeas, que para algunos marcadores difieren de las poblaciones del norte y centro de Europa (Novembre J et al., 2008). Además de los antecedentes genéticos, otras características individuales como el sexo, la edad, la presencia de factores de riesgo cardiovascular como el síndrome metabólico o la diabetes tipo 2, se han revelado como factores muy relevantes para una nutrición personalizada (Rodgers GP et al., 2020; Bush CL et al., 2020). Con respecto al sabor dulce en la diabetes tipo 2, (De Carli L et al., 2018; Neiers F et al., 2016), aunque algunos estudios sugirieron que los sujetos diabéticos tipo 2 pueden mostrar una mala sensación del gusto (Gondivkar SM et al., 2009; Perros P et al., 1996; Wasalathanthri S et al., 2014; Pugnaroni S et al., 2020) principalmente para la percepción del sabor dulce, por lo que al aumentar la búsqueda de alimentos más ricos en azúcares, aún falta consistencia (De Carli L et al., 2018; Neiers F et al., 2016; Gondivkar SM et al., 2009; Perros P et al., 1996; Wasalathanthri S et al., 2014; Pugnaroni S et al., 2020) y es necesario profundizar en este tema. Por último, otro factor a tener en cuenta es el hecho de que los gustos se han analizado mayoritariamente por separado (Diószegi J et al., 2019) cuando la mayor o menor preferencia por una cualidad gustativa posiblemente influya en la preferencia por otra, y esto debe ser investigado.

1.4.3 Preferencias en el consumo de alimentos

Nuestra sociedad actual se caracteriza por una mayor disponibilidad y acceso a todo tipo de alimentos (Sorensen LB et al., 2003). En la elección de los mismos intervienen distintos factores que son capaces de modular la preferencia y finalmente, la elección del alimento que se consume. Estos factores pueden ser biológicos, económicos o físicos, sociales y psicológicos (Wardle J et al., 2000; Sorensen LB et al., 2003; Stubenitsky K et al., 2000; Shaikh AR et al., 2008).

- Factores biológicos: sentir hambre o saciedad, la palatabilidad y las características organolépticas del alimento.
- Factores económicos o físicos: coste y acceso a los alimentos, el nivel educativo y conocimientos asociados a la alimentación
- Factores sociales: clase social, influencia cultural, contexto y entorno social
- Factores psicológicos: estrés y estado de ánimo

Aunque estos factores influyen y pautan la selección de alimentos que se prefieren consumir respecto a otros, es conocido que en la infancia es donde se generan las bases de la preferencia de alimentos. Tanto el sistema familiar que rodea la vida doméstica en la primera infancia como las experiencias tempranas, tienen un papel activo en el establecimiento de conductas que se mantienen persistentes a lo largo de la vida. Se ha observado que los hábitos alimentarios de los progenitores y las estrategias de alimentación son los determinantes más importantes que explican el comportamiento alimentario y la elección de alimentos en un niño. Por tanto, en las primeras etapas de la vida, son los padres y familia los que deben exponer a los niños a una variedad de buenas opciones de alimentos mientras se convierten en referentes de una alimentación saludable (figura 1.11) (De Cosmi V et al, 2017; Scaglioni S et al., 2018).

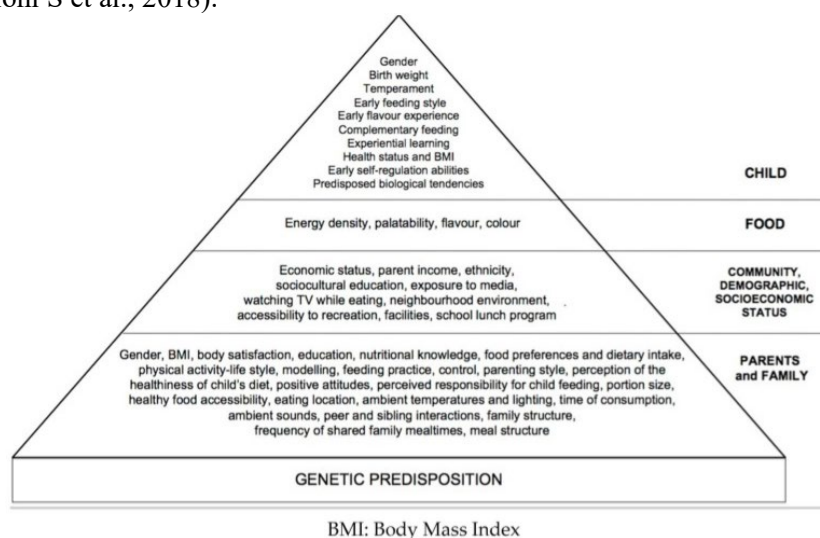


Figura 1.11. Factores que influyen en los comportamientos alimentarios de los niños (De Cosmi V et al., 2017).

Los hábitos y patrones alimentarios de cada niño y posteriormente, individuo, se forman a edades tempranas y se mantienen durante la vida posterior en gran medida (Montaño Z et al., 2015). Los comportamientos alimentarios establecidos en la infancia persisten, pudiendo incluir respuestas o comportamientos tales como irritabilidad y poca variedad en aceptación de alimentos, o una alta capacidad de respuesta a las señales alimentarias y un mayor riesgo de obesidad según las características de los alimentos que se consuman. Recientes investigaciones han indicado que la exposición a una amplia variedad de alimentos saludables desde el

período prenatal, la alimentación temprana con leche y la introducción de alimentos y bebidas complementarios, puede respaldar la aceptación posterior de este tipo de alimentos. Sin embargo, la etapa de desarrollo y crecimiento muestra que hay cierta plasticidad en el tipo de respuestas frente a los alimentos según múltiples factores que influyen a su vez al desarrollo del niño (Mennella JA et al., 2012; Carletti C et al., 2017). En recientes trabajos de investigación, se ha observado que, aunque los comportamientos alimentarios son difíciles de modificar de manera directa, las prácticas de alimentación de la familia y entorno o contexto social son un buen objetivo en las intervenciones para prevenir patrones de alimentación poco saludables y el desarrollo o permanencia del exceso de tejido graso, no sólo en infancia, sino que también en tratamientos de intervención dietética de adultos (Mocanu V et al., 2016; Scaglioni S et al., 2018). Del mismo modo que intervenciones en el estilo de vida, que incluyan favorecer el consumo de alimentos menos calóricos, con alto contenido en fibra, vitaminas y minerales, y la promoción del ejercicio físico, son clave en la elección y preferencia de alimentos y, por tanto, en la prevención de patologías asociadas a alteraciones del metabolismo. Y si bien es cierto, en la preferencia y selección de alimentos también existe predisposición genética a preferir unos sabores sobre otros, y, por tanto, unos alimentos sobre otros, la presencia de los demás factores influyentes puede determinar la elección, incluso cuando a nivel de satisfacción a efectos de palatabilidad, podrían ser otros los alimentos que más satisficieran. Los alimentos procesados con alto contenido en sal, grasas y azúcar refinado son un buen ejemplo. En general, las personas manifiestan que prefieren comer lo que les gusta, y el dulce es uno de los gustos preferidos (Bier DM et al., 2020; Petty S et al., 2020; Drewnowski A et al., 2012; Ventura AK et al., 2011). Esto puede explicarse por el hecho de que, en términos de supervivencia de la especie, el sabor dulce solía asociarse con alimentos nutritivos, ricos en energía, lo que le confería una ventaja en ambientes de escasez (Beauchamp GK et al., 2016). A diferencia del sabor amargo, que generalmente se asoció con alimentos posiblemente tóxicos, el sabor dulce se prefiere en la infancia y proporciona una sensación de seguridad cuando se ingiere (Reed DR et al., 2010). Además, existe una base innata para el placer sensorial derivado de la degustación de productos dulces (Ventura AK et al., 2011). Un estudio realizado en los Países Bajos recientemente, identificó como tanto los factores genéticos como los ambientales juegan un papel en la selección y preferencia de alimentos (Vink JM et al., 2020). En este trabajo participaron 16.541 pacientes y sus familias, pudiendo estimar la heredabilidad de la preferencia alimentaria. Se analizaron los datos de 7833 gemelos que se utilizaron en modelos específicos de heredabilidad. Se encontraron efectos genéticos dominantes para los grupos de alimentos: fruta, pescado (sólo en hombres) y consumo de especias. Se encontraron diferencias cuantitativas por sexo para carne, pescado, snacks salados y refrescos (Vink JM et al., 2020). Pero aunque el factor genético muestra influencia y vulnerabilidad en preferencia real de alimentos, cuando se incluían en

este efecto de preferencia otros factores como el nivel de estudios o clase social, los factores genéticos perdían parte del poder de influencia, concluyendo que, aunque los factores genéticos juegan un papel importante en la preferencia por los alimentos, también deben tenerse en cuenta e investigarse, la influencia de los otros tipos de factores, de manera individual y colectiva (Carletti C et al., 2017; Liem DG et al, 2019).

En la obesidad, el patrón alimentario asociado a un comportamiento de “adicción” hacia ciertos alimentos se apoya a través de tres líneas de evidencia: (a) las respuestas conductuales a ciertos alimentos son similares a las sustancias de abuso; (b) la regulación de la ingesta de alimentos y la adicción se basan en circuitos neurobiológicos similares; (c) Las personas que sufren de obesidad o adicción muestran patrones similares de activación neuroquímica y cerebral. Se ha demostrado que los carbohidratos de alto índice glucémico provocan un cambio rápido en los niveles de glucosa e insulina en sangre, similar a la farmacocinética de las sustancias adictivas. El efecto neuroquímico es muy similar a las drogas de abuso. La glucosa y la insulina actúan como señales para el sistema mesolímbico y altera la concentración de dopamina, haciendo que, por estas propiedades, los carbohidratos de alto índice glucémico sean posibles desencadenantes plausibles para la relación de adicción a la comida (Belinda L et al., 2018; Hauck C et al., 2019).

1.4.4 Rasgos de personalidad y cognición. Impulsividad

Entre los rasgos cognitivos de la personalidad y desde el enfoque cognitivo-conductual, la impulsividad podría entenderse en función del sistema de autorregulación. Y aunque la impulsividad es un constructo multifacético, puede definirse como la tendencia a pensar y actuar sin suficiente previsión, lo que a menudo resulta en un comportamiento que es discordante con los objetivos a largo plazo. De este modo, las respuestas impulsivas podrían influir en el desempeño ejecutivo. El papel de la impulsividad en los trastornos por uso de sustancias (SUD Substance Use Disorders) está bien documentado cuando se trata de trabajos de investigación vinculados a consumo de drogas (Adams RC et al., 2019; Schulte EM et al., 2016; De Wit H et al., 2008; Hershberger AR et al., 2017; Iacono WG, 2008; Verdejo-García A et al., 2008; García-Marchena N et al., 2018). Por ejemplo, Noël X et al. realizó una serie de tareas conductuales para evaluar la capacidad de suprimir respuestas irrelevantes (inhibición de respuesta) e

información irrelevante (interferencia proactiva) en un grupo de individuos dependientes del alcohol desintoxicados y controles sanos emparejados (Noël X et al., 2013). Encontraron una diferencia de grupo estadísticamente significativa para las tres pruebas que evalúan la inhibición de la respuesta, pero ninguna diferencia para la interferencia proactiva. Pero cuando observamos el rasgo de impulsividad asociado al consumo de alimentos y la sobrealimentación, los resultados son variables y muestran como diversos factores pueden ejercer su efecto en la determinación del consumo. Diversos estudios han identificado que las personas con sobrepeso/obesidad obtienen una puntuación más alta en cuestionarios autoinformados de medición de impulsividad las medidas autoinformadas (Batterink L et al., 2010; Davis C et al., 2010; Nederkoorn C et al., 2006; Adams RC et al., 2019), mientras que las personas con alto autocontrol tienen menos probabilidades de ceder al consumo sin razón y es más probable que mantengan una dieta saludable y realicen ejercicio físico (Frieze M et al., 2009; Will-Crescioni A et al., 2011; De Boer BJ et al., 2011; Adams RC et al., 2019). También se ha demostrado que las puntuaciones de impulsividad predicen malas elecciones de alimentos (Frieze M et al., 2009; Churchill S et al., 2011) y se correlacionan positivamente con el consumo de alimentos (Guerrieri R et al., 2008; Jentsch JD et al., 2014). Por ejemplo, Guerrieri R et al. encontraron que, en una muestra de mujeres con normopeso, las que mostraron puntuaciones en los test de impulsividad más altas comieron más dulces durante una de las pruebas (Guerrieri R et al., 2008). Churchill S et al., también mostraron una relación predictiva entre la impulsividad y el consumo de alimentos ricos en grasas (Churchill S et al., 2011).

El consumo impulsivo de alimentos a menudo es asociado al término *adicción*. La adicción a la comida aún no ha sido reconocida en el DSM, aunque existen similitudes reconocidas entre algunos trastornos alimentarios y los trastornos por uso de sustancias (SUD), dichas similitudes incluyen la experiencia de antojos, la reducción del control sobre la ingesta, el aumento de la impulsividad y la sensibilidad a la recompensa alterada. A su vez, diversos estudios con uso de herramientas como resonancia magnética y neuroimagen, han permitido observar las regiones del cerebro que se ven alteradas y responden al consumo y/o percepción de ciertos alimentos (Adams RC et al., 2019). Las respuestas que ejerce el sistema de dopamina mesolímbico en el consumo de sustancias de abuso son similares a las que muestra en comportamientos adictivos asociados a los alimentos. Estos trabajos mostraron como tener patrones de consumo de alimentos (tanto la manera de consumir como el tipo de alimentos) pueden producir cambios cerebrales similares a la adicción, así como atracones y síntomas de abstinencia (Fletcher PC et al, 2018).

La obesidad frecuentemente se encuentra asociada a estos rasgos de personalidad y comportamiento, siendo obesos el 88% de los que cumplen con los

criterios de adicción a la comida (Pedram P et al., 2013). Pero es importante tener en cuenta que la adicción a la comida se define por patrones de comportamiento y experiencias relacionadas con la alimentación y no con el estado de peso, ya que en personas con normopeso también se han detectado comportamiento de impulsividad y adicción a los alimentos. además, la asociación puede variar dependiendo del tipo de medida de impulsividad se utilice y el dominio de impulsividad que se esté evaluando (Emery RL et al., 2017).

1.4.5 Microbioma

El microbioma intestinal hace referencia al grupo diverso de bacterias, arqueas, hongos, protozoos y virus que habitan en el intestino grueso de todos los mamíferos, incluidos los humanos. Estudios recientes han implicado al microbioma en una variedad de procesos fisiológicos que son vitales para la salud del huésped, incluida la homeostasis energética, el metabolismo, la biosíntesis de vitaminas, la salud del epitelio del propio intestino, la actividad inmunológica y el desarrollo neuroconductual (Barko PC et al., 2018; Uebanso T et al., 2020). El genoma microbiano confiere capacidades metabólicas que superan a las propias del organismo huésped, lo que hace que el microbioma sea un participante activo e imprescindible su reconocimiento en la fisiología del organismo que habita. En términos de composición celular, la diversidad genética y la capacidad metabólica es tal, que el animal huésped debe considerarse como un organismo híbrido multiespecie compuesto por células del propio huésped y células microbianas que operan en equilibrio dinámico y simbiótico (Barko PC et al., 2018). En el marco de la genómica, la tecnología de secuenciación y la biología computacional han revolucionado el campo de estudios del microbioma, permitiendo la evaluación mecanicista de las relaciones entre un animal y sus simbioses microbianos. El microbioma es dinámico y se ve modificado según los cambios importantes durante la vida del huésped en respuesta a la variedad de factores que influyen en el mismo. El simposio anual de 2017 organizado por el Centro Médico Universitario de Groningen en los Países Bajos se centró en el papel del microbioma intestinal en la salud y las enfermedades humanas (Mohajeri MH et al., 2018). Expertos y científicos de todo el mundo examinaron distintos resultados y líneas de investigación del microbioma intestinal humano, identificando las interacciones de los prebióticos, los probióticos o las vitaminas con el microbioma en la salud y la enfermedad, el desarrollo del microbioma en los primeros años de vida y el papel del microbioma en el eje intestino-cerebro.

La microbiota intestinal también se modula drásticamente durante el embarazo y los factores intrínsecos (como el estrés), además de los factores extrínsecos (como la dieta y los medicamentos), influyen en la composición y actividad de las comunidades microbianas que habitan en nosotros a lo largo de la vida. Los metabolitos resultantes del propio metabolismo de los microorganismos, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC o SFCA), afectan la señalización intestino-cerebro y la respuesta inmunitaria (Mohajeri MH et al., 2018). La microbiota intestinal tiene un papel regulador en la ansiedad, el estado de ánimo, la cognición y el dolor que se ejerce a través del eje intestino-cerebro, por ello se han identificado variaciones y cambios en la microbiota asociados a patologías, que incluyen clásicamente la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad, el Síndrome metabólico, el asma, las enfermedades cardiovasculares, las afecciones inmunomediadas y afecciones del desarrollo neurológico (Barko PC et al., 2018; Cheung SG et al., 2019; Barandouzi ZA et al., 2020) como el trastorno del espectro autista (Ristori MV et al., 2019; Fattorusso A et al., 2019) y la esquizofrenia (Samochowiec J et al., 2021; McGuinness AJ et al., 2022), aunque recientes trabajos también lo vinculan a otro tipo de alteraciones neurológicas como el déficit de atención (TDAH) (Dam SA et al., 2019) y la depresión y trastorno bipolar (Nikolova VL et al., 2021).

En relación a enfermedades comórbidas, las evidencias favorables obtenidas tras los trasplantes fecales de ratones obesos sin colonizar muestran la vinculación entre la microbiota o microbioma intestinal con la obesidad y el Síndrome metabólico (Bäckhed F et al., 2004). Estos ratones tras ser inoculados con microbios intestinales de donantes obesos comenzaron a aumentar de peso (Bäckhed F et al., 2004). De hecho, investigaciones recientes han informado de posibles diferencias entre los tipos y familias de microorganismos que subyacen los perfiles de características de delgadez o de obesidad (Crovesy L et al., 2020). Las familias reconocidas claramente en la actualidad en estos perfiles más comunes de identificar son los Bacteroides, comúnmente menos abundantes en personas con obesidad, observándose que la abundancia de estos microorganismos aumenta cuando hay pérdida de peso (Remely M et al., 2015), mientras que los Firmicutes como *Lactobacillus* y *Clostridium* se han asociado con desregulaciones metabólicas asociadas a la obesidad (Ley RE et al., 2006; Karlsson FH et al., 2013), lo que sugiere que la abundancia de bacterias específicas podría ser beneficiosa o perjudicial para el propio estado fisiológico de obesidad (Crovesy L, et al., 2020). En referencia a estos datos, recientes trabajos tienen el objetivo común de desentrañar el papel de los microorganismos intestinales en la dinámica del peso en los seres humanos. En estudios de modificación de dieta se ha observado la variación de los tipos de Filum y/o familias de bacterias, pero no predicen en sí mismas la pérdida de peso, aunque algunos resultados sí que han indicado favorable la diferencia para algunas especies, *Phascolarctobacterium*, *Dialister*, *Prevotella* y los propios Bacteroides se vieron asociados con una mayor o

menor pérdida de peso (Muñiz-Pedrogo DA et al., 2018; Hjorth MF et al., 2018). También se ha observado que estas variaciones y aumentos de comunidades específicas en la pérdida de peso se reducen a medida que transcurre el tiempo y se estabiliza el nuevo peso (Teixeira TF et al., 2012; Rahat-Rozenbloom S et al., 2014; Muralidharan J et al., 2021).

El trasplante de microbiota fecal (FMT) también ha mostrado ser altamente eficaz para el tratamiento de infecciones recurrentes por *Clostridium difficile*. Del mismo modo que la ingestión de prebióticos o probióticos se ha utilizado para tratar una variedad de afecciones que incluyen estreñimiento, reacciones alérgicas e infecciones en la infancia y síndromes de colon irritable (Mohajeri MH et al., 2018).

El problema residual de los estudios del microbioma reside en las diferencias de los resultados obtenidos, debiendo tenerse en cuenta que las condiciones y factores que disciernen entre las investigaciones pueden tener mayor poder y control en los resultados obtenidos, sobre todo en los estudios de intervención de dieta y estilos de vida, en la que múltiples factores asociados pueden modular el nivel o grado de intervención y sus efectos. Son muchos los trabajos que indican cómo el porcentaje de grasa, de resistencia a la insulina y peso corporal es mayor en los ratones libres de gérmenes, criados en ambientes estériles que estas mismas especies criados en condiciones habituales (Bäckhed F et al., 2004). Se describió una reducción drástica de Bacteroides y un aumento proporcional de Firmicutes en ratones modificados genéticamente para el fenotipo de obesidad en comparación con ratones delgados y salvajes, alimentados con la misma dieta, destacando la contribución del microbioma intestinal a la obesidad (Ley RE et al., 2005). Sin embargo, los hallazgos que involucran la abundancia de una familia u otra a un perfil o patrón alimentario, tal como hemos indicado, no es consistente (Barko PC et al., 2018). No se detecta ninguna asociación estadísticamente significativa clara entre la relación Bacteroides-Firmicutes (B/F) ni con el IMC ni con los cambios de peso en general, lo que destaca la necesidad de ampliar la investigación en un nivel taxonómico más profundo en lugar de considerar simplemente el desequilibrio en la proporción de los fillum Bacteroides y Firmicutes únicamente (John GK et al., 2016). Además, también se han observado diferencias particulares a partir de la etnia de la población de estudio. En un estudio realizado con pacientes obesos chinos, se encontró significativamente que la cantidad de Bacteroides spp. era reducido en comparación a individuos en normopeso (Liu R et al., 2017). Para el género *Prevotella*, en cambio, se observa incrementada en los individuos que refieren obesidad (Zhang H et al., 2009; Barko PC et al., 2018), aunque resultados de otros trabajos muestran que no existen asociaciones significativas entre la abundancia o no del fillum *Prevotella* y el peso corporal e IMC (Zupancic ML et al., 2012), si bien es cierto, los individuos que

muestran una mayor presencia del género *Prevotella* respecto a *Bacteroides*, responden de manera más susceptible a las dietas ricas en fibra y cereales integrales, indicando una menor estabilidad en la pérdida de peso, es decir, recuperan el peso más rápidamente que los sujetos que mostraban una presencia mayor para el género *Bacteroides* que *Prevotella*, especialmente cuando la ingesta de fibra dietética era baja y el metabolismo de la glucosa estaba alterado (Hjorth MF et al., 2020). Teniendo en cuenta estos resultados, hacer coincidir la dieta con el perfil del microbioma intestinal puede ser crucial para aumentar la efectividad y tratamiento de los programas de pérdida de peso. La pérdida de peso con dieta mediterránea ha mostrado producir un aumento en la relación B/F, además de un aumento de microorganismos productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) o conocidos por sus siglas en inglés *Short chain fatty acids* (SCFA), que utilizan carbohidratos y fibras en su metabolismo, se han asociado a efectos beneficiosos en el organismo humano, sobretodo butirato y derivados (Muralidharan J et al., 2021), aunque también se ha visto un aumento de estos productores de SCFA en personas obesas (Teixeira TF et al., 2012; Rahat-Rozenbloom S et al., 2014). También se demostró una mejora del metabolismo de la glucosa inducida por fibra dietética en individuos con mayor abundancia de *Prevotella* (Kovatcheva-Datchary P et al., 2015). Por lo tanto, se necesitan más estudios en el futuro para comprender la relación entre la abundancia de *Prevotella* y la resistencia a la insulina (Kovatcheva-Datchary P et al., 2015; Belizário JE et al., 2018). Aunque, trabajos de intervención en el estilo de vida y dieta a largo plazo (igual o superior a 12 meses), tras la pérdida de peso de los tres primeros meses, las diferencias en el perfil de microbiota intestinal pueden volver a su composición original si los cambios y/o modificaciones no se mantienen como nuevos hábitos adquiridos, además de la influencia de la pérdida de peso que también condiciona la producción de unas bacterias frente a otras. Por tanto, el perfil de microbiota no se asocia con cambios a largo plazo en el peso corporal total, sino que se adaptan a nuevas condiciones, que son favorables en la medida que se continua con unas pautas de alimentación y consejo dietético saludables. Aunque si bien es cierto, estos resultados son preliminares y otros estudios y trabajos muestran que cambios y/o modificaciones del microbioma sí que pueden verse presentes incluso tras haber modificado de nuevo algunos hábitos dietéticos, decisiones y patrones alimentarios (Biesiekierski JR et al., 2019; Fragiadakis GK et al., 2020).

En conclusión, identificar el tipo de microbiota intestinal a nivel de géneros que muestran estar potencialmente relacionadas con cambios en el peso corporal en respuesta a la intervención en el estilo de vida, para los distintos tipos y características de población, puede permitir el estudio del metabolismo en su totalidad, mejorando los conceptos de nutrición y medicina de precisión y

personalizada, así como el tratamiento de la obesidad, teniendo en cuenta las funciones e interacciones que ejerce el microbioma y que hasta los últimos años no ha sido foco de investigación o no había adquirido la relevancia presente en la actualidad (Barko PC, et al., 2018), si bien, el crecimiento de la bioinformática y técnicas de análisis metagenómico está permitiendo ampliar y enriquecer este conocimiento, así como diseñando nuevas técnicas de implantar este conocimiento de manera más eficiente y útil, como es el uso de variantes genéticas relacionadas con microbiomas relevantes (Mi-RSNP), que permitirán conocer los distintos microorganismos (o principales) que conforman el microbioma del intestino humano analizado a partir de la secuenciación de genes de muestras de heces (Asensio EM et al., 2022).

1.4.6 COVID-19

El nuevo coronavirus (COVID-19 o 2019-nCoV o SARS-CoV-2), que emergió repentinamente en diciembre de 2019, fue rápidamente denominado por la OMS una pandemia mundial, ya que ha habido alrededor de 98,0 millones de casos confirmados y alrededor de 2,0 millones de muertes hasta enero de 2021 (Rahman S et al., 2021). El SARS-CoV-2 se transmite de persona a persona a través de varias rutas, principalmente a través de gotas de tamaño microscópico que se insertan por las vías respiratorias, lo que dificulta contener su propagación y explica su denominación de pandemia (Rahman S et al., 2021). Aunque, nuestra comprensión de COVID-19 ha aumentado significativamente y las tasas de mortalidad se han ido reduciendo, gracias al diseño de vacunas principalmente, todavía es foco de estudio y en los mecanismos de infección por los que actúa son diversos los factores que influyen (Chilamakuri R et al., 2021). De hecho, sabemos que existe heterogeneidad en la fase infecciosa aguda, siendo los síntomas fatiga, fiebre, problemas respiratorios, falta de aliento, tos, etc., pero también existe heterogeneidad en las complicaciones a largo plazo observadas después de la enfermedad por COVID-19 (Desai AD et al., 2022), problemas con el sueño, desordenes cognitivos y trastornos psicológicos Khachatryan SG, 2021; Mulyadi M et al., 2021; Rahman S et al., 2021). Además de agravar el estado de salud de pacientes que ya presentan comorbilidades, como obesidad, síndrome metabólico, diabetes, etc. (Raveendran AV et al., 2021; Denson JL et al., 2021; Stefan N et al., 2021).

En 2020, en un intento por controlar los brotes de la enfermedad por COVID-19, los distintos gobiernos de todo el mundo emitieron órdenes de restricciones sociales y bloqueos que tenían el potencial de limitar la diseminación del virus por la reducción del contacto directo, como una de las medidas de mayor envergadura establecidas en los últimos años ante el desbordante número de personas afectadas. Los sistemas sanitarios de la gran mayoría de países estaban saturados, no pudiendo responder a las necesidades sanitarias y la necesidad de reducir la infección era alarmante. El bloqueo en los sistemas sanitarios pasó a ser un problema también en el sentido de no poder atender en consecuencia al resto de personas enfermas por otras patologías. La epidemia de COVID-19 causó un fuerte impacto en la población con enfermedades crónicas preexistentes, del mismo modo que también afectó al diseño y consecución de estudios prospectivos y longitudinales en pacientes (Guarisco G et al., 2021; Paz-Graniel et al., 2023). La pandemia afectó a las relaciones y contactos en persona, la inscripción de participantes, el seguimiento y la recogida de datos de los participantes en los estudios se convertían en tareas complicadas, ya que únicamente se podía hacer telefónicamente o virtualmente (Fitzgibbon M et al., 2021; Park KS et al., 2021; Pisu M et al., 2021). En este sentido, a principios de 2020 se informaron inquietudes con respecto a la investigación remota y el equipo de los ensayos clínicos durante y después de la pandemia de COVID-19, especialmente en lo que respecta a las intervenciones conductuales (McDermott MM et al., 2021). Se sugirió que las modificaciones del protocolo de los ensayos clínicos en curso pueden introducir sesgos, arrojar dudas sobre la validez de los ensayos y las conclusiones finales y, por lo tanto, las posibles adaptaciones remotas deben cambiar solo después de una reflexión exhaustiva del impacto (McDermott MM et al., 2021). En algunos casos, pueden ser necesarios nuevos enfoques estadísticos para la correcta interpretación de los resultados del ensayo. El grupo de declaración CONSERVE 2021 y la OMS han establecido pautas para informar protocolos de ensayos y ensayos completos modificados debido a la pandemia de COVID-19 y otras circunstancias atenuantes, cuyo objetivo es proporcionar orientación para mejorar el informe de ensayos en los que los protocolos tuvieron que ser modificados y asegurar la validez y consistencia de los resultados de estos estudios (Singh JA et al., 2020; Orkin AM et al., 2021).

En el momento en que comenzó la pandemia de COVID-19 (marzo de 2020 en España), se completó el reclutamiento del estudio PREDIMED-Plus, pero la intervención estaba en curso para la mayoría de los participantes, por lo que se tuvo que establecer varias estrategias para continuar con la intervención y la recopilación de datos de forma remota (Paz-Graniel I et al., 2023).

1.5 Asociación del síndrome metabólico con el riesgo de enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular incluye un amplio conjunto de trastornos que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, tal como se ha descrito en puntos anteriores. Siendo los eventos metabólicos que están presentes en las distintas etapas de enfermedad crónica los susceptibles a ser tratados desde la atención preventiva, con el fin de optimizar la enfermedad coronaria, los resultados clínicos de insuficiencia cardíaca y de fibrilación auricular (FA).

En los últimos años, distintos estudios y revisiones bibliográficas han manifestado el estudio de la asociación del Síndrome metabólico y las patologías crónicas que lo envuelven como base de la enfermedad cardiometabólica, que permite un enfoque terapéutico temprano y sostenible, basado en la evidencia conocida hasta la actualidad, para promover la salud cardiometabólica y reducir el desarrollo y consecuencias/efectos de la enfermedad cardiovascular (Mechanick JI et al., 2020).

La base y/o desarrollo de la enfermedad cardiovascular se reconoce por tres impulsores primarios (genética, medio ambiente y comportamiento) y dos impulsores metabólicos (adiposidad y disglucemia) con aplicaciones a tres criterios de valoración cardiovasculares (enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular). El estudio de las distintas vías específicas que configuran los impulsores primarios tempranos con la presencia de adiposidad posteriormente, así como la resistencia a la insulina, disfunción de las células β del páncreas y la aparición del consecuente Síndrome metabólico, lo que conduce a la enfermedad cardiovascular (Mechanick JI et al., 2020).

En gran parte de los pacientes, el tratamiento de la enfermedad cardiovascular comienza con la aparición de eventos cardíacos como la angina de pecho, un síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular, insuficiencias cardíacas determinadas y/o enfermedad vascular periférica sintomática. Otras acciones, consideradas también tratamientos por su elevada carga preventiva, incluyen el abandono del hábito de fumar y tratamientos farmacológicos específicos como las estatinas en la reducción del c-LDL. Sin embargo, el tratamiento con estatinas en ensayos de enfermedad cardiovascular mostraba que la reducción promedio del riesgo era sólo ~30%, dejando en el marco de estudio la necesidad de tratar la patología como el conjunto de determinantes que la componen (Baigent C et al., 2005).

Dada la carga de enfermedad cardiovascular que soportan los pacientes y nuestras sociedades, se necesitan estrategias de prevención más eficaces. En este sentido, la consideración importante es que la enfermedad cardiovascular representa un proceso de enfermedad crónica que comienza temprano en la vida con oportunidades para la prevención primaria, secundaria y terciaria que puede mitigar la ocurrencia de eventos en etapa terminal. Además, el proceso de enfermedad crónica involucra integralmente la diabetes tipo 2 y la obesidad, que, por supuesto son distintos de los eventos de enfermedad cardiovascular en etapa terminal, pero sin embargo son tanto manifestaciones como impulsores de este proceso de enfermedad crónica.

En la enfermedad crónica de base cardiometabólica y, por consiguiente, enfermedad cardiovascular, la anomalía central que impulsa la progresión de la enfermedad es la resistencia a la insulina. De hecho, el riesgo que reside en el individuo tras el tratamiento con estatinas se atribuye en gran medida a la resistencia a la insulina (Rewers M et al., 2004; Tenenbaum A et al., 2006; Gast KB et al., 2012). El nuevo modelo de estudio de la enfermedad cardiovascular aborda los factores de riesgo modificables que pueden mitigar y reducir el sufrimiento en el paciente y los costes sociales, reduciendo la morbilidad asociada (Mechanick JJ et al., 2020).

El término factor de riesgo se refiere a las circunstancias (variables genéticas o ambientales) que hacen que la probabilidad de desarrollar una enfermedad sea mayor en aquellas personas que los presenten. La investigación de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares o enfermedades del sistema circulatorio constituye una labor compleja debido a la presencia de las muchas variables que inciden y se interrelacionan, pero supone una herramienta fundamental en su prevención. No obstante, a partir de datos obtenidos de estudios epidemiológicos clásicos, los factores de riesgo han podido ser identificados y clasificados, tradicionalmente, en modificables (consumo de tabaco, consumo de alcohol, sedentarismo, elevada ingestión de grasas saturadas en la dieta, dislipemia, diabetes, hipertensión, obesidad, hiperhomocisteinemia) y no modificables (sexo, edad, genética) en la medida en que se pueda influir o no en ellos (Haskell WL, 2003; Farrell SW et al, 2019). Sin embargo, gracias al concepto de interacción gen-ambiente se ha revolucionado la visión clásica de factor modificable o no. En la epidemiología cardiovascular clásica no incorporaba en sus estudios el componente genético de la enfermedad a nivel molecular porque se carecía de información sobre ello. En la última década, y tras la secuenciación del genoma humano, ha surgido una nueva disciplina, la epidemiología genómica cardiovascular, que tiene como objetivo la integración de la información genética y ambiental en el estudio de la etiología de las enfermedades cardiovasculares (Francois ME et al, 2018), así como generar nuevo conocimiento sobre la contribución genética y ambiental a los distintos fenotipos cardiovasculares. Estos fenotipos, pueden ser clasificados en

dos grandes grupos: los denominados *fenotipos intermedios*, que a su vez se consideran factores de riesgo de los *fenotipos finales* de enfermedad cardiovascular. Entre los fenotipos intermedios se incluyen las concentraciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas: colesterol total, triglicéridos, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), glucemia, insulinemia, homocisteinemia, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, obesidad, sobrepeso, metabolitos del estrés oxidativo, marcadores de inflamación o distintas concentraciones de hormonas) los denominados *fenotipos finales*. Estos fenotipos finales son los distintos grupos de enfermedad cardiovascular mencionados anteriormente. Es difícil definir con claridad la contribución que cada uno de los factores de riesgo ejerce sobre los fenotipos. De hecho, pueden darse efectos sinérgicos entre diferentes factores independientes, de manera que cuando varios de ellos concurren en un mismo individuo, el riesgo de desarrollar la enfermedad es más aditivo. Además, existe evidencia de que el efecto que ejercen cambios en los diferentes factores ambientales o modificables sobre los fenotipos de enfermedad cardiovascular difieren de forma significativa entre individuos (Tiret L, 2002, Ordovás JM et al, 2004; Ordovás JM et al, 2007). Así pues, el estudio de la contribución genética y ambiental sobre fenotipos intermedios y finales de enfermedad cardiovascular y de síndrome metabólico permiten caracterizar interacciones gen-ambiente y así, obtener conocimiento para poder realizar recomendaciones específicas a nivel individual que actúen sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular y la relación con la presencia de síndrome metabólico (Ordovás JM et al, 2004), incluso la posibilidad de diseñar una escala de puntuaciones “Cardiovascular Risk Score” que permita determinar el nivel de riesgo a sufrir o desarrollar una enfermedad de etiología cardiovascular (Ordovás JM et al, 2011), pudiendo abordar los síntomas de la patología desde distintas perspectivas y tratamientos, aumentando la efectividad y reduciendo las tasas de coste.

La resistencia a la insulina es uno de los factores de riesgo clave en la aparición del Síndrome metabólico y evolución en enfermedad cardiovascular. La resistencia a la insulina es el resultado de la combinación del exceso de adiposidad y la disglucemia (figura 1.12). Estos dos factores de riesgo, a su vez, se derivan de los impulsores primarios de la genética, el entorno y el comportamiento, y conducen a la progresión de la enfermedad cardiometabólica. Específicamente, la referencia a la adiposidad está incorporada en el término diagnóstico recientemente propuesto para definir la obesidad, “enfermedad crónica basada en la adiposidad” (Mechanick JJ et al., 2017), y la disglucemia progresa de acuerdo con el modelo definido por “enfermedad crónica basada en disglucemia” (Mechanick JJ et al., 2018). La disglucemia y el exceso de tejido adiposo se cruzan en el nivel de

resistencia a la insulina agravando el estado patológico cardiometabólico (Frei A et al., 2014).

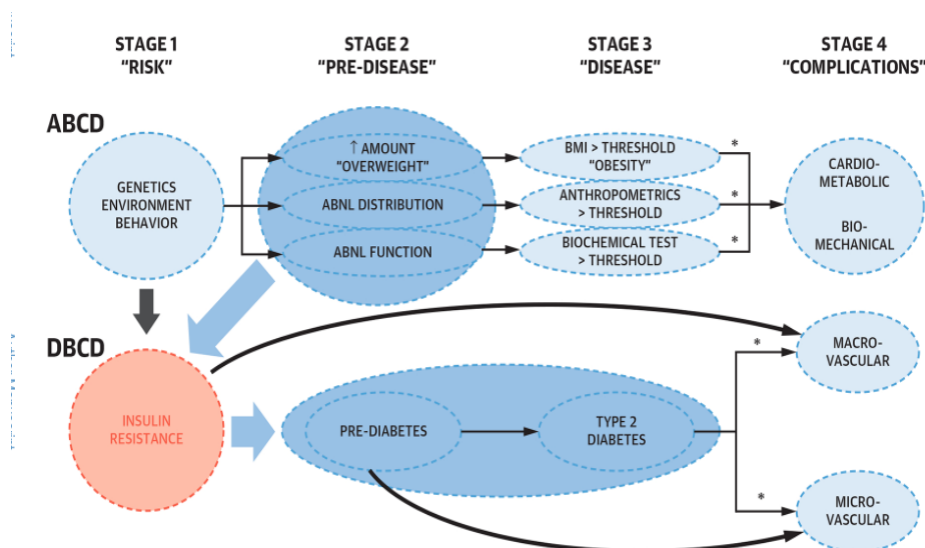


Figura 1.12. Resistencia a la insulina en la intersección de ABCD y DBCD

Las áreas sombreadas y las flechas indican las principales relaciones causales: adiposidad anormal a la resistencia a la insulina a la disglucemia. Los asteriscos indican esfuerzos de otros rasgos del síndrome metabólico. ABCD = enfermedad crónica basada en la adiposidad; ABNL = anormal; IMC = índice de masa corporal; DBCD = enfermedad crónica basada en disglucemia (Mechanick JJ et al., 2020).

Cuando nos referimos a la trama de genética, entorno y comportamiento, tenemos que tener en cuenta siempre la correcta integración de tres componentes: genotipo (la base heredada), fenotipo (la manifestación de lo que pasa) y ambiente (las condiciones del entorno) (Ordovás JM, 2011). Y ya que la mayor parte de las enfermedades genéticas comunes en la población no presentan un modo de herencia mendeliano, es decir, no existe un único gen responsable de la enfermedad, sino que suelen ir moduladas por factores ambientales (interacción gen-ambiente) o por diversos genes (interacción gen-gen), serán los modelos genéticos más realistas aquellos que consideran que uno o varios genes con uno o varios polimorfismos tienen un efecto sobre el riesgo de aparición de una enfermedad, pudiendo haber una interacción entre ellos y entre factores no genéticos. Se entiende que la enfermedad cardiovascular es de origen multifactorial (figura 1.13) puesto que existe interacción entre los propios genes además de la interacción con factores ambientales a su vez (Ordovás JM et al., 2004).

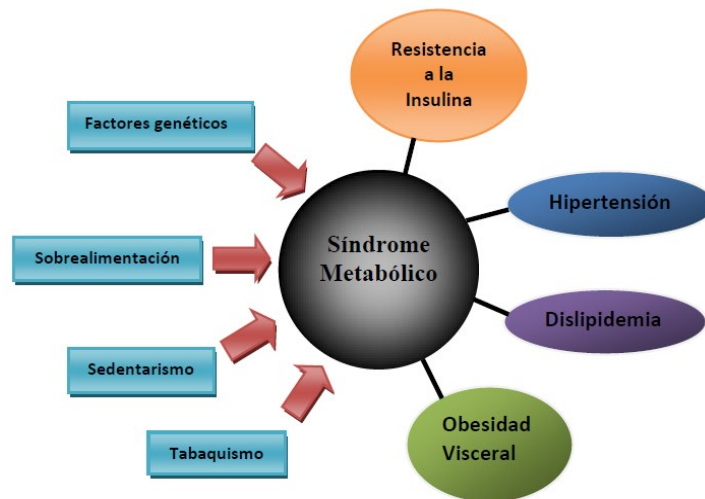


Figura 1.13. Variantes genéticas comunes y factores ambientales en el desarrollo de Síndrome Metabólico (Pérez-Martínez P et al, 2012).

1.6 Antecedentes que llevan a realizar este estudio

Una elevada adherencia a la dieta mediterránea se ha asociado a una menor mortalidad por cualquier causa en numerosos estudios de cohorte de personas mayores (Trichopoulou A et al., 2014). Los resultados del estudio de la cohorte EPIC, que incluía a más de 22.000 participantes, indicaban que una mayor adherencia a la Dieta Mediterránea tradicional se asociaba a una menor mortalidad global y a una menor mortalidad por enfermedad coronaria (Sofi F et al., 2008; Trichopoulou A et al., 2014). En el seguimiento del estudio HALE con personas sanas de edades entre 70 y 90 años, se observaron resultados similares (Knoops KT et al., 2004), al igual que en el NIHAARP Diet and Health study (Mitrou PN et al., 2007) y en Nurses Health Study (Fung TT et al., 2009). En varios estudios caso-control también se observó una relación inversa entre los niveles de adherencia a la Dieta Mediterránea y la incidencia de infarto de miocardio no fatal (Martínez-González et al., 2002; Kouviri M, et al., 2020). Asimismo, en un estudio de prevención secundaria se observó una marcada reducción en la tasa de re-infarto o de muerte cuando en el grupo de pacientes coronarios que fueron asignados a la

dieta mediterránea experimental y en la que los derivados lácteos se reemplazaron por una margarina especial rica en ácido alfa-linolénico (ALA) (De Lorgeril M et al., 1999). A su vez, los resultados publicados tras la realización del meta-análisis destacaba los efectos beneficiosos de una mayor adherencia a una Dieta Mediterránea tradicional sobre la mortalidad global y la mortalidad de origen cardiovascular (Sofi F et al., 2009). A raíz de la publicación de los resultados de este estudio, la Asociación Americana del Corazón (*American Heart Association*, AHA) vio en la Dieta Mediterránea una herramienta útil en la prevención de la patología cardiovascular, pero advirtiendo que era preciso realizar más estudios antes de recomendar de forma concluyente a la población. Por ello, los siguientes estudios tenían como objetivo averiguar si la dieta en sí, ejercía un efecto fundamental en la protección frente a problemas cardiovasculares, y si este posible efecto era dependiente o independiente de otros factores, o ambas vinculaciones, como ocurre con la realización de actividad física o incluso ciertas terapias conductuales (Salas-Salvadó J et al., 2019).

Las tasas de éxito en el tratamiento de las patologías crónicas multifactoriales como ocurre con el Síndrome metabólico son variables, pero son numerosos los trabajos que muestran como la combinación de estas distintas herramientas, formulando la personalización a las necesidades del sujeto a tratar, confabulan el éxito y persistencia/mantenimiento en el tiempo. Un estudio reciente realizado en mujeres italianas postmenopáusicas mostraba como con terapia combinada de dieta mediterránea y ejercicio físico, los índices de riesgo de enfermedad cardiovascular se veían reducidos, como los índices de riesgo Índice Aterogénico de Plasma (AIP), Producto de Acumulación de Lípidos (LAP) e Índice de Hígado Graso (FLI), así como reducción en los niveles de índices de masa corporal y del exceso de peso (Di Renzo L et al., 2020). Otro trabajo recientemente publicado también indicaba asociación significativa entre los niveles de adherencia a la dieta mediterránea y la reducción del perímetro de la cintura, así como también se vinculaba con un aumento en los niveles de colesterol HDL (puntuación en cuestionario PREDIMED ≥ 7 puntos; $p < 0,04$), sugiriendo que el c-HDL y la distribución de la masa corporal son parámetros fuertemente influenciados por la dieta mediterránea (Lampignano L et al., 2020).

También hay muchas evidencias epidemiológicas que sugieren que el consumo de ciertos alimentos, clásicos y referentes del patrón mediterráneo, como el aceite de oliva virgen extra y los frutos secos, tienen efectos protectores sobre el sistema cardiovascular. Tanto en ensayos clínicos a corto plazo como a largo plazo han mostrado beneficios en el tratamiento dietético del Síndrome metabólico y otras patologías crónicas (Martínez-González MA et al., 2015; Guasch-Ferré M et al., 2017). Se ha observado que la ingesta frecuente de ambos alimentos se asocia a una reducción de varios biomarcadores de riesgo cardiovascular (Shen J et al., 2015; Martínez-González MA et al., 2015; Guasch-Ferré M et al., 2017; Camargo

A et al., 2020). Gran parte de estos resultados adquirieron un mayor nivel de relevancia tras las evidencias demostradas en el estudio PREDIMED, PREvención con Dieta MEDiterránea (Estruch R et al, 2018), siendo aceptada y defendida la dieta mediterránea por parte de la AHA y otras asociaciones y colectivos de la atención primaria, en el tratamiento de las patologías crónicas tales como la obesidad y Síndrome metabólico. Haciendo referencia a que gran parte del éxito de este patrón alimentario residía en los términos de “adherencia”, que se mostraban superiores cuando se trataba de la dieta mediterránea si se comparaba con las dietas bajas en grasa y sal utilizadas clásicamente como guía en personas con riesgo metabólico (como pudo ser *The Lyon Diet Heart Study*). Los beneficios en el seguimiento de un patrón alimentario siempre son mayores en las dietas que muestran mayor afinidad o preferencia, es decir, mayor adherencia a la misma (Martínez-Lapiscina EH et al, 2013).

El estudio PREDIMED se perfiló como un ensayo multicéntrico, aleatorio, comparando diversos grupos paralelos, en función del alimento clave que debían consumir en su dieta. Participaron 7447 personas asignadas al azar en cada uno de los grupos (un grupo de dieta mediterránea suplementado con aceite de oliva virgen extra (1L por semana), otro grupo de dieta mediterránea complementado con frutos secos (30g/día), y el grupo control, que debía seguir las recomendaciones dietéticas de una dieta baja en grasa, propuesta por la AHA (tabla 1.9).

Tabla 1.9. Representación de las variables iniciales destacadas en el estudio (Estruch R, et al 2018)

	DM + AOV (n= 2.543)	DM + FS (n=2.454)	Control (n=2.450)
Edad (DE)	67 (6)	67 (6)	67 (6)
Mujeres (%)	59	54	60
Diabetes (%)	50	47	49
Hipertensión (%)	82	82	84
Fumadores (%)	14	15	14
Dislipidemia (%)	72	73	72
IMC, kg/m ² (DE)	30 (4)	30 (4)	30 (4)
Circ. cintura (DE)	100 (10)	100 (11)	101 (11)
Diet Med 0-14 pts. (DE)	8.7 (2)	8.7 (2)	8.4 (2)

DM: Dieta Mediterránea; AOV: Aceite Oliva Virgen; FS: Frutos secos; IMC: Índice masa corporal

La selección de participantes fue aleatoria, englobando ambos sexos, siendo la franja de edad en hombres 5 años inferior a las mujeres, con la pretensión de equidad en cuanto al riesgo cardiovascular (55-80 años en hombres y 60-80 años

en mujeres). Ambos géneros no presentaban enfermedades cardiovasculares en evolución, pero si se describía la presencia de alteraciones metabólicas crónicas, que actualmente se reconocen como factores de riesgo de Síndrome metabólico y/o enfermedad cardiovascular. Algunos de los participantes sufrían de diabetes (Salas-Salvado J et al, 2011), así como hipertensión o hipercolesterolemias, bien por predisposición genética o por la influencia de factores tales como dietas altas en grasas saturadas, colesterol y azúcares y exceso calórico o energético. Además de otros factores de riesgo presentes, como ser fumador, padecer de sobrepeso u obesidad (Romaguera D et al, 2009), o historia familiar de enfermedades prematuras de tipo cardiovascular (Corella D et al, 2008). En el estudio se utilizaba un cuestionario diseñado específicamente, que partía del cuestionario de adherencia de dieta mediterránea previo de Trichopoulou, (Trichopoulou A, 2014), incluyendo en esta nueva versión 14 preguntas que revelaban mediante la puntuación obtenida en las respuestas, el nivel de adherencia a la dieta mediterránea, permitiendo ver si los niveles de adherencia se veían modificados en los distintos grupos participantes en la medida que eran intervenidos, así como el aumento a esa misma adherencia en el mismo participante según transcurría el periodo de estudio. Los participantes fueron seguidos durante cerca de cinco años.

El análisis del riesgo, así como el grado de prevención que se conseguía mediante el seguimiento de este patrón dietético fue relevante y de gran magnitud. En el grupo de seguimiento de dieta mediterránea suplementado con aceite de oliva virgen extra fue 0,70 (Intervalo de confianza del 95% [IC], 0,53 a 0,91), siendo también de 0,70 para el grupo con dieta mediterránea suplementado con frutos secos (Intervalo de confianza del 95% [IC], 0,53 a 0,94), siendo las relaciones significativas con $p=0,009$ y $p=0,02$, respectivamente.

Las conclusiones resultantes del estudio PREDIMED mostraron un efecto protector similar en los dos grupos intervenidos con Dieta Mediterránea, aunque si bien es cierto, sólo las comparaciones del riesgo a nivel de accidente cerebrovascular alcanzaron significación estadística. Estos resultados indicaban una importante correlación entre la intervención con una dieta Mediterránea tradicional suplementada con alimentos tradicionales del patrón alimentario mediterráneo, como el aceite de oliva virgen extra y los frutos secos, eran capaces de reducir en un 30% la incidencia de complicaciones cardiovasculares, como el accidente cerebrovascular o el persistente infarto de miocardio (Estruch R et al, 2018). Además, fue el eje de una serie de sucesivos estudios que permiten a día de hoy indicar que seguir la dieta estudiada aporta efectos preventivos a nuestra salud (figura 1.14), aportando evidencia científica de primer orden a favor de la eficacia de la Dieta Mediterránea tradicional en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular (Estruch R et al, 2018; Salas-Salvado J et al., 2019).

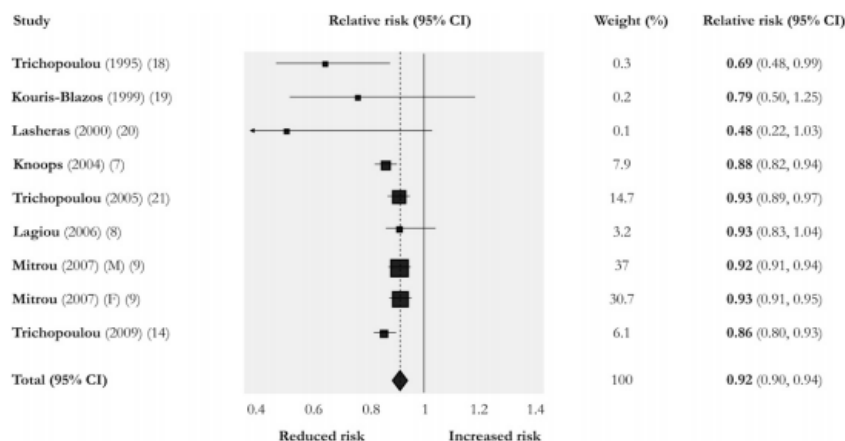


Figura 1.14. Diagrama sobre la asociación entre un aumento de 2 puntos del índice de adhesión a la Dieta Mediterránea y el riesgo de mortalidad por cualquier causa.

El centro de cada cuadrado indica el riesgo relativo del estudio, y las líneas horizontales indican IC del 95%. El área del cuadrado es proporcional a la cantidad de información recopilada en el estudio. El rombo o diamante representa el tamaño total del efecto (Sofi F et al, 2008).

Tras la realización del estudio PREDIMED y de los análisis posteriores realizados al gran número de muestras obtenidas gracias al gran tamaño de muestra que se obtuvo, se observaron resultados que relacionaban una reducción en la incidencia de aparición de diabetes (Juanola-Falgarona M et al, 2013) en las personas que seguían un patrón dietético mediterráneo, muy similar a la que se conseguía con las dietas restrictivas en calorías, tan poco fructíferas o permanentes en el tiempo por los pacientes que se ven comprometidos a seguirlas (también eran capaces de disminuir de la misma forma la prevalencia de obesidad) (Salas-Salvado J et al, 2011).

Así pues, en otros estudios relacionados se vieron resultados tales como la demostración de que una mayor adherencia a la dieta mediterránea estaba asociada a una pérdida de la adiposidad abdominal en la población general europea (figura 1.15.) (Romanguera D et al, 2009), o una reducción en las tasas de cáncer de mama (Toledo E et al., 2015; Turati F et al., 2018), cáncer de colon (Farinetti A et al., 2017), Síndrome metabólico y efectos en la longevidad (Di Daniele N et al., 2017).

Estos resultados a su vez, se veían también vinculados a otros factores asociados, también comentados, como su repercusión en sí mismos en los niveles de adherencia a un tipo de dieta u otra. En este sentido, la realización de pautas de ejercicio físico, así como ciertos hábitos y condiciones conductuales ejercen su influencia en la manifestación de los resultados obtenidos tras el seguimiento de un estilo de vida u otro, pudiendo disminuir y/o aumentar los efectos beneficiosos evidenciados, como en la pérdida de peso en el tratamiento combinado para el sobrepeso y obesidad y de patologías crónicas asociadas (Franz MJ et al., 2015; Schröder H et al., 2018).

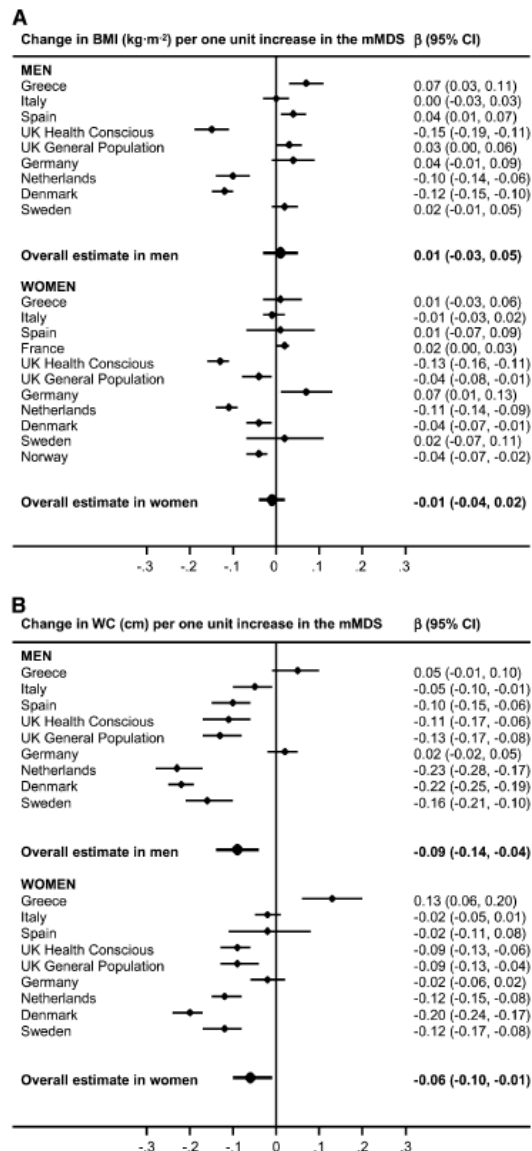


Figura 1.15. Asociaciones entre países y sexo, así como entre la puntuación obtenida en el cuestionario modificado para DietMed y el IMC (A) o CC (B) en los participantes del estudio EPIC-PANACEA. El efecto resultante de la estimación (b) e IC del 95% ajustados por variables potenciales de confusión (Romanguera D et al, 2009).

1.7 Salud y Medicina de Precisión

El desarrollo de las nuevas tecnologías ómicas, incluida también la denominada secuenciación *Next Generation Sequencing* (NGS), ha permitido desarrollar la denominada medicina de precisión (Ginsburg GS et al., 2018). Esta nueva era se focaliza más en desarrollar nuevos biomarcadores que permitan personalizar más los tratamientos y diseñar las estrategias personalizadas para el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de diversas enfermedades (Roberts MC et al., 2021) crónicas. La medicina de precisión en el tratamiento de patologías crónicas como el Síndrome metabólico, a través de la integración de los datos clínicos y moleculares, permite obtener un conocimiento más profundo del perfil biológico y genético de cada paciente (Ginsburg GS et al., 2018; Roberts MC et al., 2021; Allen GC et al., 2022). El desarrollo de las ómicas será clave en la práctica clínica, transformando el concepto de interacción gen-nutriente como proceso metabólico muy específico en uno de tipo holístico, en el que una fracción significativa de todos los genes y metabolitos regulados pueden ser cuantificados de manera concurrente (Ordovás JM, et al., 2011; Carrasco-Ramiro F et al., 2017; Schendure J et al., 2019; Allen GC et al., 2022). En relación a los cambios percibidos tanto en la incidencia de fenotipos finales como en la regulación de fenotipos intermedios ha sido posible comenzar a esclarecer las posibles relaciones entre predisposición genética y la probabilidad de manifestación (Schendure J et al., 2019; Allen GC et al., 2022). Como extensión a la medicina de precisión, ha surgido el concepto de Salud de precisión (Khoury et al, 2018) que va más allá de la medicina de precisión extendiendo el concepto a la población general en lugar de centrarse en los pacientes. La salud de precisión incorpora los principios de promoción de la salud y de la prevención de la enfermedad teniendo en cuenta los nuevos marcadores ómicos.

Para la implementación de la medicina de precisión y/o la salud de precisión en la prevención y tratamiento de las principales enfermedades crónicas incluyendo obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, Síndrome metabólico y deterioro cognitivo, entre otras es necesario incorporar los marcados ómicos a la investigación epidemiológica tradicional (Ordovás JM et al., 2011; Ginsburg GS et al., 2018; Roberts MC et al., 2021). En este sentido la investigación de los factores que influyen en la pérdida de peso en personas de alto riesgo cardiovascular en el marco de un estudio de intervención intensiva con dieta mediterránea y promoción de la actividad física, constituye una magnífica oportunidad para incorporar la investigación de marcadores ómicos (fundamentalmente genómicos, epigenómicos

y metabolómicos) y obtener así nueva información para su futura aplicación en salud/medicina de precisión. Además en la era de la salud/medicina de precisión, cobran también especial relevancia otras variables relacionadas con las características de las personas ya que también contribuyen a personalizar mejor la prevención y el tratamiento. En ese sentido la incorporación de la perspectiva de género/sexo en los estudios de este tipo resulta crucial para obtener nuevos resultados en hombres y mujeres que permita comprobar la homogeneidad o la heterogeneidad de las asociaciones (Corella D et al., 2018; Holdcroft A, 2007; Mauvais-Jarvis F et al., 2017; Schiebinger L et al., 2016; Hunt L et al., 2022). Partiendo de este marco general se plantean los objetivos de esta Tesis Doctoral.

2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La población de edad avanza con síndrome metabólico y sobrepeso/obesidad tiene un elevado riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y otros fenotipos cardiometabólicos relacionados suponiendo un elevado coste sanitario y social. Hipotetizamos que a pesar de que esta población tiene una edad avanzada y unos hábitos de dietéticos en general poco saludables, así como un elevado porcentaje de sedentarismo, una intervención intensiva con dieta mediterránea hipocalórica junto con un incremento de la actividad física dentro de un ensayo aleatorizado de intervención, puede ser eficaz cambiando dichos hábito y conseguir una pérdida de peso y una mejora de parámetros cardiometabólicos que resultará en la reducción del riesgo cardiovascular y de otro fenotipos relacionados, en comparación con un grupo control. Además, hipotetizamos que variables menos analizadas en los estudios nutricionales como la percepción del sabor y las preferencias por sabores y por alimentos, entre otras (impulsividad, cognitivas, sueño), pueden tener asociaciones relevantes en la determinación de los parámetros antropométricos y cardiometabólicos en esta población e influir también en los patrones de dieta. Igualmente, hipotetizamos que los marcadores ómicos (genómicos, epigenómicos, transcriptómicos, metabolómicos) necesitan ser incorporados en estos estudios para obtener nueva información sobre su contribución en los distintos fenotipos y exposiciones analizadas en estos estudios y valorar su posible aplicación en la denominada salud de precisión.

2.2 Objetivos concretos

El objetivo general del estudio aborda la hipótesis general planteada. Dicho objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos en el marco del estudio PREDIMED-Plus:

1. Valorar la factibilidad de la realización de un ensayo randomizado de intervención intensiva con dieta mediterránea reducida en energía y promoción de la actividad física con apoyo conductual en comparación con un grupo control sin intervención intensiva con dieta mediterránea hipocalórica ni promoción de la actividad física, en cuanto a reclutamiento de participantes; adherencia a las intervenciones; asistencia a las visitas de seguimiento; cumplimentación de cuestionarios y realización de mediciones; obtención de muestras biológicas y cambios de patrón de adherencia a la dieta mediterránea y de actividad física a corto, medio y a largo plazo en población de edad avanzada, síndrome metabólico y obesidad/sobrepeso reclutada en el nodo de Valencia.
2. Conocer si la intervención intensiva con dieta mediterránea restringida en energía y con aumento de la promoción de la actividad física resulta en una disminución de la energía total ingerida en las distintas visitas de seguimiento y en una disminución del peso corporal y de otras medidas antropométricas en población de edad avanzada, síndrome metabólico y obesidad/sobrepeso del nodo de Valencia en comparación con un grupo control. Adicionalmente conocer también si esta intervención intensiva se relaciona con mejoras en parámetros de riesgo cardiovascular como glucemia, concentraciones plasmáticas de lípidos, presión arterial y otros marcadores metabólicos en un análisis integrado del nodo de Valencia con otros nodos dentro del estudio multicéntrico PREDIMED-Plus.
3. Analizar la influencia de otros factores menos estudiados en los ensayos clínicos nutricionales y de estilo de vida en su asociación con variables antropométricas, cardiometabólicas y de ingesta dietética, entre las que destacamos la intensidad de la percepción del sabor, las preferencias por sabores y por alimentos, sueño, variables cognitivas, e impulsividad, fundamentalmente en el nodo de Valencia y su extensión otros nodos en aquellas variables analizadas también en otros subproyectos.
4. Investigar la influencia de los marcadores genómicos en los fenotipos de percepción de los 5 sabores, las preferencias por sabores y explorar su posible contribución en la pérdida de peso en los participantes del nodo de Valencia.
5. Analizar la influencia de los marcadores epigenómicos basados en la metilación de ADN a nivel de epigenoma completo en varios factores exposómicos de riesgo cardiovascular como el consumo de tabaco, el entorno rural/urbano y la diabetes, así como explorar los efectos de la intervención intensiva con dieta mediterránea reducida en energía y

aumento de la actividad física en los cambios en la metilación al año en los participantes del nodo de Valencia.

6. Conocer si la intervención intensiva con dieta mediterránea reducida en energía e incremento de la actividad física resulta en cambios en la expresión de genes específicos seleccionados y a nivel de transcriptoma completo en muestras analizadas a los 6 meses o al año.
7. Valorar el impacto de la pandemia de COVID-19 en la planificación del ensayo de intervención en el nodo de Valencia, así como en la realización de las intervenciones, el seguimiento y la declaración de eventos.
8. Integrar los resultados de los objetivos anteriores para tener una visión en conjunto que permita futuras investigaciones, generación de nuevo conocimiento y potenciales aplicaciones en salud de precisión.

3

MATERIAL Y MÉTODOS

La Tesis Doctoral se ha realizado en el marco del estudio PREDIMED-Plus. El estudio PREDIMED-Plus es un ensayo de intervención multicéntrico basado en dieta mediterránea y actividad física para la prevención primaria cardiovascular. En dicho estudio multicéntrico participan 23 centros reclutadores distribuidos en distintas provincias de España. El inicio del reclutamiento de los participantes no fue el mismo en cada uno de los centros reclutadores, sino que dichos centros se fueron incorporando paulatinamente. La fecha final de reclutamiento sí que se estableció como uniforme para todos los centros reclutadores (diciembre de 2016). El primer centro reclutador comenzó el reclutamiento de participantes en septiembre de 2013. Actualmente todos los participantes en dicho estudio multicéntrico han sido ya reclutados y aleatorizados. En total se incluyeron 6.874 participantes que cumplieron los criterios de inclusión que detallarán más adelante. Estos participantes se aleatorizaron a dos grupos de intervención mediante un programa informatizado que asignaba a los participantes de manera centralizada para cada nodo. El protocolo general del estudio PREDIMED-Plus es seguido de manera uniforme por cada uno de los centros reclutadores participantes y se cuenta también con un manual de especificaciones para la administración de cada uno de los cuestionarios y de las pruebas a realizar, así como de protocolos para la extracción de muestras biológica, realización de alícuotas, conservación de las muestras, remisión de las muestras biológicas a los biobancos. Toda esta información se encuentra en la página web del estudio PREDIMED-Plus (<https://www.predimedplus.com/>) para consultar si se requiere un mayor detalle. Esta Web está en castellano e inglés y posee una parte totalmente pública, otra parte con acceso para participantes en el estudio y otra parte privada para acceso de los investigadores del estudio. El ensayo clínico PREDIMED-Plus global fue registrado en el registro internacional de ensayos clínicos International Standard Randomized Controlled Trial (ISRCT) con el Clinical trial identifier: ISRCTN 89898870 ([www.isrctn.com/ISRCTN89898870]).

Se trata de un estudio de intervención a largo plazo que todavía está siendo completado. La fecha final prevista de finalización es en diciembre de 2024. Ello conlleva limitaciones a la hora de analizar datos de seguimiento o de presentar resultados parciales según grupos de intervención. El ensayo PREDIMED-Plus cuenta con un Comité de Dirección (Steering Committee) de investigadores del estudio, así como con un Comité Científico Externo (Data and Safety Monitoring

Board) internacional independiente que de manera periódica supervisa la ejecución y resultados del estudio. Ambos comités han indicado limitaciones para los análisis a nivel de nodo para determinados fenotipos y períodos de seguimiento, así como restricciones para los análisis parciales de eventos finales antes de la finalización del estudio. Dichas consideraciones se han tenido en cuenta al realizar esta Tesis Doctoral.

Cada uno de los 23 centros ha reclutado y seguido un número distintos de participantes. Esta Tesis Doctoral se ha realizado a partir de los datos obtenidos de los participantes reclutados en el denominado nodo de Valencia. Este nodo tiene su sede en la facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y recluta participantes fundamentalmente de la provincia de Valencia, aunque también se han incluido participantes reclutados en la provincia de Castellón. El nodo de Valencia ha sido el segundo centro que más participantes ha reclutado y aleatorizado. En total se han aleatorizado 465 participantes en el nodo de Valencia tal como posteriormente detallaremos. Estos participantes fueron los que cumplieron los requisitos especificados en el protocolo tras pasar un periodo de rodaje o “run-in” o periodo de evaluación previa a la aleatorización que será detallada en el apartado correspondiente. De los 465 participantes aleatorizados en el nodo de Valencia se han obtenido mediciones, datos de cuestionarios y muestras biológicas en las visitas: basal, a los 6 meses y posteriormente cada año de intervención (hasta 6 años), tal como se establece en el protocolo del estudio. La doctoranda ha participado activamente en el reclutamiento, seguimiento e intervenciones de estos participantes a lo largo de los 6 años del estudio. Cada centro reclutador era el responsable de tramitar los permisos de los correspondientes Comités de Ética para los pacientes reclutados en el nodo. En el nodo de Valencia, se obtuvo el informe favorable del Comité de Ética de Investigación en Humanos de la Universidad de Valencia para dicho estudio el 15 de julio de 2013 con el número de protocolo H137325532771. También se obtuvo el informe favorable para la realización de análisis posteriores el 6 de noviembre de 2017 con el número de protocolo H1509263926814. Los participantes firmaron los consentimientos informados por escrito.

Además del protocolo general común para todos los nodos reclutadores, cada centro reclutador podía realizar los denominados subproyectos específicos en base a la trayectoria investigadora previa de dicho nodo y al interés en obtener información adicional relevante sobre aspectos relacionados con el estudio. Los subproyectos específicos del nodo de Valencia eran la realización de análisis ómicos incluyendo genómica, epigenómica y transcriptómica fundamentalmente e incorporando también análisis metabólicos y metagenómicos cuando resultara pertinente. Adicionalmente, otro subproyecto específico del nodo de Valencia era la determinación de la percepción de los distintos sabores, así como el estudio de

las preferencias por sabores y por alimentos. Esta Tesis se ha centrado en los proyectos específicos de nuestro nodo además de tener los objetivos del proyecto general.

En los siguientes apartados proporcionaremos la información básica de la metodología general del estudio PREDIMED-Plus, común a todos los nodos, y que puede encontrarse con gran detalle en el protocolo del estudio y en el manual de procedimiento de dicho estudio. También en el manual de procedimientos del estudio PREDIMED-Plus se detallan las características de todo el material necesario para llevar a cabo el estudio de manera uniforme en todos los nodos incluyendo las características del material de plástico a comprar, los tubos, los racks, los reactivos, las etiquetas, los protocolos de obtención, alicuotación, conservación y distribución de muestras. Las determinaciones bioquímicas, los acelerómetros, las balanzas, los tallímetros, los tensiómetros, los equipos de electrocardiogramas, etc.

3.1 Generalidades del estudio PREDIMED-Plus

El estudio PREDIMED-Plus es un ensayo clínico de intervención intensiva con dieta mediterránea restringida en energía y fomento de la actividad física complementado con soporte conductual para demostrar, en comparación con un grupo control, en el que se realiza una intervención mínima (denominada “usual care”), que una patrón dietético de alta calidad en el que además tuviera lugar una pérdida de peso en personas con sobrepeso/obesidad, pautando además recomendaciones sobre actividad física para minimizar el sedentarismo, tendría un efecto aún más favorable sobre los factores de riesgo cardiovascular y se lograría una reducción aún mayor en el riesgo de eventos cardiovasculares duros, en comparación con la observada solo con una Dieta Mediterránea sin restricción calórica en personas de alto riesgo (Martínez-González MA et al., 2019; Sanllorente A et al., 2021). Esta premisa y objetivo principal parte de los resultados obtenidos en el estudio PREDIMED (en español: PREvencción con DIeta MEDiterránea), en el cual se mostró que una adherencia a largo plazo a una dieta mediterránea sin restricciones energéticas, complementada con aceite de oliva virgen extra o frutos secos, se asociaba a una reducción relativa del 30% de desarrollo de enfermedad cardiovascular (ictus, infarto de miocardio o muerte cardiovascular) (Martínez-González MA et al., 2019; Estruch R & Ros E, 2020).

En este ensayo multicéntrico en el que se quería seguir a dos grupos (intervención intensiva y el denominado grupo control), se calculó un tamaño de

muestra de 6000 participantes. Finalmente se pudo reclutar un tamaño de muestra mayor (n=6874) con lo que aumentó el poder estadístico. Los cálculos del poder estadístico se realizaron para el total de los nodos conjuntamente y se detallan en el protocolo del estudio, por lo que para los objetivos generales del estudio PREDIMED-Plus se aconsejan los análisis y las publicaciones conjuntas de todos los nodos en lugar de publicaciones parciales de cada nodo. Las publicaciones de cada nodo están aconsejadas para los denominados proyectos específicos de nodo que miden variables adicionales al protocolo general.

En la Tabla 3.1 se muestra la localización de los 23 nodos participantes en el estudio PREDIMED-Plus, el investigador o investigadora principal de cada nodo, el número de centros de atención primaria participantes y el número de personas aleatorizadas por cada centro en el estudio. El nodo de Valencia fue el centro que aleatorizó el segundo mayor número de voluntarios (n=465). El reclutamiento en el nodo de Valencia comenzó pronto, siendo uno de los nodos que comenzaron antes (marzo de 2014), y finalizó en diciembre de 2016. Cada participante en función del grupo de intervención al que es asignado recibe un protocolo de dieta y de actividad física, así como de visitas individuales y grupales para las intervenciones. Además, reciben aceite de oliva virgen extra en ambos grupos, y los primeros años se facilitó también la donación de frutos secos, quedando en consejo en años posteriores al no poder sufragarla.

Todos los detalles del protocolo del estudio y de los resultados preliminares se pueden encontrar en el artículo publicado titulado: “Cohort Profile: Design and methods of the PREDIMED-Plus randomized trial”, publicado en el International Journal of Epidemiology en 2019 y que dispone de acceso en abierto (<https://academic.oup.com/ije/article/48/2/387/5202210>) (Martínez-González MA et al, 2019). La intervención se mantiene 6 años y el seguimiento medio previsto para los eventos clínicos es de 8 años. De esta forma, se obtiene información sobre los efectos de la intervención a los tres niveles (consumo de alimentos, estilo de vida y comportamiento) en cambios antropométricos y bioquímicos y el posible impacto sobre alteraciones asociadas a sobrepeso y obesidad (Lozano M et al, 2019; Martínez-González MA et al., 2019).

Tabla 3.1. Nodos y número de pacientes reclutados por nodo en el estudio PREDIMED-Plus.

Location of the centre (department)	Principal investigator	Number of participating PCPH	Number of participants recruited
Navarra (Epidemiology)	Martínez-González MA	11	628
Valencia (Genetics)	Corella D	14	465
Reus (Nutrition)	Salas-Salvadó J	5	460
Barcelona (Molecular biology)	Fitó M	40	407
Alicante (Epidemiology)	Vioque J	6	361
Balearic (Cardiology)	Romaguera D	7	335
Navarra (Nutrition)	Martínez JA	8	331
Málaga (Nutrition)	Wärnberg J	3	326
Córdoba (Internal medicine)	López-Miranda J	1 ^a	308
Barcelona (Internal medicine)	Estruch R	7	302
Granada (Epidemiology)	Bueno-Cavanillas A	6	296
Vitoria (Cardiology)	Arós F	18	274
Balearic (Physiology)	Tur JA	7	270
Málaga (Endocrinology)	Tinahones FJ	6	268
Canary Islands (Epidemiology)	Serra-Majem L	5	266
León (Public Health)	Martín V	9	258
Sevilla (Primary care)	Lapetra J	10	232
Madrid (Endocrinology)	Vázquez C	12	230
Barcelona (Internal medicine)	Pintó X	11	207
Barcelona (Endocrinology)	Vidal J	5	205
Madrid (Nutrition)	Daimiel L	6	169
Jaén (Epidemiology)	Delgado-Rodríguez M	6	152
Madrid (Endocrinology)	Matía P	5	124
Total		208	6874

PCPH: Primary care health centres (Centros de salud primaria); *Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis, Dpto. de Medicina Interna, Hospital Universitario Reina Sofía (Martínez-González MA, et al., 2019).

3.1.1 Selección de participantes

3.1.1.1 Criterios de inclusión

Las características principales del estudio es que se trata de un ensayo de grupos paralelos, multicéntrico, aleatorizado y que entra en el marco de la prevención primaria. Los participantes eran hombres de 55-75 años y mujeres de entre 60-75 años, con un IMC ≥ 27 y < 40 kg/m², que presentaban al menos 3 criterios de Síndrome metabólico (Alberti KG, et al, 2009), los cuales eran:

- Obesidad central: Valorada por la medida del perímetro de cintura, debiendo ser > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres
- Niveles de triglicéridos: ≥ 150 mg/dl o hay tratamiento para hipertrigliceridemia

- Valores de c-HDL: inferiores a 40 mg/dl en hombres y 50 mg/dl en mujeres, o seguimiento de un tratamiento farmacológico específico
- Presión arterial elevada: considerada cuando PAS ≥ 135 mmHg y PAD ≥ 85 mmHg, o existe tratamiento para la hipertensión diagnosticada previamente
- Incremento de niveles de glucemia: Cuando glucemia en ayunas es ≥ 100 mg/dl ($\geq 5,6$ mmol/l) o bien tratamiento para diabetes tipo 2 ya diagnosticada

La presencia de estos criterios eran los requerimientos para participar en este estudio, ya que, a partir de las evidencias recientes del papel beneficioso de la dieta mediterránea y de la actividad física de resistencia (Fernández JM et al, 2012) sobre el Síndrome metabólico (Kastorini CM et al, 2011; Salas-Salvadó J et al, 2008), la resistencia a la insulina y la diabetes (Salas-Salvadó J et al., 2014). Se intentó que el 50% de la población de estudio fueran mujeres y que las personas diabéticas no representaran un porcentaje elevado en de la muestra final.

3.1.1.2 Criterios de exclusión

- Incapacidad o falta de voluntad para dar consentimiento informado por escrito o comunicarse con el personal del estudio o analfabetismo.
- Institucionalización del participante (que habite en residencias o centros de larga estancia).
- Historia documentada de enfermedad cardiovascular previa, incluyendo la angina de pecho, infarto de miocardio, procedimientos de revascularización coronaria, accidente cerebrovascular (ya sea isquémico o hemorrágico, incluidos los ataques isquémicos transitorios), enfermedad arterial periférica sintomática que haya requerido cirugía o que fuera diagnosticada con técnicas de imagen vascular, las arritmias ventriculares; fibrilación auricular no controlada, insuficiencia cardíaca congestiva (Clase III o IV de la *New York Heart Association*, miocardiopatía hipertrófica, e historia de aneurisma aórtico $\geq 5,5$ cm de diámetro o cirugía de aneurisma de aorta.
- Cáncer activo o antecedentes de tumores malignos en los últimos 5 años (con excepción del cáncer de piel no melanoma).
- Imposibilidad de seguir la dieta recomendada (por razones religiosas, problemas de deglución, etc.) o incapacidad para realizar actividad física.

- Baja probabilidad predicha de cambiar los hábitos alimentarios de acuerdo a los estadios de Prochaska y DiClemente del modelo de estadios de cambio (Nigg CR, et al.,1999).
- La incapacidad para seguir las visitas programadas en la intervención (individuos institucionalizados, falta de autonomía, incapacidad para caminar, falta de un domicilio estable, planes de viaje, etc.).
- Haber sido incluido en otro programa de consejos para pérdida de peso (>5 kg) durante los 6 meses previos a la visita de selección.
- Historia de haber seguido una dieta de muy bajo valor calórico durante los 6 meses antes del inicio del estudio.
- Antecedentes de procedimientos quirúrgicos para bajar de peso o intención de someterse a cirugía bariátrica en los próximos 12 meses.
- Historia de resección del intestino delgado o grueso.
- Historia de enfermedad inflamatoria intestinal.
- Obesidad de origen endocrino conocido (con excepción de hipotiroidismo tratado).
- Alergia a alimentos o componentes de la dieta mediterránea.
- Inmunodeficiencia o estado VIH positivo.
- Cirrosis o insuficiencia hepática.
- Trastornos psiquiátricos graves: esquizofrenia, trastorno bipolar, trastornos de la conducta alimentaria, depresión con hospitalización en los últimos 6 meses.
- Toda condición severa de comorbilidad con menos de 24 meses de esperanza de vida.
- Consumo problemático de alcohol o síndrome de dependencia alcohólica (o ingesta total diaria de alcohol > 50 g) o abuso de drogas en los últimos 6 meses.
- Historia del trasplante de órgano vital.
- Tratamiento concomitante con fármacos inmunosupresores o agentes citotóxicos.
- Tratamiento actual con corticosteroides sistémicos.
- Uso actual de medicación para la pérdida de peso.
- Participación simultánea en otro ensayo clínico aleatorizado.
- Los pacientes con una infección aguda o inflamación (por ejemplo, neumonía) se les permitirá participar en el estudio 3 meses después de su recuperación.
- Cualquier otra condición que pueda interferir con la realización del protocolo del Estudio.

3.1.2 Retirada del estudio

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado confirmando su interés en participar y las condiciones del uso de sus datos y muestras en el estudio. Así mismo, se informaba que eran totalmente voluntarios, con la opción de retirarse del estudio en cualquier momento sin que ello les supusiera perjuicio alguno. Los investigadores podían retirar la participación de un sujeto del estudio si consideraba que era necesario por cualquier motivo, como por reacciones adversas o incumplimiento del protocolo. Si un sujeto se retiraba prematuramente del estudio se anotaban en el cuaderno de recogida de datos los motivos que han llevado a su suspensión del estudio.

3.1.3 Protocolo de reclutamiento

Los participantes fueron reclutados por los médicos de familia de los Centros de Salud de atención primaria asociados a los nodos de reclutamiento. Se tuvo en cuenta que los médicos involucrados fueran los responsables de la atención médica de los participantes, de esta manera no existiría ningún conflicto potencial ético de confidencialidad en la etapa de identificación de los participantes candidatos ni en las consultas de historias clínicas.

Inicialmente se elaboraba una carta informativa dirigida a los coordinadores principales de cada centro de salud elegido, en el que se indicaban las características y finalidades del estudio PREDIMED-Plus y se ofrecía la posibilidad de participar en dicho estudio.

Si el coordinador mostraba interés por que el centro de salud participara se convocaba una reunión en el mismo centro, que estaba dirigida a todos los facultativos y personal de atención primaria, los integrantes del servicio de enfermería, médicos, residentes y personal administrativo, buscando la colaboración en la difusión, sobretodo, en el período de reclutamiento.

Los objetivos de esta reunión eran:

- Explicar el estudio a los médicos, enfermeros y personal administrativo
- Solicitar la colaboración y realizar un listado del personal que aceptaba colaborar
- Consensuar el mejor método de elaboración de un listado por cada médico de los posibles candidatos a participar en el estudio

- Definir claramente la función de dichos facultativos en el estudio
- Recoger información sobre la infraestructura del Centro de Salud/Centro Especializado. Por si era posible proporcionar un lugar apropiado dentro del mismo centro para poder realizar las extracciones de sangre y las entrevistas correspondientes, así como las mediciones antropométricas y reuniones informativas, con la asiduidad correspondiente al designado en el protocolo para cada grupo de participación.

De esta forma, los facultativos de los centros de salud podían presentar el estudio PREDIMED-Plus a posibles participantes que cumplieran los factores de inclusión establecidos en el protocolo de estudio. Tras su consentimiento, se aportaban los teléfonos de los candidatos al personal del estudio. Una vez se disponía de la información para contactar con el posible participante, se procedía a realizar llamadas y entrevistas con el objetivo de evaluar la voluntad de los pacientes a participar en el estudio, su posible cumplimiento con la intervención prevista y su disponibilidad a perder peso. Los posibles participantes fueron evaluados extensamente por sus criterios de elegibilidad, así como su probabilidad de:

- a) asistir a las sesiones programadas,
- b) completar las herramientas de evaluación del protocolo, autocontrol y registro de datos de estilo de vida y hábitos alimentarios, y
- c) su disposición y actitud para cambiar sus hábitos alimentarios de acuerdo con el modelo de las etapas del cambio (Nigg CR, et al., 1999).

Si el candidato estaba interesado y cumplía con los criterios indicados, se daba por iniciado el **período de rodaje (*run-in*) o evaluación previa a la aleatorización**, que duraba 4 semanas. Este período se iniciaba con una visita de selección (**S1**) y seguía con una llamada de refuerzo a las 2 semanas (**S2**) y una segunda visita de evaluación al final, tras 4 semanas (**S3**) del contacto primero.

1) La **visita S1** (45-60 min), incluía:

- a) La administración de un cuestionario de inclusión o exclusión
- b) La explicación del estudio. Se entregaba la hoja de información del estudio para el paciente y los consentimientos informados (imprescindibles para su inclusión en el estudio), y se explicaba la necesidad de firmarlos tras su lectura para poder participar en el estudio. Se pedía firmar dos formularios de consentimiento informado, ya que uno era pertinente al hecho participar y poder analizar variables generales y otro era referente a la muestra de ADN para análisis genómicos. Se explicaban detalladamente todos los procedimientos y el compromiso de tiempo previsto, así como si existían dudas.

- c) Se realizaban pruebas de electrocardiograma (ECG), así como determinaciones protocolizadas y estandarizadas de altura, peso, cintura y presión arterial.
- d) Se proporcionaba a los participantes material escrito sobre recomendaciones generales acerca del manejo del Síndrome metabólico y sus características en forma de díptico, así como recetas generales de Dieta Mediterránea por estación del año, sin restricción calórica en el grupo control y con restricciones hipocalóricas consensuadas en el grupo de intervención.
- e) Se otorgaba un cuaderno de registro de alimentos prospectivo de 3 días (2 días hábiles y 1 día de fin de semana), un cuestionario de actividad física en el tiempo libre y un registro de autocontrol de peso y circunferencia de la cintura y circunferencia de la cadera, además se le daba al participante una cinta métrica, siendo el paciente el que debía registrar en un cuaderno su peso y circunferencias 1 vez/semana durante el período de ejecución del *run-in*.
- f) Se proporcionaba a los participantes los cuestionarios clínico-psicopatológicos y de calidad de vida.

Se les pedía a los participantes que devolvieran todos los cuestionarios anteriormente mencionados bien cumplimentados en la siguiente visita (S3).

2) En la **visita de S2**, que tenía lugar a las dos semanas, se realizaba una llamada telefónica para ver si había variaciones en el peso y se recordaba la próxima visita, insistiendo en que llevaran el registro de alimentos completo, el cuestionario de actividad física, el registro de autocontrol y los cuestionarios clínico-psicopatológicos y de calidad de vida.

3) La **visita de S3** incluía la evaluación final del período de evaluación previa (*run-in*) que era a las 4 semanas de la visita de S1 (30 minutos). En esta visita se cumplimentaban los siguientes puntos:

- a) Se obtenían datos sobre el registro de alimentos, el cuestionario de actividad física, el registro de autocontrol de peso, circunferencia de la cintura y cadera, y los cuestionarios clínicopsicopatológicos y de calidad de vida.
- b) Se medían el peso y la circunferencia de la cintura, y se consideraban estos como medidas basales o medidas de la primera visita en el estudio.
- c) Se administraba y cumplimentaba el cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos y los 5 tests cognitivo-neuropsicológicos que, a diferencia de los clínico-psicopatológicos, siempre han de ser presenciales y realizados por el personal del estudio. Estos 5 tests son: Minimal, fluencia verbal y fonológica, las series inversas de dígitos, *trail-making test* y test del reloj.
- d) El participante era informado de que recibiría una llamada telefónica para las siguientes citaciones, en consecuencia, a su grupo de participación asignado.

- e) Se informaba sobre la necesidad del ayuno nocturno para la extracción de sangre y recogida de la primera orina de la mañana *in situ*, y para la posible evaluación basal inmediata tras haber sido aleatorizados, y si el paciente era seleccionado en el grupo de intervención se pautaba la sesión informativa correspondiente.

El tiempo entre que se completaba la fase de *run-in* y la entrada a la intervención era de como mínimo una semana y como máximo un mes. Una vez transcurrido este tiempo se realizaba el proceso de aleatorización para asignar el grupo de intervención a los participantes (figura 3.1).

En el apartado de resultados se detalla el número de participantes del nodo de Valencia que se incluyeron en el run-in, así como el número de participantes asignados aleatoriamente a cada grupo de intervención.

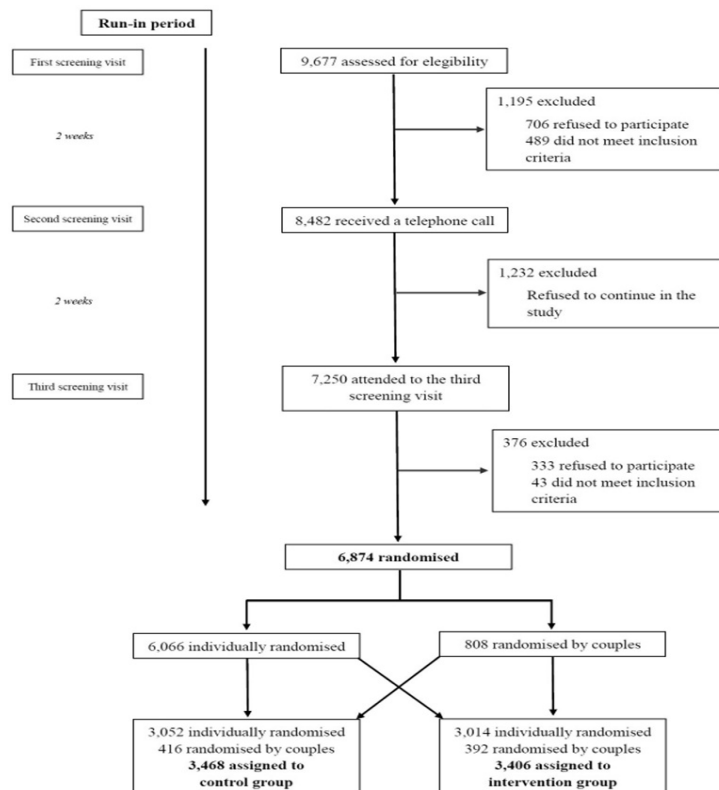


Figura 3.1. Diagrama de flujo estudio PREDIMED-Plus (Martínez-González MA et al., 2019)

3.1.4 Recopilación de datos

La obtención de información sobre las variables demográficas socioeconómicas, de estilo de vida, antropométricas, clínicas, bioquímicas, así como la obtención de muestras biológicas se realizaba fundamentalmente en los centros de atención primaria principalmente de los participantes. En el nodo de Valencia se realizaban algunas pruebas de subproyectos específicos en la facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Como se ha indicado en los apartados de esta Tesis Doctoral, la obtención de cuestionarios va distribuida en las distintas visitas a lo largo del tiempo total del estudio, lo que ha permitido y permite conocer las características de nuestra población participante en un inicio y poder ver las posibles modificaciones realizadas por los pacientes a lo largo de este tiempo de intervención, en cuanto a los cuestionarios relacionados con la propia intervención (datos longitudinales), así como la variación presente en un mismo participante (datos transversales). Tanto la recogida de muestra biológica como los cuestionarios de calidad de vida, se han recogido y se continúan recogiendo, en las visitas estipuladas en el protocolo, en el inicio (visita basal), a los 6 meses, y en los años impares. Los parámetros bioquímicos y perfil de hemograma se determinaron en cada una de estas visitas mencionadas y se analizaron en el hospital Clínico de Valencia. En cuanto a los cuestionarios cognitivo-neuropsicológicos, se realizaron en el inicio del estudio y posteriormente se han continuado realizando a los 2, 4, 6 y 8 años de seguimiento. La Tabla 3.2 muestra de manera gráfica la planificación de la realización de los cuestionarios según las respectivas visitas. Cumpliendo con el protocolo que se ha descrito. En el momento en que esta Tesis Doctoral está siendo presentada el estudio continúa en funcionamiento, por lo que debemos tener presente que los pacientes de nuestro nodo se encuentran en períodos de visita diferentes, pero todos han cumplido los 6 años de intervención. Los primeros pacientes reclutados (iniciaron el estudio en 2014-2015) ya se encuentran en la visita de 8 años o están próximos a realizarla, los reclutados al año de inicio del estudio (2015-2016) están en la visita de 7 años, y los reclutados en el último año (2016-2017) en la visita de 6 años.

Tabla 3.2. La tabla muestra las principales medidas y actividades de toma de datos por visita (Protocolo PREDIMED-Plus)

	EVALUACIÓN PREVIA												
	S1	S2	S3	INICIO	6M	AÑO1	AÑO2	AÑO3	AÑO4	AÑO5	AÑO6	AÑO7	AÑO8
1. CUESTIONARIO DE ELEGIBILIDAD	X												
2. REGISTRO DE ALIMENTOS (3 DIAS)	e		X										
3. MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS*	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4. CUESTIONARIO GENERAL				X									
5. 137-item FFQ			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
6. CUESTIONARIO DIETA MEDITERRANEA (17/14-items)**				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7. CUESTIONARIOS DE ACTIVIDAD FÍSICA†	e†		X†	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8. TEST DE LA SILLA (Evaluación actividad física)				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9. ACCELEROMETRÍA			e	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10. CUESTIONARIO DE SEGUIMIENTO					X	X	X	X	X	X	X	X	X
11. ELECTROCARDIOGRAMA	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X
12. MEDICIONES DE TENSIÓN ARTERIAL	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13. RECOGIDA DE MUESTRA DE SANGRE				X	X	X		X		X		X	X
14. RECOGIDA DE ORINA MATUTINA				X	X	X		X		X		X	X
15. RECOGIDA DE UÑAS				X		X		X		X		X	X
16. PRUEBAS COGNITIVO-NEUROPSICOLÓGICAS‡			X				X		X		X		X
17. CUESTIONARIOS CLÍNICO-PSICOPATOLÓGICOS‡	e		X			X	X	X	X	X	X	X	X
18. CUESTIONARIOS DE CALIDAD DE VIDA*	e		X			X		X		X		X	

S: Visita de selección; FFQ: Cuestionario validado semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos; M: mes; e: Entrega.

*Las mediciones antropométricas incluirán: peso, talla, circunferencia de la cintura y circunferencia de la cadera.

†Cuestionario de actividad física en el tiempo libre de Minnesota en su versión reducida, y los cuestionarios PAR-Q, RAPA (RAPA1 y RAPA2) y el de preguntas de sedentarismo del NHS; ‡Cuestionario de Actividad Física en el tiempo libre de Minnesota largo.

**Se trata de cuestionarios breves de adhesión a Dieta Mediterránea. En el grupo control se utilizará el mismo cuestionario que se usó en PREDIMED (Schroeder et al, 2011) y que tiene 14 ítems. En el grupo de intervención intensiva se utilizará el cuestionario de Dieta Mediterránea hipocalórica (ver más abajo) que tiene 17 ítems.

‡Mini-Mental State Examination, test del reloj, fluencia verbal semántica y fonológica (animales + P), dígitos (batería WAIS-III) directos e inversos y test del trazo.

‡Depresión de Beck BDI-II, escala multidimensional de locus de control sobre el peso y criterios diagnósticos TCA. *Cuestionario de salud SF-36.

Debemos tener presente que debido a que el estudio no ha llegado a su fin, la determinación de fenotipos finales sigue vigente a día de hoy, mientras que de fenotipos intermedios sí que se han podido obtener resultados previos tras el primer año de intervención realizada (Salas-Salvadó J, et al., 2019). Pero únicamente han sido publicados los de los 6 meses y en la primera anualidad, ya que el objetivo principal de realización del estudio PREDIMED-Plus reside en ver la efectividad de una intervención multimodal, con dieta mediterránea con restricción energética, promoción de actividad física y apoyo conductual, en la reducción del peso a largo plazo y en la prevención del desarrollo de enfermedad cardiovascular y otros fenotipos finales, y para poder contemplar este objetivo los resultados deben ser analizados cuando el estudio se haya completado en su totalidad. En consonancia a esta idea, en 2020 tras la situación excepcional de confinamiento producido por la pandemia generada por el virus COVID-19, se decidió tener en cuenta como subproyecto los datos referidos por los participantes en este momento (Paz-Graniel I et al., 2023), ya que el estado de salud general se vio condicionado en múltiples formas y podía suponer un problema en el alcance de los objetivos principales y secundarios del estudio PREDIMED-Plus. En el caso del subproyecto E2bN, como solamente incluía una pequeña submuestra y había que dar resultados dentro de los work packages del proyecto europeo, sí que se obtuvo autorización para poder analizar la intervención hasta los 3 años.

En nuestro nodo, Universitat de València, en nuestros 465 participantes, se han realizado en el momento basal diversas determinaciones adicionales a esta batería de cuestionarios descritos, permitiendo ampliar el conocimiento en los múltiples factores que pueden influir en el seguimiento de una intervención y en el desarrollo de una patología y/o alteración metabólica (Corella D et al., 2014; Corella D, 2022). En los participantes correspondientes a nuestro grupo, se les ha realizado test de percepción de sabor, así como la determinación de preferencias por sabores y alimentos, también se les ha preguntado sobre distintas variables en función a los horarios de sueño (cronotipo) y calidad del mismo, y los múltiples análisis ómicos, que incluyen GWAs (Fernández-Carrión R et al., 2021) y EWAs de esta muestra y algunos metabolitos (GlycA, aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), colina y derivados).

Respecto a la intervención, los participantes aleatorizados en este grupo realizaron las programadas visitas mensuales de forma grupal e individual, como parte de la intervención intensiva dietética y de estilo de vida. En el grupo control se realizaron las visitas anuales correspondientes según el protocolo. Durante la realización de las reuniones grupales y visitas individuales se repartía aceite de oliva virgen extra (proporcionado por Fundación Patrimonio Comunal Olivarero), siendo ambos los grupos que lo recibían y reciben, ya que se deseaba que todos los pacientes partieran de una de las características esenciales de la dieta mediterránea (cocinar y aderezar con aceite de oliva virgen extra), y que fuera la intervención energética la que pudiera ser capaz de evidenciar los posibles efectos beneficiosos de la adherencia a la dieta mediterránea con control en las energías consumidas mediante el diseño de menús hipocalóricos y aumento de la actividad física y reducción del sedentarismo.

La adherencia a la dieta mediterránea se evaluó mediante la puntuación alcanzada en la escala de adherencia a dieta mediterránea restringida en energía que consta de 17-ítems y ha sido también validada (Schröder H et al., 2021) relacionadas con la dieta mediterránea en su versión hipocalórica. También se hizo uso de la escala PREDIMED de 14 ítems previamente validada (Schröder H et al., 2011). Se puntuó con 1 punto por cada ítem que captura la adherencia a la dieta mediterránea y 0 puntos para los ítems que no: usar solo aceite de oliva virgen extra para cocinar, aderezos para ensaladas y untables; frutas; verduras; pan blanco; pan integral; carne roja o productos cárnicos; mantequilla, margarina o crema; bebidas azucaradas; leguminosas; pescados o mariscos; dulces o pasteles comerciales; chiflado; pollo, pavo o conejo; sofrito (salsa hecha con tomate y cebolla, ajo y aceite de oliva); añadir edulcorantes artificiales preferentemente no calóricos a las bebidas en lugar de azúcar; pasta no integral o arroz blanco; consumo moderado de vino tinto. Una puntuación más alta (de 0 a 17) indicó una mayor adherencia a la dieta mediterránea. La población de estudio se clasificó en dos grupos 193 que reflejan una adherencia baja (de 0 a 8 puntos) y alta (de 9 a 17 puntos) a la dieta mediterránea. El gasto total de energía relacionado con la actividad física en el tiempo libre se estimó como la suma de la frecuencia, la duración y la intensidad de cada actividad dividida por 30 días/mes (METmin/día) utilizando el cuestionario REGICOR abreviado y validado (Molina L et al., 2017).

Otra variable interesante en esta Tesis Doctoral, fue el estado de tabaquismo. Esta información se obtuvo mediante un cuestionario previamente descrito administrado (Salas-Salvadó J et al., 2019). Este cuestionario contenía una pregunta general sobre el consumo actual y pasado de tabaco (nunca fumador, exfumador de más de 5 años, exfumadores de hasta 1 año, exfumadores de menos de 1 año y fumadores actuales). En este cuestionario también se incluyeron preguntas sobre el tipo de tabaco fumado (cigarrillos, puros y pipa), así como el número de cigarrillos/cigarros/pipas fumadas por día y el número promedio de años que el participante refería haber fumado. Los fumadores actuales se clasificaron como aquellos que fumaban al menos un cigarrillo, cigarro o pipa por día, aunque ninguno de los participantes indicó que fumaba pipas. Sin embargo, seis participantes informaron fumar puros en lugar de tabaco. Teniendo en cuenta que el número de nicotina de los puros es mayor que el encontrado en un cigarro, se empleó un factor de conversión para integrar y poder considerar en los análisis las respuestas de estos pacientes (Malhotra J et al., 2017). Por lo tanto, en promedio consideramos que 1 puro equivalía a 3 cigarros, y todos los fumadores fueron analizados juntos. Para el fumador actual, también analizamos el número promedio de cigarros fumados por día y calculamos el número de paquetes-año fumados como el número de cigarros fumados por día dividido por 20 y multiplicado por el número de años que los participantes han fumado (Teshima A et al., 2022). El tabaquismo se analizó por primera vez como una variable ordinal que incluía 5 niveles (nunca, exfumador de >5 años, exfumador entre 5-1 años, exfumador <1 año y fumadores actuales). La segunda forma de estudiar el efecto del tabaquismo y la metilación de determinados genes, consistió en definir previamente en tres categorías la variable “fumar”: fumadores actuales, exfumadores y no fumadores. Y finalmente, también se realizaron dichos análisis comparando dos grupos principales: los nunca fumadores y los fumadores actuales.

En la elección y preferencia de alimentos también se han obtenido distintos resultados que muestran la relevancia de ciertas predisposiciones genéticas. En esta Tesis se muestran resultados obtenidos en diversos análisis en esta población mediterránea, en los que nos hemos centrado específicamente en la influencia del sabor dulce, seleccionando los siguientes ítems de los 17 ítems del cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea, antes descrito, pudiendo hacer un análisis más exhaustivo, en cuanto a los principales alimentos azucarados reconocidos: “ítem 6: ¿Cuántas bebidas azucaradas (refrescos, cola, bitter, jugos) ¿bebes a la semana?”; “ítem 9: ¿Cuántas veces a la semana consume bollería como galletas, dulces o tortas?”, y “ítem 13: ¿Agrega azúcar a sus bebidas (café, té)?” (Fernández-Carrión R, et al., 2021), de la misma forma, que se realizaron reportes sobre las preferencias alimentarias y por los sabores (Coltell O et al., 2019; Gervis JE et al., 2021; Fernández-Carrión R et al., 2021).

Por tanto, en esta Tesis se han observado y estudiado las características de la población de manera basal, así como se ha tratado de analizar los efectos de la adherencia a la dieta mediterránea y la misma intervención con dieta mediterránea hipocalórica y promoción de estilo de vida saludable y terapia o tratamiento conductual y la relación con las variables sociodemográficas, clínicas, factores de estilo de vida a través de los cuestionarios generales desde la visita basal hasta los últimos meses de ejecución de este trabajo de Tesis Doctoral y los diversos análisis genómicos.

3.1.4.1 Obtención de datos mediante cuestionarios

Los cuestionarios que se realizaron en las respectivas visitas permitieron recoger información necesaria sobre los pacientes participantes:

- a) **Información general:** La información sobre el historial médico, antecedentes familiares y uso de medicamentos fue recogida en la visita basal a través del cuestionario general.
- b) La valoración de **hábitos alimentarios e ingesta dietética:** Previamente se validó el cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos con 137 ítems que se utilizará tanto en visita de selección 3 como en cada visita anual de seguimiento para evaluar la dieta de los participantes (Fernández-Ballart JD et al, 2010). Además, la escala de 17 ítems de dieta mediterránea hipocalórica debe ser cumplimentada en cada visita. Esta puntuación de 17 ítems (Schröder H et al, 2021), administrada tanto al grupo de intervención intensiva como al grupo control se ha utilizado para evaluar el cumplimiento de la intervención y como elemento clave para orientar las entrevistas de motivación individuales durante el seguimiento. En el grupo control se utilizaba además la misma escala de 14 ítems que se usó en el PREDIMED (Schröder H et al, 2011), esta escala no contempla la reducción de calorías ingeridas, pero sí que se consuman alimentos propios de la dieta mediterránea.
- c) **Actividad física:** A excepción de la visita de selección 1 donde a los participantes se le proporcionaba un cuestionario de actividad física en el tiempo libre de Minnesota, al inicio, a los 6 meses y durante las visitas de seguimiento los participantes completaban un cuestionario previamente validado para actividad física (Elosua R et al, 2000) en su versión reducida y mucho más cómoda que el cuestionario de Minnesota. En todas las visitas se les realiza el test de la silla (1 min) para evaluar la forma física y los

cuestionarios PAR-Q (Physical Activity Readiness Questionnaire), RAPA (RAPA1 y RAPA2) (Rapid Assessment of Physical Activity) y se realizan preguntas sobre el tiempo de sedentarismo del NHS (Nurses' Health Study). Además, cada participante aleatorizado al grupo de intervención intensiva recibió un podómetro (Yamax SW200 Digi-Walker Pedometer) para el auto-control de los pasos caminados cada día en el inicio del estudio, de esta forma se fomentaba la realización de un número específico de pasos, adaptado a las características del paciente. A lo largo de las distintas visitas, se han utilizado acelerómetros GENEActiv para cuantificar la actividad física a los participantes al inicio, a los 6 meses, y posteriores años. Estos acelerómetros tenían que llevarse una semana y posteriormente se interpretaba por algoritmos de machine learning la actividad física realizada. Las lecturas se remitían a la Facultad de Medicina de Málaga donde se procesaban de manera centralizada. Debido al coste de los acelerómetros, éstos sólo se pudieron poner en una submuestra de participantes. Ver más detalle en la publicación al respecto (Sayón-Orea C et al, 2019). En base a las valoraciones obtenidas según la clasificación del estado y del nivel de actividad física realizada, se pautaba una recomendación progresiva de condicionamiento y actividad física.

- d) **Auto-control y monitorización** de la información durante el seguimiento: En las visitas de seguimiento, se cuestionaba a los participantes sobre posibles eventos clínicos que pudieran haber sucedido entre visitas. Actualizando en cada visita la prescripción de medicamentos que cada participante refería.
- e) **Evaluación de efectos adversos:** a los 6 meses y anualmente se cumplimentaba un cuestionario específico sobre posibles efectos adversos ocurridos atribuibles a la intervención o la pérdida de peso, así como si existía algún impedimento para consumir los alimentos asociados directamente a dieta mediterránea (aceite de oliva virgen extra y frutos secos).
- f) **Electrocardiograma:** Los electrocardiogramas se realizaban cuando era posible en los Centros de Salud en el momento de entrada al estudio (visita de selección 1), a los seis meses y en todas las visitas anuales posteriores posibles. Se escaneaban, almacenaban y se registraban.
- g) **Recogida de muestra biológica:** Tanto las muestras de sangre y orina en ayunas como las uñas se recogían en las visitas de inicio (basal), 6 meses, y años impares. Los análisis convencionales bioquímicos para la sangre han sido los parámetros clásicos de valoración: concentraciones séricas de lípidos (colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos), glucemia plasmática, hemograma, ionograma, y concentraciones séricas de calcio, ácido úrico, urea, creatinina, albúmina y proteína C reactiva, así como velocidad de

sedimentación globular, hemoglobina A1c, pruebas de función hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina y transaminasas en suero: aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y gamma-glutamyl transpeptidasa) y era opcional realizar las pruebas de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina activada y fibrinógeno), recogiendo también al inicio del estudio (basal) y en las visitas de seguimiento según protocolo. Respecto a la recogida de las uñas se pedía a los pacientes que las aportaran en unas bolsas con cierre zip-lock etiquetadas convenientemente que les otorgábamos con sus respectivas etiquetas.

La recogida de muestra de heces se incorporó algún tiempo más tarde, tras iniciarse el subestudio Cognition y anunciar la suma de los análisis del microbioma de los pacientes a partir del tipo de dieta, se entregaba a los participantes un recipiente esterilizado (Muralidharan J et al., 2019), que disponía de una espátula para posibilitar la recogida de la muestra más fácilmente. El recipiente debía congelarse y se entregaba al personal del estudio a la vez que las muestras de uñas.

h) Valoración neuropsicológica y de calidad de vida: Esta valoración incluía 3 apartados:

- A. Función cognitiva
- B. Calidad de vida
- C. Psicopatología

Al inicio del estudio y cada dos años (a los 2, 4, 6 y 8 años de seguimiento, se les administraba a los participantes una batería de 6 tests de función. El primero (Mini-Mental State Examination (MMSE)) es un test de cribado cognitivo, los otros 5 tests exploran diversas áreas de función cognitiva. Estos test han sido diseñados para detectar cambios y/o mejoras en el rendimiento cognitivo (apartado A). La escala única de calidad (Short-Form 36, o SF-36) se recogía de todos los participantes basalmente y en años impares (tras 1, 3, 5, y 7 años de seguimiento) (apartado B). Mientras que los cuestionarios psicopatológicos (apartado C) se recogían basalmente y todos los años. Todos los instrumentos incluidos en la batería cognitiva, de calidad de vida y psicopatológicos han sido normalizados en población española para el rango de:

- A. Seis tests cognitivo-neuropsicológicos (se deben realizar presencialmente): MMSE, Fluencia verbal semántica mediante “animales en 1 minuto”, Fluencia verbal fonológica mediante “palabras en 1 minuto que empiezan por la letra P”, Memoria de trabajo verbal y visual series inversas de Dígitos de la batería WAIS-III, Trail Making Test, Test del reloj.
- B. Un solo test de calidad de vida (que pueden responder los participantes en sus hogares): Se valoraba con el cuestionario de salud SF-36 (versión de

- 36 ítems) (Ferrer M et al, 1998; Ware JE Jr et al., 1998); que se utilizaba basalmente (*run-in*) y cada dos años (años impares) para alternarlo con los tests cognitivos (años pares).
- C. Tres cuestionarios clínico-psicopatológicos (podían responderlo los pacientes en casa): Inventario de Depresión de Beck (BDIII), Escala multidimensional de Locus de Control sobre el peso, Screening para descartar Trastornos de la Conducta Alimentaria (TCA) comórbido según criterios diagnósticos (estos cuestionarios se realizaban en todas las visitas).

Los cuestionarios que era posible hacer su realización en casa se exigía que el participante se comprometiera a entregarlos o remitirlos en un plazo máximo de 15 días. De la misma forma que se insistía en aportar las muestras biológicas posteriores a la extracción sanguínea en un plazo de 15 días. Ya que así no hay problemas de asociar las respuestas y demás información de los cuestionarios y pruebas de la visita y estas otras.

3.1.4.2 Obtención de datos antropométricos

El peso y la cintura se registraban en cada visita con los participantes en ropa ligera y sin zapatos o accesorios, con una balanza electrónica de alta calidad. La altura se medía a la entrada del estudio con un tallímetro. La circunferencia de cintura se tomaba en el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca, mientras que el perímetro de la cadera se medía en la parte más ancha de la misma. Estas mediciones se realizaban en la visita de selección 1, visita basal y de forma anual. La última parte del cuestionario general estaba dedicada a la exploración física en la que se recogían datos antropométricos tales como, peso, altura, cintura y cadera, además de la presión arterial sistólica, la diastólica y la frecuencia cardíaca. A continuación, se explica en qué consistía la metodología de estas mediciones.

3.1.4.2.1 Medición de la talla

La medición de la talla se realizaba con un tallímetro estándar, preferiblemente de brazo móvil. El paciente se descalzaba previamente, y se

quitaba la chaqueta, si es el caso. Los participantes debían estar en una superficie firme y lisa, y debía colocarse de espaldas al tallímetro, apoyando los talones, nalgas y brazos. La cabeza debía estar en el plano horizontal y con los pies/tobillos juntos. Se desplazaba el brazo móvil del tallímetro hasta que se apoyaba sobre la superficie de la cabeza, formando un ángulo recto con el brazo móvil del tallímetro. Los valores se expresaban en centímetros, redondeando a 1cm.

3.1.4.2.2 Medición del peso

Se utilizaba una báscula calibrada previamente. Como medida adicional de proyectos específicos de nodo se podía realizar la medida de la composición corporal. En algunos nodos se utilizó DEXA. En otros nodos se podía utilizar y la medición de la composición corporal mediante bioimpedancia mediante TANITA®. En nuestro nodo utilizamos esta alternativa en algunas mediciones. Gracias a la bioimpedancia obtenemos información sobre: masa magra y masa grasa, referida en peso (Kg) y porcentaje, el porcentaje de agua corporal, el peso de masa ósea y grasa visceral, el cálculo de peso ideal que considera a partir de la edad y altura que se han insertado, el cálculo de IMC, y la respectiva edad metabólica. Tanto en la TANITA como en el peso, el participante se debe situar en el centro de la misma y debe vestir ropa ligera, retirando el peso superfluo, sin zapatos, ni chaquetas o abrigos. El peso se expresa en kilos (Kg) con un decimal, redondeando al valor de 100 gramos.

3.1.4.2.3 Medición del perímetro de la cintura y cadera

Para realizar estas mediciones se ha utilizado una cinta métrica. El participante se colocaba en bipedestación y mantenía la cabeza recta, con los brazos a ambos lados del cuerpo. Se medía el perímetro abdominal en espiración en el punto intermedio de la línea trazada entre la última costilla y la cresta ilíaca. Se asegura que la cinta está al mismo nivel por delante y por detrás. Se anotaba en escala de 0,1cm. Para la cadera se pedía al participante que levantara la pierna doblándola, como subiendo un peldaño, de esta forma se tomaba de referencia el punto medio de la cadera, que suele corresponderse con el punto que más sobresale normalmente en las mujeres. También se anotaba en escala de 0,1cm.

3.1.4.2.4 Obtención de Índice de Masa Corporal

El Índice de Masa Corporal (IMC) se ha calculado mediante la fórmula: $IMC (Kg/m^2) = peso (Kg)/(talla(m))^2$. Se consideraba un individuo con sobrepeso cuando $IMC \geq 25 Kg/m^2$ y obeso con $IMC \geq 30 Kg/m^2$.

3.1.4.2.5 Medición de la presión arterial

Para la medición de la presión arterial, los participantes permanecían en una silla con la espalda y brazos apoyados en una situación que permitía que el brazal se encontrara a la altura del corazón. Se les pedía que evitaran fumar o tomar cafeína durante los 30 minutos previos a la determinación de la presión arterial. Se iniciaba tras al menos 5 minutos de reposo a su llegada. La cámara del manguito debe rodear como mínimo al 80% del brazo. Las determinaciones de la presión arterial se tomaban con un esfigmomanómetro automático (Omron 705 IT Intellisense, Susaka Co. LTD, Japón). Se promedian 3 lecturas (o más si era necesario) separadas por 2 minutos. Si las dos primeras diferían más de 5 mmHg se obtenían y promedian lecturas adicionales. Se consideraba hipertensión cuando los valores de presión arterial eran superiores o iguales a 135/85 – 140/90 mmHg.

3.1.4.3 Obtención de muestras biológicas

Las extracciones de sangre se llevaban a cabo en los centros de reclutamiento. Se extraían unos 55 ml de sangre siempre que no hubiera problemas y la extracción fuera óptima. Se recogían en distintos tubos para los respectivos análisis bioquímicos y de laboratorio. Los análisis bioquímicos en sangre se realizaban preferentemente en fresco en un laboratorio acreditado. El suero, el plasma citrato y las muestras de plasma EDTA se distribuían en alícuotas de 250 µl y 500 µl, y se almacenaban a -80°C para futuros análisis. Los análisis de orina se llevaban a cabo en los centros de reclutamiento de la misma manera siguiendo el protocolo específico de recogida de muestras biológicas para PREDIMED-Plus.

3.1.4.3.1 Obtención de muestras biológicas para análisis bioquímico

Se extraían los siguientes tubos a cada voluntario:

- 1 tubo EDTAK2 y 1 tubo de suero a partir de los cuales se realizaba un análisis de hemograma y de parámetros bioquímicos
- 2 tubos de 10 mL con EDTAK2. Los tubos deben mantenerse en frío hasta su procesamiento. Estos tubos iban destinados a obtener plasma-EDTAK2, plasma-EDTAK2 frío e interfase celular (*buffy coat*).
- 1 Tubo de 4,5 mL con citrato como aditivo (tapón azul), destinado a obtener plasma-citrato e interfase celular (*buffy coat*).
- 2 Tubos de 10 mL y 1 tubo de 6mL para suero (tapón rojo). Su procesamiento debía estar protegido de la luz, tapando los tubos con papel de aluminio. Estaban destinados a obtener suero.
- Los tubos de sangre EDTAK2 (tapón violeta) y sangre citrato (tapón azul) se centrifugaban, inmediatamente después de su extracción a 1.700g durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- El suero y el plasma obtenidos se alicuotaban en crioviales de 250 µL y 500 µL, 250 µL en el caso de la muestra plasma-citrato. Los crioviales destinados al plasma frío se refrigeraban previamente a 4°C.
- La interfase blanca (capa de células blancas) que se obtenía en los tubos de EDTA tras su centrifugación se recogía como *buffy coat* (aproximadamente 1 ml por tubo). El *buffy coat* obtenido de cada uno de los tubos de EDTA se repartía en dos crioviales (aproximadamente 500 µl por vial).

Otros instrumentos para la obtención de muestras biológicas eran:

- 1) Tubos de extracción sanguínea. Los tubos son de la marca BD Vacutainer Systems.
- 2) Adaptadores para tubos Vacutainer, palomillas de extracción sanguínea.
- 3) Contenedores de orina de 100 mL para recolección de orina reciente.
- 4) Bolsas con cierre zip-lock de tamaño 70x100 mm para el almacenamiento de las uñas.
- 5) Racks vacíos W-RACK96 0,65 ml WILMUT
- 6) Tubos W-SER WILMUT 0,65 ml (donde se alicuotarán las muestras)
- 7) Tapones con código de color para los crioviales que facilite un reconocimiento visual rápido para la identificación de la naturaleza de las muestras: Tapones W-SEAL. Para los viales negros, se utilizarán los Tubos W-SER WILMUT 0,65 ml protegiéndolos con cinta adhesiva negra.
- 8) Posteriormente, se incorporaron recipientes estériles con espátula incorporada para la recogida de muestra fecal por parte de los propios participantes.

3.1.5 Protocolo de fraccionamiento en alícuotas

Las muestras biológicas que se recogían en el estudio PREDIMED-Plus son de naturaleza diversa, incluyendo plasma, suero, *buffy coat*, orina, uñas y heces. Las muestras biológicas se recogían estando el voluntario en posición supino, a primera hora de la mañana y después de como mínimo 10 horas de ayuno. Para el almacenamiento de los crioviales se utilizaron racks W-RACK96 0,65 WILMUT (b/18 u.). En el trabajo de campo, para facilitar el llenado y la manipulación de los crioviales, se aconsejaba utilizar un rack para cada voluntario, siguiendo el esquema de la figura adjunta. Si de algún voluntario no se pueden completar todos los crioviales se dejaban los espacios vacíos respetando las posiciones de la plantilla para facilitar la identificación visualmente. Los crioviales se tapaban con tapones de color siguiendo el código descrito en la imagen (figura 3.2).

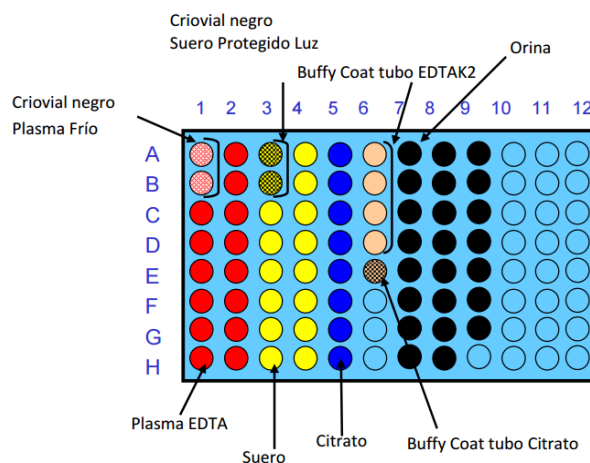


Figura 3.2. Esquema de asignación de tapones de color según contenido de alícuota

3.1.5.1 Protocolo de almacenamiento y conservación de muestras

Una vez realizadas las alícuotas se colocaban las muestras en los Racks W y eran almacenadas de manera temporal a -80°C hasta que se realizaba el correspondiente envío de muestras a los centros asignados. El nodo de Valencia tenía asignada la recepción de muestras de *buffy coat* para realizar la extracción de ADN y los análisis genómicos. Para la realización del envío, las alícuotas se separaban según

indicaciones del nodo receptor y en cada rack era imprescindible que las muestras pertenecieran a una misma visita de seguimiento, así como era imprescindible que se mantuviera la cadena de frío, asegurando que la muestra no sufría perjuicio alguno durante su transporte. La lectura de los códigos de las etiquetas se correspondía con el asignado a los pacientes y a los crioviales. Para facilitar y posibilitar un registro eficiente se hacía uso de un lector-pistola de códigos datamatrix: LECTOR VOYAGER 1400g LECTOR AREA IMAGER+STAND (Honeywell ©).

3.1.5.2 Protocolo de distribución de muestras

Se acordó que las criocajas correspondientes a cada participante serían distribuidas a los biobancos pautados de los centros receptores: BIOBANCO Hospital Clínic de Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona, IMIM, FMCS-URV, F. Medicina UV, F Medicina UMA, Facultat de Farmàcia UB.

3.1.6 Asignación de los grupos de estudio

Los participantes fueron aleatorizados en una proporción 1:1, a un grupo control o a un grupo de intervención intensiva sobre el estilo de vida según un programa informático centralizado y al que se accedía desde cada nodo. El proceso de aleatorización se realizó mediante el uso de una secuencia numérica aleatoria generada por ordenador y asignada centralmente (información disponible en www.predimedplus.com). El centro de coordinación era el responsable del procedimiento de aleatorización de los participantes, y éstos eran asignados al grupo de intervención de forma estratificada por centro, sexo y grupo de edad (<65, 65-70, >70 años). Se permitió la inclusión en el mismo grupo de matrimonios o parejas, evitando sesgos del seguimiento del grupo aleatorizado si hubiese sido diferente. Los centros reclutadores a través de la página web preparada para ello, indicaban el número de ID del participante, el nodo y su edad y el sistema informático automáticamente asignaba al sujeto participante al grupo de intervención sin que existiera la posibilidad de que pudiera cambiarse el grupo de intervención desde aquel momento. Una vez asignada la intervención se mantenía durante 6 años, con un seguimiento medio de 8 años para eventos clínicos.

3.1.7 Protocolo de intervención

Todos los participantes siguieron recibiendo su asistencia sanitaria habitual durante el periodo de duración del estudio por parte de los profesionales de Atención Primaria y su médico de cabecera habitual. En ningún caso la asistencia del equipo del estudio PREDIMED-Plus, tanto de nuestro nodo de Valencia, como los otros nodos, sustituía la atención primaria del propio centro de salud. El protocolo de intervención difería según la asignación al grupo de intervención intensiva o al denominado grupo control de acuerdo tal como detallamos seguidamente.

3.1.7.1 Grupo de intervención con Dieta Mediterránea hipocalórica

En este grupo se prescribía una dieta mediterránea tradicional, pero que era restringida, y además venía acompañada de programas de actividad física y apoyoconductual, con objetivos específicos de pérdida de peso, incluyendo la automonitorización y un seguimiento frecuente durante toda la duración de la intervención del estudio. Estos participantes participaban en entrevistas individuales y sesiones grupales de motivación a base de 3 contactos mensuales el primer año de intervención y 2 contactos mensuales después. Se les suministraba gratuitamente aceite de oliva virgen extra (1 L/mes). El nivel de cumplimiento de la intervención era controlado periódicamente, pudiendo adaptarla si se consideraba necesario.

En estos 6 primeros meses, además de la visita inicial, los participantes en el grupo asignado aleatoriamente al programa de intervención intensiva participaban en sesiones individuales y en reuniones de grupo, y existía un tercer contacto personal cada mes mediante una llamada telefónica mensual para recibir refuerzo de los objetivos y resolver posibles dudas. Para fomentar la pérdida de peso se hacía uso de registros para que pudieran controlar y registrar las variaciones de su peso y cintura, siendo una estrategia útil para que aprendieran a automonitorizarse correctamente. Además, se les animaba a reemplazar una comida al día por alimentos de bajo aporte calórico, y para ello se les ofrecían alternativas amplias y agradables, en consonancia con la tradición culinaria de la Dieta Mediterránea. Por último, en el supuesto de que el participante no consiguiera alcanzar los objetivos previstos en la última visita individual de esta etapa (sexto mes), se mantenía una entrevista motivacional con el personal preparado del estudio para intentar averiguar las causas por las que el paciente no había podido alcanzar la pérdida de peso deseada y tratar de reconducir la situación y proporcionar medidas de rescate.

3.1.7.2 Grupo control

Este grupo recibía la atención habitual por profesionales de atención primaria y todo el material escrito educativo, así como las instrucciones para el seguimiento de la dieta mediterránea que ya se ha utilizado en el ensayo PREDIMED y ha demostrado beneficios en la prevención de morbilidad cardiovascular, además de recomendaciones generales sobre el estilo de vida para el manejo del Síndrome metabólico. A los participantes del grupo control se les ofrecía una sesión grupal cada 6 meses por parte del equipo del estudio PREDIMED-Plus y se les proporcionaba de forma gratuita aceite de oliva virgen extra (6L cada 6 meses) si asistían a estas sesiones, con el objetivo de potenciar la dieta mediterránea y fidelizar su participación en el ensayo.

3.1.8 Marcadores intermedios de riesgo y fenotipos finales

Además de la medida del peso y otros parámetros antropométricos y cardiometabólicos en las distintas visitas, en el estudio PREDIMED-Plus los eventos clínicos son un objetivo final. A lo largo de las visitas de seguimiento, el personal de trabajo de campo va obteniendo información de posibles eventos clínicos que además son revisados y complementados por el comité de eventos clínicos de cada nodo formado por médicos. Los médicos de cada participante colaboran en recoger información sobre los eventos de las historias clínicas con la periodicidad que establece el protocolo de recogida de eventos. Estos médicos, al igual que los miembros del Comité Clínico desconocen la asignación del paciente al grupo de intervención. Posteriormente, la información de los eventos es remitida para su verificación al Comité Clínico central de Adjudicación de Eventos. La información que se remite al Comité Clínico carece de datos personales de los participantes. El proceso de tramitación de los datos se realiza mediante la web del ensayo clínico. De manera resumida y según el protocolo de recogida de eventos, éstos se clasifican en primarios y secundarios:

3.1.8.1. Eventos primarios o eventos principales finales

Los resultados primarios o eventos principales finales que se clasifican en este estudio:

- 1) La incidencia de enfermedad cardiovascular (compuesto de infarto de miocardio no fatal (Thygesen K et al., 2012), accidente cerebrovascular agudo (ictus, isquémico y hemorrágico) y/o muerte cardiovascular (Zipes DP, et al., 2006).
- 2) Pérdida de peso y mantenimiento a largo plazo de la pérdida de peso.

3.1.8.2 Resultados secundarios

Se recoge información de otros posibles fenotipos secundarios relacionados con el riesgo cardiometabólico:

- Obesidad abdominal: Se ha asociado al riesgo de enfermedad cardiovascular, la medición de las variaciones de la circunferencia de la cintura (medida en centímetros (cm)).
- Mortalidad total: Incluye todas las causas de muerte tanto las de causa cardiovascular (muerte súbita y muerte cardiovascular no súbita) como las provocadas por traumatismo, insuficiencia renal, neoplasia, sepsis, suicidio, y muertes de causa no aclarada. Todos los fallecimientos se confirmarán mediante revisión del Informe del Instituto Nacional de Defunciones.
- Angina inestable: El diagnóstico de angina inestable requiere la presencia de al menos una de las características clínicas siguientes: Dolor anginoso en reposo prolongado (>20 min); Angina de comienzo reciente (Class II or III of the Classification of the Canadian Cardiovascular Society); o Angina progresiva por desestabilización reciente de una angina previa con al menos grado III de la clasificación canadiense y/o episodios en reposo (Hamm CW et al., 2011).
- Revascularización coronaria (percutánea o quirúrgica): La revascularización percutánea o quirúrgica tiene dos indicaciones en angina: 1) La angina inestable o síndrome coronario agudo sin elevación del ST. 2) Mejoría pronóstica basada en la anatomía coronaria (número de vasos afectados,

severidad y localización de las lesiones) y en la presencia de disfunción ventricular izquierda (Hamm CW et al., 2011).

- Insuficiencia cardíaca (IC): La insuficiencia cardíaca aguda o crónica es un síndrome en el que los pacientes presentan síntomas y signos provocados por alteración de la estructura o función cardíacas (McMurray JJ et al., 2012; Yancy CW et al., 2013).
- Enfermedad arterial periférica: La adjudicación del evento se realizará de acuerdo con los criterios de la TASC II y la guías de la Sociedad Europea de Cardiología (Norgren L et al., 2007; Tendera M et al., 2011).
- Fibrilación auricular (FA): La fibrilación auricular se define (Camm AJ et al., 2010; Fuster V et al., 2011) como la arritmia cardíaca con las siguientes características: 1) El ECG de superficie (ECG) muestra intervalos RR' irregulares sin ningún patrón; 2) No se observan ondas P bien definidas en el ECG. Algunas ondas auriculares aparentemente regulares se pueden ver en algunas derivaciones del ECG, especialmente en V1; 3) La longitud del ciclo auricular (cuando se ve) p.ej.: intervalo entre dos ondas auriculares, es habitualmente <200 mseg (>300 lat/min).
- Diabetes tipo 2: El diagnóstico de diabetes se debe establecer cuando se da alguna de las siguientes circunstancias:
 - $HbA1c \geq 6,5\%$. La prueba debe realizarse en un laboratorio que use un método certificado y estandarizado para el ensayo DCCT; o
 - Glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl. El ayuno se define como la no ingesta calórica por lo menos durante 8 horas; o
 - Glucemia 2h. postprandial ≥ 200 mg/dl durante la prueba de tolerancia a la glucosa. La prueba debe realizarse como indica la OMS, con una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua; o
 - Síntomas clásicos de hiperglicemia y una glucemia al azar >200 mg/dl.
 - En ausencia de hiperglicemia inequívoca (punto anterior), los criterios deben ser confirmados tras repetir la prueba (American Diabetes Association, 2014).
- Complicaciones Diabetes tipo 2: Se evaluarán anualmente la presencia o no de complicaciones microvasculares de la diabetes en todos los participantes: nefropatía diabética, retinopatía diabética, polineuropatía diabética (American Diabetes Association, 2014).

-
- Cáncer: Se analizarán todos los cánceres excepto los cánceres de piel no-melanoma. Se codificarán de acuerdo a la Clasificación Internacional de la OMS (Stewart BW et al., 2014).
 - Demencia/enfermedad de Alzheimer: El diagnóstico se acepta según las recomendaciones del National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup (McKhann GM, et al., 2011) o si el diagnóstico lo realiza un neurólogo.
 - Enfermedad de Parkinson: los eventos serán aceptados de acuerdo con los criterios diagnósticos descritos por Hughes AJ et al., (Hughes AJ et al., 1992) o si el diagnóstico lo realiza un neurólogo.
 - Depresión unipolar: el diagnóstico se realizará según los criterios del DSM-V (Roehr B, 2013). Se aceptan como trastornos depresivos: depresión mayor, persistente, y otros trastornos depresivos.
 - Fractura osteoporótica: son fracturas de baja energía, se definen como fracturas producidas por una caída del mismo nivel. Se identifican a partir de radiografías o informes obtenidos a partir de dos servicios radiológicos (Bliuc D, et al., 2009).
 - Colelitiasis o colescistectomía: el diagnóstico de colelitiasis se basa en los hallazgos de las exploraciones con imagen incluyendo ecografía abdominal, TAC o RMN. El diagnóstico precisa informe quirúrgico (Gallstone Disease, 2014).
 - Gota sintomática: es un trastorno que muestra un espectro de hallazgos clínicos y patológicos. Normalmente se presenta como una artritis que es aguda y puntual, pero también como una artritis crónica de una o varias articulaciones. Este cuadro clínico se basa en un exceso de ácido úrico, que se expresa en parte por una hiperuricemia (valores de ácido úrico en suero mayor de 7,0 mg/dL (Khanna D et al., 2012).
 - Accidente isquémico transitorio (AIT): el AIT es un episodio transitorio y focal de disfunción neurológica causado por isquemia cerebral, retiniana o de la médula espinal, sin evidencia de infarto agudo en las técnicas de neuroimagen, preferentemente RMN cerebral (Easton JD et al., 2009).
 - Cataratas: Se aceptará para el diagnóstico la hoja o informe de intervención quirúrgica.

- Tromboembolismo venoso (TEV): los TEV indicados deben satisfacer los criterios de diagnóstico estándar para la trombosis venosa o el (Trombo) Embolismo Pulmonar (EP). El diagnóstico debe confirmarse mediante técnicas objetivas de imagen.
- Cirugía por obesidad.

A partir de la situación excepcional vivida por la pandemia generado por el virus COVID-19 (SARS-COV-2) en el año 2020, momento en el que coincidía con las visitas de seguimiento 6, 5 y 4 años, se incluyó la confirmación de infección por este patógeno como evento, ya que condicionaba en gran forma la dieta y el estilo de vida, así como el estado de ánimo y otras variables asociadas al estado de salud. Por este motivo se procedió a generar un subproyecto, en el cual se recogía información sobre la relación con la situación vivida con el confinamiento y como éste podía afectar al programa de intervención multimodal protocolado en el estudio PREDIMED-Plus. El diagnóstico por COVID-19 se declaraba como evento cuando se presenta la confirmación de infección por COVID-19 mediante PCR SARS-Cov-2 positiva (infección aguda) o Ag SARS-Cov-2 (infección aguda) o Ac SARS-Cov-2, totales o IgG (infección pasada).

En la realización de esta Tesis doctoral se han incluido de manera general el número de eventos declarados y que fueron verificados por el Comité Clínico de Adjudicación de Eventos de los participantes correspondientes al nodo de Valencia, Universitat de València, hasta el año 2020 sin indicar en ningún momento a que grupo pertenecen ni realizar ningún análisis de variables relacionadas con eventos.

3.1.8.3 Marcadores intermedios

Los marcadores intermedios de este estudio se han medido a través de distintos tipos de cuestionarios estandarizados y adaptados a población española: los cambios en la ingesta de nutrientes y el patrón alimentario han sido determinados a partir de los 17 ítems de puntuación de adherencia a una dieta mediterránea hipocalórica (grupo de intervención intensiva) y por cambios en los alimentos e ingesta de nutrientes derivados del cuestionario de frecuencia de alimentos durante el seguimiento. Los cambios en la presión arterial sistólica y diastólica, las concentraciones séricas de lípidos, glucosa en ayunas, pruebas de función renal, ácido úrico, hemoglobina A1c, proteína C reactiva y las pruebas de función hepática han sido evaluadas anualmente durante el período de inicio y de

intervención. También se evaluaron anualmente la proporción de participantes en cada grupo que requerían medicación antihipertensiva o antidiabética, o hipolipemiantes, los resultados del ECG, la función cognitiva, la calidad de vida y las puntuaciones en las escalas psicológicas y neuropsicológicas. Se han obtenido y almacenado muestras de plasma, suero, *buffy coat* y orina.

Del mismo modo que se realizaron las respectivas determinaciones en laboratorio de polimorfismos genéticos de genoma completo, posibles modificaciones epigenéticas y valores de metabolitos, análisis transcriptómicos. Así como pruebas de percepción y preferencia de sabores y alimentos. Los datos obtenidos fueron analizados pudiendo ver si se establecen relaciones estadísticamente significativas entre la información total recogida de los participantes.

3.2 Realización de tests específicos de percepción de sabores

Estos tests de percepción de sabores no están incluidos en el protocolo general del estudio. Se trata de pruebas específicas a realizar en el nodo de Valencia. A los participantes de este nodo se les ofreció la opción de realizar dichos tests y finalmente fueron completados por unos 385 participantes a nivel basal. Para ello se utilizó una metodología estandarizada para tal fin previamente utilizada por nuestro grupo en trabajos previos (Barragan R et al, 2018) y adaptada para los participantes PREDIMED-Plus Valencia (Coltell et al, 2019). Las pruebas se realizaron a primera hora en una sala bien acondicionadas en cuanto a temperatura, confort y silencio, permitiendo una buena concentración a la hora de realizar la prueba. En primer lugar, se explicó en qué consisten las pruebas detalladamente a los participantes, para que puedan realizar la valoración del nivel de percepción adecuadamente. Para cada sabor se eligió un compuesto representativo, que se administró en cinco concentraciones. Los participantes se sometían a la degustación de las cinco concentraciones de los cinco sabores clásicos representados: dulce (sacarosa), salado (NaCl), ácido (ácido cítrico), umami (glutamato) y amargo (soluciones PROP y PTC). Dispuestos en Eppendorf pequeños, de un solo uso, para las distintas concentraciones, siendo el blanco o patrón “agua destilada” y en el caso de sabor amargo, la prueba se realiza con papeles impregnados con las distintas concentraciones, en este caso el blanco es papel sin impregnación. Para cada sabor, se utilizaron los siguientes productos (todos de Sigma-Aldrich, Milán, Italia): 6-n-propiltiouracilo (PROP) y feniltiocarbamida (PTC), sacarosa, NaCl, ácido cítrico y sal monopotásica monohidratada (MPG) del ácido L-glutámico, para los sabores amargo (PROP y

PTC), dulce, salado, ácido y umami, respectivamente. Se utilizó agua destilada como disolvente y como blanco o control. Cada sabor se presentaba a los sujetos de forma independiente. Además, se evaluaba la percepción del sabor amargo de los participantes utilizando dos compuestos, PTC y PROP. Tanto PTC como PROP están determinados genéticamente por loci similares, por lo que se utilizaron ambas sustancias para medición del sabor amargo como validación. Las diversas soluciones de diferente concentración fueron preparadas para cada sabor incluyendo el blanco o control. La serie de concentraciones (concentraciones 0, I, II, III, IV y V, respectivamente) utilizadas para cada saborizante se basó en estudios previos (Zhao L et al., 2003; Bufé B et al., 2005; Chen QY et al., 2007; Ramos Da Conceicao Neta ER et al., 2009; Barragán R et al., 2018; Coltell O et al., 2019; Fernández-Carrión R et al., 2021) y fueron los siguientes: para PTC (0,056, 0,18, 0,56, 1,8, 5,6 mM) y para PROP (0,055, 0,17, 0,55, 1,7 y 5,5 mM); para sacarosa (100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM y 400 mM), para NaCl (25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM y 200 mM); para ácido cítrico (1 mM, 5 mM, 10 mM, 17 mM y 34 mM); y para MPG (25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM y 200 mM).

Tanto las tiras de papel para detección del sabor amargo como los Eppendorf pequeños utilizados en las pruebas de los demás sabores son rotulados con símbolos y organizados en gradillas de un orden preestablecido e igual para todos los participantes. Como parte de la estandarización del protocolo de percepción de sabores, antes de comenzar las pruebas de percepción del gusto, los participantes debían enjuagarse la boca varias veces con agua. Posteriormente, todos los participantes recibieron una plantilla en la que debían completar una escala de calificación de la intensidad de la percepción del sabor para cada sabor y concentración. La escala constaba de 6 valores para indicar el nivel de intensidad (de 0 a 5) con el que se percibe el sabor de la prueba, 0 significaba “sin sabor” y 5 “extremadamente fuerte”. Se pidió a cada sujeto que tratara de saborear la solución durante unos segundos o el papel de filtro y, tras escupirlo, calificar el nivel de sabor que se detecta de manera autónoma. Los sujetos calificaron la solución de sabor correspondiente seleccionando en la plantilla y escala la puntuación que más se aproximaba a la magnitud de su sensación. Es importante que la boca se enjuague con agua antes y después de cada prueba de sabor, ya que podría haber interferencias en la detección de los mismos. Por ello, entre cada prueba de sabor había un descanso de 3 a 5 minutos antes de pasar a saborear el siguiente. También existe un orden específico en su realización, empezando por amargo, seguido de dulce, salado, ácido y umami. Se utilizó la misma escala de puntuación para todos los gustos, ya sea para el sabor amargo, en papel de filtro, o para los demás sabores, en solución líquida. Con las puntuaciones de las cualidades gustativas individuales, es posible construir una "puntuación gustativa total" para cada concentración que denominamos “total taste score”, sumando los puntos obtenidos para cada uno de los sabores individuales para cada concentración ensayada.

(concentraciones I a V). El rango de la puntuación de sabor total para cada concentración fue de 0 a 25 puntos, esto se conoce como “variable multisabor”. Esta variable se utiliza como una medida combinada de la percepción global del sabor, como se ha observado en diversos estudios (Barragán R et al., 2018; Coltell O et al., 2019). Aunque hemos determinado distintas concentraciones, la mayoría de los análisis de asociación de esta Tesis los realizaremos con las concentraciones más elevadas, ya que se magnifican más las diferencias (concentración V). Estas concentraciones son: 5,5 mM para PROP; 400 mM para sacarosa; 200 mM para NaCl y MPG; y 34 mM para ácido cítrico.

3.3 Realización de tests específicos de preferencias por sabores y alimentos

Además de las pruebas de percepción de sabores, los participantes debían completar otro cuestionario sobre su experiencia hedónica calificando la preferencia por los diferentes sabores, es decir, puntuar con una escala cuantitativa de 1 a 9 (Me disgusta extremadamente” (valor 1) hasta “Me gusta extremadamente” (valor 9)) cuánto les gustaba cada sabor (Barragán R et al., 2018; Fernández-Carrión R et al., 2021). La escala incluye una categoría neutral “ni me gusta ni me disgusta”, el valor 5. La confiabilidad, validez y capacidad discriminatoria de la escala hedónica de 9 puntos han sido demostradas (Wichchukit S et al., 2015).

La detección y preferencia de sabores es uno de los factores que más importancia adquiere en el éxito de los tratamientos de intervención dietética y estilo de vida. Por tanto, la identificación y análisis de los niveles de percepción en distintas poblaciones y/o con características determinadas, nos permite individualizar y personalizar los tratamientos, aumentando la efectividad y el éxito. Son diversos los estudios que sugieren que una mayor o menor percepción del sabor pueden correlacionarse con patrones de ingesta distintos, que pueden estar asociados a la presencia o predisposición de ciertas patologías o enfermedades (García-Bailo B et al, 2009; Genick UK et al, 2011; Fischer ME et al, 2014; Robino A, 2015; Barragán R et al., 2018; Coltell O et al., 2019). De esta forma, conocer los niveles de percepción y de preferencia de los sabores permite modificar los patrones alimentarios a otros con un perfil de macro y micronutrientes más saludable y adecuado para su seguimiento.

Posteriormente se preguntaba también por preferencias por alimentos. Teniendo en cuenta que se trataba de una población de edad avanzada y que el número de alimentos a valorar era mayor (37 ítems), se diseñó una escala con menor número de puntos (categorías de respuesta) para simplificar el proceso de selección (Aggarwal A et al., 2016). Utilizamos una escala de 4 puntos más simple, adaptando la escala hedónica de 9 puntos de los cuestionarios de asociación de preferencia o gusto de sabores descrita en el punto anterior (Cardello AV et al., 1982). La categoría de punto medio (ni me gusta ni me disgusta) se eliminó para minimizar el sesgo de la posición neutral (Garland R, 1991). Los participantes puntuaron en una escala ascendente de preferencias alimentarias de 1- “desagrado extremo, no gusta nada” a 4- “gusto extremo, gusta muchísimo”. Los alimentos incluidos en el cuestionario de preferencia de alimentos se adaptaron a las características de la población de estudio, siendo los alimentos seleccionados a aparecer en el cuestionario: leche entera, leche semidesnatada, yogur entero, yogur semidesnatado, huevos, carnes rojas, aves, pescado azul, pescado blanco, quesos curados, queso fresco, embutidos, pan, pasta, legumbres, judías verdes, brócoli, alcachofas, naranjas, limones, otras frutas, aceite de oliva, aceite de girasol, otros aceites, mantequilla, margarina, alioli, salazones, picantes, especias, nueces, cereales para el desayuno, dulces y helados, chocolates y azúcar. Los pacientes debían puntuar su preferencia por estos 37 alimentos de 1 a 4 según les gustaban o preferían, aunque por recomendaciones dietéticas reconocieran que trataban de evitar su consumo de manera frecuente.

3.4 Realización de análisis genómicos específicos

En primer lugar, se realizó la extracción de ADN a partir de los leucocitos aislados de sangre periférica. Este ADN tenía que ser de gran calidad y se podía utilizar tanto para los análisis de polimorfismos genéticos como para los análisis de metilación de ADN. El protocolo se realizó en el laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de Valencia, bajo las condiciones óptimas y en salas distintas para impedir la contaminación de las muestras. En primer lugar, se procedió a la extracción de ADN a partir de leucocitos de sangre fresca y posteriormente a la preparación de las muestras para el consecuente genotipado masivo de los polimorfismos de interés a gran escala. La extracción de ADN se realizó mediante metodología automatizada. Se utilizó el robot MagNa Pure Compact Instrument de Roche. Para la determinación y confirmación del nivel de calidad de muestra de ADN se hizo uso del

espectrofotómetro Nanodrop de ThermoFischer®, así como con *PicoGreen* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) siendo imprescindible que las absorbancias (A260/280) se encuentren dentro de los parámetros 1,8-2,0, confirmando la posibilidad de hacer uso de esa muestra de ADN para los futuros análisis de genotipado y epigenoma masivo (GWAS y EWAS).

El resto de instrumentos y aparatos necesarios (centrífugas, estufas, baños, pipetas monocanales y multicanales) fueron los habituales en los laboratorios, haciendo uso de los mismos en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universitat de València.

Para la realización del genotipado masivo se utilizaron los chips de genotipado masivo Infinium OmniExpress-24 versión 1.2 BeadChip (Illumina Inc.) según el protocolo del fabricante con los estándares de calidad establecidos. Este chip es capaz de detectar hasta 713.599 SNPs. La detección de alelos y genotipos se realizaron en el programa de genotipado Genome Studio (Illumina, Inc.). El procesamiento de datos se realizó en el Departamento de Lenguajes y Sistemas de Computación de la Universidad Jaume I mediante el uso de pipelines de análisis estándar implementados en el lenguaje de programación Python con los programas de la librería Numpy combinados con PLINK v1.9 (Purcell S et al., 2007; Chang CC et al., 2015). Se aplicaron controles de calidad de datos y se realizaron estudios de asociación de genoma completo, conocidos como GWAS tal como se describirá en el apartado de análisis estadístico.

3.5 Realización de análisis epigenómicos específicos

Los análisis epigenómicos no involucran cambios en la secuencia del ADN, pero modulan y alteran la expresión génica (figura 3.3) (Corella D et al. 2014). En el estudio del epigenoma debe tenerse en cuenta que, a diferencia del genoma, que es el mismo en todas las células somáticas, el epigenoma es específico de cada tipo de célula y tejido, por lo que es muy importante caracterizar el tejido de origen que se analiza en la muestra (Corella D et al., 2018).

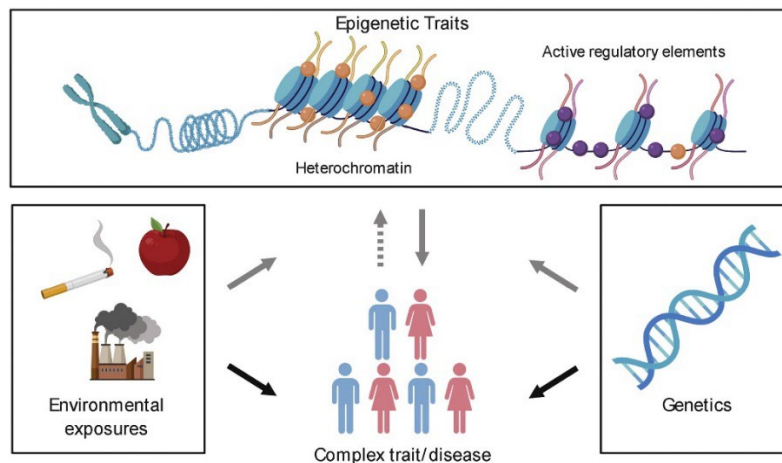


Figura 3.3. Interacción entre factores ambientales y genéticos producen alteraciones epigenéticas que afectan a la cromatina y muestran fenotipos finales y/o alteraciones en el individuo (Corella D et al. 2014)

En esta Tesis hemos incluido análisis de metilación del ADN como principal modificación epigenómica. Para ello hemos utilizado el ADN extraído de leucocitos, con el mismo procedimiento que el descrito anteriormente para los análisis genómicos, pero requiriendo en este caso mayor concentración. Se analizó la metilación de epigenoma completo para la posterior realización de EWAS o de CpGs seleccionados. Para ello, se emplearon los chips de metilación Infinium Human Methylation EPIC BeadChip (850K) (Illumina, San Diego, California) (figura 3.4), que interroga a más de 850,000 sitios CpG para el perfil de metilación del ADN, incluyendo más del 90% de las sondas en la matriz 450K y sitios o islas CpG adicionales (Pidsley R et al., 2016). Las posiciones (pocillos de muestra) de las muestras de ADN se aleatorizaron en los microchips para minimizar los *batch effect* (Zindler T et al., 2020). El procesamiento adicional de las matrices se realizó en el centro de Genómica Humana, Erasmus MC, Rotterdam. La conversión de bisulfito de ADN se realizó utilizando el kit de metilación de ADN Zymo EZ-96 (Zymo Research, Irvine, CA) y las muestras se hibridaron a la matriz Illumina EPIC, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los microarrays se escanearon con un sistema Illumina HiScan y se generaron archivos ".idat" y tras controles de calidad se realizaron los correspondientes análisis de EWAS tal como se describe en los análisis estadísticos.

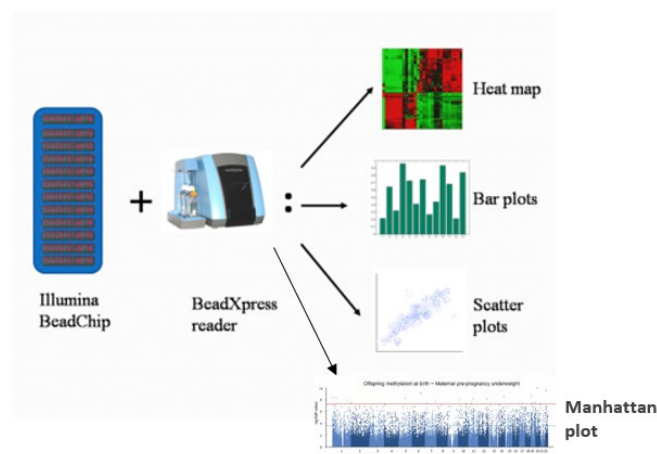


Figura 3.4. Illumina EPIC 850K y su respectivo lector permiten la obtención de resultados, cuyas asociaciones se plasman en distintos tipos de gráficos: Heat-map, Bar-plots, Scatter Plots and Manhattan Plot, correspondiendo con gráficos de variación de temperatura, de barras o columnas, dispersión y Manhattan.

3.6 Análisis específicos de metabolómica y transcriptómica

Dentro de los proyectos específicos del nodo de Valencia hemos realizado la medida del perfil de metabolitos en suero en unos 426 participantes a nivel basal. Para la medida del perfil de metabolitos hemos utilizado la plataforma internacional basada en resonancia magnética nuclear (RMN). Esta plataforma de metabolómica de RMN (figura 3.5) de alto rendimiento (Nightingale Health Ltd., Helsinki, Finlandia) se ha aplicado y validado en numerosos estudios (Würtz P et al., 2012; Würtz P et al., 2017; Jelenkovic A et al., 2014) y proporciona más de 300 metabolitos. Para esta Tesis nos hemos centrado en las determinaciones de aminoácidos ramificados básicos esenciales (BCAA por sus siglas en inglés *Branched-Chain Amino Acids*), incluyendo valina, leucina e isoleucina (Yamamoto K et al., 2017; Le Couteur DG et al., 2020; Kubacka J et al., 2021). También hemos analizados las concentraciones de un nuevo biomarcador de inflamación denominado GlycA (Lee DH et al., 2016; Mehta NN et al., 2020) y las concentraciones séricas de colinas (Park J et al., 2022; Bekdash RA, 2023). Todos

ellos se incluyen en el perfil de metabolitos que proporciona esta plataforma de metabolómica.

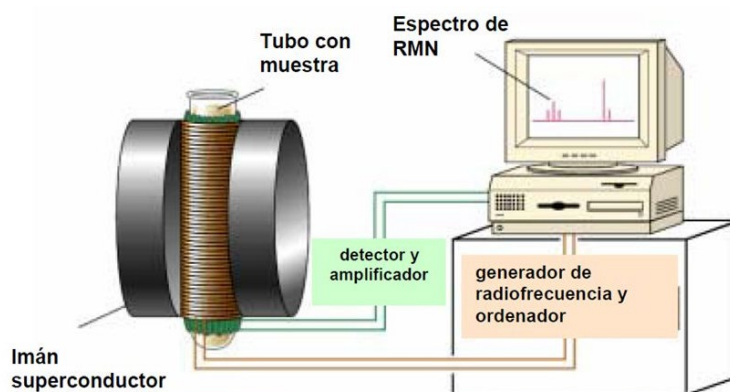


Figura 3.5. Descripción plataforma metabolómica utilizada mediante resonancia magnética nuclear (RMN)

Para los análisis de transcriptómicos se analizó el ARN de las muestras de sangre fresca de los participantes en el estudio. El ARN se ha aislado mediante el kit de purificación del ARN de Promega en el robot de la misma casa comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se ha medido la integridad y calidad del ARN en la facultad de medicina de Valencia a través de la determinación del RIN en un autoanalizador Agilent. Sólo muestras de ARN de gran calidad ($RIN > 8$) se han procesado para los análisis de expresión. Se han realizado dos aproximaciones. La primera es la selección de genes candidatos para el análisis de su expresión. Los genes seleccionados fueron PER1 y CLOCK (ritmo circadiano); CAT y GPX3 (estrés oxidativo); DDIT4 (reparación del ADN) y ARRDC3 (diabetes). Así en un estudio para ver los cambios de expresión a nivel basal y a 6M tras pérdida de peso se seleccionaron 25 participantes en el grupo de intervención y 25 participantes en el grupo control. A todos ellos se les aisló el ARN de leucocitos, se midió la calidad y se determinaron los cambios de expresión en genes seleccionados relacionados con la pérdida de peso, estrés oxidativo y cronobiología a través de sondas TaqMan específicas para la expresión de cada gen. Brevemente, 500 ng de ARN total de todas las muestras se transcribieron inversamente utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystem, Foster City, CA, EE. CA, EEUU). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystem). Los genes se amplificaron usando sondas Taqman disponibles comercialmente (Applied Biosystems). El kit de expresión

génica Taqman se utilizó para el análisis de PCR en tiempo real. Las reacciones de amplificación por duplicado se realizaron en las siguientes condiciones estándar. El nivel relativo de ARNm para cada transcrito se calculó mediante los métodos estándar para la expresión génica y los cambios de expresión se cuantificaron como las diferencias en los $2^{-\Delta Ct}$.

Para los análisis transcriptómicos de transcriptoma completo se utilizaron muestras de ARN seleccionadas de 36 participantes en el grupo de intervención intensiva a tiempo basal y tras el año de intervención. Se utilizó el array de transcriptoma completo Human Gene chip array 2.0 de Affymetrix y se procesaron las muestras en la unidad de análisis genómicos de la facultad de medicina de la Universidad de Valencia por personal especializado. Tras el procesamiento y los respectivos controles de calidad de obtuvieron los datos de expresión de transcriptoma completo que se procesaron estadísticamente con Partek genomic suite y se analizó el *fold change* en cambios de expresión en modelos ajustados por posibles variables de confusión como sexo, edad, diabetes, leucocitos y batch effect. Se anotaron los genes que presentaron diferencias más significativas en los cambios de expresión.

3.7 Análisis estadísticos en el estudio general y en los estudios específicos

Fundamentalmente se han realizado análisis estadísticos en los 465 participantes reclutados en el nodo de Valencia. Además, para algunos resultados, estos participantes se han analizado conjuntamente con participantes de los demás nodos del estudio PREDIMED-Plus y en esos casos se han supervisado los análisis estadísticos realizados para la muestra global en otros nodos. Estos análisis estadísticos han incluido en general modelos de regresión lineal o logística multivariable en función de si la variable dependiente era continua o categórica y un ajuste por variables de confusión. En algún caso se han realizado análisis factoriales y extracción de componentes principales y análisis de clusters, o regresión de Cox. Se han realizado análisis globales o estratificados por distintas variables de interés como sexo, diabetes, u otras variables que se especifican en cada estudio.

Para los análisis estadísticos de los datos de los participantes del nodo de Valencia, en primer realizó un análisis descriptivo comprobando la normalidad de las variables continuas o cuantitativas mediante visualización de gráficos

(distribución de frecuencias, gráficos qq). Cuando la variable no mostraba una distribución normal, se aplicó una transformación logarítmica, como ocurrió con los niveles plasmáticos de triglicéridos u otro tipo de transformación como raíz cuadrada. Se calcularon medias y las desviaciones típicas para las variables cuantitativas. Las variables categóricas se expresaron en porcentaje. Se empleó un test t-Student para comparar las medias de dos grupos independientes, previa determinación de la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene, y el test ANOVA para la comparación de medias brutas de variables continuas. Para la comparación de porcentajes se utilizó un test Chi-Cuadrado (χ^2). En los análisis de los resultados obtenidos en los test de percepción de sabores, los coeficientes de correlación de rango de Spearman se calcularon para estimar la asociación entre la preferencia por el sabor dulce y las preferencias por los otros sabores. También se utilizaron coeficientes de correlación de Spearman para calcular la asociación entre las preferencias gustativas y la percepción gustativa. Así mismo, se utilizaron modelos lineales generales ajustados por posibles factores de confusión para estimar las asociaciones entre las preferencias de sabor y los alimentos azucarados (preferencias e ingesta). Los modelos se ajustaron secuencialmente de la siguiente manera: modelo 1, sin ajustar; modelo 2, ajustado por edad y sexo; modelo 3, ajustado adicionalmente para la diabetes. Se realizó un ajuste adicional por IMC, tabaquismo, actividad física, horas de sueño realizadas por la noche y nivel de adherencia a la dieta mediterránea. Las medias ajustadas para las variables continuas se estimaron a partir de los modelos lineales generales ajustados multivariados. En algunos análisis, las preferencias gustativas o alimentarias se dicotomizaron (dependiendo de la media poblacional) y las asociaciones con las variables correspondientes se estimaron mediante modelos de regresión logística. Los odds ratios (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% para las variables correspondientes se estimaron en modelos de regresión logística. Los modelos de regresión logística también se ajustaron multivariados como se indicó anteriormente para los modelos lineales. Se realizaron análisis para toda la población y se estratificaron por diabetes cuando se conocía esta información. En estas determinaciones también realizamos un análisis factorial con las cinco variables de preferencia gustativa (dulce, amargo, salado, ácido y umami) para identificar la multidimensionalidad latente mediante la identificación de un número potencialmente menor de variables no observadas (latentes) llamadas factores. La idoneidad de este análisis se evaluó con base en el valor de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y la prueba de Bartlett (homogeneidad de varianza). Se utilizó el análisis de componentes principales (ACP) para extraer los factores. Se utilizó el criterio de Kaiser (componentes que tienen valores propios mayores que 1) para seleccionar el número óptimo de componentes en el análisis factorial. Se utilizó la rotación ortogonal (varimax) para aclarar los factores. El método varimax intenta minimizar el número de variables de alta carga en un factor latente (Santos RO et al., 2019). Para cada individuo, se calcularon las puntuaciones de los factores obtenidos y

estas puntuaciones factoriales se utilizaron posteriormente como variables latentes de preferencias gustativas combinadas en los correspondientes análisis de asociación mostrados en los resultados.

En el estudio específico sobre la asociación entre las preferencias gustativas y la preferencia de alimentos dulces o el consumo de alimentos azucarados incluidos en la escala de adherencia a la dieta mediterránea, se utilizó la preferencia por el sabor dulce como variable original (colapsada como dicotómica). Estos análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS Statistics versión 26.0, NY. Todas las pruebas fueron de dos colas y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos para estas asociaciones.

3.7.1 Análisis de GWAS

Tras la lectura de los arrays de genoma completo con Genome Studio (Illumina, Inc.), el procesamiento de datos se realizó en el Departamento de Lenguajes y Sistemas de Computación de la Universidad Jaume I mediante el uso de pipelines de análisis estándar implementados en el lenguaje de programación Python con los programas de la librería Numpy combinados con PLINK v1.9 (Purcell S et al., 2007; Chang CC et al., 2015). A partir del conjunto completo inicial, se filtraron aquellos polimorfismos o SNP que no estaban mapeados en los cromosomas autosómicos. Además, se eliminaron los SNP con una frecuencia alélica menor $< 0,01$ o que se desviaba del equilibrio de Hardy-Weinberg esperado ($p < 1,0 \times 10^{-5}$). Unos 620.000 SNP superaron el filtro de calidad para su posterior análisis (Coltell O et al., 2019). Para identificar los genes más asociados a los fenotipos a estudiar, por ejemplo, preferencia por el sabor dulce (extensible a los demás fenotipos estudiados) realizamos un análisis exploratorio de GWAS utilizando PLINK v1.9. y se consideraron 2 enfoques: un GWAS clásico basado en SNP, así como un nuevo GWAS basado en genes (Watanabe K et al., 2017; Wang L et al., 2020). El GWAS basado en SNP se llevó a cabo para la variable principal de este estudio, que es la preferencia de sabor dulce medida. Esta variable fue considerada en primer lugar como una variable dicotómica para el análisis de asociación GWAS.

También se realizó un análisis exploratorio de la preferencia por el sabor dulce como variable continua, con el único objetivo de comprobar la consistencia de los resultados. En segundo lugar, utilizamos la variable latente para el factor de sabor dulce combinado (como variable continua) obtenido en el PCA para GWAS.

Los alelos para cada SNP se consideraron de acuerdo con un modelo aditivo (0, 1 o 2 copias del alelo variante). Cuando la variable dependiente se consideró continua, se ajustaron modelos lineales generales, tanto ajustados sin ajustar como multivariantes, incluyendo las diferentes variables de confusión (sexo, edad,

diabetes tipo 2, como se indica específicamente en cada modelo). Se estimaron los coeficientes de regresión para el alelo menor. Asimismo, cuando la variable dependiente era dicotómica (mayor o menor preferencia por el sabor dulce) se utilizó el análisis de regresión logística (no ajustado y ajustado por los posibles factores de confusión indicados). Para el GWAS basado en SNP, se utilizó el umbral convencional de $p < 5 \times 10^{-8}$ para la significación estadística de todo el genoma. Del mismo modo, de acuerdo con las reglas GWAS convencionales, los SNP con valores de p por debajo de 1×10^{-5} también se consideraron sugestivos de significación para todo el genoma. A pesar de estas consideraciones generales, como hay muy pocos estudios de GWAS que analicen la preferencia de sabor, algunas tablas muestran SNP con valores de p inferiores a 5×10^{-4} para ayudar a otros autores a comparar sus resultados o a realizar metaanálisis. Aunque todos los participantes eran caucásicos blancos, y no se esperaba ningún sesgo étnico o estratificación de la población, verificando esta influencia potencial calculando el factor de inflación genómica (coeficiente lambda: > 1 indica inflación y < 1 indica deflación). Asimismo, se realizó un ACP utilizando PLINK (Purcell S et al., 2007; Chang CC et al., 2015). Este método utilizó datos de genotipado de todo el genoma para estimar los ejes de componentes principales que se pueden usar como covariables en el análisis de asociación correspondiente. Se calcularon 20 componentes principales utilizando PLINK (Chang CC et al., 2015) y se utilizó la parte superior de estos componentes para ajustar los modelos de asociación.

Se utilizó la biblioteca R qqman R (Barret JC et al., 2005) y Haploview (versión 4.2) (Turner SD, 2014) para crear Manhattan plots y calcular el desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNP de interés. Se realizó una gráfica cuantil-cuantil (qq-plot) comparando los valores p esperados y observados (Barret JC, et al., 2005) en el entorno estadístico R. Además, utilizamos FUMA (Functional Mapping and Annotation of Genome-Wide Association Studies) (Watanabe K et al., 2017) para calcular la estadística lambda para diagramas qq. Se utilizó LocusZoom.js para generar visualizaciones gráficas específicas del locus de la posición de los SNP seleccionados en el GWAS a genes cercanos y puntos calientes de recombinación local (Pruim RJ et al., 2010), así como para indicar el LD.

Además de llevar a cabo varios GWAS basados en SNP, en los que se analizan las asociaciones con SNP individuales, también se realizará un GWAS basado en genes. Este análisis basado en genes considera el efecto agregado de múltiples SNP en una sola prueba en lugar de analizar cada SNP por separado (Watanabe K et al., 2017). Esto parte de los resultados iniciales de asociación de los diferentes SNP con PLINK (estadísticas de resumen) y utiliza FUMA, una plataforma que anota, prioriza, visualiza e interpreta los resultados de GWAS (Szkiba D et al., 2014; Watanabe K et al., 2017; Watanabe K et al., 2019). Esta plataforma utiliza MAGMA (Multi-marker Analysis of GenoMic Annotation), una herramienta rápida y flexible para el análisis de genes y conjuntos de genes de datos de genotipos GWAS (de Leeuw CA et al., 2015). La información de LD se

recuperó del panel europeo 1000 Genomes. La corrección de Bonferroni para el análisis basado en genes se estableció en el nivel de evidencia de significación a nivel de gen de $p < 2,7 \times 10^{-6}$ ($-\log_{10} 2,7 \times 10^{-6} = 5,568$). Del mismo modo, el nivel sugestivo de asociación para el análisis basado en genes se estableció en $p < 1 \times 10^{-4}$ (Chung J et al, 2019). Además, para la variable dicotómica de preferencia de sabor dulce, utilizamos la herramienta FUMA SNP2GENE para la anotación funcional extensa para todos los SNP en genómica. áreas identificadas por SNP principales; y la función FUMA GENE2FUNC para la anotación de genes en contexto biológico (Watanabe K et al., 2017).

3.7.2 Análisis de EWAS

Tras el escaneo de los resultados en el Illumina HiScan se generaron archivos ".idat". Se implementaron procedimientos de control de calidad en las instalaciones de Human Genomics para evaluar la calidad y confiabilidad de los datos de metilación del ADN generados, lo que implica el uso de paquetes Minfi, Meffil y ewas-tools R (Min JL et al., 2018; Murat K et al., 2020; Bhat B et al., 2022). Brevemente, este control de calidad identificó muestras que fallaron o tenían métricas de control subóptimas con respecto a la conversión deficiente de bisulfito, todos los tipos de hibridación deficiente y muestras con una tasa de llamada baja. De los pacientes que aportaron muestra sanguínea, 414 muestras pasaron este control de calidad y fueron analizadas para el EWAS. Además, en este control de calidad previo al procesamiento, un subconjunto de sondas, en estas muestras, se identificaron como subóptimas, y pudo crearse una lista para un filtrado adicional. Se realizaron los controles adicionales de calidad de ADN, así como la normalización de datos y el filtrado con Partek® Genomics Suite® (Ramirez K et al., 2021).

Posteriormente, se filtraron y excluyeron sondas de los cromosomas X e Y, así como sondas de baja calidad y se llevó a cabo la normalización funcional, un método que utilizaba las sondas de control interno presentes en la matriz para inferir entre la variación técnica de la matriz y que extiende la normalización cuantil y supera a otros tipos de normalización utilizados anteriormente (Fortin JP et al., 2014). Además, se aplicaron corrección de colorante y corrección de fondo normal-exponencial fuera de banda (NOOB) (Ross JP et al., 2022). Los valores beta (que van de 0 a 1 y) se obtuvieron como métricas para medir los niveles de metilación y se basan en las intensidades medidas del par de sondas (una sonda metilada y una sonda no metilada) en cada sitio CpG (Du P et al., 2010). Una vez realizados estos pasos, se continuó convirtiendo los valores beta en valores M de la siguiente manera: $\text{valor } M = \log_2 (\text{beta}/(1-\text{beta}))$. La ventaja de los valores M es la

mayor homocedasticidad en comparación con los valores beta (Xie C et al., 2019). Por lo tanto, se siguieron las recomendaciones metodológicas y se emplearon valores M para el análisis estadístico y valores beta para la interpretación biológica directa (correspondientes al porcentaje de un sitio CpG que está metilado) (Du P et al., 2010; Xie C et al., 2019). inicialmente se realizó el EWAS para el fenotipo tabaquismo con cinco niveles (nunca, exfumador >5 años, exfumador entre 5-1 años, exfumador <1 año y fumadores actuales). Para las pruebas estadísticas, se emplearon valores M de todo el genoma para la metilación en los sitios de CpG. Se utilizaron modelos ANCOVA con ajustes de covariables para detectar la metilación diferencial, del mismo modo que se ajustaron varios modelos estadísticos para tener en cuenta las posibles variables de confusión y garantizar la coherencia. Los modelos se ajustaron gradualmente para tener presente otras variables que podían influir de algún modo, como el sexo, la edad, *batch effect*, el IMC, la presencia de diabetes tipo 2 y los recuentos de células medidas directamente (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos después de verificar la multicolinealidad), aumentando la validez de estos resultados (Barton SJ et al., 2019; Kaushal A et al., 2017). Todos estos pasos fueron verificados para proseguir posteriormente con los cálculos de los valores de p y los coeficientes de regresión parcial para cada sitio o isla CpG. El valor de corte p para la significación estadística EWAS se estableció en $p < 9 \times 10^{-8}$ según lo propuesto por Mansell G et al., (Mansell G et al., 2019) cuando se utilizó la matriz de metilación EPIC. $p < 1 \times 10^{-5}$ fue considerado como el nivel sugestivo de significación. Los Manhattan plot del modelo EWAS ajustado presentados en esta Tesis Doctoral se calcularon con el programa R y se representaron. Para el control de calidad, se realizaron gráficos cuantiles-cuantiles (Q-Q) que compararon los valores de p esperados, calculados en el programa estadístico R. Asimismo, se calcularon los valores del factor de inflación genómica (λ) (van Iterson M et al., 2017). Para determinar los resultados de las islas de CpG metilados diferencialmente mejor clasificados, se obtuvieron valores beta y se trazaron contra los cinco niveles para el fenotipo del fumador previamente descritos.

Tras esto, para confirmar la asociación entre el tabaquismo y la metilación, se utilizó la variable “fumador” de 3 categorías (nunca fumadores, grupos de ex fumadores y fumadores actuales) y se compararon los pacientes que respondieron que nunca habían fumado *versus* fumadores actuales y ex fumadores *versus* fumadores actuales, con estas variables, se realizó otro EWAS. En estos resultados de EWAS, nuevamente se utilizaron valores M y se ajustaron modelos ANOVA multivariantes. Los modelos se ajustaron por sexo, edad, *batch effect*, IMC, diabetes tipo 2 y recuento de línea celular blanca. Para cada respuesta de la variable “fumar”, se generaron los valores p ajustados y las diferencias beta. Del mismo modo, se representaron diagramas de Manhattan para los análisis categóricos. Se realizaron también gráficos de Miami plot para la comparación de distintos niveles de adherencia a la dieta mediterránea.

Similar metodología se realizó para las otras variables dependientes estudiadas en las que aplicó la metodología EWAS para la identificación de perfiles de metilación según el entorno rural/urbano y otras variables relacionadas con la diabetes.

Posteriormente, el análisis de las vías y rutas metabólicas se realizó con KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa M et al., 2000) y la descripción del gen y atributos del grupo génico se caracterizaron por medio del proyecto de ontología génica (Gene Ontology, GO) (Yu H et al., 2007).

3.7.3 Análisis de vías y rutas metabólicas de los genes mediante Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

La Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)) es una base de conocimientos para el análisis sistemático de las funciones de los genes en términos de redes de genes y moléculas. El componente principal de KEGG es la base de datos *PATHWAY* que consta de diagramas gráficos de rutas bioquímicas que incluyen la mayoría de las rutas metabólicas y algunas rutas reguladoras bien conocidas. La información de la ruta también está representada por las tablas de grupos de genes que resumen los grupos de genes ortólogos y parálogos entre diferentes organismos. Los genes ortólogos son genes homólogos de especies diferentes que evolucionaron a partir de un ancestro común, mientras que los parálogos son genes resultantes de la duplicación. KEGG mantiene la base de datos *GENES* para los catálogos de genes de todos los organismos con genomas completos y organismos seleccionados con genomas parciales, que se vuelven a anotar continuamente, así como la base de datos *LIGAND* para compuestos químicos y enzimas (Ogata H et al., 1999; Kanehisa M et al., 2000). Recientemente se ha introducido a la base de datos el apéndice que contiene una colección de proteínas individuales cuyas funciones se caracterizan experimentalmente y a partir de las cuales se define un número creciente de KO. Además, las bases de datos de *DISEASES* y *PHARMACS* se han mejorado mediante el análisis sistemático de etiquetas de fármacos para una mejor integración de enfermedades y fármacos con las redes moleculares KEGG. KEGG se está convirtiendo en una base de conocimientos integral tanto para la interpretación funcional como para la aplicación práctica de la información genómica (Kanehisa M et al., 2017).

Cada catálogo de genes está asociado con el mapa gráfico del genoma para ubicaciones cromosómicas que está representado por el subprograma Java. Además de los esfuerzos de recopilación de datos, KEGG desarrolla y proporciona varias herramientas informáticas, como para reconstruir rutas bioquímicas a partir de la

secuencia completa del genoma y para predecir redes reguladoras de genes a partir de los perfiles de expresión génica (figura 3.6). Las bases de datos KEGG crecen y aumentan la información disponible en su enciclopedia exponencialmente y se actualizan diariamente, ya que la cantidad masiva de información obtenida en los estudios que incluyen muestras de gran cantidad de participantes o datos de conjuntos de estos estudios a su vez. Además, pueden descargarse gratuitamente en <http://www.genome.ad.jp/kegg/>, permitiendo su uso y ampliando su catálogo de datos a su vez (Kanehisa M et al., 2000; Ogata H et al., 1999).

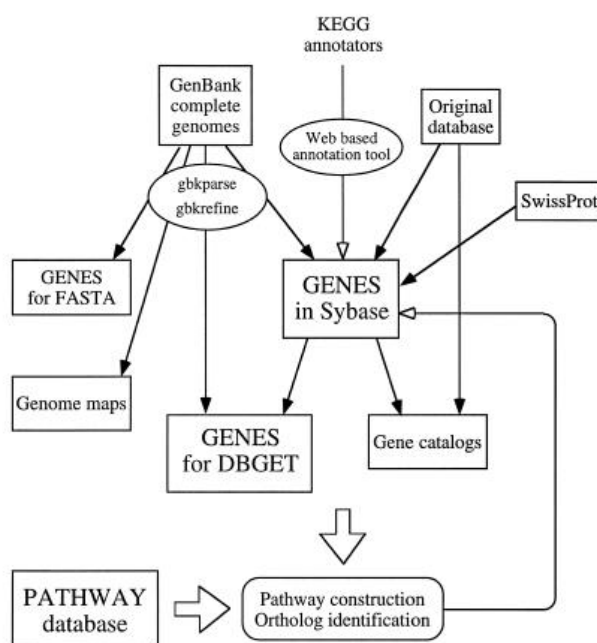


Figura 3.6. Procedimientos utilizados para organizar y anotar la base de datos GENES (Kanehisa M et al., 2000)

3.7.4 Determinación de atributos y descripción de los mediante Gene Ontology (GO)

La identificación de genes esenciales en un organismo dado es importante para la investigación de sus funciones fundamentales en la supervivencia del organismo. Además, si es posible, descubrir los vínculos entre las funciones

centrales o las vías con estos genes esenciales nos ayudará a obtener una visión más profunda de las funciones clave de estos genes. De esta premisa nace Gene Ontology (GO; <http://www.geneontology.org>), un recurso bioinformático basado en la comunidad que proporciona información sobre la función del producto génico utilizando ontologías para representar el conocimiento biológico, de manera estructurada y computable, indicando funciones de los genes y los productos genéticos. Fundada en 1998, GO se ha adoptado ampliamente en las ciencias de la vida y sus contenidos están en constante mejora, tanto en cantidad como en calidad (Gene Ontology Consortium, 2019). Para la distribución de la herramienta, así como para la obtención de conocimiento e integrarlo, se conforma El Gene Ontology Consortium (GOC), cuya función es actualizar y ampliar áreas de la ontología, como términos relacionados con la estructura celular (los cilios), términos del ciclo celular y procesos de organismos multicelulares. También tiene implementado herramientas para generar términos ontológicos basados en un conjunto de reglas lógicas haciendo uso de plantillas, y permitir una mejor comprensión de los datos obtenidos. El GOC tiene su propia página web donde resume los nuevos desarrollos y la documentación, sirviendo como un portal para los datos GO. Los usuarios pueden realizar análisis de enriquecimiento de GO y buscar términos, anotaciones en productos genéticos y metadatos asociados en múltiples especies utilizando el nuevo navegador AmiGO2 (Gene Ontology Consortium 2015, 2019).

3.8 Estudio Eat 2 be Nice (E2bN) – Subproyecto Cognition PREDIMED-Plus

El subproyecto PREDIMED-Plus Cognition se formalizó en el año 2015, siendo cinco los nodos pertinentes al estudio PREDIMED-Plus los que, a su vez, forman parte de este trabajo. Este subproyecto forma parte del proyecto Eat2beNice (E2bN), el proyecto E2bN se corresponde como consorcio basado en colaboraciones de ocho consorcios europeos superpuestos y reconocidos (Horizon2020). El nacimiento de este consorcio pretende que se creen sinergias y equipos multidisciplinares internacionales entre especialistas de distintos campos de la salud, incluyendo biólogos, microbiólogos, neurólogos, dietistas-nutricionistas, psicólogos, psiquiatras, enfermeros, médicos, investigadores. Formando parte de la investigación y difusión de los conocimientos adquiridos, y trabajando con los otros proyectos de Horizon2020. Dentro del marco E2bN y

subproyecto Cognition se realizaron las estancias de mención internacional de esta Tesis, en el centro de investigación Departments of Psychiatry & Human Genetics, Radboud University Medical Centre Nijmegen, The Netherlands bajo la supervisión de Alejandro Arias Vásquez, PhD, Assistant Professor | Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour | Radboud University Medical Centre Nijmegen, IP del estudio E2bN.

La realización de los respectivos análisis de muestra fecal y microbioma se realizaron en este centro de investigación y en la Universidad de Wageningen, The Netherlands.

Con el fin de realizar el aprendizaje in situ y guiado por personal experto del grupo del Dr. Alejandro Arias Vásquez, se concedieron diversas ayudas (Ayuda concedida por Dra. Dolores Corella, Premio Jaume I (2018) y ayuda a la movilidad Ciberobn Instituto Carlos III (2019)) durante la consecución de esta Tesis Doctoral que permitieron que se realizara el período de estancia en el mencionado centro de investigación en Nijmegen, The Netherlands, permitiendo que se obtuvieran los suficientes conocimientos sobre la metodología básica y técnicas de análisis relacionadas en el estudio del efecto del microbioma intestinal en el comportamiento, tanto en estudios en humanos como en animales. Además, la realización de esta estancia permitió conocer las particularidades de la aplicación del análisis del efecto del microbioma en el marco del proyecto Eat2beNICE y aprender la metodología para asistir a los participantes en la Facultad de Medicina de Valencia, administrando los cuestionarios correspondientes relacionados con el proyecto y recogiendo las muestras de heces estipuladas para los análisis de microbioma.

Los objetivos del proyecto/consorcio E2bN eran ampliar conocimientos sobre todos aquellos factores que influyen en rasgos de impulsividad, de compulsividad, comportamientos antisociales y adicciones. A día de hoy, estas características continúan sin comprenderse bien, pero si bien es cierto, se observa que la dieta, el estilo de vida, el nivel socioeconómico, el sexo y la heredabilidad desempeñan funciones fundamentales en su evolución y desarrollo. Para poder realizar el estudio y relación de estas variables con la aparición o no de rasgos característicos del comportamiento se usan distintos enfoques epidemiológicos en las distintas muestras existentes entre los distintos grupos investigadores participantes y los estudios que se realizan. De esta forma se investigan posibles asociaciones de los componentes de la nutrición y el estilo de vida con la impulsividad/compulsividad, y cómo dichas asociaciones son moderadas por los factores mencionados. También es posible observar el efecto potencial protector de la práctica de ejercicio y actividad física habitualmente, así como el estudio de los efectos del microbioma intestinal y sus metabolitos, la conectividad cerebral y los patrones epigenéticos como mediadores y predictores del cambio de

comportamiento. Conectando todos estos conocimientos a través de una red ampliamente formada y trabajada que permite una comunicación sencilla y rápida.

De esta forma, el subproyecto PREDIMED-Plus Cognition forma parte de los subproyectos y proyectos mismos que forman parte del consorcio E2bN.

Los pacientes participantes en el subproyecto PREDIMED-Plus Cognition son aquellos que fueron reclutados en el último periodo de reclutamiento, siendo el fin en noviembre 2016, nuestro grupo, el nodo de Universitat de València, incluyó 70 participantes que participaban en ambos proyectos.

Los objetivos principales residían en:

- 1) Explorar el perfil psicológico y neurocognitivo de los pacientes obesos y con sobrepeso con síndrome metabólico (características de reclutamiento del estudio PREDIMED-Plus)
- 2) Identificar factores neurocognitivos y psicológicos predictivos de los resultados del tratamiento y la caída del tratamiento de esta muestra específica, después de enfermedades diagnosticadas de esta índole.

Para ello, la metodología planificada consistía en realizar tres sesiones de intervención psicológica (**basal o visita inicial, primer año o primera visita (01) y tercer año o segunda visita (02)**), diseñadas e implantadas para su ejecución similar en los nodos participantes. En el estudio PREDIMED-Plus ya están incluidas en las respectivas visitas protocoladas las medidas de evaluación de referencia para controlar ciertas variables clave en los estudios de intervención de estilo de vida, dieta y conductual (es decir, depresión, deterioro cognitivo, locus de control, comportamiento alimenticio anormal). Por tanto, se realizan medidas específicas de locus de control, comportamiento anormal de la alimentación, sintomatología depresiva y procesos cognitivos específicos en cada una de las sesiones mencionadas. La batería de cuestionarios realizada para cada una de las sesiones programadas es:

a) Memoria de los procesos de atención y evaluación de las funciones ejecutivas:

- Aprendizaje auditivo-verbal de King (RAVLT) (Rey A, 1964)
- Figura compleja de Rey (Rey A, 1941; Osterrieth PA, 1944)
- Prueba de interferencia color-palabra (STROOP) (Golden CJ, 1994)
- Vocabulario (subtest WAIS III) (Wechsler D, 2002)
- Pruebas de rendimiento de Conners (CPT)

b) Deterioro cognitivo:

- Prueba de símbolos de dígitos (SDMT) (Smith A, 1973)
- Evaluación cognitiva de Montreal (MoCA) (Nasreddine ZS et al, 2005)

c) Adopción de decisiones

- Tarea de juego de Iowa (IGT)

d) Medidas autoinformadas psicológicas y de impulsividad:

- Escala de impulsividad (UPPS-P) (Whiteside SP, 2003)
- Escala de adicción a la comida de Yale (Gearhardt A et al., 2009)
- Prueba corta de funcionamiento (FAST) (Rosa AR et al., 2007)
- Cuestionario disejecutivo (DEX) (*Subescala de la Behavioural Assessment of the Dysexecutive Syndrome (BADS)*) (Wilson BA et al., 1996)

3.8.1 Material y métodos de las pruebas específicas del subestudio PREDIMED-Plus Cognition

Las pruebas descritas y test cognitivos se realizaban de manera presencial. Algunas de las pruebas son autoadministradas (cuestionario de impulsividad UPPS-P, la escala de adicción a los alimentos de Yale, la prueba de funcionamiento (FAST) y el cuestionario disejecutivo (DEX), siendo respondidas por el propio paciente en la misma consulta o llevándolo consigo y aportándolo en los días próximos. La otra parte de test son realizados en la consulta con el personal especializado y preparado para realizar dichas pruebas (aprendizaje de RAVLT, figura compleja de Rey, SDMT, STROOP, Subtest-WAIS III y MoCA). Se requiere lápiz y papel, además para la figura compleja de Rey se requieren dos colores adicionales al lápiz. El uso de tres colores distintos permite ver el orden en el que el paciente trata de dibujar esta misma figura, pudiendo interpretar como el sujeto aísla cada parte y las relaciona unas con otras, cómo las ve y las jerarquiza en formas envolventes y/o incluidas en otras formas que soportan o ya las interpreta como formas soportadas (Osterrieth PA, 1944; Rey A, 1964).

Las construcciones incluidas pueden ser:

- a) Construcción sobre el armazón: El sujeto comienza su dibujo por el rectángulo central, sobre el cual agrupa después todos los demás detalles de la figura. El gran rectángulo (y sus diagonales) sirven de referencia y punto de partida.
- b) Detalles englobados en un armazón: El sujeto comienza por uno u otro detalle contiguo al gran rectángulo (por ejemplo, cruz superior izquierda), o traza el rectángulo y luego algún detalle lateral (por ejemplo, cuadrado inferior).

También es tipo II cuando sujeto dibuja primero diagonales, para luego envolver en rectángulo centra (muy poco común).

- c) Contorno general: El sujeto comienza por dibujar el contorno íntegro de la figura, sin diferenciar el rectángulo central. Sujeto obtiene así una especie de contenedor en el que luego coloca todos los detalles internos de la figura.
- d) Yuxtaposición de detalles: El sujeto va construyendo los detalles contiguos unos a otros procediendo como si constituyera un rompecabezas. No hay elemento director de la reproducción. La figura final, con este método, puede ser perfecta.
- e) Detalles sobre un fondo confuso: El sujeto realiza un grafismo poco o nada estructurado, en el que no es posible identificar el modelo, sino que sólo unos detalles.
- f) Reducción a un esquema familiar: El sujeto traslada la figura a un esquema que le es familiar y que recuerda (a veces vagamente), la forma del modelo (casa, barco, pez, monigote, etc.).
- g) Garabatos: El sujeto simplemente hace unos garabatos en los que no es posible reconocer ninguno de los elementos del modelo ni tampoco su forma global.

En la figura compleja de Rey también se observa la capacidad de recuerdo inmediato y recuerdo diferido, permitiendo el cálculo de puntuaciones a partir de una leyenda descrita en el propio cuestionario para el evaluador. Cada línea, figura y/o símbolo que forma parte del conjunto de la figura de Rey (figura 3.7) se puntúa con un máximo de dos puntos si se ha copiado o recordado correctamente, con un punto si es un símbolo parecido o situado en un lugar próximo al correcto y con cero puntos si no se ha recordado nada. Para la evaluación de la memoria inmediata de la figura de Rey, tras la ejecución de la figura la primera vez, en la que el participante se fija y copia dicha figura, se realiza el test de símbolos (SDMT), tras esta prueba, se pide al participante que trate de dibujar la figura de Rey lo más fielmente posible a su recuerdo. Para la memoria diferida, debe haber transcurrido un tiempo de al menos ± 30 min desde la realización de la copia. Después de dibujar la figura de rey de memoria, se pide al participante que continúe las siguientes pruebas de cognición, el test de Stroop, el aprendizaje de RAVLT y MoCA. Tras la realización de estos test en el orden indicado, tratamos que el participante dibuje de nuevo la figura de Rey de memoria, la puntuación de este dibujo será la que se corresponde con la memoria diferida. En los tres momentos en los que se dibuja la figura de Rey se debe anotar el tiempo que requiere el participante para realizarla, así como el tipo de construcción, que puede variar de ser copiado inicialmente a ser

recordado, tanto de manera inmediata como diferida, y se puntúa cada uno de los símbolos, líneas y/o estructuras que se han acertado o son muy parecidos a los del dibujo original. Finalmente se realizará el reconocimiento de las piezas que conforman la figura, de esta manera se evalúan y puntúan los verdaderos y falsos positivos y los verdades y falsos negativos.

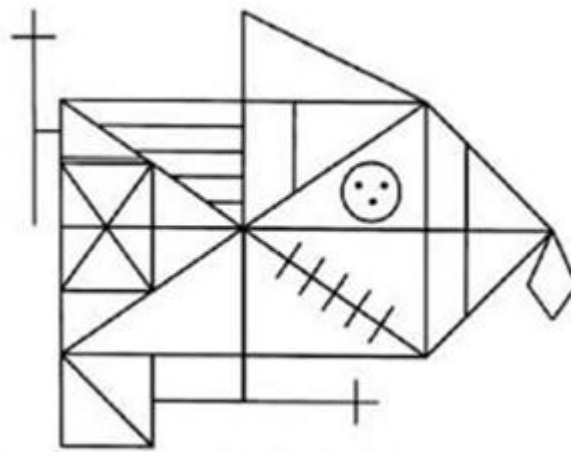


Figura 3.7. Figura de Rey-Osterrieth (Rey A, 1964)

También se requiere un cronómetro para las mediciones de los tiempos de realización de cada una de las pruebas.

3.8.2 Visitas y muestras biológicas

Tras la aceptación de los participantes a participar en el subproyecto, se les citaba para realizar la exploración neuropsicológica inicial, concertando un día lo más próximo posible a la visita basal correspondiente al estudio PREDIMED-Plus. El protocolo debía administrarse siguiendo el orden establecido en el archivo de impresión (Protocolo de Evaluación PREDIMED-Plus Cognición versión A, <https://www.predimedplus.com/acceso-equipo-medico/pruebas-especificas/subproyecto-predimed-plus/>). Finalmente, se recogían los cuestionarios cumplimentados, revisando que no haya quedado ninguna pregunta sin responder y aclarando las posibles dudas que presente el participante.

Como parte de la información que se recogía en el conjunto de estudio E2bN, se incorporó la escala autoreportada de síntomas de TDAH en adultos (ASRS-V1.1.) (American Psychiatric Association, 2020; Schweitzer JB et al., 2001). Este cuestionario se administraba a los 18 meses de la fecha de inclusión en el estudio PREDIMED-Plus. Es un cuestionario sencillo que se responde en 10 minutos por lo que podía incluirse a otra batería de cuestionarios de PREDIMED-Plus que debiera realizarse en la siguiente visita. Así se evitaba una nueva visita extra sólo para la realización de este cuestionario.

Para este estudio se requirió la recogida adicional de heces según el protocolo descrito en (Muralidharan J et al., 2021; Atzeni A et al., 2021). El ADN de las heces es extraído mediante el kit de ADN QIAamp PowerFecal (Qiagen) siguiendo los pasos propios del protocolo del fabricante. La cantidad de ADN se evalúa utilizando Qubit 2.0 Fluorometer-dsDNA (High Sensitivity Kit; Invitrogen). Tras la extracción, el ADN se almacena a -20°C hasta su posterior procesamiento (Muralidharan J et al., 2021). Las muestras se dispusieron en aproximadamente 250 g de alícuotas y se almacenaron a -80°C . A los participantes que usaban antibióticos o pre/probióticos 15 días antes de la recolección de la muestra se les pidió que hicieran la recolección 15 días después de que se suspendiera el uso de los mismos. El tipo de bacterias que conforman el microbioma se miden mediante la determinación de las secuencias del gen ribosómico 16S rRNA que se amplifican a partir del ADN utilizando el kit de metagenómica Ion 16S (Thermo Fisher Scientific, Italia) (Muralidharan J et al., 2021). Posteriormente se utilizan los necesarios packs y programas informáticos diseñados para los datos resultantes de este kit, permitiendo conocer la taxonomía, la distancia filogenética, así como la diversidad alfa o beta de las bacterias, y poder determinar si existen asociaciones entre los patrones alimentarios, estilo de vida, capacidades cognitivas, etc. y las características del microbioma (Conlon MA et al., 2014; Gareau MG 2016; Redondo-Useros N et al., 2020).

3.8.3 Metodología realizada durante el período de estancia

Como parte de la colaboración entre los estudios PREDIMED-Plus y E2bN se apoya la realización de la estancia en el centro de investigación Radboud UMC, Nijmegen, The Netherlands, dentro de esta Tesis Doctoral con mención internacional. Entre el grupo de investigación que lleva a cabo el estudio E2bN y el grupo de Universitat de València se forma a su vez una colaboración, de la cual surge la metodología adicional realizada en el marco formado entre PREDIMED-

Plus Valencia y E2bN, la cual consistía en realizar de manera previa una revisión completa sobre el TDAH (es una de los trastornos o alteraciones cognitivas que más ha investigado este grupo) y las posibles interacciones con la ingesta de determinados nutrientes y si, trastornos como el TDAH en niños, adultos y ancianos, ejercen influencia en otros factores como la obesidad, los niveles de lípidos, la percepción y preferencia de sabores, calidad de vida, si el sueño es reparador y de buena calidad, cronotipo, etc. Además de ello, la metodología implicaba los métodos descritos en anteriores apartados que se combinaban según el objetivo del artículo a realizar.

4

RESULTADOS

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral son fruto de la investigación realizada por la doctoranda dentro del marco del estudio multicéntrico PREDIMED-Plus. Al ser un ensayo de intervención multicéntrico que todavía no ha finalizado, existen limitaciones a la hora de presentar los resultados parciales, tanto los generados en el propio nodo como los globales participando más nodos hasta que no finalice del ensayo clínico. Se realizó una política de publicaciones y de análisis de resultados aprobada por todos los investigadores del estudio multicéntrico que tiene que ser seguida de manera estricta. Aunque la doctoranda ha realizado las tareas de investigación en el marco del estudio de intervención PREDIMED-Plus Valencia desde el inicio del mismo hasta la actualidad (más de 6 años de dedicación investigadora incluyendo el reclutamiento de los participantes, administración de cuestionarios, realización de mediciones antropométricas y de otro tipo, procesado de muestras biológicas, realización de las intervenciones de dieta y actividad física, seguimiento anual de los participantes y obtención de los datos y mediciones correspondientes, existen limitaciones en la política general de generación de resultados, por lo que a pesar de haber generado muchos datos, no es pertinente su análisis a nivel de nodo, ya que los tamaños de muestra se calcularon para el estudio multicéntrico a nivel global. En base a ello, presentaremos a nivel de nodo los resultados de proyectos específicos para los que contamos con autorización del Comité de Dirección, mientras que otros resultados que tienen que ser integrados con los de los demás nodos para obtener resultados globales, se presentarán de manera conjunta con otros nodos. Fundamentalmente se presentarán resultados con los 23 nodos, o en el caso de tratarse de proyectos específicos multicéntricos con menos nodos, se presentarán los resultados solamente con los nodos que forman parte del proyecto específico. En todos los resultados presentados en los que se integran los datos del nodo de Valencia junto con los demás nodos, se trata de estudios ya publicados en los que la doctoranda ha participado como autora colaborando en todas las etapas de la elaboración del artículo correspondiente al que se hace referencia.

En cuanto a la temporalidad, no existe restricción temporal en la presentación de datos basales. Sin embargo, para el seguimiento y para el análisis del efecto de las intervenciones, se han restringido los análisis a los dos primeros años, ya que la publicación de más tiempo de seguimiento ha sido desaconsejada por el Comité Científico Externo del estudio PREDIMED-Plus al suponer un fraccionamiento de los resultados de los artículos finales con todo el período de 6-8 años completo. Además, a pesar de que se permite la publicación de análisis con hasta 2 años de seguimiento, se aconseja analizar conjuntamente los grupos de intervención intensiva y control al incluir ambos intervención con dieta mediterránea y no anticipar así resultados finales. Sólo en casos especiales como el estudio piloto y otros estudios de monitoreo se ha permitido analizar claramente las intervenciones de manera comparativa sobre parámetros antropométricos, y fenotipos intermedios de glucemia, lípidos, marcadores de inflamación y de cumplimiento de día. Excepcionalmente y para proyecto específicos con necesidad de presentar resultados dentro de los planes de trabajo establecidos por las respectivas convocatorias, se han permitido análisis a 3 y 4 años, tal como se mencionará posteriormente.

Los proyectos específicos del nodo de Valencia, para los cuales se van a presentar con más detalle los resultados basales, contando con autorización, son los proyectos focalizados en la medida de la percepción del sabor y preferencias por sabores, así como los proyectos basados en análisis ómicos (genómicos, epigenómicos, metabolómicos y transcriptómicos) en los participantes del nodo de Valencia. Adicionalmente, nuestro nodo en Valencia administró cuestionarios de hábitos del sueño y calidad del mismo, junto a la determinación del tipo de cronotipo, así como de trazos de personalidad, y cuestionarios de felicidad, para los que también hemos realizado análisis en esta Tesis. Aunque la doctoranda, junto con el médico coordinador de la declaración de eventos, ha participado durante más de 6 años en la detección y declaración de eventos. Esta información sobre los fenotipos finales del estudio se presentará de manera global por año de seguimiento en nuestro nodo sin desglosar por tipo de evento ni presentar análisis estadísticos de los factores con los que se asocian, al no disponer de autorización de acuerdo con la política del estudio, hasta no finalizar el mismo.

4.1. Características sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas, clínicas, adherencia a la dieta mediterránea, consumo de alimentos y actividad física en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia y el multicéntrico PREDIMED-Plus a nivel basal

Las características principales que debían cumplir los participantes reclutados en el estudio PREDIMED-Plus eran: edades superiores a los 55 años en el caso de hombres y 65 años en el caso de mujeres. El límite de la edad de participación estaba en 75 años. Los participantes candidatos debían presentar al menos tres de las características que definen el síndrome metabólico (hiperglucemia (superiores a 100mg/dL), hipertensión (>135/85mmHg), dislipemias (c-HDL <40mg/dL en hombres y <50mg/dL en mujeres), hipertrigliceridemia (>150mg/dl triglicéridos), obesidad abdominal (>108cm contorno cintura de hombres y >88cm en mujeres), así como era imprescindible que tuvieran un IMC superior a 27,0 kg/m². Todos los participantes reclutados en cada nodo cumplían estas características, ya que sin estos criterios no era posible su inclusión en el estudio.

4.1.1 Características basales de los participantes PREDIMED-Plus en el nodo de Valencia

En el nodo de Valencia se reclutaron inicialmente 649 participantes, de los cuales 465 fueron los que cumplieron todos los criterios de inclusión y finalmente fueron aleatorizados para el ensayo de intervención. Estas 465 personas, tras firmar los consentimientos informados, fueron aleatorizadas en sus respectivos grupos: grupo intervención intensiva con dieta mediterránea restringida en energía más actividad física y el denominado grupo control (intervención no intensiva con dieta mediterránea dentro del “usual care”), siendo estas 465 personas el tamaño de muestra de participantes aleatorizados que se han incluido y seguido en el estudio PREDIMED-Plus Valencia. De ellos 239 (51,4%) personas fueron aleatorizadas al grupo de intervención intensiva y 226 (48,6%) personas fueron aleatorizadas al grupo denominado control. Estos participantes no difieren basalmente en las principales variables analizadas a nivel basal.

En la Tabla 4.1 se presentan las características sociodemográficas, antropométricas,

bioquímicas, de adherencia a la dieta mediterránea y de actividad física de los 465 participantes en el nodo de Valencia de manera general y por sexo.

Tabla 4.1. Descripción de características demográficas, clínicas, estilo de vida y genéticas, basales, según el sexo en participantes PREDIMED-Plus reclutados en el nodo de Valencia

	Muestra total	Hombres	Mujeres	
Variable	(n=465)	(n=198)	(n=267)	
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	<i>p</i> *
Edad (años)	65,24 $\pm$ 4,83	63,95 $\pm$ 5,34	66,19 $\pm$ 4,17	<0,001
Peso (kg)	84,03 $\pm$ 13,57	92,40 $\pm$ 13,13	77,82 $\pm$ 10,12	<0,001
Cintura (cm)	105,68 $\pm$ 10,00	110,91 $\pm$ 8,72	101,80 $\pm$ 9,10	<0,001
IMC (kg/m ²)	32,28 $\pm$ 3,60	32,20 $\pm$ 3,45	32,35 $\pm$ 3,71	0,651
PAS (mmHg)	141,75 $\pm$ 18,30	144,22 $\pm$ 18,20	139,93 $\pm$ 18,20	0,012
PAD (mmHg)	80,91 $\pm$ 9,80	82,66 $\pm$ 10,12	79,61 $\pm$ 9,37	0,001
ADM 14 ptos	8,12 $\pm$ 1,77	8,22 $\pm$ 1,99	8,05 $\pm$ 1,60	0,472
ADM 17 ptos	8,03 $\pm$ 2,76	7,85 $\pm$ 2,81	8,16 $\pm$ 2,71	0,222
Actividad física total (METs)	1676,25 $\pm$ 1521,41	1918,54 $\pm$ 1764,11	1496,58 $\pm$ 1287,15	0,003
Glucosa (mg/dl)	113,03 $\pm$ 27,36	113,83 $\pm$ 28,76	112,43 $\pm$ 26,30	0,584
CT (mg/dl)	196,61 $\pm$ 37,83	188,25 $\pm$ 38,75	202,82 $\pm$ 35,97	<0,001
c-LDL (mg/dl)	124,71 $\pm$ 31,07	121,61 $\pm$ 32,38	127,02 $\pm$ 29,91	0,064
c-HDL (mg/dl)	51,66 $\pm$ 11,46	47,20 $\pm$ 10,58	54,98 $\pm$ 10,98	<0,001
triglicéridos (mg/dl)	141,72 $\pm$ 61,08	139,37 $\pm$ 55,71	143,47 $\pm$ 64,85	0,475

MET: equivalente metabólico. 1 MET es equivalente a kcal x kg⁻¹ x h⁻¹, el gasto de oxígeno se media como 3,5 mL/kg/min. *p: Valor P en la comparación de variables por sexo. Se empleó una prueba T-student. Valor calculado para el logaritmo de la concentración de TG; DE: Desviación estándar; IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; ADM 14 ptos: Media de la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos; ADM 17 ptos: Media de la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 17 puntos; MET: equivalente metabólico. 1 MET es equivalente a kcal x kg⁻¹ x h⁻¹, el gasto de oxígeno se media como 3,5 mL/kg/min; CT: Colesterol total; c-LDL: Colesterol LDL; c-HDL: Colesterol HDL; TG: Triglicéridos; E: Media de kilocalorías consumidas en un día.**

Respecto al sexo, se han reclutado 46,0% hombres y 54,0% mujeres, con una media de edad de 65 $\pm$ 5 años. La media del perímetro de la cintura para ambos

sexos fue de $106,1 \pm 0,5$ cm ($111,2 \pm 0,6$ cm en hombres y $102,0 \pm 0,6$ cm en mujeres).

La mayoría de los participantes fueron reclutados en la ciudad de Valencia y municipios próximos a la ciudad. Aunque una pequeña parte de estos participantes también pertenecían a municipios de la provincia Castellón.

En la tabla 4.2 se muestra las prevalencias de variables cualitativas a nivel basal según sexo en los 465 participantes en el estudio PREDIMED-Plus Valencia.

Tabla 4.2. Prevalencia de consumo de tabaco, otras variables del estilo de vida, nivel de estudios y variables clínicas en los participantes en el estudio PREDIMED-Plus valencia

	Total (n= 465) (%)	Hombres (n=198) (%)	Mujeres (n=267) (%)	<i>p</i>[*]
Tabaquismo				
Fumadores	10,5	15,2	7,1	<0,001
Exfumador 0-1 año	3,2	6,1	1,1	<0,001
Exfumador 1-5 años	5,4	8,1	3,4	<0,001
Exfumador >5 años	32,5	53	17,2	<0,001
Nunca fumador	48,4	17,7	71,2	<0,001
Fenotipos de Síndrome metabólico				
Prevalencia de Diabetes	38,1	38,9	37,5	0,753
Tratados con antihipertensivos	78,9	79,3	78,7	0,847
Tratados con hipolipemiantes	65,2	65,7	64,8	0,741
Nivel de escolaridad				
Titulado superior o similares	10,3	13,6	7,9	<0,001
Técnico escuela universitaria	7,3	8,6	6,4	<0,001
Escuela secundaria o bachiller	20,4	28,8	14,2	<0,001
Escuela primaria	61,9	49	71,5	<0,001

p^{*}: Valor P en la comparación de variables por sexo. Se empleó una prueba T-student.

En la tabla 4.3 se presentan las principales variables de consumo de alimentos, nutrientes y aporte de energía a nivel basal según sexo. Para la obtención de estos valores se incluyeron los datos de 463 participantes de los 465 reclutados en el nodo de Valencia, ya que dos participantes, un hombre y una mujer, fueron excluidos por tener un aporte de energía implausible (muy alto superior a 7000 kcal/día).

Tabla 4.3. Valores medios de consumo de energía, macro y micronutrientes y grupos de alimentos en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia

	Total (n= 463) (Media ± DE)	Hombres (n=197) (Media ± DE)	Mujeres (n=266) (Media ± DE)	p*
Energía total (kcal/día)	2376,5 ± 506,9	2537,1 ± 545,3	2257,5 ± 441,1	<0,001
Hidratos de Carbono (%)	43,7 ± 5,8	43,3 ± 5,7	44,0 ± 5,9	0,214
Proteínas (%)	18,1 ± 2,5	17,3 ± 2,3	18,7 ± 2,5	<0,001
Grasas (%)	36,0 ± 5,1	35,7 ± 5,0	36,2 ± 5,2	0,293
AGM (%)	17,9 ± 3,8	17,8 ± 3,8	18,0 ± 3,7	0,469
AGP (%)	6,2 ± 1,9	6,2 ± 1,8	6,2 ± 1,9	0,892
AGS (%)	9,4 ± 1,7	9,3 ± 1,7	9,5 ± 1,7	0,312
Verdura (g/día)	405,2 ± 141,4	386,3 ± 132,5	419,2 ± 146,4	0,013
Fruta (g/día)	389,1 ± 186,6	376,6 ± 191,2	398,4 ± 183,0	0,216
Legumbres (g/día)	19,9 ± 10,9	21,1 ± 12,8	19,0 ± 9,2	0,040
Cereales (g/día)	169,9 ± 73,8	184,6 ± 80,0	159,0 ± 66,9	<0,001
Lácteos (g/día)	373,9 ± 210,2	342,8 ± 198,6	396,9 ± 215,9	0,006
Cárnicos (g/día)	164,6 ± 60,8	169,5 ± 59,9	161,0 ± 61,3	0,136
Aceite de oliva (g/día)	29,8 ± 11,6	29,7 ± 12,4	29,8 ± 11,0	0,979
Pescados (g/día)	108,6 ± 44,5	109,8 ± 45,8	107,7 ± 43,7	0,611
Frutos secos (g/día)	17,3 ± 21,2	18,7 ± 21,1	16,3 ± 21,2	0,235
Galletas (g/día)	29,6 ± 27,7	32,2 ± 31,4	27,7 ± 24,5	0,084
Alcohol (g/día)	7,8 ± 11,7	13,7 ± 14,0	3,5 ± 6,9	<0,001
Fibra (g/día)	28,6 ± 8,7	27,9 ± 8,2	29,1 ± 9,0	0,142

p*: Valor P en la comparación de variables por sexo. Se empleó una prueba ANOVA.

En esta tabla se detallan los valores medios de ingesta energética a modo de calorías por día, el porcentaje de macronutrientes de hidratos de carbono, proteínas y grasas, de las cuales se especifica el tipo de grasa a partir de los enlaces de sus moléculas (monoinsaturados, poliinsaturados, saturados). Y los valores medios de grupo de alimento consumido. Todos los valores medios indican su desviación estándar. El consumo de calorías diarias, así como la ingesta de proteínas, el consumo de verduras, legumbres, cereales, lácteos, galletas y alcohol fueron estadísticamente significativos según el sexo de los participantes. Los participantes mostraron diferencias estadísticamente significativas según sexo en ingesta de energía total (medida en kcal/día) ($p<0,001$), proteínas (%/día) ($p<0,001$), verdura ($p=0,013$), legumbres ($p=0,040$), cereales ($p<0,001$), lácteos ($p=0,006$), galletas ($p=0,084$) y alcohol (g/día) ($p<0,001$).

Desde el momento basal, cada participante ha realizado las visitas de seguimiento a los 6 meses y anualmente hasta los 6 años de intervención activa. Tras los 6 años, el protocolo del estudio incluye dos años de seguimiento sin intervención. En la actualidad todos los participantes del nodo de Valencia han

finalizado los 6 años de intervención y nos encontramos realizando los seguimientos de 7 y 8 años. El estudio finalizará en diciembre de 2024. De los 465 pacientes aleatorizados, únicamente 3 de ellos han sido localizables (0,64%) y no se ha podido completar su seguimiento, ya que además de cambiar de datos de contacto, han cambiado de provincia de residencia. El resto de los participantes se ha podido intervenir y seguir con los distintos tipos de alternativas que ha proporcionado el protocolo del estudio para casos especiales en cada visita. Se han priorizado siempre las visitas presenciales, pero si no se podía acudir presencialmente, un porcentaje pequeño de las visitas se han realizado telefónicamente.

La mayoría de los cuestionarios y mediciones se realizaban en cada visita, sin embargo, algunos de ellos se administraban en años alternos. Igualmente, las muestras biológicas se recogían basalmente, a los 6 meses, al año y cada año impar. De ellas se realizaban alícuotas y se almacenaban a -80 grados hasta las mediciones oportunas. También se han recogido heces en una submuestra para los proyectos específicos basados en la composición de la microbiota intestinal.

4.1.2 Descripción de los participantes del estudio PREDIMED-Plus multicéntrico

Gracias al reclutamiento realizado en cada uno de los 23 nodos participantes en el estudio multicéntrico PREDIMED-Plus, se consiguió reunir una gran cohorte de 6874 participantes (edad media $65,0 \pm 4,9$, rango: 55–75 años en hombres y 60–75 años en mujeres) con sobrepeso u obesidad (índice de masa corporal de 27 a 40 kg/m^2), considerados participantes con síndrome metabólico. Nuestro grupo ha contribuido con 465 participantes al número total, siendo el segundo nodo de España que más participantes ha aleatorizado. En la tabla 4.4 se describen las principales características de los participantes en el estudio PREDIMED-Plus, entre los que se incluyen los del nodo de Valencia.

**Tabla 4.4. Descripción de las características basales de los participantes
PREDIMED-Plus por grupo aleatorizado, intervención o control**

Characteristics at baseline	Control	Intervention	P-value
N	3468	3406	–
Subjects individually randomized	3052	3014	–
Subjects randomized in couples	416	392	–
Age (mean years, SD)	65.0 (4.9)	64.9 (4.9)	0.337
Female sex (%)	48.6	48.4	0.830
Baseline weight (mean kg, SD)	86.5 (13.0)	86.7 (13.0)	0.465
Baseline waist (mean cm, SD)	107.6 (9.7)	107.6 (9.6)	0.851
Waist-to-height ratio (mean, SD)	66.5 (5.5)	66.3 (5.5)	0.300
Baseline body-mass index (kg/m ² ; mean, SD)	32.6 (3.5)	32.6 (3.4)	0.848
Obesity (%)	73.4	73.7	0.793
Smoking			0.004
Current smoker (%)	11.5	13.5	
Former smoker (%)	52.4	47.6	
Self-reported diabetes at baseline (%)	26.6	27.8	0.280
Family history of premature CHD (%)	17.4	16.1	0.132
High blood cholesterol (%)	68.5	70.1	0.130
Total cholesterol (mean mg/dl, SD)	197.6 (40.3)	196.9 (37.6)	0.521
LDL cholesterol (mean mg/dl, SD)	121.4 (40.9)	121.8 (43.6)	0.719
HDL cholesterol (mean mg/dl, SD)	48.2 (11.7)	47.9 (11.9)	0.272
Triglycerides (mean mg/dl, SD)	153.4 (79.0)	151.4 (76.9)	0.306
Glucose (mean mg/dl, SD)	113.7 (30.1)	113.2 (28.2)	0.524
Systolic blood pressure (mean mmHg, SD)	139.4 (16.7)	139.6 (17.2)	0.701
Diastolic blood pressure (mean mmHg, SD)	80.8 (9.9)	80.9 (10.0)	0.609
Hypertension (%)	82.7	83.5	0.393
Physical activity (METs/min-week; mean, SD)	2705 (2430)	2485 (2234)	<0.001
Chair test (#/30 sec; mean, SD)	13.2 (5.5)	13.3 (5.0)	0.393
Adherence to the erMedDiet (mean, SD)	8.5 (2.7)	8.4 (2.6)	0.109
Adherence to the MedDiet (mean, SD)	7.4 (1.9)	7.4 (1.9)	0.212
Total energy intake (kcal/d; mean, SD)	2417 (626)	2393 (603)	0.108
Fat intake (%E; mean, SD)	39.5 (6.5)	39.4 (6.6)	0.311
Carbohydrate intake (%E; mean, SD)	40.8 (6.9)	41.1 (6.8)	0.147
Protein intake (%E; mean, SD)	16.6 (2.8)	16.5 (2.8)	0.648
Alcohol intake (mean g/d, SD)	11.4 (15.5)	10.9 (15.2)	0.206
Dietary fibre intake (mean g/d, SD)	26.2 (9.0)	26.3 (9.2)	0.665
Primary education (%)	49.3	46.7	0.029
Non-European origin (%)	2.7	2.3	0.340
Willingness to change diet (mean, SD)	2.7 (0.5)	2.7 (0.5)	0.958
Married (%)	77.0	75.3	0.108
Living alone (%)	11.9	13.1	0.137
Retired (%)	56.4	54.9	0.203
Self-reported previous depression (%)	21.4	20.1	0.186
Previous weight-loss dieting (%)	43.0	42.6	0.743

CHD: enfermedad coronaria, d: día, DietMedER: Dieta Mediterránea con restricción de energía, DietMed: Dieta Mediterránea basada en cuestionario 14p, E: ingesta energética, LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad. (Martínez-González MA et al., 2019).

4.2 Asociaciones entre variables de estilo de vida y fenotipos intermedios en el estudio PREDIMED-Plus-Valencia

A lo largo de los años en los que se ha realizado el trabajo de investigación de esta Tesis Doctoral, se ha obtenido información sobre variables de estilo de vida, de consumo de alimentos, percepción y preferencia de alimentos y sabores, cronotipo y calidad del sueño, cognitivas, psicológicas-conductuales, clínicas, antropométricas, socioeconómicas, bioquímicas, y a nivel biomolecular, genéticas, epigenéticas y metabolómicas, de los participantes en el estudio PREDIMED-Plus Valencia que han sido presentadas por la doctoranda en distintos congresos y reuniones científicas. Entre ellos queremos mencionar los siguientes:

4.2.1 Patrón alimentario, nivel de estudios, sexo y consumo de alimentos

En los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia se detectó que el consumo de alimentos integrales se veía vinculado al nivel de estudios, pero más específicamente en el sexo masculino. Aunque esta diferencia entre sexos podía deberse al mayor porcentaje de mujeres con nivel de educación primaria que hombres (71,5% y 49,0%, respectivamente). En los hombres, el nivel universitario superior se asociaba al mayor consumo de alimentos integrales (5 o más veces por semana) en comparación con el nivel primario (40,7% y 14,4% respectivamente, $p=0,027$). En las mujeres, dicha asociación no se observó claramente e incluso se sugirió un consumo menor en el nivel educativo más alto. En cuanto al consumo de verduras y vegetales, no hubo diferencias en el índice de masa corporal (IMC) entre hombres y mujeres ($p=0,850$). La media de los 465 participantes (198 hombres) para el IMC fue de $32,5\pm 3,5$ kg/m². La ingesta total de energía fue mayor en hombres (2571 ± 646 kcal/d) que en mujeres (2289 ± 559 kcal/d). Después de ajustar por ingesta total de energía y edad, observamos que las mujeres tenían una ingesta total de verdura estadísticamente superior que los hombres (421 ± 8 g/d vs 384 ± 10 g/d; $p=0,007$) (figura 4.1 parte A). Y cuando estudiábamos alimentos específicamente, observamos que las mujeres consumieron significativamente más cantidad del grupo de lechugas, endivias y escarolas ($p=0,040$); de zanahorias y calabaza ($p=0,018$); y de patatas asadas ($p=0,017$) (figura 4.1, parte B). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en el consumo ajustado: acelgas y espinacas; brócoli y coliflor; tomates; judías verdes; calabacín,

zanahoria y pepinos; pimientos, espárragos; cebollas; ajos; setas y champiñones. Estos resultados fueron presentados en el congreso de Sociedad Española de Arteriosclerosis en 2018 (SEA).

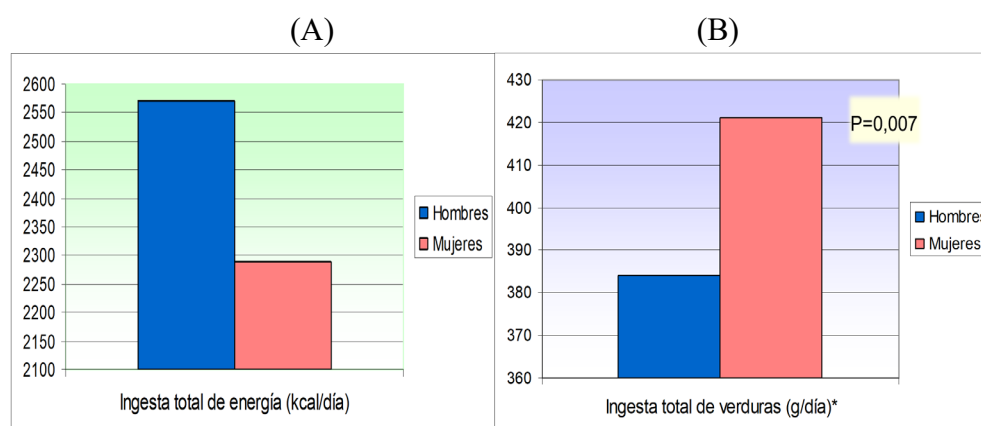


Figura 4.1. Gráficas representativas de los niveles de calorías ingeridas diferenciando por sexo en panel A, y de los gramos consumidos de verdura diariamente por sexo en panel B con $p\text{-valor} < 0,05$

Para el consumo de frutas también se midieron si existía diferencia estadísticamente significativa entre sexos. Estos resultados se presentaron en el congreso nacional 40° SEMERGEN, celebrado en Palma de Mallorca en 2018. Tras ajustar por la edad y el consumo total de energía, observamos que las mujeres tenían una ingesta total de fruta estadísticamente más alta que los hombres ($p=0,041$). Analizando los alimentos de manera específica, tal como se realizó con las verduras, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo ajustado de fresas ($p=0,004$), cerezas ($p=0,017$), sandía ($p=0,016$) y kiwis ($p=0,001$) que fue mayor en las mujeres, y el consumo de uvas ($p=0,033$) fue mayor en hombres.

4.2.2 Influencia en rasgos cognitivos y depresivos. Horarios y cronotipos

A su vez, algunas cualidades del comportamiento, así como rasgos de personalidad y funciones cognitivas se estudiaron a lo largo de los años. La depresión y tristeza fueron algunos de los sentimientos evaluados desde el inicio del estudio.

4.2.2.1 Dieta mediterránea, cronotipo y depresión

En el congreso CIBER en 2019 se presentaron resultados obtenidos en este tipo de cuestionarios y el nivel de adherencia a la dieta mediterránea. La adherencia a dieta mediterránea fue evaluada por el cuestionario de evaluación de la adherencia de 17 ítems, también se evaluaron los síntomas depresivos por el Inventory de Depresión de Beck (BDI), incluyendo 21 ítems que se refieren a síntomas y actitudes relacionadas con la depresión. Una puntuación más alta en el BDI indicó síntomas depresivos más graves, el cronotipo se evaluó con el cuestionario Morningness-Eveningness [MEQ (Horne y Ostberg)], El MEQ, como antes hemos mencionado, consta de 19 elementos sobre la hora preferida de despertarse y acostarse y los horarios de actividad diaria. Una puntuación más alta indicó matutina. Los puntos de corte MEQ fueron los siguientes: definitivamente tipo matutino (70-86 puntos), tipo moderadamente matutino (59-69 puntos), tipo intermedio (42-58 puntos), tipo moderadamente vespertino (31-41 puntos) y definitivamente vespertino (19-30 puntos). Además, se agruparon los tipos matutinos y vespertinos para análisis adicionales (<42 eran tipos vespertinos y >58 eran matutinos). Se ajustaron modelos de regresión multivariante, la puntuación media mañana-tarde obtenida fue de 56 ± 8 . Después del ajuste por edad, esta puntuación tendió a ser mayor en hombres que en mujeres, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística ($57 \pm 0,6$ vs $55 \pm 0,5$; $p=0,054$, respectivamente). La prevalencia de las 5 categorías fue la siguiente: definitivamente tipo matutino (3,4%), tipo moderadamente matutino (34,8%), tipo intermedio (57,3%), tipo moderadamente vespertino (3,7%) y definitivamente vespertino (0,8%). Detectamos una fuerte asociación entre las llagas matutinas-vespertinas y los síntomas depresivos según el inventario BDI: $4,9 \pm 0,8$; $8,5 \pm 0,5$; $9,2 \pm 0,4$; $11,9 \pm 2,5$ y $12,3 \pm 4,9$; respectivamente, p -trend: 0,024). Esta asociación siguió siendo estadísticamente significativa incluso tras el ajuste por sexo y edad, aunque en este

caso no se observó diferencias por la adherencia a la dieta mediterránea. En 2021, en el congreso Nutrition de la ASN, se midió la asociación entre el tipo de cronotipo y los síntomas de depresión con estos mismos cuestionarios. Estos síntomas fueron superiores en mujeres ($p=1,5 \times 10^{-8}$) y en participantes diagnosticados de diabetes ($p<0,01$). En esta submuestra sí que se identificó la influencia de la adherencia a dieta mediterránea. La adherencia se veía asociada inversamente con las puntuaciones del cuestionario de escala de depresión (BDI) ($p<0,001$) tras haber ajustado por sexo y por diabetes (p -interacciones $<0,05$). Las puntuaciones medias del cuestionario MEQ se asociaron de manera inversa a la depresión, siendo la asociación estadísticamente significativa cuando se utilizan las 5 categorías para clasificar el cronotipo. En un modelo ajustado de regresión multivariable por los factores sexo, diabetes, edad, IMC y actividad física, se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas entre las puntuaciones de BDI y la adherencia a dieta mediterránea ($\text{beta}=-0.28$; $p=0,010$) y el cronotipo ($\text{beta}=-0,90$; $p=0,047$). Cuando se trataron de determinar si existía interacción entre el cronotipo y la adherencia a la dieta los resultados no fueron significativos ($p=0,498$). Indicando que el cronotipo vespertino se asocia más significativamente a síntomas de depresión, pero estar adherido a la dieta mediterránea puede invertir esta asociación y contraatacar el efecto del cronotipo en los síntomas depresivos.

4.2.2.2. Horarios de consumo de alimentos, picoteo y cronotipo

El tipo de cronotipo influye por consonancia, en los horarios en los que se realizan las distintas ingestas de alimentos. En la muestra de estudio de participantes PREDIMED-Plus Valencia, se obtuvo información sobre las preferencias horarias para realizar las distintas tomas diariamente. También se refirió si existía diferencia de horarios entre los fines de semana y la semana laboral, ya que la mayoría de los sujetos de estudio son personas jubiladas. En estos resultados presentados en el congreso SEA en 2019, se determinaron que había diferencias por sexo en las tomas de desayuno y almuerzo. El horario del desayuno era similar de lunes a viernes (sobre las 8,40h), realizándose más tarde los sábados y domingos (a las 9,00h). Tanto entre semana como en fin de semana, hubo diferencias significativas por sexo ($p<0,05$) con las mujeres desayunando un poco más tarde que los hombres. El almuerzo a media mañana (11,00h) fue similar entre semana y fin de semana, pero también las mujeres lo realizan un poco más tarde ($p<0,05$). El resto de tomas no mostraron diferencias significativas por sexo ($p>0,05$ para cada día).

En cuanto a otros rasgos asociados al comportamiento y la personalidad, encontramos la impulsividad y la adicción, y en este sentido, el hábito de picotear.

En este mismo congreso, se presentaron los datos obtenidos en relación al “picoteo” o *snacking* en inglés. Se preguntaron los alimentos a los que se recurre como picoteo a los participantes participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia, así como los momentos en el día en los que se picoteaba, y la frecuencia diaria y semanal y se analizó estadísticamente. Se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas por sexo en los alimentos que se tienden a picotear, siendo los hombres los que consumían mayor cantidad de cacahuete frito ($p=0,020$) y de olivas ($p=0,026$). Por el contrario, las mujeres tendieron a consumir más rosquilletas ($p=0,054$). También las galletas y las frutas fueron alimentos reportados en el picoteo, y aunque fueron más consumidos por mujeres, las diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0,183$ y $p=0,135$, respectivamente) (tabla 4.5). Al analizar la frecuencia de picoteo, no se detectaron diferencias significativas entre sexos ($p>0,05$), tampoco hubo diferencias por sexo en el momento del día en el que se producía más el picoteo, siendo para ambos sexos a media mañana.

Tabla 4.5. Alimentos preferentes para picotear por muestra total y por sexo

Alimentos picoteados (%)	% total	% según sexo	p-valor
Frutas	28,70%	65,0% mujeres	0,135
Olivas	17,70%	59,5% hombres	0,026*
Galletas	15,00%	73,3% mujeres	0,183
Rosquilletas	12,90%	74,1% mujeres	0,054*
Refrescos	1,90%	75,0% hombres	0,193
Cacahuetes fritos	26,30%	56,4% hombres	0,020*

* p : los valores marcados con * han sido estadísticamente significativos.

4.2.2.3 Horarios, cronotipo y confinamiento

Durante la pandemia causada por el virus COVID-19, quedó manifestado cuan de importante es mantener una rutina, con su respectiva actividad y funcionalidad, así como cognitivamente, lo necesario que puede resultar la

obligación de tener tareas pendientes, tanto como laborales como algunas clásicas del día a día de nuestra población de estudio, participantes de edad avanzada, con fenotipos de síndrome metabólico de etnia mediterránea.

Durante la pandemia se analizaron 424 de estos participantes (42,5% hombres). Se recogieron datos mediante encuestas telefónicas sobre pautas de comportamiento. Así mismo, se obtuvo información del cuestionario de Horne-Ostberg, que clasifica a los participantes según si son muy matutinos (máxima puntuación) o muy vespertinos. Los resultados mostraron que había una prevalencia de los cronotipos vespertino extremo, vespertino moderado, indefinido, matutino moderado, y matutino extremo de 0,7%, 3,5%, 59,9%, 32,6% y 3,3%, respectivamente. Se observó un incremento significativo en la hora de despertarse, levantarse, irse a dormir, y en los horarios de desayuno y comida de manera gradual según el cronotipo desde el matutino extremo hasta el vespertino extremo ($p < 0,001$ en todos), salvo comida ($p = 0,045$), posiblemente por hábitos muy marcados es la única toma que se respetaba su franja horaria. Respecto a la percepción que tenían los participantes sobre sí mismos de cómo están durmiendo, de los que referían que dormían bien el 4,5% eran vespertinos y el 40,6% matutinos, frente a los que referían dormir mal, que un 9,8% eran vespertinos y el 23,5% matutinos ($p = 0,048$), observándose la misma tendencia en su percepción de la conciliación del sueño ($p = 0,052$). De entre los que tomaban medicación para dormir, el 7,3% eran vespertinos y el 24,4% eran matutinos, con diferencias entre los que no toman según el cronotipo extremo (3,3% vespertinos y 41,9% matutinos, $p = 0,001$). Lo que se determinó de estos resultados es que, durante la pandemia, en esta población de edad avanzada, el cronotipo modulaba las pautas horarias de despertarse, levantarse, irse a dormir, y los horarios de las comidas, así como en la calidad del sueño (Roig Espert B et al., 2020).

4.2.3 Influencia en fenotipos metabólicos de riesgo cardiometabólico y cognición

4.2.3.1 Colinas

La capacidad cognitiva también fue evaluada con distintos test especificados en Métodos. En el congreso Nutrition de la ASN en 2020, se presentaron los resultados obtenidos tras observar la asociación entre los peores resultados en test de cognición con concentraciones séricas bajas de colina y derivados. Para ello se analizaron 426 sujetos del estudio PREDIMED Plus-Valencia. La colina total

sérica, la fosfatidilcolina y la esfingomielina se determinaron mediante espectroscopia de RMN. Se administraron pruebas cognitivas, incluida la fluidez verbal (fluidez semántica y fonémica) y la prueba de trazos de unión (TMT) (partes A y B). Los polimorfismos de genes candidatos se determinaron mediante chips de genotipado. La dieta fue analizada por cuestionarios validados. Se ajustaron los modelos de regresión multivariante por los factores de confusión. Las distintas concentraciones de los diferentes tipos de colinas (total, fosfatidilcolina y esfingomielina) se asociaron fuertemente con el sexo (fue mayor en las mujeres; $p < 0,001$), edad (menor a edad creciente; $p < 0,05$) y diabetes (menor en diabetes; $p < 0,01$) en un modelo multivariante, y aunque las tres variables presentaron asociaciones estadísticamente significativas con la cognición en sí mismas, la esfingomielina sérica fue la más significativa. Así, en un modelo multivariante, la fosfatidilcolina sérica se asoció directamente con una mejor fluidez verbal ($p = 0,040$ y $p = 0,029$ para fonémica y semántica, respectivamente) e inversamente asociada (puntuación menor significa mejor rendimiento) con la TMT-A ($p = 0,013$) y la TMT-B ($p = 0,035$). En el análisis genético, detectamos varios polimorfismos fuertemente asociados con colinas (rs10991629-SLC44A1 con $p < 0,005$ y rs8068641-PEMT; $p < 0,01$, entre otros). Se identificaron varias asociaciones dietéticas, así como modulaciones por la interacción entre gen-dieta (Coltell O et al., 2020).

4.2.3.2 Aminoácidos de cadena ramificada

Los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA por sus siglas en inglés, *Branched-Chain Amino Acids*) en suero también fueron valorados en esta población de estudio mediterránea, de edad avanzada y con diagnóstico de Síndrome metabólico en gran parte de los casos, o de características asociadas. Estos resultados se presentaron en distintos congresos en los años 2021 y 2022. En el congreso internacional celebrado por el grupo CIBERObn en 2021, se analizó la asociación entre los BCAA séricos y la obesidad, el IMC y la circunferencia de la cintura. Para ello, se analizaron 652 sujetos mediterráneos de 2 cohortes compuestas por: 225 (50% mujeres; edad media 41,4 años; IMC: 26,4 kg/m²) sujetos de la población general (estudio OBENUTIC) y 426 participantes en el estudio PREDIMED Plus-Valencia (hombres y mujeres obesos/con sobrepeso de 55-75 años, con Síndrome metabólico; IMC: 32,3 kg/m²). Los sujetos fueron reclutados en la misma área geográfica (C.Valenciana) utilizando protocolos similares. Además, las muestras de suero en ayunas se midieron mediante el mismo procedimiento en el mismo laboratorio. Los BCAA (leucina, isoleucina y valina) se determinaron con una plataforma metabolómica de RMN de alto rendimiento. Se

ajustaron modelos de regresión lineal y logística multivariable. Los resultados que se observaron en la población general fueron que la media de BCAA circulantes era de $478 \pm 7,1$ micromol/L (valina: $259 \pm 3,7$; leucina: $148 \pm 2,9$ e isoleucina: $69 \pm 1,5$ micromol/L). Las concentraciones difirieron según el sexo, siendo estadísticamente mayores en los hombres ($p < 0,05$). Se detectaron asociaciones muy fuertes entre los BCAA y los parámetros relacionados con la obesidad. Después del ajuste por sexo y edad, las concentraciones totales de BCAA se asociaron directamente con el IMC ($p = 1,7 \times 10^{-7}$). Esta asociación fue estadísticamente significativa tanto para hombres como para mujeres y se observó en los tres tipos de aminoácidos. Asimismo, se detectó una fuerte asociación similar para la circunferencia de la cintura ($p = 4 \times 10^{-6}$) y el riesgo de obesidad (OR: 2,34; IC95%: 1,60-3,42 por desviación estándar de los BCAA; $p = 1 \times 10^{-5}$), siendo mayor en hombres que en mujeres. En sujetos mayores, los BCAA circulantes disminuyeron (valina: $202 \pm 2,5$; leucina: $92 \pm 1,1$ e isoleucina: $68 \pm 1,0$ micromol/L) y las asociaciones con los parámetros relacionados con la obesidad se atenuaron. Por lo tanto, no se encontraron asociaciones significativas para el IMC. Sólo se observaron pequeñas asociaciones entre isoleucina y leucina y circunferencia de la cintura ($r = 0,117$; $p = 0,015$ y $r = 0,101$; $p = 0,036$, respectivamente). Estos datos indicaron que la edad era relevante para considerar este tipo de vinculación entre los niveles de BCAA y variables de sobrepeso-obesidad.

Meses después, nuevamente, en la población PREDIMED-Plus Valencia, con sujetos de edad avanzada, se estudiaron en mayor profundidad las posibles asociaciones entre los niveles de BCAA de suero de estos participantes y variables de riesgo cardiovascular. Las concentraciones séricas medias ($\pm$ DE) en la población han sido de $0,092 \pm 0,019$ mmol/l para leucina; $0,070 \pm 0,017$ mmol/l para isoleucina y $0,199 \pm 0,037$ mmol/l para valina. Leucina e isoleucina han mostrado niveles ligeramente superiores en hombres que en mujeres ($p < 0,05$) (figura 4.2).

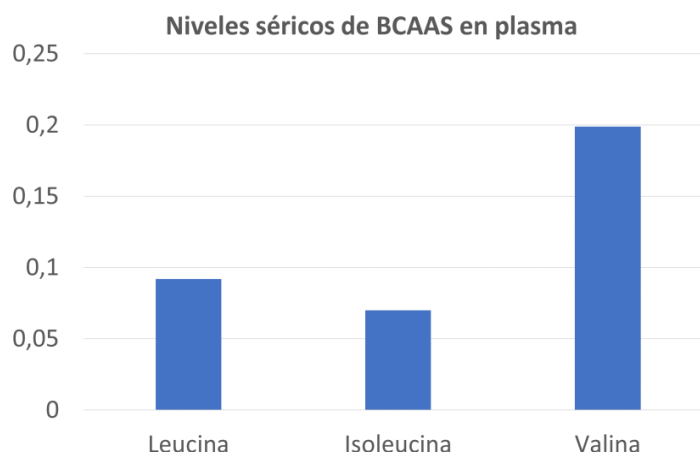


Figura 4.2. Niveles de BCAA en suero de participantes PREDIMED-Plus Valencia. Las concentraciones séricas medias ($\pm$ desviación estándar; DE) en los sujetos del estudio.

Todos ellos se han asociado muy significativamente con mayor glucemia y riesgo de diabetes. Tras ajustar por sexo, edad, índice de masa corporal y tabaco, las concentraciones de BCAA fueron de $0,38 \pm 0,01$ mmol/l en diabéticos frente $0,34 \pm 0,01$ mmol/l, en no diabéticos ($p=0,000002$). La odds de diabetes para cada desviación estándar de incremento de BCAA se estimó en OR:1,64(IC95%:1,33-2,03), $p<0,001$). Los BCAA también se han asociado ($p<0,05$) con mayores concentraciones de triglicéridos y menores concentraciones de c-HDL, tras el ajuste por variables de confusión. La adherencia global a la dieta mediterránea se asoció inversamente con las concentraciones de BCAA tanto en hombres como en mujeres, pero sin alcanzar la significación estadística ($p=0,11$). Sin embargo, el mayor consumo de carnes rojas fue el ítem más significativamente asociado con mayores concentraciones de BCAA ($p<0,01$), tanto en hombres como en mujeres. Estos últimos resultados se presentaron en el congreso SEA y SEMERGEN, celebrados en 2022.

4.2.3.3 GlycA

En esta población de estudio, de la misma forma que se midieron los niveles de los distintos tipos de colinas en el suero de los participantes PREDIMED-Plus

Valencia, también se realizó la medición de GlycA. La GlycA es un nuevo marcador de inflamación que se obtiene del espectro de RMN en suero (figura 4.3).

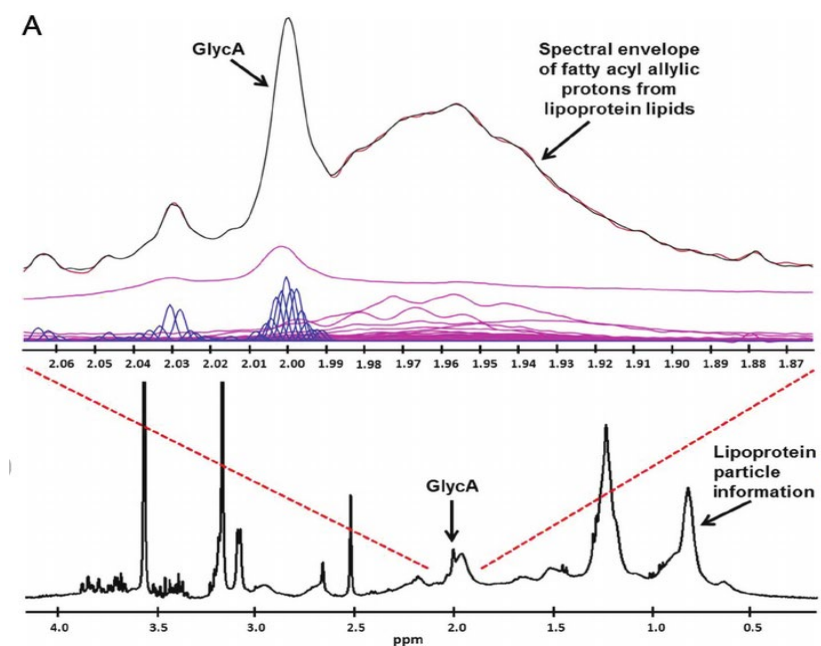


Figura 4.3. Representación espectro RMN plasmático LipoProfile que muestra en la expansión superior la señal de GlycA y el modelo de deconvolución utilizado para su cuantificación.

La línea roja es la envoltura de la señal de plasma medida, y la línea negra virtualmente superpuesta es la suma calculada de las amplitudes derivadas de la deconvolución de las señales de referencia de lipoproteína y proteína (púrpura) y N-acetil metilo (azul) (Otvos JD et al., 2015).

4.2.3.4 Bilirrubina

La bilirrubina es un pigmento tetrapirrol generado cuando la hemo oxigenasa cataliza la degradación del hemo. Esto produce biliverdina, que se convierte en bilirrubina por la biliverdina reductasa (Ding B et al., 2011). La bilirrubina se procesa aún más en los hepatocitos, donde la bilirrubina no conjugada es conjugada por uridina difosfato-glucuronosiltransferasa (UDP-GT) a una forma soluble en agua para su excreción.

Aunque, durante décadas, el aumento de las concentraciones séricas de bilirrubina se consideró un signo amenazante de enfermedad hepática subyacente y se había asociado con ictericia neonatal, los datos de los últimos años muestran que la bilirrubina es un poderoso antioxidante y sugieren que las concentraciones séricas de bilirrubina ligeramente aumentadas protegen contra las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, se necesita una mejor comprensión de las interacciones gen-dieta en la determinación de las concentraciones séricas de bilirrubina. Ninguno de los estudios previos de asociación de genoma completo (GWAS) sobre las concentraciones de bilirrubina se ha estratificado por sexo. Por lo tanto, considerando el creciente interés en incorporar la perspectiva de género en la genómica nutricional, nuestro objetivo principal fue realizar un GWAS sobre las concentraciones totales de bilirrubina sérica en una población mediterránea con síndrome metabólico, estratificada por sexo. Nuestro objetivo secundario fue explorar, como estudio piloto, la presencia de interacciones gen-dieta a nivel de GWAS. Se incluyeron 430 participantes (188 hombres y 242 mujeres, de 55 a 75 años de edad y con síndrome metabólico) en el estudio PREDIMED Plus-Valencia.

Se realizaron GWAS globales y específicos del sexo para analizar las asociaciones y la interacción gen-dieta con la bilirrubina sérica total. La adherencia (baja y alta) a la dieta mediterránea se analizó como modulador dietético (Coltell O et al., 2019). En el GWAS, detectamos más de 55 SNPs asociados con bilirrubina sérica en $p < 5 \times 10^{-8}$ (nivel GWAS). Los mejor clasificados fueron cuatro SNP (rs4148325 ($p = 9.25 \times 10^{-24}$), rs4148324 ($p = 9.48 \times 10^{-24}$), rs6742078 ($p = 1.29 \times 10^{-23}$), rs887829 ($p = 1.39 \times 10^{-23}$) y rs4148324 ($p = 9.48 \times 10^{-24}$)) en el gen UGT1A1 (UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1), que replicó hallazgos previos que revelaban que UGT1A1 era el locus principal. En el GWAS específico por sexo, los SNP mejor clasificados a nivel de GWAS fueron similares en hombres y mujeres (el SNP principal fue el rs4148324-UGT1A1 tanto en hombres ($p = 4.77 \times 10^{-11}$) como en mujeres ($p = 2.15 \times 10^{-14}$), lo que muestra resultados genéticos homogéneos para el locus principal.

En la figura 4.4 se muestra el Manhattan plot del GWAS en los participantes en el estudio PREDIMED-Plus Valencia y las concentraciones de bilirrubina (Coltell O et al., 2019).

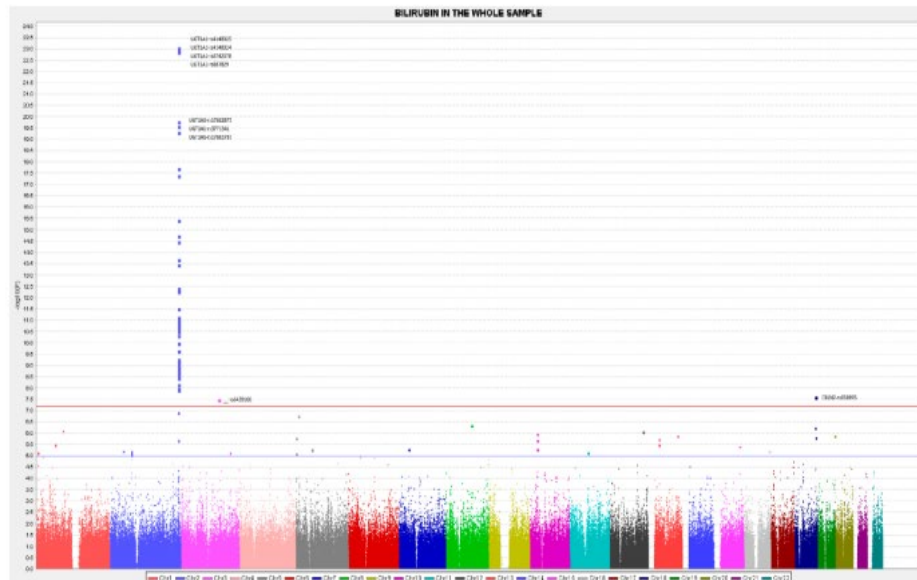


Figura 4.4. Manhattan plot para representar los resultados de GWAS de Bilirrubina de participantes PREDIMED-Plus Valencia (Coltell O et al., 2019)

Posteriormente, analizamos la adherencia a dieta mediterránea a través de una puntuación de 17 ítems. Para el análisis de las interacciones gen-dieta, se utilizó la variable dicotómica: alta adherencia y baja adherencia. En los análisis de interacción gen-dieta, solo un SNP (rs6887452), localizado en el cromosoma 5, alcanzó la significación estadística en este nivel ($p=3,14 \times 10^{-8}$). Este SNP se localiza en el gen IL17B (Interleukin 17B). El alelo menor de este SNP aumentaría las concentraciones de bilirrubina ($B=0,045$ mg/dL por alelo menor) con baja adherencia a dieta mediterránea, mientras que, con una alta adherencia a dieta mediterránea, el alelo menor de estos SNP se asociaría con una pequeña disminución de la bilirrubina sérica ($B=-0,087$ mg/dL). Esta interacción gen-dieta se observó consistentemente después del ajuste por edad, diabetes, IMC, tabaquismo, medicamentos y actividad física.

4.3 Influencia de la percepción del sabor en variables antropométricas, cardiometabólicas y patrón de dieta en los participantes PREDIMED-Plus Valencia

La percepción de los 5 sabores se realizó en 381 participantes en el estudio PREDIMED-Plus Valencia. En la figura 4.5 se muestra la intensidad de percepción de cada sabor en función de la concentración molar de la sustancia prototípica administrada.

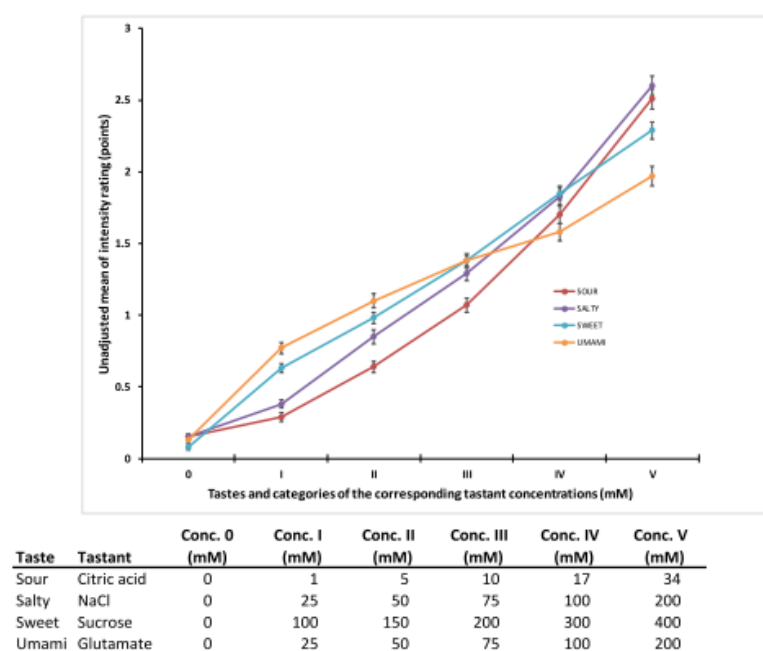


Figura 4.5. Representación gráfica de las puntuaciones en test de percepción de sabor para los distintos sabores (Coltell O et al., 2019)

Posteriormente se eligió la concentración máxima (concentración V) de cada sustancia prototípica para realizar los análisis de asociación con las variables antropométricas. Además, se creó una nueva variable llamada “total taste score”

sumando los valores de intensidad percibida de cada sabor en la concentración V. La figura 4.6 muestra la distribución de frecuencias de la total taste score en la población (Coltell O et al., 2019).

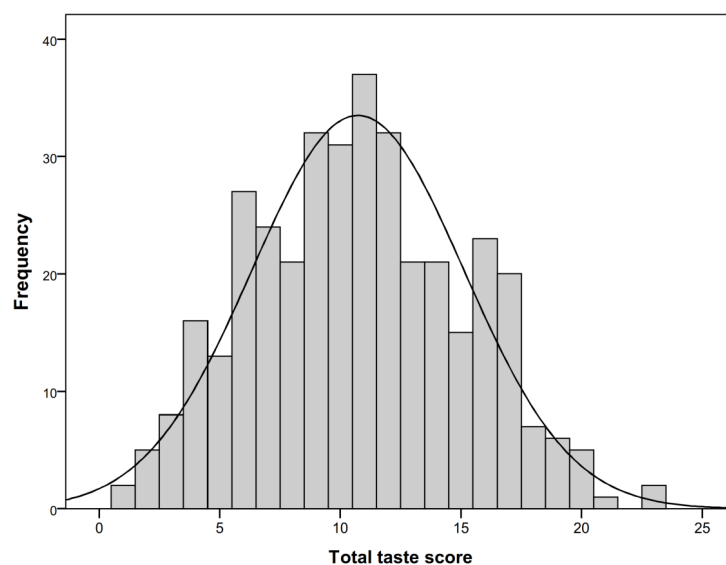


Figura 4.6. Representación de la distribución de frecuencias de “total taste score” en la población estudiada, PREDIMED-Plus Valencia (Coltell O et al., 2019)

Tras esto, realizamos la asociación entre la total taste score y los distintos grados de obesidad (figura 4.7). Encontramos una asociación muy significativa entre menor percepción del sabor y mayor grado de obesidad. Esta asociación no perdió la significación estadística al ajustar por las variables de sexo, edad, y del estilo de vida (Coltell O et al., 2019).

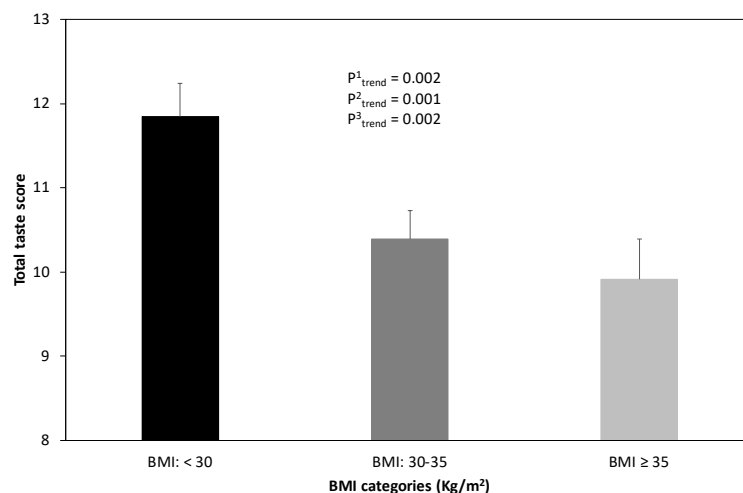


Figura 4.7. Representación gráfica de la asociación entre las marcas obtenidas en el “total taste score” y los distintos grados de obesidad (Coltell O et al., 2019)

En la tabla 4.6 se muestran los coeficientes de correlación y de regresión entre cada tipo de sabor y las variables antropométricas en los participantes en el estudio PREDIMED-Plus Valencia a nivel basal. Observamos que las mayores asociaciones inversas se obtienen con los sabores salado y umami, aunque la dirección de la asociación es inversa y significativa para varios parámetros también para los demás sabores.

Tabla 4.6. Asociación entre la intensidad de percepción de cada sabor y el peso, perímetro de cintura e IMC en los participantes PREDIMED-Plus Valencia

Taste (tastant) ¹	Parameters	Weight (kg)	Waist (cm)	BMI (kg/m ²)
Bitter (PTC) 5.6 mM	Correlation coefficients (r) ²	-0.083	-0.136	-0.097
	p ³	0.111	0.009	0.063
	Regression coefficients (B ⁴ ±SE) ⁵	-0.40±0.41	-0.74±0.33	-0.25±0.13
	p ⁶	0.326	0.024	0.064
	p ⁷	0.350	0.060	0.065
Bitter (PROP) 5.5 mM	Correlation coefficients (r)	-0.100	-0.125	-0.106
	p	0.055	0.016	0.043
	Regression coefficients (B±SE)	-0.90±0.42	-0.85±0.34	-0.29±0.14

	P	0.032	0.013	0.039
	P	0.020	0.018	0.032
Sweet (Sucrose) 400 mM	Correlation coefficients (r)	-0.122	-0.088	-0.080
	P	0.017	0.086	0.119
	Regression coefficients (B±SE)	-0.72±0.45	-0.44±0.37	-0.21±0.15
	P	0.114	0.226	0.150
	P	0.072	0.189	0.102
Salty (NaCl) 200 mM	Correlation coefficients (r)	-0.237	-0.258	-0.142
	P	<0.001	<0.001	0.006
	Regression coefficients (B±SE)	-1.09±0.41	-1.16±0.33	-0.39±0.13
	P	0.008	0.001	0.004
	P	0.019	0.002	0.008
Sour (Citric acid) 34 mM	Correlation coefficients (r)	-0.194	-0.194	-0.123
	P	<0.001	<0.001	0.017
	Regression coefficients (B±SE)	-1.13±0.44	-0.93±0.36	-0.37±0.14
	P	0.011	0.010	0.011
	P	0.011	0.014	0.015
Umami (MPG) 200 mM	Correlation coefficients (r)	-0.113	-0.094	-0.125
	P	0.028	0.068	0.015
	Regression coefficients (B±SE)	-0.88±0.41	-0.53±0.33	-0.33±0.13
	P	0.033	0.112	0.013
	P	0.072	0.205	0.037
Total taste score (with PTC) ⁸	Correlation coefficients (r)	-0.221	-0.236	-0.166
	P	<0.001	<0.001	0.001
	Regression coefficients (B±SE)	-0.35±0.13	-0.35±0.10	-0.14±0.04
	P	0.008	0.001	0.001
	P	0.012	0.003	0.002

PTC: phenylthiocarbamide.

PROP: 6-n-propylthiouracil.

MPG: L-glutamic acid monopotassium salt monohydrate.

¹: Six representative tastants for the five tastes (PTC and PROP for bitter, sucrose for sweet, NaCl for salty, citric acid for sour and MPG for umami) were tested. Correlation and regression coefficients for the intensity rating of the higher concentrations used are presented.

²: Correlation coefficients (r) obtained for the whole sample (men and women; n = 381 subjects screened).

³: Unadjusted p-value (model 1).

⁴: Regression coefficients (B) obtained for the whole sample.

⁵: Regression coefficients adjusted for sex and age.

⁶: P-value adjusted for sex and age (model 2).

⁷: P-value additionally adjusted for type-2 diabetes, smoking, physical activity and medications (lipid-lowering drugs, antihypertensive drugs and insulin) for dyslipemias, hypertension and diabetes (model 3). General lineal model with multivariate adjustment were used for the statistical analyses.

⁸: Total taste score (concentration V): the sum of the scores for the five tastes (only PTC for bitter).

En el congreso de Nutrition de American Society of Nutrition (ASN) en 2019, celebrada en Maryland, USA, se presentaron los resultados que asociaban el consumo de alimentos concretos con la percepción de sabores. Tras ajustar por edad, sexo, diabetes, tabaquismo, actividad física e ingesta energética, la percepción del sabor dulce se asoció inversamente con el consumo de vegetales ($\beta=-1,1$; 95% CI=[-2,0, -0,2]), particularmente las no-crucíferas ($\beta=-1,0$; $p=0,02$), y de frutas, los cítricos ($\beta=-0,5$; $p<0,01$); el sabor salado fue asociado positivamente con el consumo de fruta ($\beta=1,0$; 95% CI=[0,04, 1,9]), en concreto con las que no eran cítricos ($\beta=0,6$; $p=0,03$), y con el consumo de aceite de oliva ($\beta=1,1$; $p=0,02$) pero negativamente con el consumo de aceite de oliva virgen extra ($\beta=-1,4$; $p=0,02$); el ácido se asoció positivamente con el consumo de verduras crucíferas ($\beta=0,1$; $p=0,04$); el amargo se asoció inversamente con el consumo de pescado en lata ($\beta=-0,1$; $p=0,03$); y el sabor umami se asoció positivamente al consumo de vegetales no-crucíferos ($\beta=0,7$; $p=0,04$) e inversamente con el consumo de lácteos ($\beta=-0,4$; $p=0,04$). en el congreso Nutrients celebrado en Maryland, USA, en 2019, se presentaron los resultados percepción y consumo de fruta y verdura. Tras ajustar por las variables por sexo, edad, diabetes, tabaquismo, actividad física diaria e ingesta calórica semanal, hubo asociaciones inversas entre la percepción dulce y la ingesta de cítricos ($\beta=-0,5$; $p<0,01$) y vegetales totales ($\beta=-1,1$; IC 95% [-2,0, -0,2]), particularmente vegetales no crucíferos ($\beta=-1,0$; $p=0,02$); y asociaciones positivas entre la percepción de sal y consumo de fruta total ($\beta=0,9$; IC 95% [0,02, 1,7]), particularmente de frutas no cítricas ($\beta=0,6$; $p=0,03$), la percepción de sabor ácido y el consumo de vegetales crucíferos ($\beta=0,1$; $p=0,04$) y la percepción de umami y consumo de vegetales no crucíferos ($\beta=0,7$; $p=0,04$). No se observaron asociaciones significativas entre la percepción del sabor amargo y el consumo de frutas o verduras (Gervis J et al., 2019).

4.3.1 Análisis genéticos de GWAS para identificar variantes genéticas asociadas con la percepción de cada sabor y la total taste score

Estos resultados genéticos de GWAS de percepción del sabor han sido publicados en el AJCN (Coltell O et al, 2019) y ha sido la primera vez que se han publicado GWAS para la percepción de otros sabores distintos del amargo. En el

GWAS del sabor amargo, encontramos asociaciones muy significativas a nivel de GWAS con los SNP rs713598 y similares en el conocido gen *TAS2R38*. El SNP rs1726866-TAS2R38 mostró la mayor significación estadística ($p=3,96 \times 10^{-19}$), confirmando resultados previos. Para los demás sabores no encontramos asociaciones tan significativas y ninguna de ellas superó el nivel de significación de GWAS, aunque varios de ellos superaron el nivel presuntamente significativo por lo que estamos investigando dichas variantes en otras poblaciones. Al analizar los SNPs asociados al total taste score, encontramos que el SNP más significativo fue el rs1969772 (intergénico), seguido del SNP rs6592657, situado en el gen LRRC32 (Leucine-Rich-Repeat-Contains-32). Este SNP tiene elevada funcionalidad, y lo hemos elegido como mejor candidato para estudios de posteriores de randomización mendeliana. De acuerdo con ello, los portadores del alelo menor (alelo 2), tendrían una menor percepción global del sabor, siendo las medias para los genotipos 11,12 y 22 de: $11,93 \pm 0,43$, $10,57 \pm 0,29$ y $9,04 \pm 0,57$ puntos, respectivamente, $p < 0,001$.

4.4 Preferencia por sabores, relación con la percepción del sabor, preferencia por alimentos, genética y asociación con consumo de alimentos y fenotipos intermedios

Además de la percepción de sabores, en los participantes en el estudio PREDIMED-Plus Valencia, se estimó la preferencia por los 5 sabores, así como por determinados alimentos en 425 participantes. En la figura 4.8 se muestra el esquema que se siguió en la realización de este complejo y pionero estudio que ha sido publicado en la revista *Biomedicine* (Fernández-Carrión R et al., 2021).

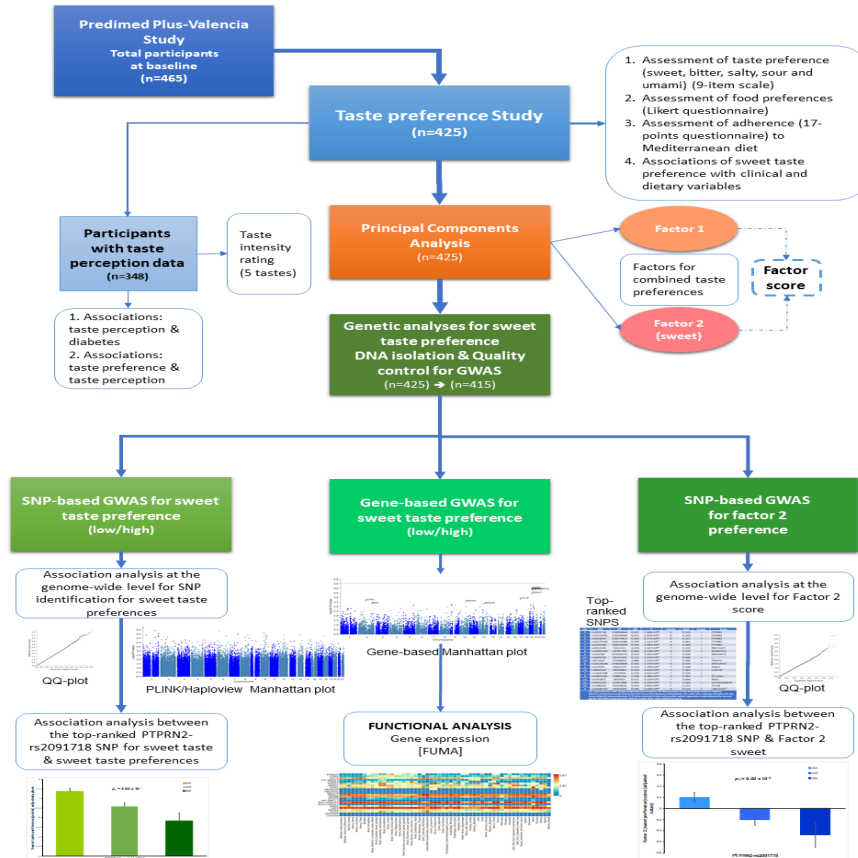


Figura 4.8. Diagrama gráfico que representa el diseño del estudio, incluyendo las secuencias de experimentos y análisis estadísticos realizados (Fernandez-Carrión R et al, 2021).

Las características de los participantes se resumen en la tabla 4.7. En esta tabla se muestran las características demográficas, antropométricas, clínicas, bioquímicas y de estilo de vida de la muestra estudiada.

Tabla 4.7. Características demográficas, clínicas y genéticas de la población de estudio según sexo

	Total (n = 425)	Men (n = 183)	Women (n = 242)	<i>p</i>
Age (years)	65.2±4.7	64.0±5.3	66.1±4.1	<0.001
Weight (Kg)	83.9±13.7	92.5±13.2	77.3±9.8	<0.001
BMI (Kg/m ²)	32.2±3.6	32.2±3.4	32.2±3.7	0.961
Waist circumference (cm)	105.6±10.1	111.1±8.7	101.4±9.0	<0.001
SBP (mm Hg)	141.3±18.1	143.8±18.6	139.5±17.6	0.015
DBP (mm Hg)	80.9±9.9	82.7±10.4	79.5±9.4	0.001
Total cholesterol (mg/dL)	196.8±37.8	188.3±39.0	203.3±35.6	<0.001
LDL-C (mg/dL)	130.9±33.2	131.5±33.7	130.7±32.8	0.681
HDL-C (mg/dL)	59.9±14.3	52.4±11.3	64.8±13.9	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	103.3±58.3	117.7±69.9	93.9±47.1	<0.001
Fasting glucose (mg/dL)	92.1±16.9	94.0±17.9	90.8±16.2	0.001
Physical Activity (MET.min/wk)	1679±1526	1947±1797	1476±1250	0.002
Hours of sleep per night (h/day) ¹	6.8±1.1	6.9±1.0	6.7±1.1	0.014
Adherence to MedDiet ²	8.0±2.8	7.9±2.8	8.1±2.7	0.404
Type 2 diabetes: n, %	163 (38.4)	71 (38.8)	92 (38.0)	0.870
Obesity: n, %	239 (56.2)	110 (60.1)	129 (53.3)	0.422
Current smokers: n, %	48 (11.3)	30 (16.4)	18 (7.4)	<0.001

Los valores son media±SD para variables continuas y número (%) para variables categóricas. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; LDL-C: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; HDL-C: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; MET: equivalente metabólico. 1 MET equivale a kcal x kg⁻¹ x h⁻¹, el coste de oxígeno se mide como 3.5 mL/kg/min; p: p-valor para las comparaciones (medias o %) entre hombres y mujeres. Se utilizó la prueba t de Student para comparar medias y pruebas de Chi cuadrado para comparar categorías. 1: Horas de sueño por noche de lunes a viernes. 2: Cuestionario cuantitativo de 17 ítems para la adherencia a la dieta mediterránea (Fernández-Carrión R et al., 2021).

4.4.1 Determinación de la preferencia por el sabor dulce y por otros sabores

Se usó la escala hedónica de 9 puntos como se detalla en los métodos. En esta escala, a mayor puntuación, mayor preferencia por cada gusto. La tabla 4.8. muestra las medias de cada preferencia gustativa para toda la muestra y estratificada por hombres y mujeres. En el total de la población, el sabor dulce fue el segundo gusto preferido, alcanzando una media de 7,16 puntos. El sabor más preferido fue el salado, con una media de 7,56 puntos, puntuación muy cercana a la preferencia por el sabor dulce. A estos gustos le seguían a mayor distancia el

umami (5,95), luego el ácido (4,62 puntos) y finalmente el amargo (4,31 puntos), siendo este el menos preferido en esta población de mayor edad. En el análisis por sexo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en la preferencia por el sabor dulce ($p=0,245$). Tampoco se observaron diferencias en las preferencias por los sabores salado, ácido y amargo. Sin embargo, se observaron diferencias muy significativas entre hombres y mujeres en su preferencia por el umami ($p<0,001$), siendo este más preferido en hombres que en mujeres. La tabla 4.8 también muestra las medias de las preferencias gustativas en sujetos diabéticos tipo 2 y no diabéticos. En general, las medias de las preferencias gustativas son similares en ambos grupos, surgiendo la mayoría de las diferencias en la preferencia por el sabor dulce, que es mayor en los sujetos con diabetes ($p=0,021$). Esta asociación se mantuvo estadísticamente significativa en un análisis multivariado después del ajuste por sexo y edad ($p=0,020$) y después del ajuste adicional por IMC ($p=0,021$), así como tras un ajuste adicional por puntuación de tabaquismo, actividad física, horas de sueño por noche y adherencia a la dieta mediterránea ($p=0,033$).

Tabla 4.8. Preferencias gustativas (dulce, salado, agrio, umami y amargo) en el total de la población y estratificada por sexo y diabetes

Taste preference	Total (n=425)	Sex			Diabetes		
		Men (n=183)	Women (n=242)	p^1	No (n=262)	Yes (n=163)	p^2
Sweet	7.16±0.09	7.03±0.14	7.25±0.12	0.245	6.99±0.12	7.42±0.14	0.021
Salty	7.56±0.08	7.45±0.13	7.65±0.10	0.196	7.54±0.10	7.60±0.12	0.690
Sour	4.62±0.10	4.71±0.16	4.55±0.14	0.445	4.66±0.13	4.55±0.17	0.614
Umami	5.95±0.09	6.44±0.13	5.58±0.12	<0.001	6.00±0.11	5.87±0.14	0.482
Bitter	4.31±0.10	4.47±0.16	4.19±0.14	0.184	4.33±0.13	4.28±0.17	0.830

Los valores son media±SE; Las puntuaciones de preferencias gustativas se han obtenido mediante una escala hedónica de 9 puntos para cada sabor. p^1 : valores p para las diferencias de sexo (pruebas t-Student). p^2 : valores p para las diferencias de estado de diabetes (pruebas t-Student) (Fernández-Carrión R et al., 2021).

Asimismo, al crear la variable dicotómica de alta o baja preferencia por el sabor dulce (en base a la media), una alta preferencia por el sabor dulce se asoció con una mayor probabilidad de ser diabético, en un modelo ajustado por sexo y edad (OR: 1,59; IC95%: 1,04-2,41, $p=0,031$), y por sexo, edad e IMC (OR: 1,59; IC95%: 1,04-2,41; $p=0,032$). Además, el ajuste adicional por tabaquismo, actividad física, horas de sueño por noche y adherencia a la dieta mediterránea no cambió el nivel de significación estadística para esta asociación (OR: 1,54; IC 95%: 1,01–2,36; $p=0,048$). Sin embargo, al analizar la preferencia gustativa en función de la presencia o ausencia de obesidad (tabla 4.9), no se encontraron diferencias entre los

grupos de obesos y no obesos, para la preferencia gustativa dulce ($p=0,437$) o cualquier otro gusto.

Tabla 4.9. Preferencias de sabor (dulce, salado, ácido, umami y amargo) dependiendo del estado de obesidad

Taste preference	Obesity		
	No (n=136)	Yes (n=289)	<i>p</i>
Sweet	7.05±0.17	7.20±0.11	0.437
Salty	7.53±0.13	7.60±0.09	0.769
Sour	4.51±0.19	4.67±0.12	0.463
Umami	5.93±0.17	5.96±0.10	0.897
Bitter	4.37±0.19	4.28±0.13	0.708

Los valores son media±SE; Las puntuaciones de las preferencias gustativas se han obtenido mediante una escala hedónica de 9 puntos para cada sabor. Los valores de *p* para la diferencia de estado de obesidad se obtuvieron mediante la prueba t-Student (Fernández-Carrión R et al., 2021).

4.4.2 Percepción del sabor dulce y otros sabores

La percepción del sabor (tabla 4.10) para diferentes sabores se evaluó en el laboratorio y calificando la intensidad del sabor percibido, como se detalla en los métodos (cuanto mayor es el puntaje, mayor es la percepción del sabor).

Tabla 4.10. Percepción del gusto (dulce, salado, agrio, umami y amargo) en el total de la población y estratificado por diabetes

Taste (tastant) ¹	Total (n = 348)	Diabetes				
		No (n = 220)	Yes (n = 128)	<i>p</i> ²	<i>p</i> ³	<i>p</i> ⁴
Sweet (Sucrose) (400 mM)	2.27±0.07	2.34±0.08	2.16±0.11	0.182	0.173	0.171
Salty (NaCl) (200 mM)	2.58±0.07	2.65±0.09	2.44±0.13	0.182	0.168	0.118
Sour (Citric acid) (34 mM)	2.51±0.07	2.58±0.08	2.39±0.12	0.197	0.191	0.132
Umami ((MPG) (200 mM)	1.99±0.07	1.99±0.09	1.99±0.12	0.969	0.979	0.898
Bitter (PTC) (5.6 mM)	1.38±0.07	1.51±0.09	1.16±0.11	0.024	0.023	0.011
Total taste score ⁵	10.71±0.23	11.10±0.29	10.05±0.39	0.034	0.026	0.019

Los valores son media±SE; Los valores de *p* para la diferencia de estado de diabetes se obtuvieron mediante la prueba t de Student. PTC: feniltiocarbamida. MPG: ácido L-glutámico monopotásico sal monohidrato. 1: Se probaron cinco catadores representativos para los cinco sabores (PTC para amargo (bitter), sacarosa para dulce (sweet), NaCl para salado (salty), ácido cítrico para ácido (sour) y MPG para umami) (Concentración V). 2: El

valor de p se obtuvo en un modelo lineal general no ajustado. 3: el valor de p se obtuvo en un modelo lineal general ajustado por sexo, edad e IMC. 4: el valor de p se obtuvo en un modelo lineal general ajustado por sexo, edad, IMC, actividad física, adherencia a la dieta mediterránea (puntuación de 17 ítems), horas de sueño y tabaquismo. 5: Puntuación total del gusto: la suma de las puntuaciones para los cinco sabores, a la concentración más alta utilizada (concentración V) (Fernández-Carrión R et al., 2021).

Los datos de percepción del gusto solo estaban disponibles para 348 de los 425 participantes incluidos en este estudio. Como ya hemos publicado un artículo anterior sobre la asociación de la percepción del gusto con el sexo y la obesidad (Coltell O, et al., 2019), no nos centraremos en la obesidad sino en la diabetes. La tabla 4.10 muestra las medias de las percepciones de las cinco cualidades gustativas, así como la puntuación total del gusto según el estado de diabetes.

La puntuación gustativa total, que es la suma de las cinco percepciones gustativas, fue estadísticamente menor en los sujetos diabéticos ($p=0,034$ y $p=0,019$ tras el ajuste multivariable). Al estudiar sabores específicos, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el sabor amargo, siendo su percepción menor en los diabéticos ($1,16 \pm 0,11$ frente a $1,51 \pm 0,09$; $p=0,024$), manteniéndose estadísticamente significativa tras ajustes multivariable ($p<0,05$). Para el sabor dulce, aunque la percepción fue ligeramente menor en los diabéticos, las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p=0,182$).

4.4.3 Correlación de la preferencia por el sabor dulce con los otros gustos

La tabla 4.11 presenta los coeficientes de correlación de Spearman entre la preferencia por el sabor dulce y la preferencia por los otros sabores. Aunque, en general, las correlaciones no fueron muy altas, observamos algunas correlaciones estadísticamente significativas. Entre ellos, la preferencia por el sabor dulce tuvo una correlación directa estadísticamente significativa con la preferencia por el sabor salado ($r=0,119$; $p=0,014$). De manera similar, la preferencia por el sabor dulce se correlacionó inversamente con la preferencia por el sabor ácido ($r=-0,110$; $p=0,024$). Para los demás gustos, la mayor correlación se observó entre la preferencia por los sabores amargo y agrio ($r=0,371$; $p<0,001$).

Tabla 4.11. Asociación entre la preferencia por diferentes sabores

Taste ¹		Sweet	Salty	Sour	Umami	Bitter
Salty	r^2	0.119	1			
	p^3	0.014				
Sour	r^2	-0.110	0.296	1		
	p^3	0.024	<0.001			
Umami	r^2	0.017	0.122	0.041	1	
	p^3	0.730	0.012	0.402		
Bitter	r^2	0.032	0.196	0.371	0.018	1
	p^3	0.508	<0.001	<0.001	0.714	

1: Las puntuaciones de las preferencias gustativas se han obtenido mediante una escala hedónica de 9 puntos para cada gusto en toda la población (n = 425). r: El coeficiente de correlación de Spearman. p: el valor p para el coeficiente de correlación de Spearman (r) (Fernández-Carrión R, et al., 2021).

También analizamos las correlaciones entre la preferencia gustativa y la percepción gustativa. Los resultados se muestran en la tabla 4.12. Aunque la preferencia por el sabor dulce muestra una correlación inversa con la percepción del sabor dulce, esta asociación es muy pequeña y no alcanzó la significación estadística ($r=-0,056$; $p=0,297$). Sin embargo, la percepción del gusto salado presentó una correlación inversa con la preferencia por el gusto salado ($r=-0,126$; $p=0,018$). Asimismo, una mayor percepción del gusto umami se asoció inversamente con la preferencia por el gusto umami ($r=-0,133$; $p=0,013$).

Tabla 4.12. Asociación entre la preferencia por diferentes gustos y su percepción (intensidad percibida)

Taste ¹		Sweet (Sucrose) (400 mM)	Salty (NaCl) (200 mM)	Sour (Citric acid) (34 mM)	Umami (MPG) (200 mM)	Bitter (PTC) (5.6 mM)
Sweet preference	r^2	-0,056	0,004	-0,002	0,075	-0,050
	p^3	0,297	0,936	0,976	0,162	0,356
Salty preference	r^2	-0,066	-0,126	-0,105	-0,116	0,030
	p^3	0,219	0,018	0,051	0,030	0,579
Sour preference	r^2	-0,028	-0,110	-0,073	-0,085	0,038
	p^3	0,602	0,040	0,174	0,115	0,482
Umami preference	r^2	-0,034	-0,095	-0,127	-0,133	-0,055
	p^3	0,531	0,077	0,018	0,013	0,309

Bitter preference	r^2	0,048	-0,105	-0,068	-0,095	-0,063
	p^3	0,375	0,051	0,206	0,075	0,246

1: Las puntuaciones de las preferencias gustativas se han obtenido mediante una escala hedónica de 9 puntos para cada gusto en toda la población. La percepción del gusto se ha obtenido calificando catadores específicos. Se probaron cinco catadores representativos para los cinco sabores (PTC para amargo, sacarosa para dulce, NaCl para salado, ácido cítrico para ácido agrio y MPG para umami) a las concentraciones indicadas (Concentración V). PTC: feniltiocarbamida. MPG: ácido L-glutámico monopotásico sal monohidrato. r : Coeficiente de correlación de Spearman. p : valor p para el coeficiente de correlación de Spearman (r). $n = 348$ sujetos con datos tanto para la preferencia de sabor como para la percepción (Fernández-Carrión R et al., 2021).

4.4.4 Análisis factorial de los principales componentes de las preferencias gustativas

Se puede observar que las preferencias por diferentes gustos son complejas y correlacionadas. Se llevó a cabo un análisis factorial de los componentes principales, basado en las cinco variables de preferencia gustativa, para comprender mejor la estructura latente que subyace a las preferencias gustativas. La medida KMO y la prueba de esfericidad de Bartlett ($p=2 \times 10^{-23}$) indicaron la pertinencia de realizar el análisis factorial. Siguiendo el criterio de Kaiser de extracción de factores con valores propios >1 , se extrajeron dos factores. El primer factor (Factor 1) explicó el 32,1% de la varianza total y el segundo factor (Factor 2) explicó el 22,3% de la varianza total. Habiendo emprendido la transformación Varimax para interpretar mejor estas variables o factores latentes, observamos (tabla 4.13) que el Factor 1 presentó cargas factoriales altas positivas con sabor agrio (0,832) y sabor amargo (0,732) y puede ser identificado como el componente que representa los sabores agrio y amargo. El gusto salado también presentó una correlación positiva bastante alta con el Factor 1, pero menor que los anteriores. La alta carga de factor observada para agrio y amargo caracterizó principalmente a este factor y se denominó "preferencia agrio-amargo". El factor 2 tuvo una carga factorial alta para la preferencia por lo dulce (0,757) seguido de umami (0,565). Al igual que para el Factor 1, este Factor 2 también presentó altas correlaciones positivas con el gusto salado, pero no es un rasgo diferencial, ya que el gusto salado también presentó alta carga factorial con el Factor 1. Por lo tanto, el Factor 2 fue etiquetado como "preferencias dulce-umami". La figura 4.9 muestra los diagramas de carga de PCA para los componentes rotados (rotación Varimax) para este análisis. En esta figura se aprecia mejor la proyección de las variables de preferencia gustativa.

Tabla 4.13. Matriz de componentes rotados para el análisis factorial, incluidas las cinco preferencias de sabor

	Component	
	1	2
SWEET Preference	-0,205	0,757
SALTY Preference	0,535	0,510
SOUR Preference	0,832	-0,054
UMAMI Preference	0,104	0,565
BITTER Preference	0,732	0,005

Correlaciones entre los componentes y las variables de preferencia de sabor originales. Análisis factorial para toda la población (n=425). Método de extracción: Análisis de componentes principales (PCA). Método de rotación: Varimax con normalización Kaiser (Fernández-Carrión R et al., 2021).

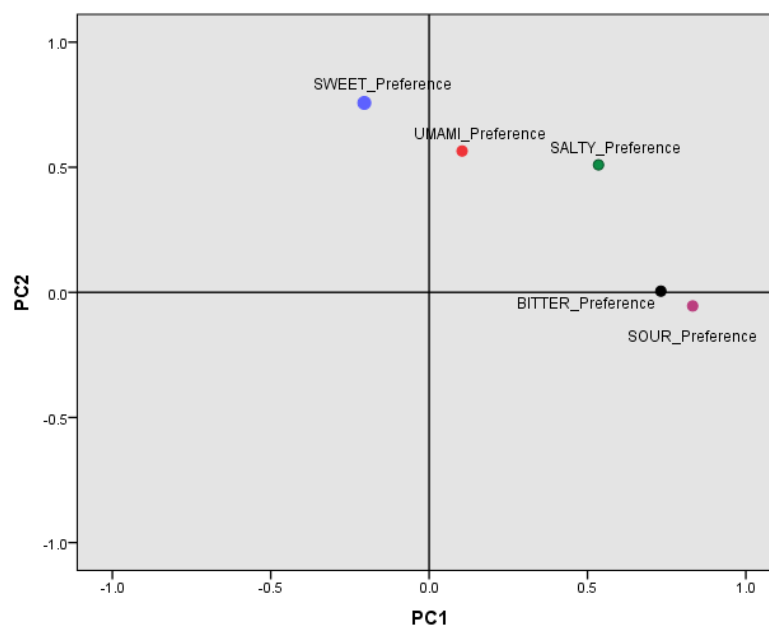


Figura 4.9. Gráficos de carga del análisis de componentes principales para los componentes rotados (rotación Varimax).

Análisis de preferencia de sabor para dulce, salado, agrio, umami y amargo. PC1 (componente principal 1), PC2 (componente principal 2). Datos obtenidos de un análisis factorial que incluye las cinco variables de preferencia gustativa (n=425 sujetos) (Fernández-Carrión R et al., 2021).

4.4.5 Asociación entre la preferencia por el sabor dulce y el gusto por los alimentos azucarados y la ingesta de alimentos ricos en azúcar

En el estudio de asociación entre la preferencia por el sabor dulce y el gusto por los alimentos azucarados (“cereales para el desayuno”, “dulces y helados”, “chocolate” y “azúcar”), encontramos fuertes asociaciones estadísticamente significativas para estos tres últimos alimentos en toda la muestra, así como cuando se estratifica en sujetos diabéticos y no diabéticos. La tabla 4.14 muestra la asociación entre la variable dicotómica preferencia por el sabor dulce (alta preferencia vs. baja preferencia) y el gusto por los cuatro alimentos azucarados incluidos en el cuestionario, tanto para la población total como por estado de diabetes. Excepto por la preferencia por los cereales para el desayuno, para los cuales las asociaciones estadísticamente significativas fueron débiles, hubo asociaciones altamente significativas ($p < 0,001$) con los demás alimentos azucarados. Así, en el conjunto de la población, tener una alta preferencia por el sabor dulce se asoció con una mayor probabilidad de mostrar una alta preferencia (gusto) por “cereales de desayuno” (OR:1,63; $p = 0,031$), “azúcar” (OR:2,35, $p < 0,001$), “chocolates” (OR:4,47; $p < 0,001$) y “dulces y helados” (OR:14,48; $p < 0,001$), en el análisis no ajustado. Estas asociaciones (a excepción de los “cereales para el desayuno”) se mantuvieron estadísticamente significativas después del ajuste multivariable (tabla 4.14).

Tabla 4.14. Asociación entre la preferencia por el sabor dulce (bajo/alto) y el gusto por los alimentos azucarados (bajo/alto) en la población total y por estado de diabetes.

Sugary foods ²	Sweet taste preference ¹					
	Whole population					
	Food liking ²	Taste preference ¹ (%)		OR ³ and 95% CI	<i>p</i> ⁴	<i>p</i> ⁵
		Low	High			
Breakfast cereals	High	24.3%	34.4%	1.63 (1.04-2.55)	0.031	0.055
Sweets-pastries and ice creams	High	64.5%	96.3%	14.48 (7.10-29.58)	<0.001	<0.001
Chocolates	High	76.3%	93.8%	4.67 (2.52-8.66)	<0.001	<0.001
Sugar	High	50.7%	70.7%	2.35 (1.55-3.55)	<0.001	<0.001
	Non diabetic subjects					
	Food liking ²	%		OR ³ and 95% CI	<i>p</i> ⁴	<i>p</i> ⁵
		Low	High			
Breakfast cereals	High	30.8%	43.0%	1.70 (1.01-2.67)	0.045	0.074
Sweets-pastries and ice creams	High	63.5%	96.8%	17.62 (6.64-46.76)	<0.001	<0.001

Chocolates	High	74.0%	92.4%	4.27 (2.05-8.89)	<0.001	<0.001
Sugar	High	51.9%	71.5%	2.32 (1.39-3.90)	0.001	0.003
Type 2 diabetic subjects						
	Food liking²	%		OR³ and 95% CI	p⁴	p⁵
		Low	High			
Breakfast cereals	High	10.4%	22.6%	2.51 (0.90-6.99)	0.071	0.108
Sweets-pastries and ice creams	High	66.7%	95.7%	11.00 (3.74-32.35)	<0.001	<0.001
Chocolates	High	81.3%	95.7%	5.08 (1.60-16.80)	0.003	0.015
Sugar	High	49.9%	69.9%	2.48 (1.24-4.96)	0.009	0.015

1: La preferencia por el sabor dulce se midió en toda la población (n = 425), incluidos los sujetos no diabéticos (n = 262) y diabéticos (n = 163). Se derivó una variable dicotómica para la preferencia de sabor dulce que consta de dos categorías, baja preferencia y alta preferencia, dependiendo de la media obtenida en la escala hedónica de 9 puntos para sabor dulce. 2: El gusto bajo y alto por los alimentos azucarados se obtuvo de una escala Likert de 4 puntos en el cuestionario de preferencia alimentaria. Aquí, una variable dicotómica (baja y alta) se derivó colapsando las dos categorías correspondientes (1 y 2 vs. 3 y 4). 3: O: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza. OR se calcularon expresando la probabilidad de un alto gusto por los alimentos correspondientes dependiendo de una alta preferencia por el sabor dulce. 4: valor p obtenido en el modelo no ajustado. 5: valor p obtenido en el modelo logístico multivariable ajustado por sexo, edad, IMC, actividad física, adherencia a la dieta mediterránea, horas de sueño y tabaquismo (Fernández-Carrión R et al., 2021).

Se encontraron asociaciones similares entre la preferencia por el sabor dulce y el gusto por los alimentos azucarados en sujetos no diabéticos y en sujetos con diabetes. Para ambos grupos, una alta preferencia por el sabor dulce se asoció con un gusto muy alto por los dulces y los helados. Estos alimentos fueron seguidos por una alta preferencia por los chocolates, que fue relativamente mayor en los diabéticos tipo 2 y en los no-diabéticos. Para analizar la asociación entre la preferencia por el sabor dulce y la ingesta de alimentos azucarados en la dieta, nos centramos en los alimentos azucarados incluidos en la puntuación de la dieta mediterránea (17 ítems) tal como se indica en métodos, como se indica en la sección Métodos. Se seleccionaron tres ítems: Ítem 6 (Bebidas azucaradas), Ítem 9 (Dulces-pastelería) y Ítem 13 (Azúcar añadida o edulcorantes no calóricos).

En la tabla 4.15 se presentan los resultados de estas asociaciones, tanto en el conjunto de la población como en función del estado diabético tipo 2. La ingesta de alimentos para cada alimento azucarado se utilizó de forma dicotómica de acuerdo con la preespecificación de su ingesta (cumpliendo o no con las recomendaciones de la dieta mediterránea, etiquetadas como de baja ingesta). Este cumplimiento fue el siguiente: <1 vez/semana para bebidas azucaradas; <3 veces/semana para bollería, y No consumo ni uso de edulcorantes no calóricos (NCS).

Tabla 4.15. Asociación entre la preferencia por el sabor dulce (bajo/alto) y el gusto por los alimentos azucarados (bajo/alto) en la población total y por estado de diabetes.

Sweet taste preference ¹							
Intake of sugary foods in the Mediterranean diet scale ²	Whole population					<i>p</i> ⁵	<i>p</i> ⁶
	Low intake ³ (Med Diet adherence)	Preference ¹		OR ⁴ and 95% CI			
		Low	High				
Sweetened beverages (I-6)	<1/ week	58.6%	56.8%	0.93 (0.62-1.39)	0.723	0.476	
Pastries (I-9)	<3/ week	47.4%	42.1%	0.81 (0.54-1.21)	0.297	0.385	
Added sugar (I-13)	No or NCS	63.2%	71.8%	1.48 (0.97-2.26)	0.066	0.105	
Non diabetic subjects							
	Low intake ³ (Med Diet adherence)	Preference ¹		OR ⁴ and 95% CI	<i>p</i> ⁵	<i>p</i> ⁶	
		Low	High				
Sweetened beverages (I-6)	<1/ week	54.8%	61.4%	1.31 (0.79-2.17)	0.289	0.299	
Pastries (I-9)	<3/ week	43.3%	44.9%	1.07 (0.65-1.76)	0.790	0.418	
Added sugar (I-13)	No or NCS	56.7%	59.5%	1.12 (0.68-1.85)	0.657	0.694	
Type 2 diabetic subjects							
	Low intake ³ (Med Diet adherence)	Preference ¹		OR ⁴ and 95% CI	<i>p</i> ⁵	<i>p</i> ⁶	
		Low	High				
Sweetened beverages (I-6)	<1/ week	66.7%	50.4%	0.51 (0.25-1.03)	0.057	0.013	
Pastries (I-9)	<3/ week	56.3%	38.3%	0.48 (0.24-0.95)	0.035	0.039	
Added sugar (I-13)	No or NCS	77.1%	88.7%	2.33 (0.96-5.66)	0.057	0.125	

1: La preferencia por el sabor dulce se midió en toda la población (n = 425), incluidos los sujetos no diabéticos (n = 262) y diabéticos (n = 163). Se derivó una variable dicotómica para la preferencia de sabor dulce que consiste en dos categorías, baja y alta preferencia, dependiendo de la media obtenida en la escala hedónica de 9 puntos para sabor dulce. En este análisis, se derivó una variable dicotómica para la preferencia de sabor dulce que consta de dos categorías (baja preferencia por sabor dulce y alta preferencia), dependiendo de la media. 2: La ingesta de los alimentos azucarados incluidos en la escala de dieta mediterránea de 17 ítems fue considerada para analizar el consumo. Estos artículos son los siguientes: bebidas azucaradas (Ítem-6), dulces-pasteles (Ítem-9) y azúcar añadida (Ítem-13) (véase el Cuadro S1 para más detalles). La ingesta de alimentos correspondiente se clasificó en dos categorías dependiendo de los criterios de adherencia a la dieta mediterránea. 3: Se consideró la baja ingesta de estos alimentos azucarados para las siguientes frecuencias: <1 vez / semana para bebidas endulzadas; < 3 tiempo / semana para pasteles, y No consumo o uso de edulcorantes no calóricos (NCS). 4: O: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza. OR se calcularon expresando la probabilidad de tener una ingesta de acuerdo con la adherencia a la dieta mediterránea (etiquetada como baja ingesta) para el alimento azucarado correspondiente dependiendo de una alta preferencia por el sabor dulce. 5: valor p obtenido en el modelo no ajustado. 6: valor de p obtenido en el modelo logístico multivariable ajustado por sexo, edad, IMC, actividad física, adherencia total a la dieta mediterránea, horas de sueño y tabaquismo (Fernández-Carrión R et al., 2021).

En general, observamos que hubo una mayor ingesta de alimentos azucarados (principalmente dulces-bollería y bebidas azucaradas) en quienes prefieren el sabor dulce, pero las asociaciones no alcanzaron la significación estadística en el total de la población. Sin embargo, se observaron asociaciones estadísticamente significativas en sujetos diabéticos tipo 2. En estos participantes, una alta preferencia por el sabor dulce se asoció con un menor cumplimiento de la recomendación mediterránea (50,4% en sujetos con alta preferencia por el sabor dulce vs. 66,7% en sujetos con baja preferencia por el sabor dulce; $p=0,013$ en el modelo multivariante ajustado) para bebidas azucaradas (menos 1 vez/semana). Así, según nuestras estimaciones, en sujetos diabéticos con alta preferencia por el sabor dulce, la probabilidad de tener un bajo consumo de bebidas azucaradas (<1 vez por semana) se redujo (OR: 0,51, $p<0,013$). Asimismo, para la bollería, teniendo en cuenta que el consumo prefijado de estos artículos de acuerdo con la adherencia a la dieta mediterránea es inferior a tres veces por semana, los sujetos diabéticos con alta preferencia por el sabor dulce presentan un menor cumplimiento de la recomendación mediterránea para este ítem (38,3% en sujetos con alta preferencia por el sabor dulce vs. 56,3% en sujetos con baja preferencia por el sabor dulce; $p=0,039$ en el modelo multivariante ajustado). Curiosamente, con respecto al ítem-13 (“¿Le agrega azúcar al café o al té?”), los sujetos diabéticos tipo 2, con una alta preferencia por el sabor dulce, puntuaron bien en este ítem, principalmente debido a un mayor uso de alimentos edulcorantes no-calóricos, evitando el azúcar de manera directa, pero no el sabor dulce.

4.4.6 GWAS exploratorios para estudiar SNP y genes asociados con la preferencia por el sabor dulce

Utilizamos dos enfoques para analizar los genes y las variantes de genes asociados con la preferencia por el sabor dulce. En primer lugar, realizamos GWAS exploratorios basados en SNP para identificar los SNP más asociados. En segundo lugar, llevamos a cabo GWAS exploratorios basados en genes.

4.4.6.1 GWAS para la preferencia de sabor dulce

Primero, analizamos los SNP a nivel de todo el genoma asociados con la preferencia dulce utilizando la variable dicotómica (preferencia alta o baja). Utilizamos análisis de regresión logística para estimar los coeficientes, así como un modelo genético aditivo. La figura 4.10 presenta el Manhattan plot, como se conocen, correspondiente que muestra el valor p ($-\log_{10}p$) de cada SNP analizado en el modelo crudo. La figura 4.11 muestra el gráfico QQ correspondiente. El valor lambda (λ) calculado fue muy bueno ($\lambda=1,004$), lo que sugiere que no hay sesgo de estratificación de la población.

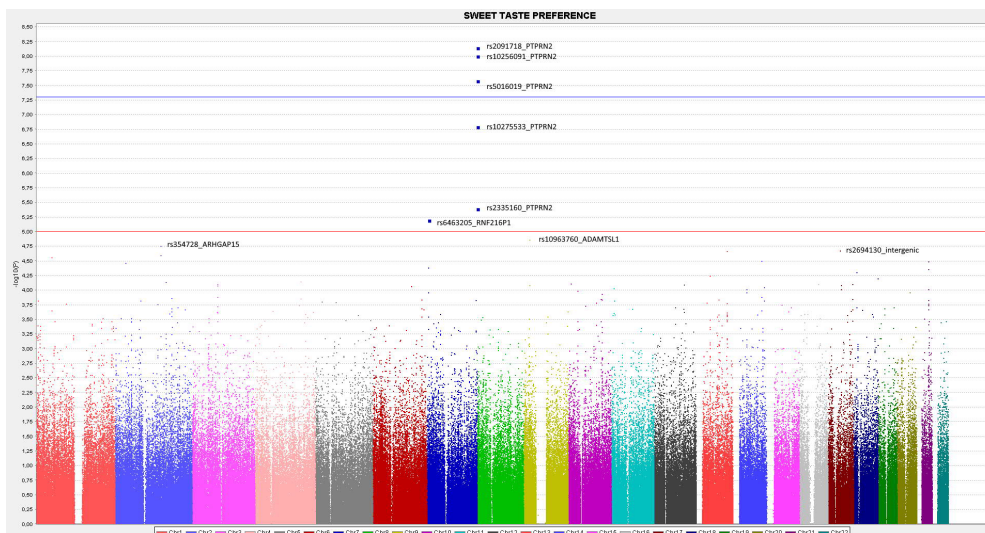


Figura 4.10. Manhattan plot para el análisis GWAS sobre la preferencia por el sabor dulce (como variable dicotómica) en toda la población utilizando PLINK y un análisis GWAS basado en un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

Se utilizaron un modelo aditivo genético y una regresión logística para estimar los valores de p , y se anotaron los SNP mejor clasificados. La línea azul representa el umbral 1 ($-\log_{10}(5 \times 10^{-8})$) para la significancia estadística de GWAS. La línea roja representa el umbral 2 ($-\log_{10}(1 \times 10^{-5})$) (Fernández-Carrión R et al., 2021).

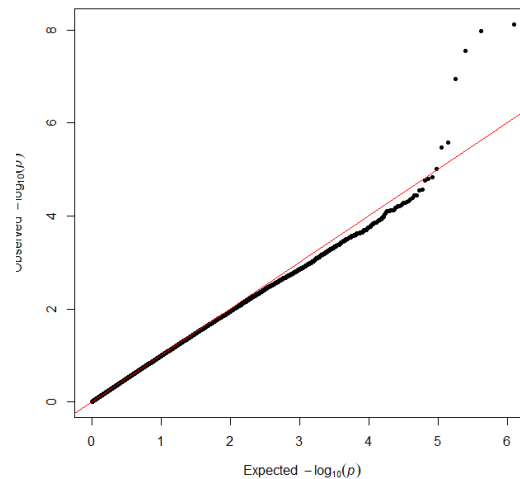


Figura 4.11. Diagrama cuantil-cuantil (QQ) para el GWAS basado en SNP sobre la preferencia de sabor dulce (variable dicotómica) en toda la población

Modelo ajustado por sexo y edad. El Control Genómico (GC) lambda se calculó con base en el percentil 50: $\lambda=1,004$ (Fernández-Carrión R et al., 2021).

Tres SNP en el gen PTPNR2 (Tirosina-proteína fosfatasa N2 de tipo receptor) (rs2091718, $p=7,17 \times 10^{-9}$; rs10256091, $p=9,94 \times 10^{-9}$; y rs5016019, $p=2,61 \times 10^{-8}$) alcanzaron la estadística importancia a nivel de todo el genoma ($p < 5 \times 10^{-8}$). El gen PTPNR2 está ubicado en el cromosoma 7. El MAF para estas variantes fue relativamente alto (0,245, 0,342 y 0,251, respectivamente). El mejor clasificado fue el rs2091718-PTPNR2. La figura 4.12 muestra el gráfico regional para este SNP. Dos genes de micro-ARN estaban cerca de este SNP (MIR595 y MIR5707). En esta figura también consideramos el *valor de p* que sugiere estar cerca del nivel de significancia ($p < 1 \times 10^{-5}$), y tres SNP superaron este nivel marcado, incluidos otros dos SNP en el gen PTPNR2 y un SNP en el gen RNF216P1 (proteína putativa similar a RNF216) ($p < 5 \times 10^{-5}$).

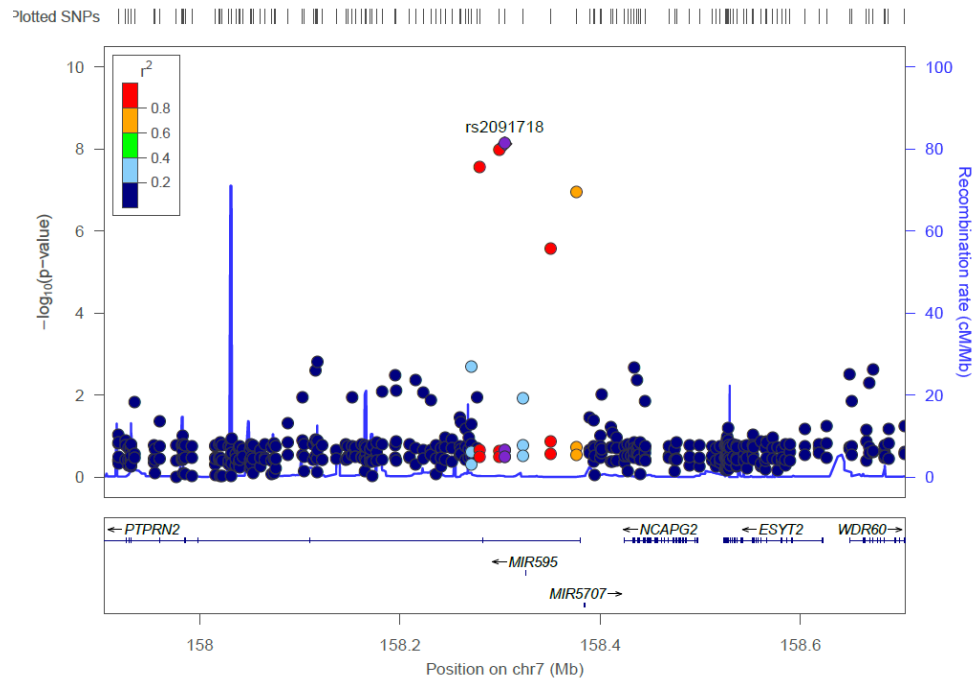


Figura 4.12. Gráfico regional para el SNP principal rs2091718, ubicado en el gen del receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo N2 (PTPRN2), en el cromosoma 7, para la preferencia por el sabor dulce (como variable dicotómica)

Valores de p obtenidos en el modelo de regresión logística ajustados por sexo y edad (Fernández-Carrión R, et al., 2021).

La tabla 4.16. muestra información más detallada sobre los SNP mejor clasificados en el GWAS sobre la preferencia por el sabor dulce, incluida la posición, el efecto (OR), el valor p , el MAF correspondiente y el gen anotado para los SNP. Las estimaciones de la Tabla 4.13. se han ajustado por sexo y edad. Después de este ajuste, el SNP líder, rs2091718-PTPRN2, permaneció asociado estadísticamente con la preferencia por el sabor dulce a nivel de todo el genoma, con el alelo menor relacionado con una baja preferencia por el sabor dulce (OR: 0,35; $p=7,46 \times 10^{-9}$).

Tabla 4.16. SNP mejor clasificados en el GWAS para la preferencia por el sabor dulce (variable categórica) en toda la población

Chr	SNP	BP	OR	P	Alleles	MAF	Strand	Gene
7	rs2091718	158304646	0.347	7.460×10^{-9}	G	0.245	-	PTPRN2

7	rs10256091	158299094	0.352	1.054×10 ⁰⁸	G	0.342	+	PTPRN2
7	rs5016019	158279412	0.364	2.773×10 ⁰⁸	G	0.251	+	PTPRN2
7	rs10275533	158376086	0.399	1.111×10 ⁰⁷	A	0.281	+	PTPRN2
7	rs2335160	158350293	0.445	2.683×10 ⁰⁶	G	0.260	-	PTPRN2
7	rs6463205	5022223	4.078	3.347×10 ⁰⁶	T	0.105	+	RNF216P1
9	rs10963760	18787794	0.480	9.748×10 ⁰⁶	G	0.259	+	ADAMTSL1
2	rs354728	143944775	0.513	1.461×10 ⁰⁵	T	0.206	-	ARHGAP15
17	rs2694130	38747318	0.251	1.560×10 ⁰⁵	T	0.046	+	—
13	rs971604	97068019	3.888	1.710×10 ⁰⁵	T	0.186	+	HS6ST3
2	rs10178148	144000004	0.505	2.759×10 ⁰⁵	G	0.144	+	ARHGAP15
1	rs319978	49067379	0.430	2.796×10 ⁰⁵	T	0.168	-	AGBL4
17	rs8082554	78039867	0.510	3.642×10 ⁰⁵	T	0.181	+	CCDC40
7	rs12667108	5133936	0.419	3.661×10 ⁰⁵	T	0.144	+	—
9	rs10811261	19882156	2.258	4.086×10 ⁰⁵	G	0.384	+	SLC24A2
11	rs3763872	9593427	0.531	4.329×10 ⁰⁵	T	0.406	-	WEE1
21	rs2835220	37367098	1.954	4.769×10 ⁰⁵	C	0.283	+	LOC101928269
14	rs1286470	91059658	0.479	4.955×10 ⁰⁵	C	0.213	-	TTC7B
2	rs10187143	34022970	0.500	5.180×10 ⁰⁵	A	0.326	+	LINC01317

Modelo ajustado por sexo y edad. Chr: Cromosoma. SNP: Polimorfismo de nucleótido único. BP: Posición de base en el cromosoma (construcción del genoma del Homo Sapiens GRCh37.p13 utilizada en Illumina HumanOmniExpress-24 BeadChip). O: odds ratio, indica el efecto del alelo menor sobre la preferencia de sabor. P: valor de p obtenido en el modo de regresión logística multivariable ajustado por sexo y edad para cada SNP utilizando un modelo aditivo genético. MAF: frecuencia alélica menor (Fernández-Carrión R, et al., 2021).

El ajuste adicional para la diabetes (Tabla 4.17) no cambió la significación en el nivel de GWAS para el SNP principal rs2091718-PTPRN2 ($p=2,28 \times 10^{-8}$), lo que muestra una buena consistencia para los otros SNP. Esta es la primera vez que se sugiere que un SNP en el gen PTPRN2 esté asociado con la preferencia por el sabor dulce. Aunque la inflación genómica λ calculada anteriormente indicó poca o ninguna estratificación de la población, además ajustamos el modelo de regresión para los principales componentes principales (PC), incluidos PC1, PC2, PC3 y PC4, como covariables en el modelo ajustado por sexo y edad. La Tabla 4.17 muestra las estimaciones para la Tabla 4.18 después de este ajuste adicional por estratificación de la población. Como era de esperar, según los resultados anteriores de λ , este ajuste adicional no cambió la significación estadística del SNP rs2091718-PTPRN2, que se mantuvo a nivel de todo el genoma. La figura 4.13 muestra el gráfico QQ para este GWAS, incluidas las PC como covariables. Como el valor de λ fue 1.022 y no mejoró el valor de λ sin el ajuste de PC, continuamos usando los modelos sin este ajuste adicional.

Tabla 4.17. SNP mejor clasificados en el GWAS para la preferencia de sabor dulce (variable categórica) en toda la población

Chr	SNP	BP	OR	<i>p</i>	Alleles	MAF	Strand	Gene
7	rs2091718	158304646	0.357	2.282x10 ⁻⁰⁸	G	0.245	-	PTPRN2
7	rs10256091	158299094	0.362	3.299x10 ⁻⁰⁸	G	0.342	+	PTPRN2
7	rs5016019	158279412	0.374	8.312x10 ⁻⁰⁸	G	0.251	+	PTPRN2
7	rs10275533	158376086	0.406	2.355x10 ⁻⁰⁷	A	0.281	+	PTPRN2
7	rs6463205	5022223	4.080	3.784x10 ⁻⁰⁶	T	0.105	+	RNF216P1
7	rs2335160	158350293	0.454	5.349x10 ⁻⁰⁶	G	0.260	-	PTPRN2
9	rs10963760	18787794	0.479	1.053x10 ⁻⁰⁵	G	0.259	+	ADAMTSL1
13	rs971604	97068019	3.938	1.703x10 ⁻⁰⁵	T	0.186	+	HS6ST3
17	rs2694130	38747318	0.257	2.496x10 ⁻⁰⁵	T	0.046	+	intergenic
11	rs3763872	9593427	0.518	2.701x10 ⁻⁰⁵	T	0.406	-	WEE1
21	rs2835220	37367098	2.002	3.190x10 ⁻⁰⁵	C	0.283	+	LOC101928269
7	rs12667108	5133936	0.415	3.553x10 ⁻⁰⁵	T	0.144	+	intergenic
21	rs762364	37406849	2.100	3.622x10 ⁻⁰⁵	G	0.255	+	SETD4
2	rs354728	143944775	0.527	3.726x10 ⁻⁰⁵	T	0.206	-	ARHGAP15
14	rs11157364	44236516	0.536	3.789x10 ⁻⁰⁵	C	0.445	+	intergenic
14	rs1957280	44232069	0.540	3.808x10 ⁻⁰⁵	T	0.444	+	intergenic
10	rs10826596	29585987	2.354	4.005x10 ⁻⁰⁵	G	0.255	+	LYZL1
12	rs7301498	94988487	0.524	4.700x10 ⁻⁰⁵	A	0.362	+	TMCC3
14	rs1286470	91059658	0.478	5.289x10 ⁻⁰⁵	C	0.213	-	TTC7B
1	rs319978	49067379	0.442	5.460x10 ⁻⁰⁵	T	0.168	-	AGBL4
13	rs9562605	32890026	0.510	5.765x10 ⁻⁰⁵	T	0.226	+	BRCA2
2	rs10187143	34022970	0.501	5.957x10 ⁻⁰⁵	A	0.326	+	LINC01317
7	rs6961543	5120148	2.337	5.987x10 ⁻⁰⁵	A	0.207	+	intergenic
21	rs2835223	37369811	0.543	6.397x10 ⁻⁰⁵	G	0.389	+	LOC101928269
2	rs10178148	144000004	0.519	6.674x10 ⁻⁰⁵	G	0.144	+	ARHGAP15
6	rs9490525	123018092	0.516	6.797x10 ⁻⁰⁵	A	0.148	+	PKIB
9	rs10811261	19882156	2.206	6.964x10 ⁻⁰⁵	G	0.384	+	SLC24A2
3	rs2639256	81052987	1.866	7.109x10 ⁻⁰⁵	A	0.388	-	LINC02027
2	rs2556094	160685529	2.706	7.426x10 ⁻⁰⁵	A	0.207	+	LY75-CD302
17	rs8082554	78039867	0.523	7.545x10 ⁻⁰⁵	T	0.181	+	CCDC40
17	rs12451399	43140100	0.462	7.916x10 ⁻⁰⁵	T	0.149	+	DCAKD
17	rs12449933	43137201	0.463	8.176x10 ⁻⁰⁵	T	0.149	+	DCAKD
3	rs17391287	80792633	1.966	8.248x10 ⁻⁰⁵	C	0.271	+	LOC105377177
13	rs238256	42923675	1.906	8.673x10 ⁻⁰⁵	G	0.441	-	intergenic

18	rs4797396	10011664	0.474	8.888x10 ⁻⁰⁵	T	0.196	+	intergenic
21	rs2212917	37381848	0.426	9.137x10 ⁻⁰⁵	A	0.178	+	intergenic
16	rs7192533	60161902	0.543	9.828x10 ⁻⁰⁵	T	0.378	+	intergenic
18	rs4799085	77533722	0.283	1.010x10 ⁻⁰⁴	T	0.168	+	intergenic

Modelo ajustado por sexo, edad y diabetes. Chr: Cromosoma. SNP: Polimorfismo de nucleótido único. BP: Posición de base en el cromosoma (construcción del genoma del Homo Sapiens GRCh37.p13 utilizada en Illumina HumanOmniExpress-24 BeadChip). OR: odds ratio, indica el efecto para el alelo menor sobre la preferencia de sabor dulce. P: Valor de p obtenido en el modelo de regresión logística multivariable ajustado por sexo, edad y diabetes para cada SNP utilizando un modelo aditivo genético. MAF: frecuencia alélica menor (Fernández-Carrión R, et al., 2021).

Tabla 4.18. SNP mejor clasificados en el GWAS para la preferencia de sabor dulce (variable categórica) en toda la población

CHR	SNP	BP	OR	P	Alleles	MAF	Strand	Gene
7	rs2091718	158304646	0.344	7.206x10 ⁻⁰⁹	G	0.245	-	PTPRN2
7	rs10256091	158299094	0.348	1.015x10 ⁻⁰⁸	G	0.342	+	PTPRN2
7	rs5016019	158279412	0.360	2.658x10 ⁻⁰⁸	G	0.251	+	PTPRN2
7	rs10275533	158376086	0.397	1.021x10 ⁻⁰⁷	A	0.281	+	PTPRN2
7	rs2335160	158350293	0.440	2.244x10 ⁻⁰⁶	G	0.260	-	PTPRN2
7	rs6463205	5022223	4.199	3.293x10 ⁻⁰⁶	T	0.105	+	RNF216P1
2	rs354728	143944775	0.507	1.108x10 ⁻⁰⁵	T	0.206	-	ARHGAP15
9	rs10963760	18787794	0.485	1.348x10 ⁻⁰⁵	G	0.259	+	ADAMTSL1
12	rs7301498	94988487	0.508	2.248x10 ⁻⁰⁵	A	0.362	+	TMCC3
17	rs2694130	38747318	0.245	2.500x10 ⁻⁰⁵	T	0.046	+	intergenic
2	rs10178148	144000004	0.503	2.565x10 ⁻⁰⁵	G	0.144	+	ARHGAP15
7	rs12667108	5133936	0.411	2.706x10 ⁻⁰⁵	T	0.144	+	intergenic
11	rs3763872	9593427	0.523	3.021x10 ⁻⁰⁵	T	0.406	-	WEE1
13	rs971604	97068019	3.799	3.153x10 ⁻⁰⁵	T	0.186	+	HS6ST3
9	rs10811261	19882156	2.302	3.236x10 ⁻⁰⁵	G	0.384	+	SLC24A2
14	rs1286470	91059658	0.469	3.608x10 ⁻⁰⁵	C	0.214	-	TTC7B
5	rs6890147	20685297	0.513	4.374x10 ⁻⁰⁵	G	0.409	+	LOC105374676
7	rs6961543	5120148	2.389	4.933x10 ⁻⁰⁵	A	0.207	+	intergenic
17	rs8082554	78039867	0.517	5.295x10 ⁻⁰⁵	T	0.181	+	CCDC40
1	rs319978	49067379	0.441	5.533x10 ⁻⁰⁵	T	0.168	-	AGBL4
10	rs10826596	29585987	2.305	5.798x10 ⁻⁰⁵	G	0.255	+	LYZL1

Modelo ajustado por sexo, edad, diabetes y los cuatro valores propios más altos de PCA componentes principales PC1, PC2, PC3 y PC4. PCA: Análisis de componentes principales. Chr: Cromosoma. SNP: Polimorfismo de nucleótido único. BP: Posición de base en el cromosoma (construcción del genoma del Homo Sapiens GRCh37.p13 utilizada en Illumina HumanOmniExpress-24 BeadChip). O: odds ratio, indica el efecto del alelo menor sobre la preferencia de sabor. P: Valor de p obtenido en el modelo de regresión logística multivariable ajustado por sexo, edad, diabetes y para los cuatro componentes principales (PC) valores propios obtenidos de un ACP donde se calcularon un total de 20 PC. MAF: frecuencia alélica menor (Fernández-Carrión R et al., 2021).

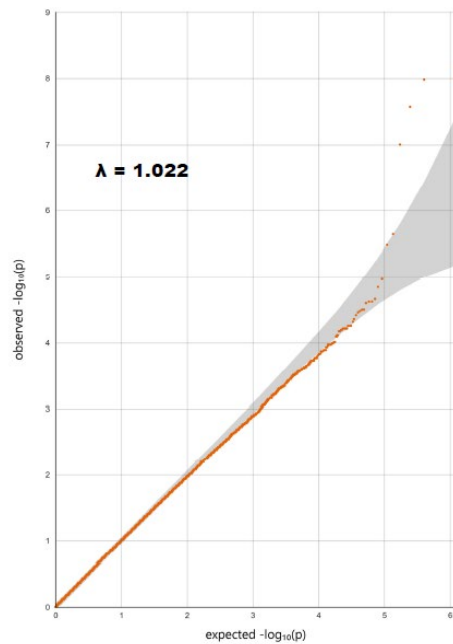


Figura 4.13. Diagrama QQ para el GWAS basado en SNP sobre la preferencia de sabor dulce (variable dicotómica) en toda la población. Modelo ajustado por sexo, edad, diabetes y componentes principales PC1, PC2, PC3 y PC4.

El control genómico (GC) lambda se calculó con base en el percentil 50 y fue 1,022 (Fernández-Carrión R et al., 2021).

Para comprender mejor la funcionalidad de estos SNP y genes relacionados, se realizó un análisis funcional con las herramientas FUMA (Szkiba D et al., 2014; Watanabe K et al., 2017). Las figuras 4.14 y 4.15 muestran el SNP principal rs2091718-PTPRN2 para el modelo ajustado de múltiples variables, su gráfico regional con los LD correspondientes, la puntuación combinada de agotamiento dependiente de la anotación (CADD) para el SNP principal y la región, así como la puntuación Regulome DB. Esta puntuación es una puntuación categórica de 1 a 7, que muestra la probabilidad de funcionalidad para el SNP principal y los SNP relacionados.

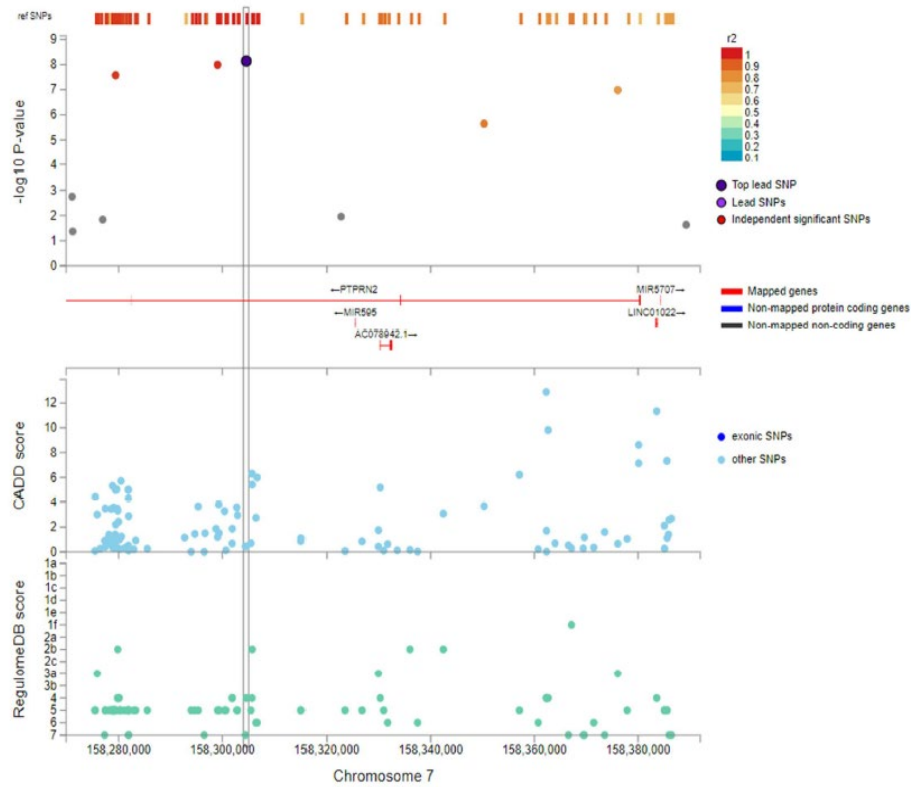


Figura 4.14. Gráfica regional para el SNP PTPRN2-rs2091718 principal, en el cromosoma 7. Cada SNP se colorea en función de r^2

Se muestra la puntuación CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), así como la puntuación Regulome DB (Fernández-Carrión R et al., 2021)

Regulome DB

RegulomeDB Categorical Scores	
Category	Description
	Likely to affect binding and linked to expression of a gene target
1a	eQTL + TF binding + matched TF motif + matched DNase footprint + DNase peak
1b	eQTL + TF binding + any motif + DNase footprint + DNase peak
1c	eQTL + TF binding + matched TF motif + DNase peak
1d	eQTL + TF binding + any motif + DNase peak
1e	eQTL + TF binding + matched TF motif
1f	eQTL + TF binding/DNase peak
	Likely to affect binding
2a	TF binding + matched TF motif + matched DNase footprint + DNase peak
2b	TF binding + any motif + DNase footprint + DNase peak
2c	TF binding + matched TF motif + DNase peak
	Less likely to affect binding
3a	TF binding + any motif + DNase peak
3b	TF binding + matched TF motif
	Minimal binding evidence
4	TF binding + DNase peak
5	TF binding or DNase peak
6	Motif hit
	No binding evidence
7	No evidence
NA	the variant does not exist in RegulomeDB

Figura 4.15. Puntuación Regulome DB para el SNP PTPRN2-rs2091718

La puntuación de Regulome DB es una puntuación categórica de 1 a 7: donde el valor 1 significa que es más probable que esos SNP afecten a los elementos regulatorios (Watanabe K et al., 2017; Fernández-Carrión R et al., 2021).

Con base en los genes cercanos y el SNP líder en la gráfica regional (figuras 4.14 y 4.15), obtuvimos con FUMA un mapa de calor de expresión génica usando el conjunto de datos GTExV8 (54 tipos de tejido) y mostrando la expresión promedio por etiqueta ($\log_2$ transformado) (figura 4.16). Este análisis funcional reveló hallazgos interesantes para el gen PTPRN2. Este gen se expresa ampliamente en los tejidos cerebrales, principalmente en la corteza cerebral. Además, se expresa en la glándula salival menor y los tejidos del estómago.

Se realizó un análisis de GWAS basado en genes para la preferencia por el sabor dulce, en la figura 5 se muestra el gráfico de Manhattan para el GWAS exploratorio basado en genes vinculados a la preferencia por el sabor dulce (variable dicotómica) en el modelo ajustado por sexo y edad. En este enfoque, los SNP de cada gen se consideraron al mismo tiempo utilizando MAGMA (de Leeuw CA et al., 2015). La figura 4.17 muestra el gráfico QQ para este GWAS basado en genes.

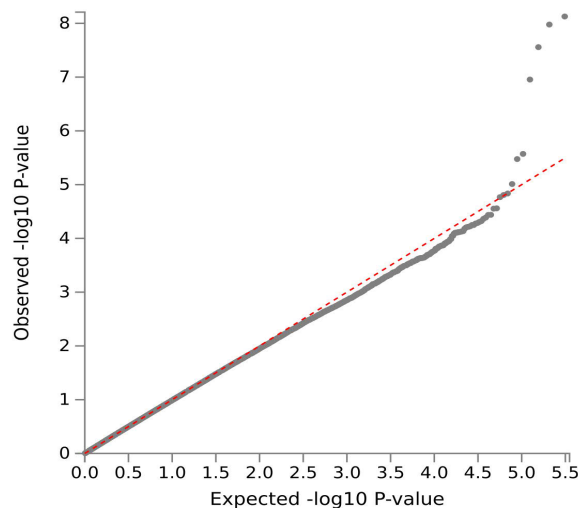


Figura 4.17. Gráfica Q-Q para el GWAS basado en genes en la preferencia de sabor dulce (ajustado por sexo y edad), obtenida usando FUMA (Watanabe K et al., 2017; Fernández-Carrión R et al., 2021).

Aquí, los valores de p para la significancia estadística a nivel de todo el genoma son diferentes de los GWAS basados en SNP: siendo $p < 2,7 \times 10^{-6}$ y $p < 1 \times 10^{-4}$ para la significación de GWAS basada en genes y para el sugerente nivel, respectivamente. En la figura 4.18, la línea roja indicaba el $-\log_{10}$ (valor p) en la significación estadística GWAS basada en genes, y la línea verde, el nivel de asociación sugerente. Estos resultados en el nivel basado en genes son consistentes con nuestros GWAS basados en SNP para el gen PTPRN2. Este gen aparece como el segundo gen mejor clasificado en $p = 1,88 \times 10^{-5}$ (nivel de significancia sugestivo). El primer gen mejor clasificado (también en el nivel de significación sugerente) fue el gen AP000688.1 ($p = 6,23 \times 10^{-6}$) en el cromosoma 21. Este gen corresponde a un ARN no codificante largo y tiene un tamaño relativamente pequeño. tamaño en comparación con el gen PTPRN2. Otros genes que alcanzaron el nivel de GWAS basado en genes sugerentes fueron: SETD4 (dominio SET que contiene 4) y LYSL2 (lisozima similar a 2). Los SNP en estos genes también se encontraban entre los primeros clasificados en el GWAS basado en SNP (tabla 4.18).

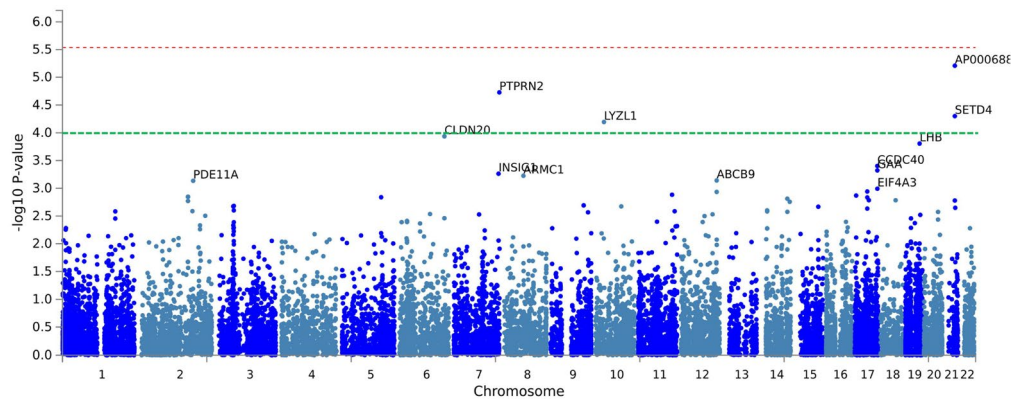


Figura 4.18. Manhattan plot para el análisis GWAS para la preferencia por el sabor dulce (como variable dicotómica) en toda la población utilizando un enfoque basado en genes (ajustado por sexo y edad).

Utilizamos MAGMA para los cálculos en la plataforma FUMA. Se anotaron los genes mejor clasificados. La línea roja en 5,56 representa el umbral 1 ($-\log_{10}(2,7 \times 10^{-6})$) para el análisis del conjunto de genes teniendo en cuenta la estricta corrección de Bonferroni. Asimismo, la línea verde en 4,00 representa el umbral 2 ($-\log_{10}(1 \times 10^{-4})$).

La tabla 4.19 muestra la información detallada de los genes mejor clasificados que se muestran en el Manhattan plot basado en genes, que indica la ubicación, el tamaño y el valor p . El gen PTPRN2 aparece como el segundo gen mejor clasificado en $p=1,88 \times 10^{-5}$, en el modelo ajustado por sexo y edad. El ajuste adicional del modelo para la diabetes no cambió el nivel de significancia para el gen PTPRN2 ($p=3,94 \times 10^{-5}$).

Tabla 4.19. Los genes mejor clasificados en el GWAS basado en genes que usan MAGMA (de Leeuw CA et al., 2015; Watanabe K et al., 2017) y calcular el valor p a nivel de gen para la preferencia de sabor dulce en toda la población

Symbol	Gene (ENSEMBL ID)	Chr	Start	Stop	Size (bp)	p
AP000688.1	ENSG00000268098	21	37402368	37417818	15450	6.229×10^{-6}
PTPRN2	ENSG00000155093	7	157331750	158380480	1048730	1.878×10^{-5}
SETD4	ENSG00000185917	21	37406839	37451687	44848	5.007×10^{-5}
LYZL1	ENSG00000120563	10	29577990	29607257	29267	6.385×10^{-5}
CLDN20	ENSG00000171217	6	155585147	155597682	12535	1.156×10^{-4}
LHB	ENSG00000104826	19	49519237	49520338	1101	1.558×10^{-4}
CCDC40	ENSG00000141519	17	78010435	78074412	63977	3.966×10^{-4}
GAA	ENSG00000171298	17	78075355	78093678	18323	4.766×10^{-4}
INSIG1	ENSG00000186480	7	155089486	155101945	12459	5.471×10^{-4}
ARMC1	ENSG00000104442	8	66514694	66546442	31748	5.964×10^{-4}
ABC9	ENSG00000150967	12	123405498	123466196	60698	7.233×10^{-4}
PDE11A	ENSG00000128655	2	178487980	178973066	485086	7.334×10^{-4}

Chr: Cromosoma. START: Posición de la base en el cromosoma (construcción del genoma del Homo Sapiens GRCh38) donde comienza el gen. STOP: Posición de la base en el cromosoma (construcción del genoma del Homo Sapiens GRCh38) donde termina el gen. TAMAÑO (SIZE): tamaño del gen en pares de bases (pb), calculado como STOP - START. P: Valores de p obtenidos por MAGMA en el análisis de conjuntos de genes ajustados por sexo y edad. Para la significación estadística, 2.7×10^{-6} se considera el nivel de evidencia significativa en el análisis a nivel de gen. Del mismo modo, $p < 1 \times 10^{-4}$ se considera como el nivel sugestivo de asociación basada en genes (Fernández-Carrión R et al., 2021).

El análisis funcional, que consiste en el mapa de calor de la expresión génica basado en el conjunto de datos GTE×v8 (54 tipos de tejido) (Watanabe K et al., 2017), para el gen PTPRN2 y otros genes mejor clasificados (figura 4.19), mostró que el PTPRN2, ampliamente expresado en Los tejidos cerebrales, principalmente en la corteza cerebral y el hipotálamo cerebral, tienen un perfil de expresión génica similar al del gen SETD4, y ambos difieren del gen LYZL2.

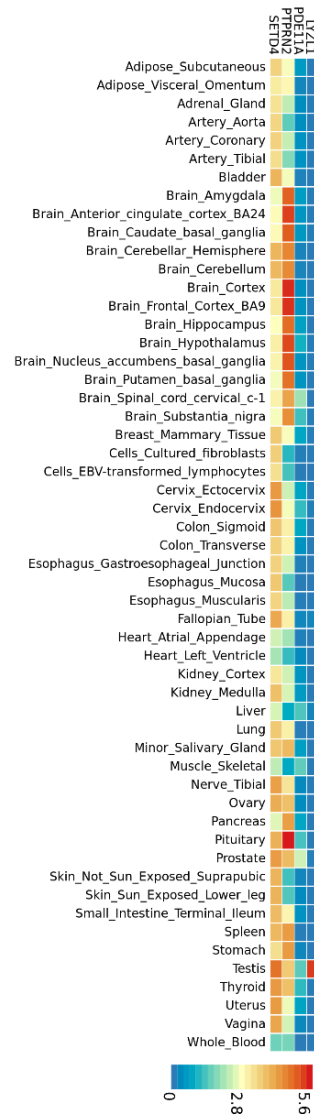


Figura 4.19. Mapa de calor de expresión génica basado en el conjunto de datos GTExV8 (54 tipos de tejidos) (expresión promedio por etiqueta) para la expresión del gen *PTPRN2* y tres genes mejor clasificados obtenidos del GWAS basado en genes sobre la preferencia de sabor dulce (variable dicotómica).

Se utilizó la herramienta FUMA-GENE2FUNC (Watanabe K et al., 2017; Fernández-Carrión R et al., 2021).

4.4.6.2 GWAS para factor 2

Además, llevamos a cabo un GWAS exploratorio basado en SNP en las puntuaciones factoriales (como una variable continua) para el Factor 2, para analizar las variantes genéticas que están asociadas con la preferencia por el sabor dulce, pero también considerando las preferencias por otros sabores. Se ha identificado que el factor 2 tiene una preferencia alta por el sabor dulce, seguido de umami, y una preferencia baja por los sabores amargo y agrio. La tabla 4.20 muestra los resultados de este GWAS en un modelo ajustado por sexo y edad. El SNP principal (rs2694130) tiene un MAF pequeño y no alcanzó el valor p de importancia GWAS. Lo que es más importante, varios SNP en el gen PTPRN2 se encontraban entre los SNP mejor clasificados (el rs5016019-PTPRN2 con $p=9,16 \times 10^{-6}$; rs2091718-PTPRN2 con $p=2,01 \times 10^{-5}$), lo que sugiere una relevancia adicional de este gen en la preferencia por el sabor dulce.

Tabla 4.20. SNP mejor clasificados en el GWAS para el factor 2 (etiquetado como "sabor dulce/umami") en toda la población

Chr	SNP	BP	Beta	p	Alleles	MAF	Strand	Gene
17	rs2694130	38747318	-0.728	9.647×10^{-07}	T	0.0459	+	intergenic
18	rs4799085	77533722	-0.738	9.952×10^{-07}	T	0.1675	+	intergenic
9	rs4484780	88860820	0.348	3.126×10^{-06}	C	0.3257	+	C9orf153
9	rs10118760	88854546	0.349	3.676×10^{-06}	T	0.3129	+	C9orf153
3	rs7642458	80859757	0.323	4.092×10^{-06}	A	0.4177	+	intergenic
3	rs17391287	80792633	0.335	6.769×10^{-06}	C	0.2708	+	LOC105377177
9	rs7848944	88859144	0.335	7.495×10^{-06}	C	0.4022	+	C9orf153
7	rs1229670	26447021	-0.922	7.861×10^{-06}	G	0.1416	+	LOC107983953
16	rs237142	26646032	0.317	8.770×10^{-06}	A	0.4411	+	intergenic
7	rs5016019	158279412	-0.369	9.156×10^{-06}	G	0.2512	+	PTPRN2
9	rs2224954	17771828	0.317	9.471×10^{-06}	C	0.4639	+	SH3GL2
9	rs4302941	17772909	0.310	1.108×10^{-05}	A	0.4609	+	SH3GL2
20	rs394732	52675188	-0.319	1.257×10^{-05}	G	0.4239	+	BCAS1
8	rs13278035	49509249	-0.651	1.265×10^{-05}	G	0.0627	+	LOC101929268
13	rs7323695	102113468	-1.236	1.275×10^{-05}	A	0.1192	+	ITGBL1
2	rs2136492	221704949	-0.737	1.334×10^{-05}	C	0.0078	-	LOC107985988
3	rs10511108	80714827	0.328	1.405×10^{-05}	C	0.2310	-	LOC105377177
14	rs8020310	74494437	-0.482	1.417×10^{-05}	G	0.1548	+	BBOF1

19	rs10221473	7236626	-0.304	1.439x10 ⁻⁰⁵	A	0.4884	+	INSR
5	rs2569235	171897090	0.308	1.475x10 ⁻⁰⁵	C	0.3564	-	intergenic
10	rs10902892	124949389	-1.553	1.489x10 ⁻⁰⁵	C	0.2200	+	LOC107984275
7	rs10275533	158376086	-0.343	1.647x10 ⁻⁰⁵	A	0.2810	+	PTPRN2
5	rs4091221	163713876	-0.320	2.006x10 ⁻⁰⁵	T	0.1697	+	intergenic
7	rs2091718	158304646	-0.355	2.007x10 ⁻⁰⁵	G	0.2454	-	PTPRN2
8	rs4733210	30816027	0.493	2.181x10 ⁻⁰⁵	G	0.3125	+	intergenic
3	rs13086426	80839513	0.320	2.239x10 ⁻⁰⁵	A	0.2312	+	intergenic
9	rs1886589	17761379	-0.292	2.348x10 ⁻⁰⁵	C	0.4549	+	SH3GL2
18	rs3018270	47447780	-0.316	2.478x10 ⁻⁰⁵	C	0.4305	+	MYO5B
7	rs10256091	158299094	-0.351	2.523x10 ⁻⁰⁵	G	0.3421	+	PTPRN2

Modelo aditivo ajustado por sexo y edad. Chr: Cromosoma. SNP: Polimorfismo de nucleótido único. BP: Posición de base en el cromosoma (construcción del genoma del Homo Sapiens GRCh37.p13 utilizada en Illumina HumanOmniExpress-24 BeadChip). BETA: indica el efecto para el alelo menor en la variable Factor 2 para la preferencia de sabor dulce. P: Valor *de p* obtenido en el modelo de regresión lineal general multivariable ajustado por sexo y edad mediante un modelo aditivo genético. MAF: frecuencia alélica menor (Fernández-Carrión R et al., 2021).

4.4.7 Asociación de rs2091718-PTPRN2 SNP con variables de preferencia de sabor dulce y otras variables relacionadas

Una vez que se identificó el polimorfismo rs2091718-PTPRN2 como el SNP líder en el GWAS basado en SNP para la variable dicotómica para la preferencia por el sabor dulce en el modelo de regresión logística, analizamos esta asociación en profundidad con otras variables de preferencia por el sabor dulce y rasgos relacionados. Para este SNP, las frecuencias genotípicas (A>G) fueron: 58,8% AA, 36,0% ácidos grasos y 5,1% GG; y estaba en un alto equilibrio de Hardy-Weinberg en esta muestra ($p=0,625$).

La figura 4.20 muestra las medias ajustadas para la preferencia por el sabor dulce como variable continua (panel A) y las puntuaciones factoriales ajustadas para el Factor 2 (panel B), dependiendo del SNP rs2091718-PTPRN2 en un modelo ajustado por sexo, edad, diabetes, IMC, tabaquismo, actividad física, horas de sueño y adherencia a la dieta mediterránea. Para ambas variables, se encontraron asociaciones estadísticamente significativas altas, lo que agrega consistencia a los hallazgos de GWAS.

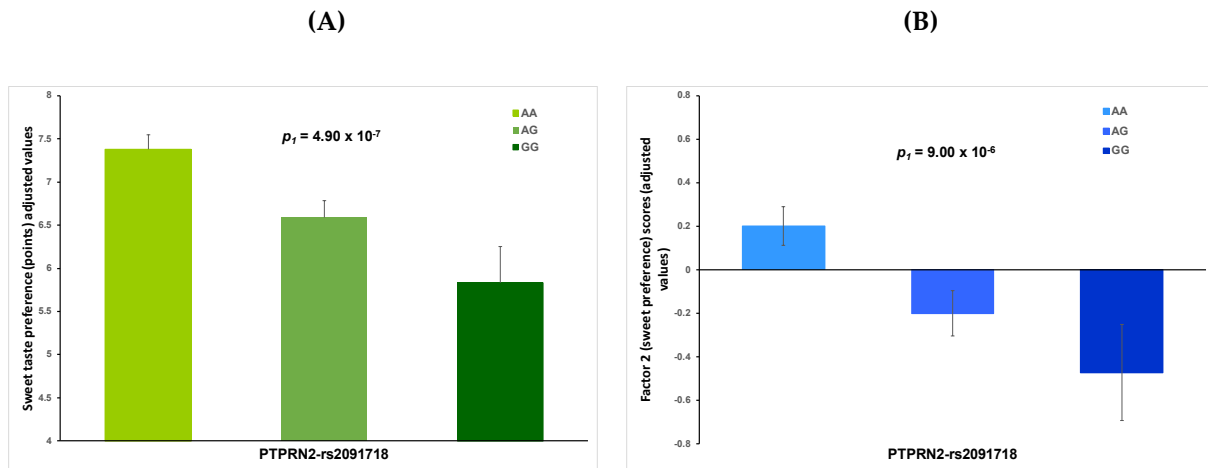


Figura 4.20. Medias ajustadas para la preferencia por el sabor dulce (Panel (A): usando la variable de preferencia por el sabor dulce como continua; y Panel (B): usando las puntuaciones del factor 2) dependiendo del SNP principal rs2091718, ubicado en el receptor de la proteína tirosina fosfatasa gen tipo N2 (PTPRN2) en toda la población.

Las medias ajustadas y los valores de p (p_1) se han obtenido en un modelo de regresión lineal general ajustado por sexo, edad, diabetes, IMC, tabaquismo, actividad física, horas de sueño por noche y adherencia a la dieta mediterránea. La frecuencia del alelo menor (MAF) es de 0,24 para el alelo G en esta población. Prevalencia de genotipos: AA (58,1%); AG (38,8%); y GG (5,1%).

Además, cuando examinamos la asociación entre el SNP rs2091718-PTPRN2 y la preferencia por el sabor dulce, según el estado de la diabetes, obtuvimos resultados estadísticamente significativos ($p < 0,01$) tanto en sujetos no diabéticos como diabéticos tipo 2 (no se muestra).

Por último, analizamos si el SNP rs2091718-PTPRN2 estaba asociado con la prevalencia de diabetes en esta población. Utilizando un modelo genético aditivo, el alelo G menor se asoció con una menor probabilidad de ser un sujeto con diabetes, tanto en el modelo bruto (OR: 0,70; IC del 95 %: 0,50–0,97, $p=0,034$) como en incluso tras ajuste multivariable por sexo, edad, IMC, tabaquismo, actividad física, horas de sueño y adherencia a la dieta mediterránea (OR: 0,69; IC95%: 0,49–0,97, $p=0,032$).

4.4.8 Asociaciones entre la preferencia y la percepción por el sabor dulce y el consumo de edulcorantes en participantes PREDIMED-Plus Valencia

También se determinó en cuanto al consumo de edulcorantes, los cuales anotábamos si eran consumidos y qué tipo se consumía generalmente de ellos, en el apartado de alimentos adicionales que no se encuentran en el listado de ítems del cuestionario de frecuencia de alimentos (CFCA), que se realizaba en todas las visitas anuales a los participantes del estudio PREDIMED-Plus. Estos resultados se presentaron como comunicación oral en el congreso organizado por el Centre Català de la Nutrició de L'Institut d'Estudis Catalans (CCNIEC) en Barcelona en 2021. El uso añadido de edulcorantes bajos en calorías a los alimentos fue reportado por el 47,9%, siendo similar en hombres y en mujeres ($p=0.053$). Este valor fue significativamente superior en participantes diabéticos que en no-diabéticos (59,3% vs 40,4%; $p<0,001$). Sin embargo, no se detectaron diferencias según la media de IMC entre los consumidores de edulcorantes y los no-consumidores (32,3 vs 32,3 kg/m²; $p=0.895$). Tampoco se observó una asociación estadísticamente significativa entre la capacidad de percepción del sabor dulce y el uso de edulcorantes, aunque sí que se detectó una asociación significativa entre la preferencia por el sabor dulce y el uso de edulcorantes. Esta asociación se mostraba aún más significativa en mujeres no-diabéticas (mostrando un mayor uso en las participantes que prefieren más el sabor dulce; $p<0.05$ en un modelo).

4.4.9 Asociación entre las preferencias por sabores en esta población mediterránea PREDIMED-Plus Valencia y las preferencias por alimentos y perfiles de sabor publicadas en participantes en el UK Biobank

En el congreso celebrado este año 2022, celebrado por el Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Obesidad y Nutrición, en Barcelona, se presentaron los resultados más recientes obtenidos de los genes identificados en el GWAS realizados en nuestra población mediterránea de estudio, con la percepción de sabores y preferencia de los mismos, así como el consumo de determinados alimentos en el UK Biobank. La preferencia por el sabor salado en nuestra población mostró gran asociación con el SNP rs10767910-RCN1

($p=0.006$), que se asociaba a la preferencia de consumo de vegetales, por otra parte, el SNP rs10502967-DCC ($p=0.027$), que se asociaba con el consumo de sal en la muestra de testar de UK Biobank (tabla 4.21).

Tabla 4.21. Asociaciones estadísticamente significativas entre la preferencia de sabor salado en población mediterránea y en población UK Biobank

CHR	SNP	BETA	P	ALLELES	MAF	MAIN TRAIT	TRAIT GENE
11	rs10767910	-0.332	0.0061	G	0.3548	F-Strong vegetables	RCN1
18	rs10502967	-0.242	0.0274	T	0.4083	F-Salty	DCC
19	rs4420638	-0.456	0.0282	G	0.1510	F-Dessert	APOE

Los modelos fueron ajustados por sexo, edad y diabetes

La preferencia por el sabor amargo en nuestra población se asoció al SNP rs1051101-FOXP1 ($p=0.02$), que se vinculaba al consumo de alimentos amargos en la muestra de participantes del UK Biobank. Similar a estos resultados los encontramos con la preferencia por el sabor ácido, que se asociaba al SNP rs7815300-PEBP4 ($p=0.006$) (tabla 4.22), que se asociaba con la preferencia por los pepinillos en vinagre de la muestra UK Biobank.

Tabla 4.22. Asociaciones estadísticamente significativas entre la preferencia de sabor ácido en población mediterránea y en población UK Biobank

CHR	SNP	BETA	P	ALLELES	MAF	MAIN TRAIT	TRAIT GENE
8	rs7815300	0.5786	0.0062	G	0.1182	Gherkins	PEBP4
3	rs1375547	0.488	0.0102	A	0.1086	F-Coffee/Alcohol	CADM2
18	rs7241775	0.401	0.0107	T	0.4319	Banana	CBLN2
20	rs6135558	0.3556	0.0156	A	0.4537	F-Glutamates	MACROD2
1	rs10789340	-0.383	0.0164	A	0.3231	Porridge	NEGR1
1	rs3101336	-0.361	0.0266	T	0.3249	F-Healthy breakfast	NEGR1

Los modelos fueron ajustados por sexo, edad y diabetes

Las preferencias por alimentos dulces y umami se asociaron con resultados menos consistentes. Curiosamente, con el objetivo de analizar estos resultados seleccionando alimentos más específicamente para ver las respuestas de preferencia entre nuestra población y la muestra del UK Biobank, observamos que, eligiendo como alimentos representativos de estos sabores, minimizando los

resultados de múltiples respuestas, chocolate para dulce, salchichas para el umami, y limón para el ácido (tabla 4.23), fueron muy pocos los SNPs de preferencia de sabores los que coincidían entre ambas poblaciones, por ejemplo, los SNPs que en nuestra población se asociaban a la preferencia por el chocolate, en población de la muestra de UK Biobank, mostraban más preferencia por los champiñones y otras setas, los alimentos salados, las olivas negras y los dulces, por lo que es necesario realizar más investigaciones en cada población ya que la mayoría de las asociaciones parecen ser específicas de población.

Tabla 4.23. Asociaciones estadísticamente significativas entre la preferencia de sabor ácido en población mediterránea y en población UK Biobank

CHR	SNP	BETA	P	ALLELES	MAF	MAIN TRAIT	TRAIT GENE
1	rs10789340	-0.504	0.0017	A	0.3231	Porridge	NEGR1
8	rs10216533	0.460	0.0022	A	0.4036	Cake icing	PSCA
7	rs10249294	-0.460	0.0030	A	0.4720	Plums	OR6B1
1	rs3101336	-0.436	0.0076	T	0.3249	F-Healthy breakfast	NEGR1
15	rs306198	-0.400	0.0144	G	0.1514	F-Capsicum	ALPK3
3	rs10511014	-0.360	0.0233	G	0.3119	Bitter foods	FOXP1
14	rs17277081	-0.303	0.0427	T	0.4273	Horseradish/wasabi	OR4K17

Los modelos fueron ajustados por sexo, edad y diabetes

4.5 Variaciones epigenéticas por consumo de tabaco en pacientes PREDIMED-Plus Valencia y efecto de la adherencia a la dieta mediterránea

4.5.1 Variaciones epigenéticas por consumo de tabaco

En toda la población, la prevalencia de nunca fumadores, antiguos fumadores y los que actualmente fumaban fue de 45,4%, 43,0% y 11,6%, respectivamente. Además, se consideraron tres tipos de exfumadores en función del tiempo transcurrido desde el abandono (más de 5 años, entre 5 y 1 años y menos de 1 año). Hubo diferencias estadísticamente significativas por sexo ($p < 0,001$), con hombres con mayor proporción de fumadores actuales (16,1%) que mujeres

(7,9%); $p < 0,001$. La cantidad de cigarros fumados por día y la duración del tabaquismo no difirieron significativamente según el sexo ($p < 0,05$) en los fumadores actuales (tabla 4.24).

Tabla 4.24. Características demográficas, clínicas y de estilo de vida de la población estudiada según sexo

	Total (n=414)	Men (n=186)	Women (n=228)	<i>p</i>
Age (years)	65.1±0.2	63.8±0.4	66.1±0.3	<0.001
BMI (Kg/m ²)	32.3±0.2	32.2±0.3	32.4±0.2	0.440
SBP (mm Hg)	141.9±0.9	143.7±1.4	140.5±1.2	0.076
DBP (mm Hg)	81.0±0.5	82.6±0.7	79.6±0.6	0.002
Total cholesterol (mg/dL)	195.7±1.8	188.1±2.8	202.0±2.3	<0.001
LDL-C (mg/dL)	124.3±1.5	121.5±2.4	126.6±1.9	0.096
HDL-C (mg/dL)	51.6±0.6	47.3±0.8	55.1±0.7	<0.001
Triglycerides ¹ (mg/dL)	141.3±2.9	139.0±4.0	143.1±4.2	0.488
Fasting glucose (mg/dL)	113.4±1.4	113.7±2.2	113.2±1.8	0.875
Physical activity (MET·min/wk)	1708±78	1941±133	1519±89	0.007
Adherence to MedDiet (17-I) ²	8.0±2.8	7.9±2.8	8.1±2.7	0.210
High Adherence MedDiet ³ (≥9) (n, %)	172 (41.5)	75 (40.3)	97 (42.5)	0.648
Type 2 diabetes (n, %)	164 (39.6)	75 (40.3)	89 (39.0)	0.790
Never smokers (n, %)	188 (45.4)	32 (17.2)	156 (68.4)	<0.001
Former smokers (> 5 years) (n, %)	139 (33.6)	97 (52.2)	42 (18.4)	<0.001
Former smokers (1 to 5 years) (n, %)	25 (6.0)	16 (8.6)	9 (3.9)	<0.001
Former smokers (< 1 year) (n, %)	14 (3.4)	11 (5.9)	3 (1.3)	<0.001
Current smokers (n, %)	48 (11.6)	30 (16.1)	18 (7.9)	<0.001
Number of cigarettes smoked per day ⁴	13.2±1.1	14.4±1.6	11.3±1.4	0.186
Number of years smoked ⁴	38.0±1.6	39.1±2.1	36.3±2.6	0.428
Number of pack-years ^{4,5}	24.9±2.4	27.9±3.4	19.9±2.4	0.105

Los valores son media±SE para variables continuas y número (%) para variables categóricas. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; LDL-C: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; HDL-C: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; MET: equivalente metabólico. 1 MET es equivalente a kcal x kg⁻¹ x h⁻¹, el gasto de oxígeno de sentarse tranquilamente medido como 3.5 ml/kg/min.; min: minuto; WK: Semana; P: valor p para las comparaciones (medias o %) entre hombres y mujeres. Se utilizó la prueba t de Student para comparar medias y pruebas de Chi cuadrado para comparar categorías. 1. Los triglicéridos se transformaron para pruebas estadísticas. 2. Cuestionario cuantitativo de 17 ítems (17-I) para la adherencia a la dieta mediterránea. 3. En alta adherencia a dieta mediterránea (cuando las puntuaciones en cuestionario son ≥9 puntos). 4. En fumadores actuales. 5. Paquete-años = (Número de cigarrillos fumados por día / 20) x número de años que el participante ha fumado.

Para iniciar los análisis y determinar la posible asociación entre el tabaquismo (5 niveles) y su metilación en todo el epigenoma, inicialmente se consideraron 5 niveles de tabaquismo (nunca, exfumador >5 años, exfumadores entre 5-1 años, exfumadores de <1 año y fumadores actuales) como una variable cuantitativa y analizamos las firmas de metilación del ADN del tabaquismo en un EWAS utilizando la matriz de metilación EPIC 850K. Los modelos se ajustaron por sexo, edad, *batch effect*, IMC, diabetes y recuento de células leucocitarias. La figura 4.21 muestra el Manhattan plot correspondiente a los valores p ajustados para cada isla CpG analizada (valores M) en el EWAS. Varios sitios de CpG metilados diferencialmente superaron el umbral de significación de todo el epigenoma $p < 9 \times 10^{-8}$ (Mansell G et al., 2019). La figura 4.22 muestra el gráfico QQ correspondiente a este EWAS.

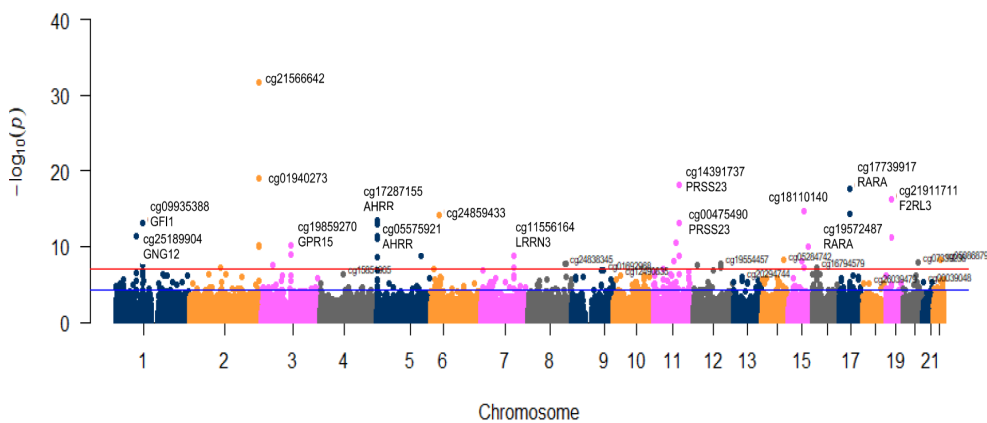


Figura 4.21. Manhattan plot de asociaciones de epigenoma completo (EWAS) para el tabaquismo (5 niveles) ajustado por covariables en toda la muestra. La línea roja representa el nivel de significancia EWAS $p = 9 \times 10^{-8}$. La línea azul representa $p = 1 \times 10^{-5}$

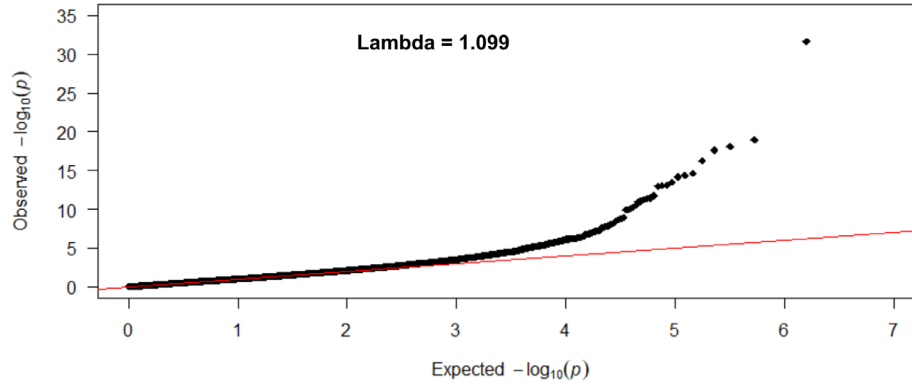


Figura 4.22. Gráfico cuantil-cuantil (QQ) para la asociación del sitio CpG en el EWAS para fumar (5 niveles).

No se observó inflación de señales en este estudio ($\lambda=1,099$). La Tabla 4.25 proporciona información obtenida en el EWAS sobre los sitios CpG metilados diferencialmente, los genes, los valores p corregidos y los coeficientes de regresión parcial obtenidos para las posiciones estadísticamente significativas con mayor significación estadística ($n = 46$).

Tabla 4.25. Las CpG metiladas diferencialmente superiores para el tabaquismo (5 niveles)

CpG site	Gene Symbol	Chr	Position	Included in 450K ³	p	r
cg21566642		2	233284661	Y	2.20E-32	-0.548
cg01940273		2	233284934	Y	1.02E-19	-0.435
cg14391737	PRSS23	11	86513429	N	8.13E-19	-0.425
cg17739917	RARA	17	38477572	N	2.30E-18	-0.420
cg21911711	F2RL3	19	16998668	N	6.15E-17	-0.403
cg18110140		15	75350380	N	2.12E-15	-0.384
cg19572487	RARA	17	38476024	Y	4.26E-15	-0.381
cg24859433		6	30720203	Y	6.33E-15	-0.378
cg17287155	AHRR	5	393347	Y	2.94E-14	-0.370
cg00475490	PRSS23	11	86517110	N	7.08E-14	-0.364
cg09935388	GFI1	1	92947588	Y	8.22E-14	-0.363
cg05575921	AHRR	5	373378	Y	1.00E-13	-0.362
cg15342087		6	30720209	Y	1.78E-12	-0.344
cg04551776	AHRR	5	393366	Y	3.50E-12	-0.340
cg25189904	GNG12	1	68299493	Y	4.27E-12	-0.339

cg03636183	F2RL3	19	17000585	Y	6.36E-12	-0.336
cg26703534	AHRR	5	377358	Y	9.58E-12	-0.334
cg25648203	AHRR	5	395444	Y	1.08E-11	-0.333
cg01901332	ARRB1	11	75031054	Y	3.21E-11	-0.325
cg27241845		2	233250370	Y	5.77E-11	-0.321
cg19859270	GPR15	3	98251294	Y	8.02E-11	-0.319
cg16841366		2	233286192	N	1.04E-10	-0.317
cg23161492	ANPEP	15	90357202	Y	1.17E-10	-0.316
cg02978227		3	98292027	N	1.04E-09	-0.300
cg11660018	PRSS23	11	86510915	Y	1.44E-09	-0.298
cg14580211	C5orf62	5	150161299	Y	1.66E-09	-0.297
cg11556164	LRRN3	7	110738315	Y	2.00E-09	-0.296
cg12806681	AHRR	5	368394	Y	2.96E-09	-0.293
cg05086879	MGAT3	22	39861490	N	4.79E-09	-0.289
cg05284742	ITPK1	14	93552128	Y	6.54E-09	-0.286
cg17738628		15	67155520	N	7.50E-09	-0.285
cg21611682	LRP5	11	68138269	Y	8.72E-09	-0.284
cg07339236	ATP9A	20	50312490	Y	1.35E-08	-0.281
cg24838345	MTSS1	8	125737353	Y	1.54E-08	-0.280
cg19554457	NUDT4	12	93774772	Y	1.61E-08	-0.279
cg25305703		8	128378218	Y	1.87E-08	-0.278
cg04535902	GFI1	1	92947332	Y	2.30E-08	-0.276
cg09945032		3	38871019	N	2.59E-08	-0.275
cg07986378	ETV6	12	11898284	Y	2.79E-08	-0.275
cg08714510	UXS1	2	106755481	N	5.78E-08	-0.268
cg15533935	NUDT4P2	12	93774767	N	6.20E-08	-0.268
cg16794579	XYLT1	16	17562419	Y	6.28E-08	-0.268
cg00310412	SEMA7A	15	74724918	Y	7.04E-08	-0.267
cg05221370	LRRN3	7	110738836	Y	7.13E-08	-0.267
cg15394081	LMO2	11	33893330	N	8.31E-08	-0.265
cg06321596	XYLT1	16	17562960	Y	8.61E-08	-0.265

1 clasificadas por el valor p más pequeño después del ajuste multivariado. 1. Se consideraron cinco niveles de tabaquismo como variable ordinal: nunca fumador, ex fumador, fumador > 5 años, ex fumador de 1 a 5 años, ex fumador < 1 año y fumador actual. 2. Los modelos se ajustaron por sexo, edad, diabetes, índice de masa corporal, efecto de lote y tipos de células leucocitarias (n = 414). 3. Indica si la CpG estaba presente (Y) o no (N) en la matriz de metilación Illumina 450K. Chr: cromosoma; p: Valores p ajustados multivariantes; R: coeficiente de correlación parcial.

Observamos una tendencia lineal, de nunca fumadores a fumadores anteriores y actuales, de disminución de la metilación en los cinco niveles de tabaquismo definidos para estos 46 sitios de CpG. La información adicional que indica si el sitio CpG estaba presente o no en la matriz Illumina 450K muestra que solo 13 CpG fueron perfiladas por la matriz EPIC 850K. La asociación más fuerte se observó en cg21566642 ($p=2,2 \times 10^{-32}$). Este sitio CpG (representado tanto en la matriz 450K como en la matriz EPIC 850K) es intergénico y se encuentra en la región 2q37.1 cerca del gen de la fosfatasa alcalina, placentaria 2 (ALPPL2). La figura 4.23 muestra los diagramas de caja de los valores beta de metilación

correspondientes para el sitio cg21566642 según el tipo de relación con el tabaquismo (5 niveles) que revelan la asociación dosis-respuesta entre el fenotipo de tabaquismo y la hipometilación del ADN.

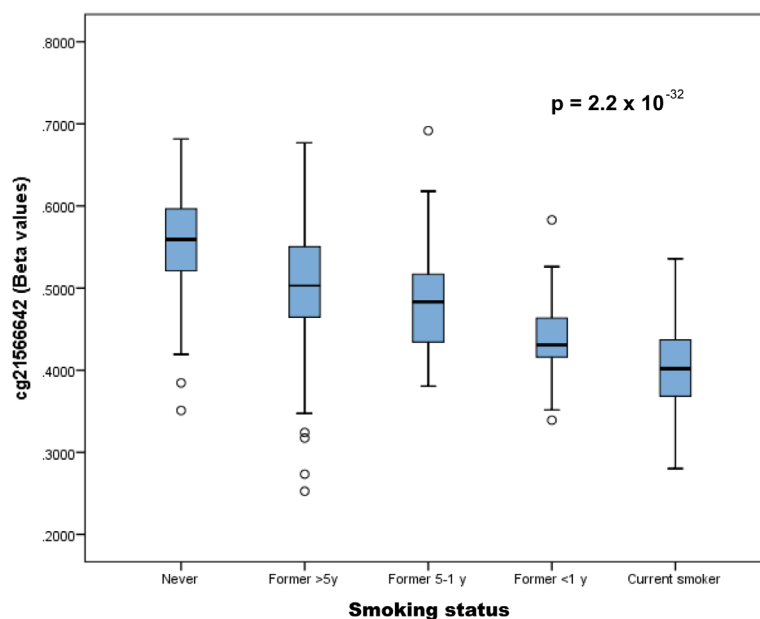


Figura 4.23. Diagramas de caja de distribuciones que muestran metilación (valores beta) del sitio cg21566642 (cromosoma 2) por tabaquismo (5 niveles).

Este resultado es altamente consistente y se ha observado previamente en varios estudios (Zeilinger S et al., 2013; Sayols-Baixeras S et al., 2015; Christiansen C et al., 2021; Cardenas A et al., 2022). Asimismo, el segundo hit fue cp01940273 ($p=1,2 \times 10^{-19}$), también localizado en la región 2q37.1, y reportado en los mismos estudios anteriormente mencionados (Zeilinger S et al., 2013; Sayols-Baixeras S et al., 2015; Christiansen C et al., 2021; Cardenas A et al., 2022), cg14391737 fue el tercer sitio de CpG más destacado en términos de importancia. Este sitio CpG solo fue perfilado por la matriz EPIC, por lo tanto, estudios previos que utilizaron la matriz 450K no pudieron descubrirlo. Sin embargo, el gen PRSS23, en el que se anota cg14391737, es uno de los genes más consistentemente asociados con la metilación diferencial del ADN en fumadores de tabaco, como lo demuestran diferentes tipos de matrices. Del mismo modo, todos los demás genes enumerados en la tabla 4.25 (excepto el NUDT4P2: nudix hidrolasa homólogo 4 pseudogen 2) han sido consistentemente reportados en otros estudios realizados en

otras poblaciones, por lo que la firma de metilación del tabaquismo en esta población mediterránea española fue, en general, bastante similar. Además de PRSS23, detectamos: RARA, F2RL3, AHRR, GFI1, GNG12 (proteína G subunidad gamma 12), ARRB1 (arrestina, beta 1), GPR15, ANPEP (alanilaminopeptidasa), C5orf62 (proteína 3 de membrana integral pequeña), LRRN3 (neuronal 3 repetida rica en leucina), MGAT3 (beta-1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa), ITPK1 (proteína de la familia inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa), LRP5 (proteína 5 relacionada con el receptor LDL), ATP9A (ATPasa fosfolípido transportador de 9A putativo), MTSS1 (dominio MTSS I-BAR que contiene 1), NUDT4 (nudix hidrolase homolog 4), ETV6 (ETS variant transcription factor 6), UXS1 (UDP-ácido glucurónico descarboxilasa 1), XYLT1 (xilosil-transferasa 1) SEMA7A (semaforina 7A-grupo sanguíneo John Milton Hagen) y LMO2 (dominio LIM solo 2). Así mismo, los sitios intergénicos de CpG se han relacionado con la metilación diferencial en varios estudios previos. No obstante, el orden de significación estadística de cada CpG difiere entre estudios. En esta población de estudio mediterránea, por ejemplo, cg05575921 en el gen AHRR no se clasificó nivel de metilación significativo como en otros estudios.

4.5.2 Asociación entre el tabaquismo (comparación de categorías) y sus firmas de metilación del epigenoma

Además, en un análisis de sensibilidad, examinamos la consistencia de los resultados anteriores (que consideraron 5 niveles de tabaquismo y se analizaron como una variable lineal) examinando el tabaquismo como una variable categórica con tres categorías (nunca, ex y fumadores actuales). Además, examinamos la firma de metilación del ADN de los fumadores nunca fumadores versus los fumadores actuales (figura 4.24) utilizando un EWAS que se ajustó por sexo, edad, efecto del lote, IMC, diabetes y recuento de células leucocitarias.

Tabla 4.26. principales sitios de CpG metilados diferencialmente clasificados por valor p para la variable categórica tabaquismo (3 categorías) y comparación de fumadores y no fumadores

A-Smoking (3 categories)				B-Never (N) versus current smokers (C)				
CpG site	Gene Symbol	Chr	p^4 (3 categories)	CpG site	Gene Symbol	Chr	p^5 (N vs. C)	Beta Difference ⁶
cg21566642		2	1.39E-29	cg21566642		2	1.68E-30	0.143
cg14391737	PRSS23	11	6.95E-20	cg01940273		2	1.30E-20	0.097
cg01940273		2	1.44E-19	cg14391737	PRSS23	11	1.71E-17	0.107
cg17739917	RARA	17	3.44E-16	cg17739917	RARA	17	5.13E-17	0.112
cg21911711	F2RL3	19	8.14E-16	cg21911711	F2RL3	19	8.76E-17	0.085
cg00475490	PRSS23	11	9.66E-16	cg00475490	PRSS23	11	1.73E-15	0.046
cg24859433		6	1.96E-14	cg24859433		6	2.29E-15	0.048
cg18110140		15	2.36E-13	cg18110140		15	3.04E-14	0.094
cg09935388	GFI1	1	5.94E-13	cg09935388	GFI1	1	6.54E-14	0.105
cg25648203	AHRR	5	9.21E-13	cg19572487	RARA	17	1.78E-13	0.073
cg25189904	GNG12	1	1.46E-12	cg25189904	GNG12	1	1.90E-13	0.110
cg19572487	RARA	17	1.55E-12	cg25648203	AHRR	5	5.67E-13	0.065
cg26703534	AHRR	5	2.44E-11	cg01901332	ARRB1	11	3.61E-12	0.078
cg01901332	ARRB1	11	2.63E-11	cg03636183	F2RL3	19	4.54E-12	0.132
cg03636183	F2RL3	19	3.84E-11	cg17287155	AHRR	5	7.31E-12	0.029
cg17287155	AHRR	5	5.62E-11	cg04551776	AHRR	5	1.89E-11	0.055
cg04551776	AHRR	5	1.01E-10	cg15342087		6	1.89E-11	0.039
cg15342087		6	1.38E-10	cg26703534	AHRR	5	2.87E-11	0.056
cg05086879	MGAT3	22	1.59E-10	cg05575921	AHRR	5	3.59E-11	0.211
cg05575921	AHRR	5	2.02E-10	cg11660018	PRSS23	11	3.66E-11	0.068
cg23161492	ANPEP	15	2.27E-10	cg23161492	ANPEP	15	8.52E-11	0.072
cg11660018	PRSS23	11	2.96E-10	cg14580211	C5orf62	5	3.47E-10	0.070
cg05284742	ITPK1	14	1.11E-09	cg05284742	ITPK1	14	3.62E-10	0.052
cg11556164	LRRN3	7	1.13E-09	cg05086879	MGAT3	22	5.47E-10	0.048
cg14580211	C5orf62	5	2.72E-09	cg16841366		2	1.11E-09	0.087
cg16841366		2	5.28E-09	cg11556164	LRRN3	7	2.00E-09	0.037
cg19859270	GPR15	3	5.33E-09	cg18146737	GFI1	1	2.07E-09	0.070
cg18146737	GFI1	1	1.41E-08	cg19859270	GPR15	3	2.68E-09	0.023
cg04535902	GFI1	1	1.52E-08	cg04535902	GFI1	1	2.83E-09	0.054
cg17738628		15	3.73E-08	cg16794579	XYLT1	16	1.12E-08	0.053
cg21611682	LRP5	11	3.89E-08	cg27241845		2	1.14E-08	0.076
cg16794579	XYLT1	16	6.77E-08	cg17738628		15	2.27E-08	0.040

Las principales CpG para esta comparación se dieron en la tabla 4.27, junto con sus respectivas diferencias beta. Se identificaron 24 sitios metilados de manera diferente entre los fumadores anteriores y actuales a nivel de EWAS.

Tabla 4.27. Las CpG metiladas diferencialmente superiores para ex fumadores (F) en relación con los fumadores actuales (C)

CpG site	Gene Symbol	Chr	p^2 (F vs. C)	Beta Difference ³
cg21566642		2	2.51E-16	0.0935
cg01940273		2	8.57E-13	0.0706
cg25648203	AHRR	5	2.39E-11	0.0563
cg26703534	AHRR	5	1.20E-10	0.0516
cg05086879	MGAT3	22	1.82E-10	0.0452
cg18110140		15	7.19E-10	0.0719
cg21911711	F2RL3	19	1.49E-09	0.0588
cg11556164	LRRN3	7	1.66E-09	0.0355
cg25189904	GNG12	1	2.65E-09	0.0824
cg23161492	ANPEP	15	3.85E-09	0.0631
cg17739917	RARA	17	8.78E-09	0.0714
cg04551776	AHRR	5	1.21E-08	0.0440
cg24859433		6	1.38E-08	0.0332
cg01901332	ARRB1	11	1.67E-08	0.0607
cg05284742	ITPK1	14	1.71E-08	0.0437
cg05575921	AHRR	5	2.35E-08	0.1707
cg09935388	GFI1	1	2.69E-08	0.0762
cg12093781	KIF26B	1	2.81E-08	0.0790
cg21611682	LRP5	11	3.43E-08	0.0433
cg17287155	AHRR	5	4.30E-08	0.0225
cg07898952	LMO2	11	4.68E-08	0.0492
cg26673040	LOC101060019	2	5.87E-08	0.0280
cg19572487	RARA	17	7.13E-08	0.0500
cg00039048	NRIP1	21	8.26E-08	0.0386
cg03636183	F2RL3	19	9.16E-08	0.0948
cg17738628		15	9.27E-08	0.0389
cg25094529	SRP14-AS1	15	9.71E-08	0.0432

Las CpG metiladas diferencialmente superiores para ex fumadores (F) en relación con los fumadores actuales (C) clasificadas por el valor p más pequeño después del ajuste multivariado 1. Los modelos se ajustaron por sexo, edad, diabetes, índice de masa corporal, efecto discontinuo y tipos de células leucocitarias. 2. p-valor para las comparaciones entre ex fumadores (n=178) y actuales (n=48). Valores p ajustados multivariantes. 3. Diferencia beta para la metilación comparando fumadores anteriores versus fumadores actuales. Chr: cromosoma; F vs. C: comparaciones entre ex fumadores (F) y actuales (C).

Los ex fumadores exhibieron mayores valores de metilación que los fumadores actuales en todas las posiciones. Los resultados fueron, en general, similares a los hallazgos anteriores, pero descubrimos una nueva CpG metilada diferencialmente significativa ($p=2.8 \times 10^{-8}$) para la comparación entre fumadores anteriores y actuales informados por primera vez aquí. Se trataba del cp12093781 (sólo perfilado en el EPIC 850K), situado en el cromosoma 1 y anotado al gen KIP26B (miembro de la familia kinesina 26B). Curiosamente, descubrimos otro nuevo sitio de GpG metilado diferencialmente que estaba en el límite de la importancia en la comparación entre fumadores anteriores y actuales. Fue, cg25094529 (solo perfilado en el EPIC 850K), anotado al gen SRP14-AS1 (SRP14 antisentido RNA1) en el cromosoma 15.

4.5.3 Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de los sitios CpG metilados diferencialmente utilizando KEGG y GO

Se realizaron análisis de la vía KEGG (Kanehisa M et al., 2000; Ogata H et al., 1999) y enriquecimiento funcional de GO (Gene Ontology Consortium, 2015, 2019) para los principales sitios de CpG metilados diferencialmente obtenidos en el EWAS para el tabaquismo (5 niveles) que pasaron el límite de FDR.

La tabla 4.28 muestra los nombres de las vías mejor clasificadas, los valores p de enriquecimiento y los valores p de enriquecimiento corregidos de Bonferroni. Detectamos 31 vías KEGG que pasaron la corrección de Bonferroni. Entre estas vías más enriquecidas, 11 relacionadas con el cáncer, incluyendo: carcinoma de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular, regulación transcripcional en cáncer, cáncer de pulmón de células pequeñas, vías en cáncer, melanoma, cáncer de páncreas, leucemia mieloide crónica, sarcoma de Kaposi y cáncer de vejiga. También detectamos enriquecimiento en vías relacionadas con osteoporosis, señalización de insulina, salud cardiovascular, adicción y arrastre circadiano. La tabla 4.29 muestra las primeras 22 funciones de enriquecimiento GO, incluido su tipo (proceso biológico, componente celular o función molecular), puntuación de enriquecimiento, valor p de enriquecimiento bruto y valor p de enriquecimiento corregido de Bonferroni. La mayoría de los hallazgos estadísticamente significativos se referían a procesos biológicos, como los éxitos "Modulación negativa de la actividad de la proteína quinasa tau" ($p=1,1 \times 10^{-50}$), seguido de "Regulación positiva de la producción de interleucina-13" ($p=3,1 \times 10^{-42}$).

Tabla 4.28. Muestra los nombres de las vías mejor clasificadas, los valores p de enriquecimiento y los valores p de enriquecimiento corregidos de Bonferroni. Detectamos 31 vías KEGG que pasaron la corrección de Bonferroni

Pathway Name	Enrichment Score	Enrichment p^1	Bonferroni (Enrichment p)²
Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	26.912	2.05E-12	3.90E-10
VEGF signaling pathway	22.448	1.78E-10	3.39E-08
Morphine addiction	21.911	3.05E-10	5.80E-08
Endocrine resistance	20.622	1.11E-09	2.10E-07
Chemokine signaling pathway	18.663	7.85E-09	1.49E-06
Phospholipase D signaling pathway	18.406	1.01E-08	1.93E-06
Non-small cell lung cancer	18.024	1.49E-08	2.83E-06
Glioma	17.219	3.33E-08	6.32E-06
Cholinergic synapse	17.090	3.78E-08	7.19E-06
Hepatocellular carcinoma	15.770	1.42E-07	2.69E-05
Human cytomegalovirus infection	15.279	2.32E-07	4.40E-05
ErbB signaling pathway	15.148	2.64E-07	5.02E-05
Relaxin signaling pathway	14.613	4.51E-07	8.56E-05
Transcriptional misregulation in cancer	13.791	1.03E-06	1.95E-04
Small cell lung cancer	13.644	1.19E-06	2.26E-04
Apelin signaling pathway	13.353	1.59E-06	3.02E-04
Pathways in cancer	13.329	1.63E-06	3.09E-04
Fc gamma R-mediated phagocytosis	12.986	2.29E-06	4.36E-04
Circadian entrainment	12.829	2.68E-06	5.09E-04
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	12.365	4.27E-06	8.11E-04
GnRH secretion	11.470	1.04E-05	1.98E-03
Growth hormone synthesis, secretion and action	10.053	4.31E-05	8.18E-03
Melanoma	10.035	4.38E-05	8.33E-03
Calcium signaling pathway	9.991	4.58E-05	8.70E-03
Platelet activation	9.558	7.06E-05	1.34E-02
Axon guidance	9.510	7.41E-05	1.41E-02
Pancreatic cancer	9.430	8.03E-05	1.53E-02
Chronic myeloid leukemia	9.430	8.03E-05	1.53E-02
Dopaminergic synapse	8.928	1.33E-04	2.52E-02
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	8.742	1.60E-04	3.04E-02
Bladder cancer	8.386	2.28E-04	4.33E-02
Chemical carcinogenesis - receptor activation	7.854	3.88E-04	7.38E-02
GABAergic synapse	7.833	3.96E-04	7.53E-02
Human immunodeficiency virus 1 infection	7.803	4.09E-04	7.76E-02
Breast cancer	7.713	4.47E-04	8.49E-02
Gastric cancer	7.580	5.11E-04	9.70E-02

Tabla 4.29. Muestra las primeras 22 funciones de enriquecimiento GO, incluido su tipo (proceso biológico, componente celular o función molecular), puntuación de enriquecimiento, valor p de enriquecimiento bruto y valor p de enriquecimiento corregido de Bonferroni

Function	type	Enrichment Score	Enrichment p	Bonferroni (Enrichment p)
negative regulation of tau-protein kinase activity	biological process	123.12	3.40E-54	1.09E-50
positive regulation of interleukin-13 production	biological process	103.66	9.57E-46	3.08E-42
positive regulation of interleukin-5 production	biological process	82.26	1.89E-36	6.07E-33
perinucleolar compartment	cellular component	74.01	7.19E-33	2.32E-29
regulation of interleukin-13 production	biological process	68.58	1.65E-30	5.32E-27
inositol trisphosphate metabolic process	biological process	61.71	1.58E-27	5.10E-24
regulation of inorganic anion transmembrane transport	biological process	61.71	1.58E-27	5.10E-24
positive regulation of macrophage differentiation	biological process	54.58	1.97E-24	6.34E-21
regulation of endocytic recycling	biological process	48.06	1.34E-21	4.33E-18
negative regulation of granulocyte differentiation	biological process	46.30	7.78E-21	2.50E-17
regulation of protein localization to early endosome	biological process	46.30	7.78E-21	2.50E-17
positive regulation of protein localization to early endosome	biological process	46.30	7.78E-21	2.50E-17
positive regulation of histone H3-K9 acetylation	biological process	46.30	7.78E-21	2.50E-17
regulation of cAMP-dependent protein kinase activity	biological process	42.90	2.33E-19	7.51E-16
cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity	molecular function	41.16	1.34E-18	4.30E-15
regulation of anion channel activity	biological process	41.16	1.34E-18	4.30E-15
regulation of interleukin-5 production	biological process	40.71	2.09E-18	6.74E-15

negative regulation of cAMP-dependent protein kinase activity	biological process	37.03	8.25E-17	2.65E-13
regulation of macrophage differentiation	biological process	36.92	9.28E-17	2.99E-13
negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	biological process	35.90	2.56E-16	8.25E-13
positive regulation of protein localization to endosome	biological process	33.66	2.42E-15	7.78E-12
cAMP-dependent protein kinase regulator activity	molecular function	33.66	2.42E-15	7.78E-12

1.valor p para el enriquecimiento de la vía basado en KEGG. 2.p-valor para la corrección de Bonferroni.

4.5.4 Dosis-respuesta de la metilación del ADN en fumadores actuales

Examinamos las asociaciones dosis-respuesta en fumadores actuales para CpG significativas de la EWAS de tabaquismo (5 niveles de tabaquismo) al correlacionar la metilación (valores beta) en los sitios de CpG mejor clasificados y el número de cigarrillos fumados. Utilizamos tanto cigarrillos diarios fumados como el número de paquetes-años fumados. Los diagramas de dispersión para el sitio cp21566642 en la región 2q37.1 se representan en la figura 4.26 tanto el número de cigarrillos fumados por día (panel A) como los paquetes-años fumados (panel B) mostraron una sólida relación dosis-respuesta. Un mayor consumo de cigarrillos se relacionó sustancialmente con una disminución de la metilación en este lugar. La tabla 4.30 muestra las correlaciones de la metilación (valores beta) con los cigarrillos fumados por día y el número de paquetes-año fumados para las otras CpG. Para los sitios de CpG más relevantes, se identificaron dosis-respuestas estadísticamente significativas en términos de hipometilación.

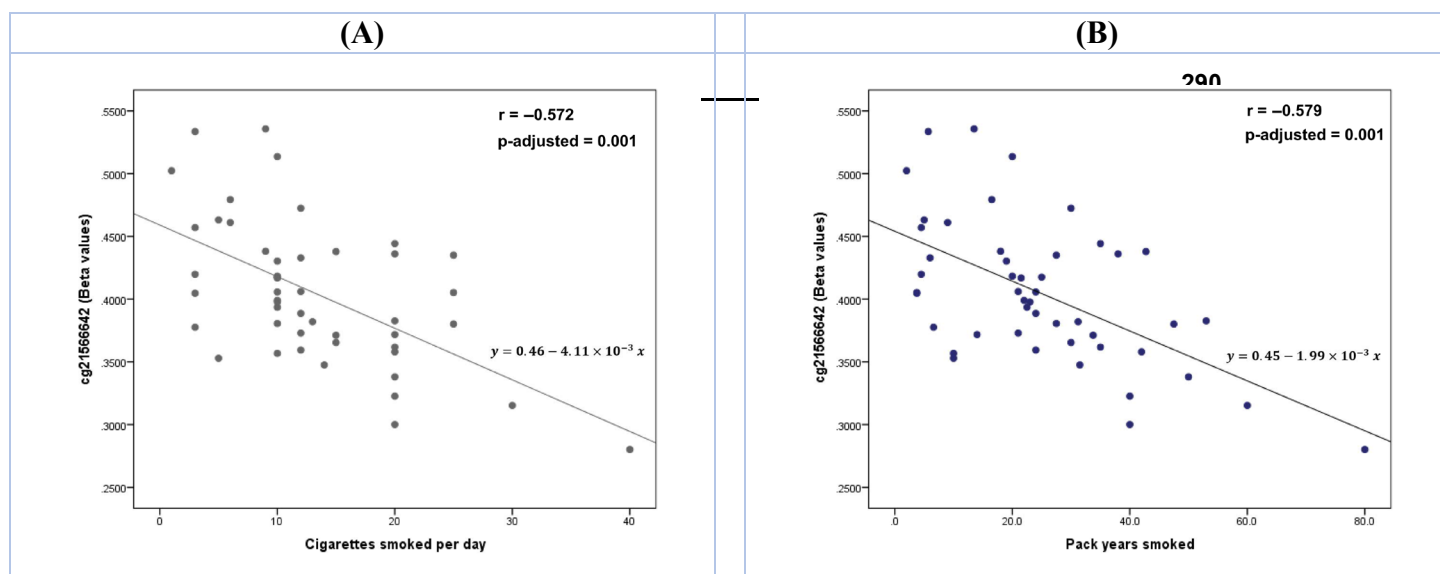


Figura 4.26. Diagrama de dispersión para la asociación entre los niveles de metilación en el sitio cp21566642 (valores beta) y los cigarrillos fumados por día (panel A), y los paquetes-años fumados (panel B) en fumadores actuales ($n = 48$).

Tabla 4.30. La tabla muestra las correlaciones de la metilación (valores beta) con los cigarrillos fumados por día y el número de paquetes-año fumados para las otras CpG

		A-Number of cigarettes per day		B-Number of pack-years	
CpG	Gene Symbol	r	p	r	p
cg21566642	intergenic	-0.523	0.0001	-0.516	0.0002
cg01940273	intergenic	-0.418	0.0031	-0.410	0.0038
cg14391737	PRSS23	-0.368	0.0100	-0.531	0.0001
cg17739917	RARA	-0.247	0.0908	-0.344	0.0168
cg21911711	F2RL3	-0.176	0.2308	-0.414	0.0035
cg18110140	intergenic	-0.374	0.0089	-0.450	0.0013
cg19572487	RARA	-0.320	0.0265	-0.332	0.0213
cg24859433	intergenic	-0.328	0.0230	-0.533	0.0001
cg17287155	AHRR	-0.241	0.0992	-0.104	0.4816
cg00475490	PRSS23	-0.269	0.0644	-0.367	0.0102
cg09935388	GFI1	-0.196	0.1821	-0.308	0.0334
cg05575921	AHRR	-0.402	0.0046	-0.509	0.0002

cg15342087	intergenic	-0.382	0.0073		-0.523	0.0001
cg04551776	AHRR	-0.359	0.0122		-0.212	0.1486
cg25189904	GNG12	-0.222	0.1299		-0.352	0.0141
cg03636183	F2RL3	-0.243	0.0967		-0.408	0.0040
cg26703534	AHRR	-0.229	0.1175		-0.359	0.0121
cg25648203	AHRR	-0.365	0.0108		-0.372	0.0092
cg01901332	ARRB1	-0.067	0.6503		-0.333	0.0207
cg27241845	intergenic	-0.238	0.1027		-0.483	0.0005
cg19859270	GPR15	-0.305	0.0351		-0.498	0.0003
cg16841366	intergenic	-0.266	0.0676		-0.401	0.0047
cg23161492	ANPEP	-0.100	0.5010		-0.196	0.1817
cg02978227	intergenic	-0.210	0.1519		-0.343	0.0171
cg11660018	PRSS23	-0.233	0.1108		-0.295	0.0418
cg14580211	C5orf62	-0.196	0.1822		-0.349	0.0150
cg11556164	LRRN3	-0.104	0.4817		-0.187	0.2019
cg12806681	AHRR	-0.051	0.7296		-0.168	0.2534
cg05086879	MGAT3	-0.355	0.0133		-0.316	0.0288
cg05284742	ITPK1	-0.239	0.1013		-0.361	0.0117
cg17738628	intergenic	-0.061	0.6808		-0.262	0.0718
cg21611682	LRP5	-0.173	0.2395		-0.324	0.0247
cg07339236	ATP9A	-0.033	0.8219		0.012	0.9378
cg24838345	MTSS1	-0.082	0.5798		-0.118	0.4260
cg19554457	NUDT4	-0.147	0.3177		-0.210	0.1523

4.5.5 Metilación en CpG seleccionada como predictores del tabaquismo

Evaluamos el desempeño de los 5 sitios de CpG mejor clasificados en la tabla 4.32 como clasificadores del estado de tabaquismo. El nivel de metilación del ADN (valores beta) en estos sitios fueron muy buenos clasificadores entre fumadores actuales y nunca fumadores.

La figura 4.27 muestra las curvas ROC para las 5 CpG mejor clasificadas y las AUC correspondientes, IC del 95% y valores *p*. El sitio cp21566642 en 2q37.1

fue el clasificador más fuerte entre fumadores y nunca fumadores con un AUC de 0.97; IC95%: 0,94-0,99; $p=1,4 \times 10^{-23}$.

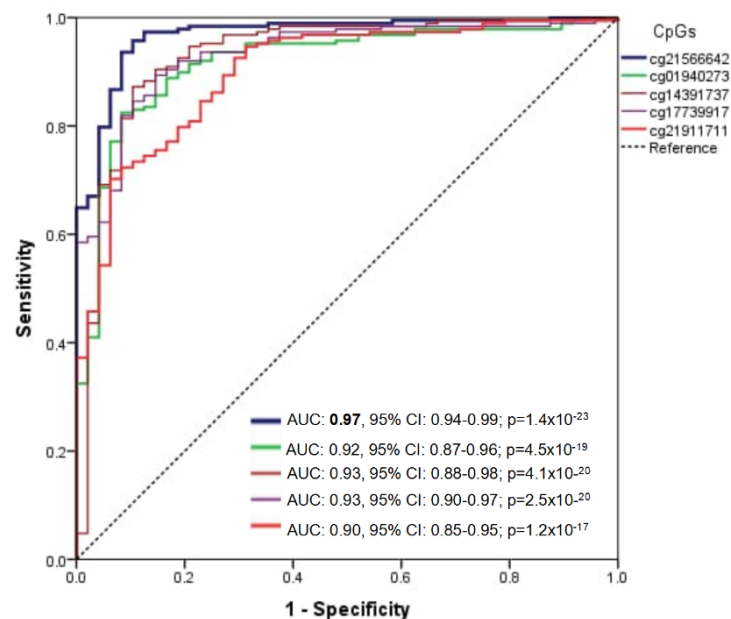


Figura 4.27. En esta figura se muestran las curvas generadas de las características operativas del receptor (ROC) de los cinco sitios de metilación de CpG mejor clasificados para el tabaquismo, para discriminar a los fumadores actuales y nunca fumadores. Se presenta el área bajo la curva (AUC), los intervalos de confianza (IC) del 95% y los valores p correspondientes.

4.5.6 Asociación entre el tabaquismo (5 niveles) y sus firmas de metilación de todo el epigenoma por sexo

Examinamos las firmas de metilación del ADN específicas del sexo para el tabaquismo en dos EWAS separadas realizadas en hombres y mujeres. Analizado como una variable de cinco niveles, el tabaquismo se ajustó por edad, efecto de lote, IMC, diabetes y recuento de leucocitos. La tabla 4.31 muestra las principales CpG metiladas diferencialmente para cada EWAS tanto en hombres como en mujeres. En general, hombres y mujeres tuvieron resultados similares en las CpG

más relevantes. Así, cp21566642 en la región 2q37.1 fue el hit en ambos sexos ($p=2,2 \times 10^{-15}$; $r=-0,561$ en hombres y $p=4,1 \times 10^{-16}$; $r=-0,522$ en mujeres).

Tabla 4.31. Principales CpG metiladas diferencialmente para el análisis de metilación de todo el epigenoma del estado de tabaquismo (5 niveles)

Men (n=186)					Women (n=228)				
CpG site	Gene Symbol	Chr	p	r	CpG site	Gene Symbol	Chr	p	r
cg21566642		2	2.20E-15	-0.561	cg21566642		2	4.07E-16	-0.522
cg03636183	F2RL3	19	1.92E-11	-0.487	cg14391737	PRSS23	11	2.51E-12	-0.458
cg01940273		2	3.73E-10	-0.458	cg05575921	AHRR	5	1.55E-11	-0.443
cg17287155	AHRR	5	8.37E-09	-0.425	cg09935388	GF11	1	5.80E-11	-0.431
cg17739917	RARA	17	1.28E-08	-0.420	cg17739917	RARA	17	1.32E-10	-0.424
cg14391737	PRSS23	11	3.89E-08	-0.407	cg00475490	PRSS23	11	2.57E-10	-0.418
cg19572487	RARA	17	9.96E-08	-0.396	cg01940273		2	8.28E-10	-0.407
cg04551776	AHRR	5	1.37E-07	-0.392	cg21911711	F2RL3	19	9.46E-10	-0.405
cg15342087		6	1.48E-07	-0.391	cg24859433		6	1.94E-09	-0.398
cg27241845		2	1.56E-07	-0.390	cg25966498	SPATA17	1	9.11E-09	-0.383
cg21911711	F2RL3	19	2.96E-07	-0.382	cg18110140		15	1.08E-08	-0.381
cg18110140		15	1.25E-06	-0.363	cg11556164	LRRN3	7	1.65E-08	-0.376
cg23161492	ANPEP	15	1.28E-06	-0.362	cg19572487	RARA	17	2.51E-08	-0.372
cg24090911	AHRR	5	1.32E-06	-0.362	cg25648203	AHRR	5	6.15E-08	-0.362
cg24859433		6	2.12E-06	-0.355	cg25189904	GNG12	1	7.29E-08	-0.360
cg01901332	ARRB1	11	3.67E-06	-0.348	cg21929649	EFTUD2	17	2.90E-07	-0.344

1. en hombres y mujeres, 2. después del ajuste multivariante. 1. Se consideraron cinco niveles de tabaquismo como variable ordinal: nunca fumador, ex fumador, fumador > 5 años, ex fumador de 1 a 5 años, ex fumador < 1 año y fumador actual. 2. Los modelos se ajustaron por edad, diabetes, índice de masa corporal, efecto discontinuo, tipos de células leucocitarias y estratificados por sexo (n = 186 en hombres y n = 228 en mujeres). Chr: cromosoma; p: Valores p ajustados multivariantes; R: coeficiente de correlación parcial.

Del mismo modo, se identificó hipometilación en las GpG más relevantes para PRSS23, F2RL3, RARA y AHRR tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, se pueden observar diferencias adicionales específicas del sexo en ciertos sitios. En esta población, descubrimos un nuevo sitio de CpG asociado ($p=9.1 \times 10^{-9}$) con el tabaquismo en mujeres. Corresponde al gen SPATA17 (Spermatogenesis Associated 17) y solo está perfilado por la matriz EPIC 850K. Esta asociación está siendo reportada por primera vez en esta etapa.

4.5.7 Dosis-respuesta de la metilación del ADN en fumadores actuales

Realizamos un EWAS estratificado para el tabaquismo (5 niveles) dependiendo del nivel de adherencia a la dieta mediterránea (bajo y alto) para explorar la posible modulación de la dieta mediterránea en la firma de metilación de todo el epigenoma del tabaquismo. La figura 4.28 muestra un Miami plot correspondiente para ambos EWAS ajustados por sexo, edad, efecto de lote, IMC, diabetes y recuentos de leucocitos. Detectamos un perfil aparentemente diferente. Sólo cp21566642 en el gen 2q37.1 y cp14391737 en el gen PRSS23 presentaron diferencias EWAS estadísticamente significativas en la metilación tanto en los niveles bajos como altos de adherencia.

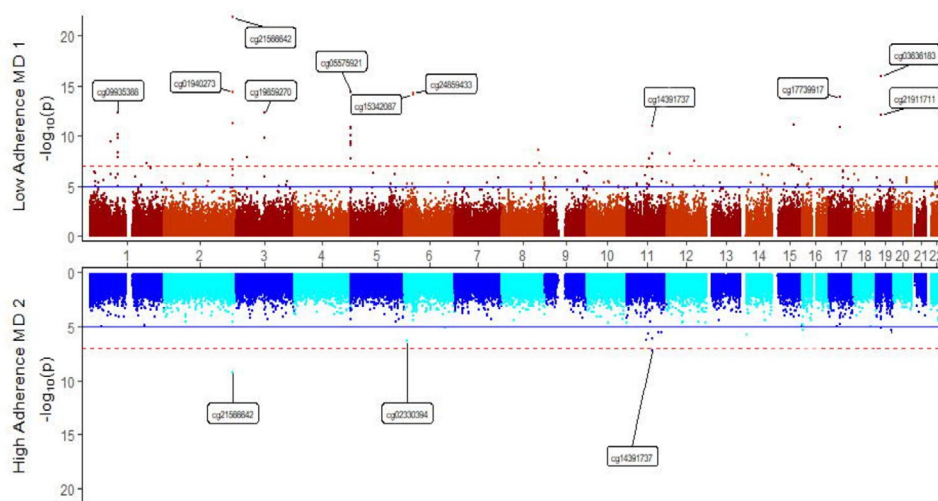


Figura 4.28. Miami plot para el análisis de metilación de todo el epigenoma para fumar (5 niveles), dependiendo de la adherencia a la dieta mediterránea: baja adherencia (por encima del eje x) y alta adherencia (por debajo del eje x).

Se destacan las 11 CpG más significativas para el bajo nivel de adherencia. Para el nivel de adherencia alto, se destacan las 3 CpG más significativas. La línea roja representa el nivel de significación EWAS $p=9 \times 10^{-8}$. La línea azul representa $p=1 \times 10^{-5}$.

La tabla 4.32 muestra la mayor información sobre las CpG metiladas diferencialmente superiores en función de la adherencia a la dieta mediterránea, los genes anotados, los valores p y los coeficientes de correlación.

Tabla 4.32. Principales CpG metiladas diferencialmente para el análisis de metilación de todo el epigenoma de tabaquismo (5 niveles)

Low adherence to Mediterranean diet (n=242)					High adherence to Mediterranean diet (n=172)				
CpG site	Gene Symbol	Chr	<i>p</i>	<i>r</i>	CpG site	Gene Symbol	Chr	<i>p</i>	<i>r</i>
cg21566642		2	1.34E-22	-0.592	cg21566642		2	5.27E-10	-0.474
cg03636183	F2RL3	19	1.15E-16	-0.516	cg14391737	PRSS23	11	6.21E-08	-0.419
cg01940273		2	3.72E-15	-0.494	cg02330394	C6orf52	6	3.96E-07	-0.395
cg05575921	AHRR	5	4.31E-15	-0.493	cg04569608	PLCB3	11	6.31E-07	-0.389
cg24859433		6	5.52E-15	-0.491	cg00475490	PRSS23	11	8.17E-07	-0.385
cg15342087		6	7.71E-15	-0.489	cg14175932		14	1.81E-06	-0.374
cg17739917	RARA	17	1.41E-14	-0.484	cg26742440	RAB6A	11	1.98E-06	-0.372
cg09935388	GFI1	1	4.39E-13	-0.459	cg22024876	KBTBD3	11	2.37E-06	-0.370
cg19859270	GPR15	3	4.79E-13	-0.459	cg02286229		11	2.93E-06	-0.367
cg21911711	F2RL3	19	7.56E-13	-0.455	cg21619351	SCAF1	19	4.83E-06	-0.359
cg27241845		2	5.28E-12	-0.440	cg13496340	TIGD7	16	5.06E-06	-0.358
cg18110140		15	6.71E-12	-0.438	cg26815336		6	7.03E-06	-0.353
cg14391737	PRSS23	11	9.53E-12	-0.435	cg21911711	F2RL3	19	8.06E-06	-0.351
cg19572487	RARA	17	1.34E-11	-0.432	cg01697541	TMEM97	17	8.57E-06	-0.350
cg25648203	AHRR	5	1.43E-11	-0.431	cg08376211	MAP7D1	1	9.11E-06	0.349
cg26703534	AHRR	5	1.80E-11	-0.430	cg22078572	KDSR	18	9.73E-06	-0.348
cg18316974	GFI1	1	7.05E-11	-0.418	cg22488975	EDEM3	1	1.11E-05	-0.346
cg12806681	AHRR	5	9.23E-11	-0.415	cg22692169	LINS1	15	1.11E-05	-0.346
cg02978227		3	1.41E-10	-0.412	cg01207684	ADCY9	16	1.37E-05	-0.343
cg18146737	GFI1	1	1.46E-10	-0.411	cg17739917	RARA	17	1.64E-05	-0.340
cg25189904	GNG12	1	3.59E-10	-0.403	cg16552945	ARHGDIG	16	1.78E-05	-0.338
cg17287155	AHRR	5	3.74E-10	-0.403	cg00502002	ANAPC16	10	2.03E-05	0.336
cg23576855	AHRR	5	7.03E-10	-0.397	cg18149653		12	2.23E-05	-0.335
cg04551776	AHRR	5	8.71E-10	-0.395	cg08870961		12	2.37E-05	0.334
cg24838345	MTSS1	8	2.35E-09	-0.386	cg19355087	NKX6-2	10	2.38E-05	-0.333
cg12876356	GFI1	1	5.04E-09	-0.378	cg01940273		2	2.42E-05	-0.333
cg07986378	ETV6	12	5.25E-09	-0.378	cg16915863	LOC400043	12	2.43E-05	0.333
cg11660018	PRSS23	11	5.69E-09	-0.377	cg21897843	GAB2	11	2.63E-05	0.332
cg09945032		3	1.36E-08	-0.368	cg18866308	G3BP1	5	2.82E-05	-0.331
cg04535902	GFI1	1	1.44E-08	-0.367	cg02048416	DOK1	2	2.89E-05	-0.330
cg01901332	ARRB1	11	1.71E-08	-0.366	cg10352046		12	2.99E-05	-0.330
cg24090911	AHRR	5	2.02E-08	-0.364	cg16487464		8	3.10E-05	0.329
cg16841366		2	2.60E-08	-0.361	cg27072224	DNAJC15	13	3.12E-05	0.329
cg19554457	NUDT4	12	3.29E-08	-0.359	cg21038620	LAT	16	3.31E-05	-0.328
cg14372879		1	5.72E-08	-0.353	cg02882774	NDUFA6	22	3.57E-05	-0.327
cg25305703		8	6.03E-08	-0.352	cg09061824	FLOT1	6	3.60E-05	-0.326
cg13681954		2	6.48E-08	-0.352	cg08445320		14	3.86E-05	0.325
cg17738628		15	7.22E-08	-0.350	cg27228559	CASC2	10	4.13E-05	-0.324

1. dependiendo del nivel de adherencia a la dieta mediterránea. 2. después del ajuste multivariante. 3. 1. Se consideraron cinco niveles de tabaquismo como variable ordinal: nunca fumador, ex fumador, fumador > 5 años, ex fumador de 1 a 5 años, ex fumador < 1 año y fumador actual. 2. Baja adherencia (<9 puntos en la puntuación de

la dieta mediterránea P-17); Alta adherencia (≥ 9 puntos en la puntuación de la dieta mediterránea P-17). 3. Los modelos se ajustaron por sexo, edad, diabetes, índice de masa corporal, efecto discontinuo y tipos de células leucocitarias (n = 414). Chr: cromosoma; p: Valores p ajustados multivariantes; R: coeficiente de correlación parcial.

Cuando la adherencia a la dieta mediterránea fue baja, observamos un perfil de metilación típico del tabaquismo, con los genes mejor clasificados consistentemente reportados en otras poblaciones. A pesar del tamaño limitado de la muestra, se identificaron 38 CpG metiladas diferencialmente a nivel EWAS en sujetos con una baja adherencia a la dieta mediterránea. Sin embargo, se detectaron menos diferencias significativas en la metilación en individuos con altos niveles de adherencia. El tamaño de muestra relativamente pequeño de este estrato puede influir en los hallazgos. No obstante, el alcance de las diferencias observadas en la significación estadística y en un subconjunto de los genes clasificados reveló un posible efecto de la dieta mediterránea sobre el nivel de metilación de ciertas CpG. Una de estas CpGs adicionales moduladas por la dieta mediterránea podría ser cp05575921 en el gen AHRR. Este sitio es uno de los CpG más fuertemente vinculados al tabaquismo en investigaciones anteriores. Sin embargo, al examinar su influencia en esta población mediterránea en su conjunto, esta CpG no ocupó los niveles superiores de metilación diferencial. Después del análisis estratificado por la adherencia a la dieta mediterránea, esta CpG se encontraba entre los cuatro primeros éxitos en el grupo de baja adherencia, pero carece de significación estadística en el grupo de alta adherencia. Para evaluar si existe una interacción estadística entre la adherencia a la dieta mediterránea y el consumo de tabaco en la metilación de CpG específicas, seleccionamos las dos CpG más relevantes (cp21566642 en la región 2q37.1 y cp05575931 en el gen AHRR) y examinamos la significación estadística del término interacción dieta*tabaquismo en un modelo jerárquico. Estos hallazgos se muestran en la figura 4.29. El panel A muestra que no hubo interacción de tabaquismo*Dieta Mediterránea para el sitio cp21566642 ($P = 0,808$). Sin embargo, hubo una interacción estadísticamente significativa (Panel B) para el cp05575921 en el gen AHRR ($p=0,013$). La figura 4.35 también muestra la interacción estadísticamente significativa entre el tabaquismo y la adherencia a la dieta mediterránea en la metilación del ADN para otras 2 CpG seleccionadas (paneles C y D). Este es un estudio exploratorio, y se necesita investigación adicional para caracterizar mejor cómo la dieta mediterránea modula la metilación por el tabaquismo.

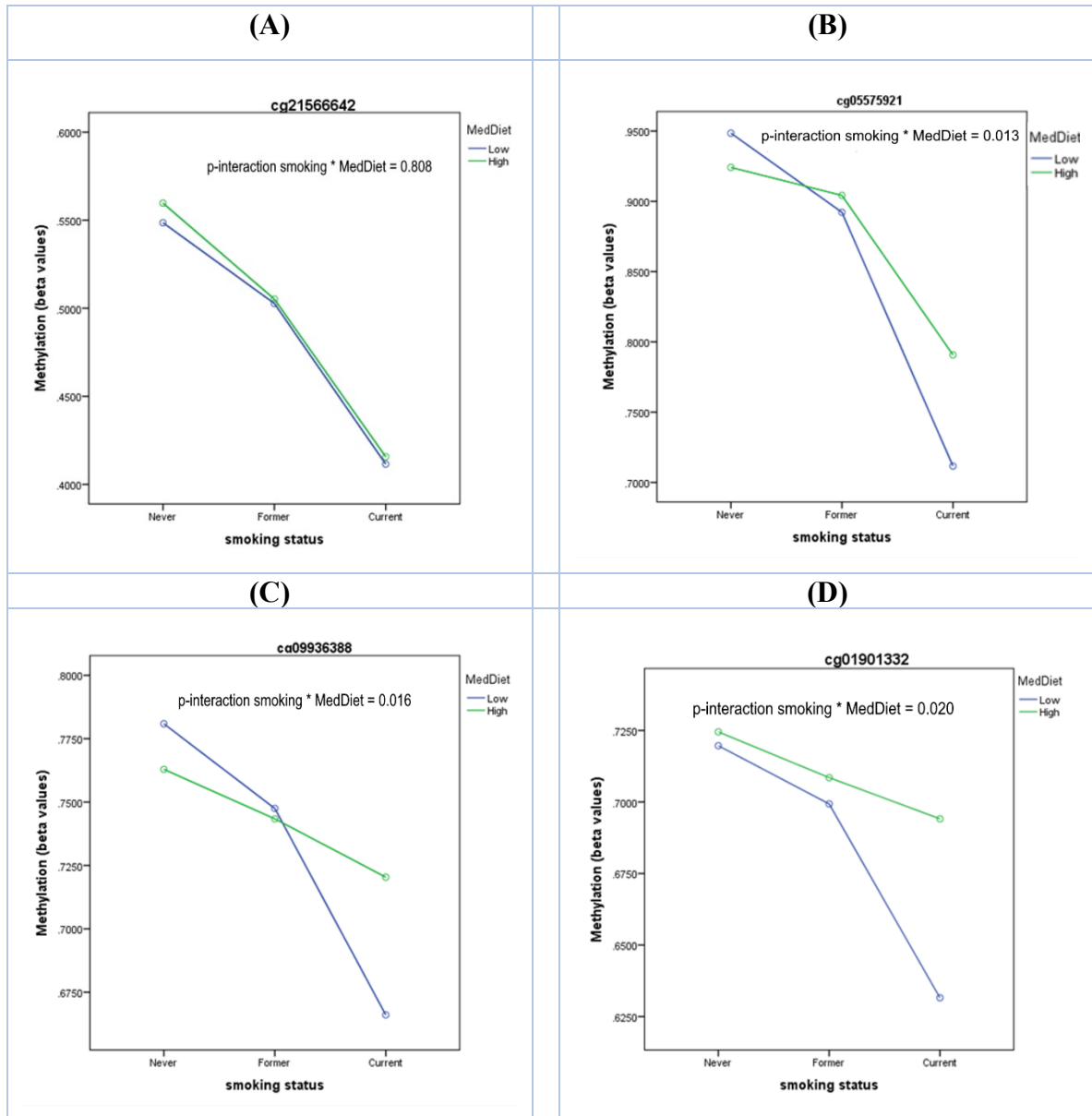


Figura 4.29. Interacciones entre la dieta mediterránea (analizada como baja y alta adherencia) y el tabaquismo en la determinación de la metilación del ADN en sitios seleccionados de CpG: (A) cg21566642; (B) cg05575921; (C) cg09936388; y (D) cg01901332. Los valores p para los términos de interacción fueron multivariados ajustados por sexo, edad, índice de masa corporal, diabetes, efecto de lote y leucocitos

4.6 Otras asociaciones con fenotipos intermedios mediante metilación de epigenoma

4.6.1 EWAS con fenotipos relacionados con la glucemia

Se ha demostrado que alteraciones en el metabolismo como los estados de hiperglucemia pueden alterar fuertemente las firmas epigenéticas en muchos tejidos, influyendo y aumentando el riesgo cardiovascular. Varios EWAS realizados han identificado regiones metiladas diferencialmente entre sujetos con diabetes y controles no diabéticos. Sin embargo, los EWAS en sujetos con síndrome metabólico dependiendo de la diabetes, que tienen en cuenta los medicamentos utilizados, aún son escasos y por ello nos centramos en investigar las firmas y vías de metilación en estos participantes dependiendo del estado de diabetes y el tratamiento farmacológico de la misma. Para ello, se estudiaron 414 sujetos y se clasificaron en 5 grupos en función de su relación con el estado de hiperglucemia: 61,0% no diabéticos, 3,0% diabéticos tratados con estilo de vida; 27,0% diabéticos tratados con metformina, 4,5% diabéticos tratados con otros medicamentos (diferentes de las insulinas) y 5,0% diabéticos con tratamiento de insulina (más otros medicamentos). Analizamos la metilación con el array Illumina EPIC (850K). Tras el ajuste de las variables confusoras: *batch effect*, sexo, edad, IMC y tabaquismo, obtuvimos diferencias estadísticamente significativas de los valores M al comparar los 5 grupos. Los lugares de metilación más significativos: cg27024081 ($p=3,4 \times 10^{-14}$); cg06611426 ($p=6,8 \times 10^{-9}$) y cg17385679 ($p=1,1 \times 10^{-8}$). El análisis de enriquecimiento de vías identificó como más relevantes estas vías: reparación por escisión de bases ($p=3,7 \times 10^{-13}$) y vía de señalización mTOR ($p=5 \times 10^{-5}$). Estos resultados fueron publicados en la revista Metabolism con abstract (Giménez-Alba IM et al., 2021).

También investigamos la asociación entre la metilación en genes que codifican microRNAs y la edad cronológica, presentando los resultados en un congreso internacional.

4.6.2 Análisis de la metilación genes que codifican microRNAs

Como resultados, se obtuvieron asociaciones significativas entre la metilación de varios genes que codifican miRNAs y la edad cronológica.

Destacando el MIR34B (cg26561785; $p=3,9\times 10^{-8}$; hipermetilación asociada a mayor edad; $r=0,28$). Estudios previos han relacionado miR-34a con el envejecimiento vascular y la artritis. En el análisis específico por sexo se detectaron diferencias. Las CpG mejor clasificadas en hombres fueron MIR34B (cg26561785; $p=9,2\times 10^{-6}$) y MIR9-3 (cg12530503; $p=1,8\times 10^{-5}$); mientras que en las mujeres fueron MIR376B (cg05348084; $p=4,3\times 10^{-7}$) y MIR203A (cg24454784; $p=3,9\times 10^{-6}$), por lo que nuestros resultados indican que la metilación alterada en los genes MIR se asocia con la edad cronológica, y esta asociación puede ser diferente entre hombres y mujeres con síndrome metabólico y por ello con riesgo cardiovascular alto (Fernández-Carrión R et al., 2022).

4.6.3 EWAS de la influencia del entorno rural/urbano en la huella metilómica de los participantes con síndrome metabólico

Una de las asociaciones posibles que se evaluó era si el nivel de metilación de algunos genes estudiados difería según el lugar de nacimiento, es decir, se trataba de analizar si el carácter rural o urbano del lugar de nacimiento podía influir en el nivel de metilación de determinados genes. Para ello, se analizaron 295 participantes (53,6% mujeres) PREDIMED-Plus Valencia para los cuales se pudo obtener información del lugar de nacimiento, de edad entre 55-75 años, con Síndrome metabólico y se estudió la influencia del lugar de nacimiento en la metilación del ADN a la edad de reclutamiento. Se clasificaron los lugares de nacimiento en 6 categorías de rural-urbano según el censo de habitantes del INE: (1- <1000: Zonas rurales; 2- 1000-4999: Pueblos pequeños; 3- 5000-14.999: Pueblos medianos; 4- 15.000-49.999: Pueblos grandes; 5- 50.000-99.999: Ciudades pequeñas; 6- >100.000: Ciudades grandes. Tras realizar el control de calidad y normalización, secuenció la metilación con el parámetro Beta (entre 0 y 100% de metilación para cada CpG) y se empleó el parámetro M ($\log_2(\text{Beta}/(1-\text{Beta}))$) para los análisis estadísticos. Los modelos se ajustaron por sexo, edad, diabetes, IMC, leucocitos y *batch effect*. Se aplicaron los análisis de *pathways* o de vías metabólicas según la base de conocimiento Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y Gene Ontology (GO). Se constató una influencia significativa del lugar de nacimiento, rural-urbano, en los perfiles de metilación del ADN décadas después (ajustando por otras variables de confusión) y se observó que a mayor urbanización del lugar de nacimiento los CpG más significativos eran: cg08364654 (chr-3-intergénico; $p=1,04\times 10^{-6}$; $r=0,296$), hipermetilado con mayor urbanización; cg05407200 (chr-11-intergénico; $p=5,91\times 10^{-6}$; $r=-0,275$), hipometilado con más urbanización; cg17081914 (NCKAP5, *Peripheal clock*

protein gene, implicado en lupus, déficit de atención e hiperactividad y varios cánceres; $p=2.31 \times 10^{-5}$; $r=0.258$), hipermetilado con más urbanización. Otros genes con mayor significación en variaciones de metilación de islas CpG fueron: CNNM2, KRBOX1, DPEP3 y ELANE. Las combinaciones de estos CpG pueden ser útiles a la hora de elaborar huellas metilómicas (tabla 4.33).

Tabla 4.33. Lista de islas o sitios CpG con mayor relevancia estadística en el EWAS de la influencia rural-urbano.

Probeset ID	Gene Symbol	CHR	<i>p</i>	Correlation <i>r</i>
cg08364654		3	1.04E-06	0.295761
cg05407200		11	5.91E-06	-0.275195
cg17081914	NCKAP5	2	2.31E-05	0.257769
cg08479950		19	3.81E-05	-0.251101
cg13267776	CNNM2	10	5.13E-05	-0.247016
cg27084712		3	5.69E-05	0.24556
cg11555493	KRBOX1-AS1	3	6.69E-05	0.243312
cg02599498		7	7.17E-05	-0.242324
cg22714811		3	7.63E-05	0.241447
cg21104412		3	7.81E-05	0.241124
cg04990977		14	9.49E-05	0.238338
cg27595003	KRBOX1	3	9.58E-05	0.238213
cg16170874	DPEP3	16	1.07E-04	0.236682
cg20353612	MACROD2-IT1	20	1.07E-04	0.236649
cg19240483	TBL2	7	1.07E-04	-0.236639
cg02487452	ELANE	19	1.17E-04	-0.235319

En el análisis de rutas metabólicas, la ruta del metabolismo de la Taurina y de la Hipotaurina (*Taurine and hypotaurine metabolism*) (puntuación=16.925; $p=4.464 \times 10^{-8}$) ha presentado más diferencias según el carácter rural-urbano del lugar de nacimiento, seguido de la ruta de la biosíntesis de Glicosaminoglicanos (*Glycosaminoglycan biosynthesis-keratan sulfate*) (puntuación=13.393; $p=1.525 \times 10^{-6}$). Ambas vías están asociadas con múltiples fenotipos de enfermedades crónicas (tabla 4.34).

Tabla 4.34. Resultados de mayor significancia estadística de las principales vías metabólicas en el EWAS de la influencia rural-urbano.

Pathway Name	Enrichment Score	Enrichment <i>p</i>
Taurine and hypotaurine metabolism	16.9247	4.46E-08
Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	13.3932	1.53E-06
Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	12.5253	3.63E-06
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	12.5253	3.63E-06
Pantothenate and CoA biosynthesis	9.95172	4.76E-05
NF-kappa B signaling pathway	6.54805	1.43E-03
Mucin type O-glycan biosynthesis	6.14903	2.14E-03
beta-Alanine metabolism	5.77718	3.10E-03
Propanoate metabolism	5.60706	3.67E-03
Various types of N-glycan biosynthesis	4.88259	7.58E-03
Apoptosis	4.74438	8.70E-03
Carbohydrate digestion and absorption	4.64033	9.65E-03

En el análisis de Gene Ontology (GO) del EWAS se determinó las funciones moleculares influenciadas por características del lugar de nacimiento destacando la función molecular y procesos biológicos (tabla 4.35).

Tabla 4.35. Lista de funciones moleculares con resultados de mayor relevancia estadística en el análisis GO del EWAS de la influencia rural-urbano.

Function	Type	Enrichment Score	Enrichment <i>p</i>
phosphatidylethanolamine binding	molecular function	59.71	1.17E-26
chemokine biosynthetic process	biological process	55.72	6.34E-25
neutrophil mediated killing of gram-negative bacterium	biological process	55.72	6.34E-25
regulation of aconitate hydratase activity	biological process	55.72	6.34E-25
positive regulation of aconitate hydratase activity	biological process	55.72	6.34E-25
positive regulation of platelet-derived growth factor receptor-beta signaling pathway	biological process	55.72	6.34E-25

Este estudio piloto ha mostrado que el carácter rural-urbano del lugar de nacimiento tiene una influencia estadística en la metilación del ADN décadas después. Los resultados fueron presentados en comunicación oral por la doctoranda en el congreso 18º International Society of Urban Health (ISUH), celebrado en Valencia en octubre de 2022.

4.7 Asociaciones basales obtenidas en el análisis integrado del nodo de Valencia con los demás nodos PREDIMED-Plus

Como política general del estudio PREDIMED-Plus se prefiere el análisis multicéntrico de los datos salvo para lo que sean proyectos específicos de nodo. En ese caso los datos de Valencia son analizados junto con los demás centros participantes en el estudio y la doctoranda ha participado como autora en las publicaciones más relevantes. Entre ellas seleccionamos los siguientes resultados para presentarlos de manera breve.

4.7.1 Relación entre la zona geográfica de localización del nodo, consumo de alimentos y fenotipos intermedios

Se relacionó la zona geográfica donde residen los participantes del estudio PREDIMED-Plus con las características que definen el síndrome metabólico. Se analizaron los datos basales transversales: 6646 adultos españoles, de 55 a 75 años, con sobrepeso/obesidad y Síndrome metabólico, clasificados en cuatro áreas geográficas (Norte, Central, Este y Sur). El consumo de alimentos se recogió mediante el cuestionario validado de frecuencia de alimentos (CFCA) de 143 ítems para evaluar la ingesta de energía y nutrientes. La prevalencia de la ingesta inadecuada de nutrientes se estimó de acuerdo con las ingestas dietéticas de referencia (IDR). Para los análisis, se utilizó regresión logística ajustada multivariante para evaluar la relación entre el área geográfica y la ingesta inadecuada de nutrientes. Los resultados mostraron que los participantes que

residían en el área norte consumían cantidades significativamente más bajas de verduras y pescado, pero más azúcar y alcohol ($p < 0,001$) que lo que se observaba en otras áreas. Las ingestas de fibra dietética, vitamina A, E, calcio y magnesio fueron menores entre los hombres del área Norte que en las otras áreas ($p < 0,001$). Otras variables como el sexo femenino, ser no fumador y realizar actividad física diariamente también se asociaron con una ingesta adecuada de nutrientes. Tras estos datos se determinó que el área geográfica puede influir en la ingesta de nutrientes, por lo que el efecto sobre la calidad de la dieta debe tenerse en cuenta al planificar las políticas alimentarias de cada área geográfica (Cano-Ibáñez N et al., 2018) (tablas 4.36 y 4.37).

Tabla 4.36. Ingesta de grupos de alimentos (g/día), adherencia a dieta mediterránea y perfiles nutricionales entre áreas geográficas analizadas

	North Area		Central Area		East Area		South Area		p Value
n	(n = 1436)		(n = 493)		(n = 2938)		(n = 1779)		
	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI	
Food group intake									
Vegetables (g/day)	291.1	284.1–298.2	327.8	315.1–340.5	335.8	330.8–34.7	331.5	325.1–337.9	<0.001
Fruits (g/day)	389.6	380.0–400.1	366.0	347.0–385.0	332.5	325.1–339.8	366.9	357.4–376.5	0.001
Legumes (g/day)	18.8	18.2–19.4	20.6	19.6–21.7	19.7	19.3–20.1	23.2	22.7–23.8	<0.001
Cereals (g/day)	173.4	169.4–177.4	150.2	143.0–157.3	142.8	140.0–145.5	143.8	140.2–147.4	<0.001
Milk/ dairy products (g/day)	367.0	356.6–377.3	387.3	368.7–405.9	320.8	313.6–328.1	357.9	348.6–367.3	<0.001
Meat/meat products (g/day)	150.8	147.9–153.7	143.6	138.4–148.8	155.4	153.4–157.5	125.7	123.1–128.3	<0.001
Olive oil (g/day)	42.9	42.0–43.8	35.9	34.4–37.5	40.6	40.0–41.2	37.0	36.2–37.8	<0.001
Fish/seafood (g/day)	95.7	93.3–98.1	109.8	105.4–114.1	102.5	100.9–104.2	99.5	97.3–101.7	<0.001
Nuts (g/day)	12.9	12–13.8	16.3	14.7–17.9	15.0	14.4–15.6	15.5	14.7–16.3	<0.001
Sugar/ sweets (g/day)	32.6	31.1–34.2	29.5	26.7–32.2	25.5	24.5–26.6	23.2	21.8–24.6	<0.001
Eggs (g/day)	25.9	25.3–26.5	24.1	23.0–25.2	22.6	22.1–23.0	23.0	22.5–23.6	<0.001
Adherence to MedDiet									
MedDiet Q-P17 ^a , mean	8.6	8.4–8.7	9.2	9.0–9.5	8.1	8.0–8.2	8.9	8.8–9.0	<0.001
Energy intake and nutrient profiles, mean									
Total energy intake (kcal/day)	2425.0	2397.6–2452.3	2398.8	2349.7–2447.9	2357.6	2338.5–2376.6	2301.0	2276.3–2325.7	<0.001
Total fat intake (%)	38.3	38.0–38.6	38.5	37.9–39.1	40.4	40.1–40.6	39.0	38.7–39.3	<0.001
Monounsaturated fat (%)	19.9	19.7–20.2	19.5	19.1–19.9	21.0	20.8–21.1	20.3	20.1–20.5	<0.001
Polyunsaturated fat (%)	6.1	6.0–6.2	6.3	6.1–6.5	6.4	6.3–6.4	6.5	6.4–6.6	<0.001
Saturate fat (%)	9.5	9.4–9.6	10.1	9.9–10.2	10.3	10.2–10.3	9.6	9.5–9.6	<0.001
Carbohydrate intake (%)	41.8	41.1–42.1	41.6	41.0–42.3	39.8	39.6–40.1	41.8	41.5–42.1	<0.001
Protein intake (%)	16.3	16.1–16.4	17.0	16.7–17.2	16.8	16.7–16.9	16.4	16.3–16.5	<0.001
Alcohol intake (g/day)	13.5	12.8–14.2	10.4	9.1–11.6	10.6	10.1–11.1	9.7	9.1–10.4	<0.001
Fibre intake (g/day)	25.8	25.4–26.3	26.4	25.6–27.3	25.8	25.4–26.1	26.2	25.8–26.6	0.191

Ingesta de grupos de alimentos (g/día), adherencia a dieta mediterránea y perfiles nutricionales entre áreas geográficas analizadas (población total n = 6646). Los valores se presentan como medias ajustadas por edad y sexo. Se realizó la prueba ANCOVA a dieta mediterránea Q-P17, adherencia al cuestionario de dieta mediterránea 17 puntos (Cano-Ibáñez N et al., 2018).

Tabla 4.37. Participantes con ingesta de nutrientes por debajo de 2/3 de las IDR por áreas geográficas, edad y sexo.

Nutrient	Group	DRI ^a	North Area	Central Area	East Area	South Area	p Value ¹
Dietary fibre	Male 55-70	30 g/day	28.1	28.4	27.0	29.2	0.744
	Male >70	30 g/day	19.4	27.8	24.0	29.4	0.442
	Female 60-70	21 g/day	2.3	4.6	4.1	4.0	0.310
	Female >70	21 g/day	3.7	6.9	5.6	2.2	0.383
<i>p value</i> ²			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Vitamin A	Male 55-70	900 µg/day	28.8	21.2	15.8	16.6	<0.001
	Male >70	900 µg/day	25.5	16.7	17.3	17.4	0.353
	Female 60-70	700 µg/day	8.6	5.8	5.6	5.2	0.078
	Female >70	700 µg/day	8.2	6.9	10.4	5.1	0.341
<i>p value</i> ²			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Vitamin B ₉	Male 60-70	400 µg/day	19.3	18.5	22.2	22.6	0.250
	Male >70	400 µg/day	17.4	22.2	18.8	23.9	0.667
	Female 55-70	400 µg/day	15.7	17.3	17.4	20.2	0.204
	Female >70	400 µg/day	11.9	24.1	21.9	21.0	0.092
<i>p value</i> ²			0.128	0.819	0.020	0.649	
Vitamin D	Male 60-70	15 µg/day	89.0	75.7	83.6	83.0	<0.001
	Male >70	20 µg/day	99.0	100.0	97.6	97.8	0.786
	Female 55-70	15 µg/day	87.9	77.5	82.0	85.0	0.002
	Female >70	20 µg/day	98.5	93.1	97.2	100.0	0.061
<i>p value</i> ²			<0.001	0.021	<0.001	<0.001	
Vitamin E	Male 55-70	15 mg/day	63.7	52.3	43.3	43.6	<0.001
	Male >70	15 mg/day	56.1	50.0	44.7	54.4	0.214
	Female 60-70	15 mg/day	63.1	48.6	49.0	50.4	<0.001
	Female >70	15 mg/day	70.2	44.8	61.8	61.6	0.062
<i>p value</i> ²			0.178	0.826	<0.001	<0.001	
Calcium	Male 55-70	1000 mg/day	14.2	8.6	11.7	13.5	0.090
	Male >70	1200 mg/day	22.5	11.1	30.8	30.4	0.163
	Female 60-70	1200 mg/day	25.3	19.7	26.7	25.7	0.268
	Female >70	1200 mg/day	21.6	27.6	24.3	28.3	0.625
<i>p value</i> ²			<0.001	0.002	<0.001	<0.001	
Magnesium	Male 55-70	420 mg/day	10.2	8.1	7.6	7.7	0.206
	Male >70	420 mg/day	12.2	5.6	8.7	9.8	0.718
	Female 60-70	320 mg/day	1.0	1.7	1.2	1.5	0.846
	Female >70	320 mg/day	1.5	3.5	1.2	1.5	0.819
<i>p value</i> ²			<0.001	0.042	<0.001	<0.001	

IDR: Ingesta dietética de referencia. Se utilizó la prueba Chi-Cuadrado de Pearson para estimar las diferencias entre la prevalencia de ingestas inadecuadas de nutrientes según el área geográfica para cada estrato de edad y sexo (valor de *p* 1) y también para estimar las diferencias entre la prevalencia de ingestas inadecuadas de nutrientes según la edad y el sexo, para cada área geográfica (valor de *p* 2) (Cano-Ibáñez N et al., 2018).

4.7.2 Asociación entre indicadores socioeconómicos y calidad de la dieta

Es probable que las disparidades socioeconómicas y los factores del estilo de vida determinen la calidad general de la dieta tal como se ha ido mencionando a lo largo de esta Tesis Doctoral. Una de las publicaciones recogía las conclusiones tras analizar la influencia de los factores socioeconómicos y de estilo de vida en la densidad de nutrientes, pudiendo influir y/o condicionar alteraciones en el metabolismo. Para esto se realizaron análisis transversales de la información basal del estudio PREDIMED-Plus con 6646 participantes. La ingesta de energía y nutrientes (para 10 nutrientes) se calculó utilizando el CFCA y la densidad de nutrientes se estimó dividiendo la ingesta absoluta de nutrientes por la ingesta total de energía. La prevalencia de ingesta inadecuada se estimó de acuerdo con las ingestas dietéticas de referencia. Se ajustaron modelos de regresión lineal multivariable para examinar las asociaciones entre el estado socioeconómico o los factores del estilo de vida y la densidad de nutrientes. Los resultados que se obtuvieron mostraron que una proporción considerable de los participantes examinados realizaba una ingesta deficiente de vitaminas A, D, E, B₉, calcio, magnesio y fibra dietética (tabla 4.38). La ingesta inadecuada de cuatro o más de los diez nutrientes considerados estuvo presente en el 17% de los participantes. Una mayor densidad de nutrientes se asociaba directa y significativamente con el sexo femenino, un mayor nivel educativo y una mejor adherencia a la dieta mediterránea. Los factores del estilo de vida, como no fumar y evitar los estilos de vida sedentarios, también se asociaron de forma independiente con una mejor densidad de nutrientes (Cano-Ibáñez N et al., 2020).

Tabla 4.38. Coeficientes de un modelo de regresión lineal multivariable ajustado para evaluar la diferencia en la densidad de nutrientes por varias variables

	Total fibre g/1000 kcal	Vitamin A µg/1000 kcal	Vitamin B ₉ µg/1000 kcal	Vitamin D µg/1000 kcal	Vitamin E mg/1000 kcal	Calcium mg/1000 kcal	Magnesium mg/1000 kcal
Sex							
Men	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
Women	1.3 (1.12, 1.46)	33.4 (16.71, 50.02)	15.2 (13.10, 17.32)	0.2 (0.09, 0.27)	0.3 (0.20, 0.34)	38.5 (31.16, 45.79)	12.2 (10.45, 13.87)
Age							
≤70 y ^a	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
>70 y	0.3 (0.08, 0.48)	-21.9 (-41.09, -2.75)	1.2 (-1.22, 3.64)	-0.1 (-0.20, 0.01)	-0.08 (-0.16, -0.01)	4.0 (-4.46, 12.37)	-0.5 (-2.49, 1.45)
Smoking habits							
Current smoker	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
Former smoker	0.4 (0.16, 0.60)	-12.8 (-34.04, 8.37)	1.9 (-0.80, 4.57)	0.1 (-0.01, 0.21)	0.04 (-0.04, 0.13)	10.4 (1.04, 19.66)	2.9 (0.73, 5.09)
Never smoker	0.5 (0.28, 0.74)	-2.9 (-25.16, 19.42)	3.5 (0.71, 6.35)	0.1 (0.01, 0.25)	0.07 (-0.02, 0.17)	19.6 (9.77, 29.34)	3.9 (1.59, 6.18)
Physical activity status							
Less active	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
Moderately active	0.4 (0.22, 0.58)	5.7 (-11.72, 23.02)	4.1 (1.85, 6.25)	-0.1 (-0.10, 0.08)	0.08 (0.01, 0.16)	4.4 (-3.20, 12.05)	3.4 (1.61, 5.18)
Active	0.2 (-0.01, 0.34)	-16.7 (-33.53, 0.11)	2.0 (-0.17, 4.09)	-0.1 (-0.14, 0.04)	-0.04 (-0.12, 0.03)	-2.4 (-9.75, 5.02)	0.6 (-1.15, 2.31)
Educational status							
Tertiary	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
Secondary	-0.1 (-0.29, -0.09)	0.9 (-17.79, 19.66)	-3.7 (-6.02, -1.28)	0.1 (-0.09, 0.11)	-0.07 (-0.14, 0.01)	-3.5 (-11.69, 4.76)	-2.8 (-4.71, -0.86)
Primary	-0.1 (-0.27, -0.10)	10.3 (-7.68, 28.26)	-2.9 (-5.17, -0.62)	-0.1 (-0.13, 0.06)	-0.01 (-0.09, 0.07)	-1.5 (-9.37, 6.41)	-4.7 (-6.59, -2.89)
Civil status							
Married	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
Widowed	-0.3 (-0.53, -0.02)	14.6 (-11.84, 41.10)	-0.8 (-4.18, 2.52)	-0.1 (-0.24, 0.04)	0.1 (-0.10, 0.12)	0.4 (-11.18, 12.07)	-0.9 (-3.66, 1.78)
Divorced/ separated	0.3 (0.05, 0.62)	20.3 (-7.23, 47.89)	1.7 (-1.82, 5.15)	-0.1 (-0.22, 0.08)	0.2 (0.06, 0.29)	6.0 (-6.14, 18.01)	4.1 (1.26, 6.92)
Others ^b	0.2 (0.13, 0.55)	-7.4 (-40.23, 25.39)	-0.7 (-4.82, 3.49)	-0.1 (-0.21, 0.13)	0.1 (-0.07, 0.21)	-10.2 (-24.64, 4.17)	1.2 (-2.18, 4.57)
Living alone							
Yes	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
No	-0.2 (-0.50, 0.04)	22.7 (-3.58, 49.03)	1.1 (-2.20, 4.46)	-0.2 (-0.31, -0.03)	0.1 (-0.07, 0.15)	-3.9 (-15.43, 7.68)	-2.2 (-4.87, 0.54)
MedDiet adherence							
Low	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)	0 (ref)
Medium	1.33 (1.17, 1.48)	35.4 (20.17, 50.60)	12.9 (11.01, 14.87)	0.38 (0.30, 0.46)	0.09 (-0.03, 0.16)	33.3 (26.58, 39.95)	15.2 (13.64, 16.77)
High	3.05 (2.86, 3.24)	66.5 (48.09, 84.83)	29.7 (27.41, 32.06)	0.75 (0.65, 0.84)	0.24 (-0.17, 0.32)	69.7 (61.67, 77.80)	33.4 (31.46, 35.23)

Los coeficientes deben interpretarse como diferencias (intervalo de confianza del 95%) de la densidad media de nutrientes en g/1000 kcal. El modelo multivariable incluye todas las variables presentadas anteriormente y se ajusta adicionalmente por índice de masa corporal (continuo, kg / m²), estado laboral (4 categorías), ingesta de carbohidratos (continuo), ingesta de MUFA (continuo), ingesta de AGPI (continuo) e ingesta de SFA (continuo). a) Esta categoría de edad incluye 55-70 años para los hombres, y 60-70 años para las mujeres. b) Incluye estados civiles: religiosos y solteros (Cano-Ibáñez N et al., 2020).

4.7.3 Asociación entre duración y calidad del sueño con parámetros antropométricos y otros fenotipos de riesgo

El sueño, su duración y calidad, también fueron medidos, analizados y publicados en el 2018 (Rosique-Esteban N et al., 2018), y se examinaron las asociaciones independientes y combinadas de la duración del sueño y la variabilidad del sueño con la composición corporal, la obesidad y la diabetes en participantes del estudio PREDIMED-Plus. La muestra seleccionada consistía en 1986 residentes en la comunidad con sobrepeso/obesidad y síndrome metabólico. Se evaluaron y analizaron de forma transversal las asociaciones de la duración del sueño derivada de la acelerometría y la variabilidad del sueño con el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de la cintura (CC) y la composición corporal ajustando modelos de regresión lineal ajustados multivariable. Los cocientes de prevalencia (RP) y los intervalos de confianza (IC) del 95% para la obesidad y la diabetes se obtuvieron mediante regresión de Cox ajustada multivariable con tiempo constante. Los participantes que fueron considerados “peor durmientes” (duración del sueño no recomendada específica de la edad más la variabilidad del sueño por encima de la mediana) y los “mejores durmientes” (duración del sueño recomendada específica de la edad más la variabilidad del sueño por debajo de la mediana) se caracterizaron combinando la duración del sueño y la variabilidad del sueño, y se examinaron sus asociaciones con estos resultados. Como resultados se detectó que el incremento de una hora por la noche en la duración del sueño se asociaba inversamente con el IMC ($\beta -0,38 \text{ kg/m}^2$ [IC del 95%: $-0,54$ - $-0,23$]), CC ($\beta -0,86 \text{ cm}$ [IC95%: $-1,25$ - $-0,47$]), obesidad (PR 0,96 [IC del 95%: 0,93-0,98]), diabetes (PR 0,93 [IC95%: 0,88-0,98]) y otras medidas relacionadas con la adiposidad derivadas de DXA (grasa androide y grasa del tronco, todas $p < 0,05$). Cada incremento de 1 hora en la variabilidad del sueño se asociaba positivamente con diabetes (PR 1,14 [IC del 95%: 1,01-1,28]). En comparación con los “mejores dormidores”, los “peores dormidores” se veían asociados positivamente con la obesidad (PR 1,12 [IC del 95%: 1,01-1,24]) y DT2 (PR 1,62 [IC del 95%: 1,28-2,06]). Este análisis reveló asociaciones transversales de la duración del sueño con parámetros de adiposidad y obesidad. La duración del sueño y la variabilidad del sueño se asociaron con diabetes, por lo tanto, tener en consideración la duración y la variabilidad del sueño podrían aportar un valor adicional al tratamiento de la diabetes, ya que pueden actuar de forma sinérgica (figura 4.30) (Rosique-Esteban N et al., 2018).

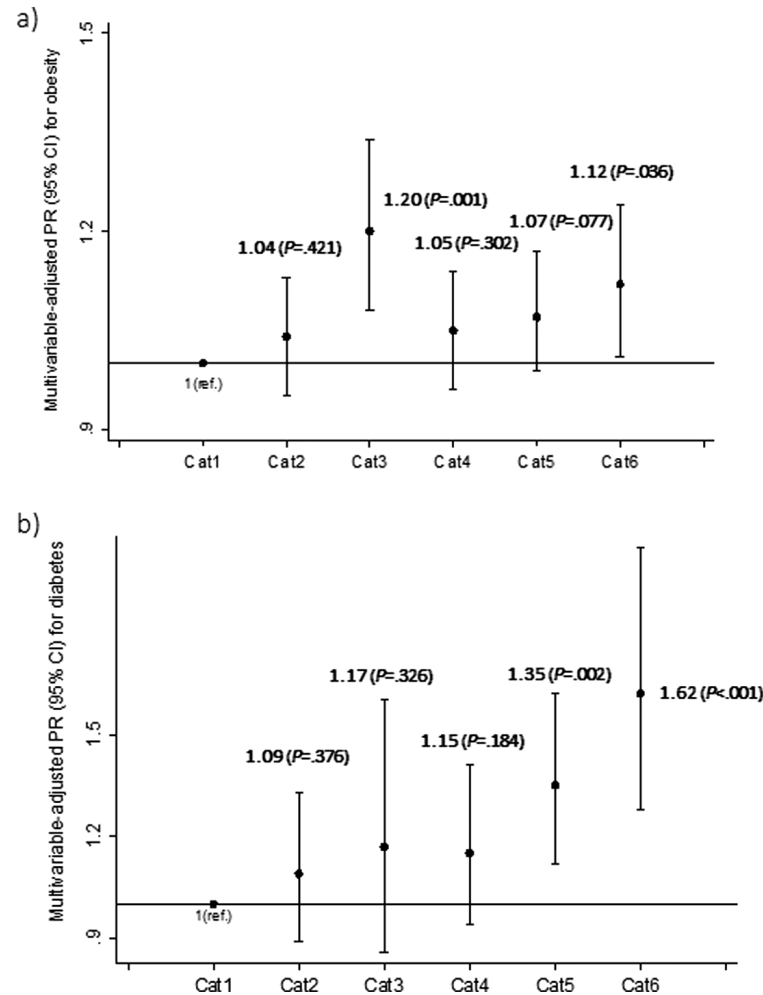


Figura 4.30. La prevalencia se ajustó con modelo multivariable para: la obesidad (a) y la diabetes (b) en categorías conjuntas de duración del sueño y variabilidad del sueño.

Cat: categoría. Cat1 ("personas que duermen bien") incluyó a los participantes después de la duración del sueño recomendada específica para su edad (7-9 horas / noche de sueño para individuos con <65 años y 7-8 horas/noche para individuos con ≥65 años) más baja variabilidad del sueño (<mediana del sueño DE) (n = 400). Cat2 incluyó participantes con una duración del sueño que puede ser apropiada según su edad específica más baja variabilidad del sueño (n = 489). Cat3 incluyó participantes con duración del sueño no recomendada más baja variabilidad del sueño (n = 96). Cat4 incluyó participantes después de la duración recomendada del sueño específica por edad más una alta variabilidad del sueño (n = 385). Cat5 incluyó participantes con una duración del sueño que puede ser apropiada según su edad específica más alta variabilidad (n = 469). Cat6 ("durmientes mal") para los participantes con duración del sueño no recomendada (<6 horas/noche de sueño para individuos con <65 años y <5 horas/noche para individuos con ≥65 años o ≥9 horas/noche) más alta variabilidad del sueño (≥mediana de sueño DE) (n = 147) (Rosique-Esteban N et al., 2018).

4.7.4 Asociación entre consumo de frutas y parámetros cardiometabólicos

Otro de los artículos publicados abarcaba la información sobre el consumo de frutas y su asociación con diferentes parámetros cardiometabólicos (Becerra-Tomás N et al., 2021). Nuevamente, la muestra multicéntrica, con 6633 participantes, fueron evaluados con el CFCA para registrar su consumo de frutas, anotando la frecuencia de consumo de los mismas. Se ajustaron modelos de regresión lineal para evaluar la asociación entre las variables de exposición (fruta total, subgrupos basados en el color de las frutas) y diferentes factores de riesgo cardiometabólicos. Los individuos que fueron clasificados en la categoría más alta de consumo total de fruta (≥ 3 porciones/d) tenían una menor circunferencia de cintura (CC) ($\beta = -1,04$ cm; IC del 95%: -1,81, -0,26), niveles de glucosa en ayunas ($\beta = -2,41$ mg/dL; IC95% (-4,19, -0,63) y colesterol LDL ($\beta = -4,11$ mg/dL; IC 95%: -6,93, -1,36), pero, inesperadamente, presión arterial sistólica más alta ($\beta = 1,84$ mmHg; IC del 95%: 0,37, 3,30) y presión arterial diastólica ($\beta = 1,69$ mmHg; IC 95%: 0,83, 2,56) en comparación con aquellos en la categoría más baja de consumo (< 1 porciones/día). Los participantes que consumieron ≥ 1 porción/día de zumo de fruta total tenían menores niveles de CC ($\beta = -0,92$ cm; IC del 95%: -1,56, -0,27) y glucosa en ayunas ($\beta = -1,59$ mg/dL; IC 95%: -2,95, -0,23) que aquellos que consumieron < 1 porción/mes (figura 4.31). Las asociaciones con los factores de riesgo cardiometabólico difirieron según el color de las frutas. Estos resultados mostraron que el color de las frutas podía asociarse a ciertas variables de riesgo cardiovascular y Síndrome metabólico, sin embargo, respecto a las asociaciones con los niveles de presión arterial más elevados podrían atribuirse, al menos parcialmente, al sesgo de causalidad inversa inherente al diseño transversal del estudio (Becerra-Tomás N et al., 2021).

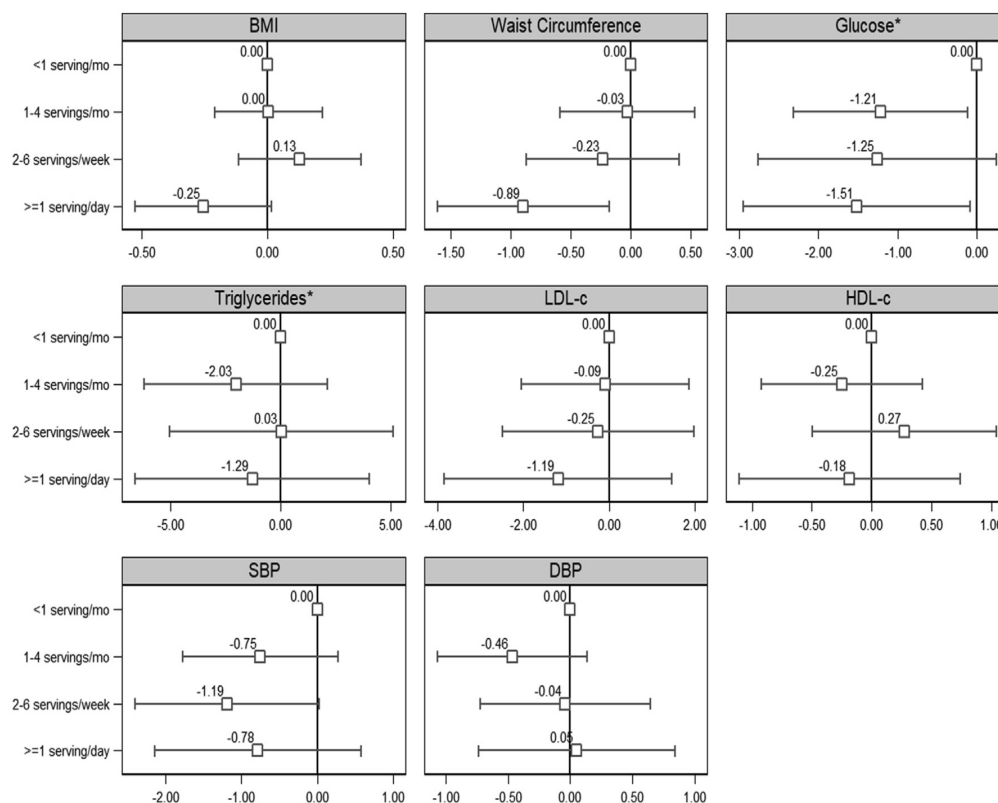


Figura 4.31. Coeficientes b ajustados multivariados e IC del 95% para diferentes factores de riesgo cardiovascular según categorías de consumo de jugo de fruta natural.

Los modelos de regresión lineal y los análisis de regresión mediana se ajustaron por sexo, edad (en años), hábito de fumar (nunca, ex fumador o actual), nivel educativo (primaria, secundaria o universidad/posgrado), prevalencia de diabetes (sí/no), prevalencia de hipertensión o uso de antihipertensivos (sí/no), prevalencia de hipercolesterolemia (sí/no), actividad física en el tiempo libre (METs x min/semana), centro de reclutamiento (en cuartiles por número de participantes), ingesta de energía (Kcal/día), ingesta de alcohol (g/d y agregando el término cuadrático), cribado de 16 puntos (excluyendo el elemento de fruta) de adherencia a la dieta mediterránea (continuo), consumo total de fruta (<1 porción/día, 1 a <2 porciones / día, 2 a <3 porciones/día o 3 porciones/día) e IMC (excepto IMC y circunferencia de la cintura). Los datos son medianos (IC95%) (Becerra-Tomás N et al., 2021).

4.7.5 Asociación entre ingesta de líquidos y variables cardiometabólicas en subproyecto PREDIMED-Plus

La medida de la ingesta de líquido en el estudio PREDIMED-Plus, sólo se ha realizado en una submuestra de participantes de distintos nodos. La ingesta de agua en dichos participantes PREDIMED-Plus se publicó en 2019. El objetivo era evaluar las posibles asociaciones entre el consumo de líquidos a partir de las recomendaciones de ingesta total de agua que se realizan a los participantes (TWI) y la ingesta total de agua a partir de bebidas (TWIF) y determinados factores sociodemográficos y de estilo de vida en los participantes con Síndrome metabólico y riesgo cardiovascular, reclutados en PREDIMED-Plus. En el análisis transversal se incluyeron datos de 1902 participantes. Se utilizó un cuestionario español validado de ingesta de líquidos de 32 ítems para evaluar el consumo de bebidas y la ingesta de agua. Para los consiguientes análisis, se utilizaron modelos de regresión logística multivariable para evaluar la razón de posibilidades (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95 % para cumplir con las recomendaciones de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria para TWI y TWIF, según diversos factores sociodemográficos y de estilo de vida, y para las asociaciones conjuntas de la adherencia a la dieta mediterránea y la actividad física moderada-vigorosa (MVPA). Los resultados indicaron que el volumen total medio de ingesta de líquidos en la población estudiada era de 1934 ± 617 ml/día. El agua era la bebida más consumida. Sólo se observaron diferencias significativas entre sexos en el consumo de bebidas alcohólicas y calientes. El cumplimiento de TWIF se asoció con el sexo femenino (OR 3,02; 2,40, 3,80), alta adherencia a dieta mediterránea (OR 1,07; 1,02, 1,12) y en los participantes que realizaban más actividad física (OR 1,07; 1,02, 1,13). La edad se asociaba inversamente (OR 0,96; 0,94, 0,98). Se observaron resultados similares para el cumplimiento de las recomendaciones TWI en relación al sexo (OR 5,34; 3,85, 7,42), a la adherencia a dieta mediterránea (OR 1,16; 1,02, 1,31) y actividad física (OR 1,07; 1,00, 1,15), mostrando una asociación conjunta entre la actividad física y adherencia a dieta mediterránea. Por lo que se concluyó que el mejor cumplimiento de las recomendaciones hídricas se asociaba al sexo femenino y a seguir estilos de vida saludables donde la adherencia a dieta mediterránea y la realización de actividad física diaria están presentes (Paz-Graniel I et al., 2019) (figura 4.32).

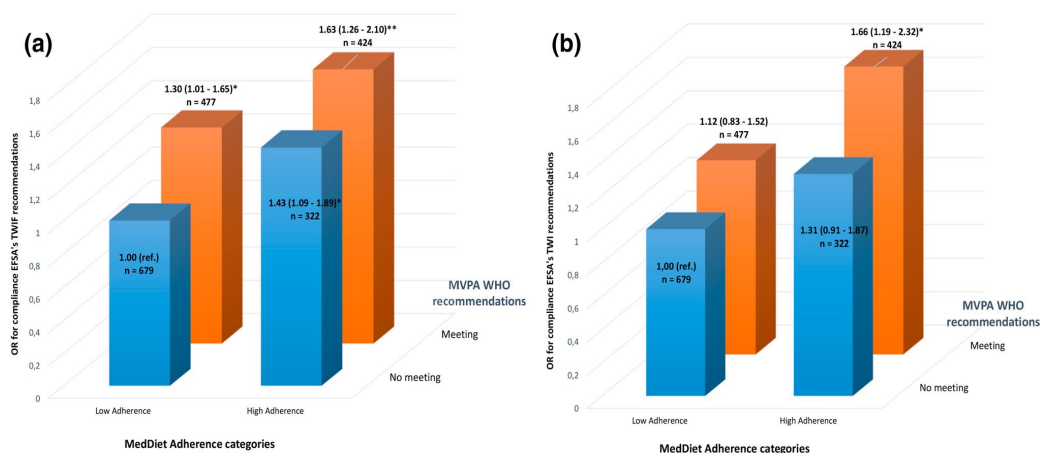


Figura 4.32. Porcentaje de individuos de la población estudiada que cumplen o no la recomendación de la EFSA para la ingesta total de agua de líquidos (TWIF) y la ingesta total de agua (TWI).

En el panel a) OR (IC del 95 %) por el cumplimiento de las recomendaciones de la EFSA para la ingesta total de líquidos para la asociación conjunta de la adherencia a la dieta mediterránea y las recomendaciones MVPA (n=1902). En el b) OR (IC 95%) para el cumplimiento de las recomendaciones de la EFSA para la ingesta total de agua para las asociaciones conjuntas de adherencia a la dieta mediterránea y las recomendaciones de MVPA (n=1902) (Paz-Graniel I et al., 2019).

4.7.6 Asociación entre consumo de café y variables cognitivas

Otro de los artículos publicados por Paz-Graniel I et al., fue el que evaluaba la asociación entre el consumo de café e ingesta de cafeína y el funcionamiento cognitivo deficiente en participantes PREDIMED-Plus. Se incluyeron los datos de todos los participantes que completaron la prueba Mini-Mental State Examination (MMSE) (n=6427; edad media=65±5 años), una de las pruebas pertinentes a la batería de pruebas neuropsicológicas protocoladas. El consumo de café y de cafeína quedaba registrado en el CFCA. Se analizaron transversalmente estos datos y se ajustaron los modelos de regresión logística para evaluar la asociación entre el consumo total de café con cafeína y descafeinado, así como el consumo total de cafeína en la dieta y el deterioro cognitivo. Los resultados mostraron que los consumidores totales de café y los de café con cafeína tenían un mejor funcionamiento cognitivo que los no-consumidores cuando se medía mediante el MMSE y tras ajustar por los posibles factores de confusión (OR 0,63; IC del 95%: 0,44–0,90 y OR 0,56; IC del 95 %: 0,38–0,83,

respectivamente). Los resultados fueron similares cuando se medía el rendimiento cognitivo mediante la prueba de dibujo del reloj (CDT) y la prueba de creación de trazos A y B (TMT-A/B). Estas asociaciones no se observaron para el consumo de café descafeinado. Los participantes que se clasificaban el tercil más alto de consumo total de cafeína en la ingesta diaria tenían menos probabilidades de deficiencia del funcionamiento cognitivo que los del tercil de referencia de menor consumo cuando se examinaron mediante el MMSE (OR 0,64; IC del 95 %: 0,47–0,87) y también cuando se medía con otras pruebas neurocognitivas que evaluaban otros dominios cognitivos (es decir, CDT y TMT-A/B) (figura 4.33) (Paz-Graniel I et al., 2020).

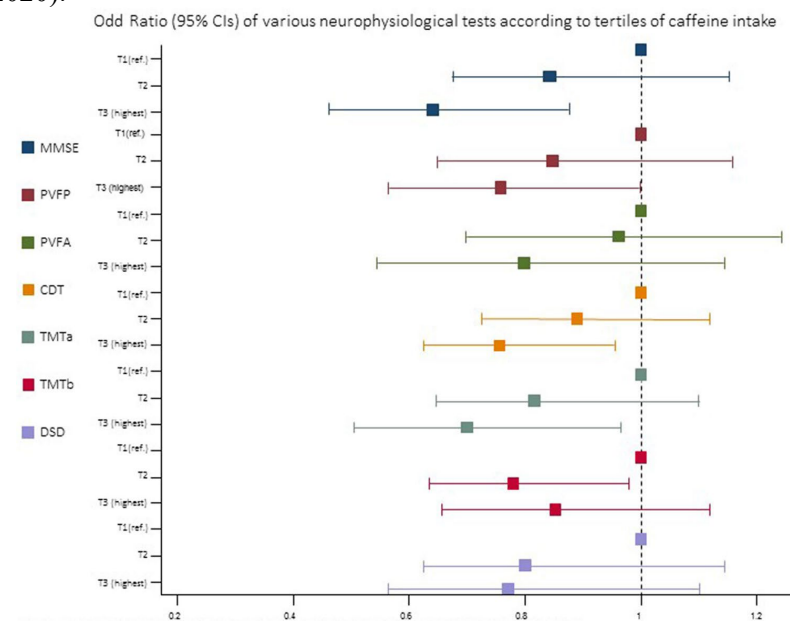


Figura 4.33. Odds ratio (IC 95%) de diversas pruebas neurofisiológicas según terciles de ingesta de cafeína.

MMSE: Mini Mental State Examination, PVFP: fluidez verbal fonológica, PVFA: fluidez verbal semántica, CDT: prueba de reloj, TMTa: pruebas de creación de senderos A, TMTb pruebas de creación de senderos B, DSD: puntuación memoria dígitos. Se realizó el modelo de regresión logística multivariable ajustado por edad (años), sexo, índice de masa corporal (kg/m^2), nivel educativo (primaria, secundaria o universidad/posgrado), tabaquismo (nunca, anterior o actual), consumo total de energía ($\text{kcal}/\text{día}$), actividad física ($\text{MET. min}/\text{semana}$), consumo de alcohol ($\text{g}/\text{día}$, y añadiendo el término cuadrático), prevalencia de diabetes (sí/no), hipertensión (sí/no), hipercolesterolemia (sí/no), consumo de verduras ($\text{g}/\text{día}$), frutas ($\text{g}/\text{día}$), frutos secos ($\text{g}/\text{día}$), galletas ($\text{g}/\text{día}$), pescado ($\text{g}/\text{día}$), productos lácteos ($\text{g}/\text{día}$), carne ($\text{g}/\text{día}$), legumbres ($\text{g}/\text{día}$), aceite de oliva ($\text{g}/\text{día}$), cereales ($\text{g}/\text{día}$), estado depresivo (depresión leve/moderada a grave) y centro participante (en cuartiles por número de participantes). Todos los análisis se realizaron con estimaciones robustas de la varianza para corregir la correlación intracluster (Paz-Graniel I et al., 2020).

4.7.7 Asociación entre consumo de otros alimentos y fenotipos intermedios

Otros alimentos consumidos analizados en la población PREDIMED-Plus han sido los lácteos fermentados y sus subtipos, y si existía asociación con determinados componentes del Síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. Se realizaron los consecuentes análisis transversales de información basal de 6572 participantes. Se hizo uso del CFCA y de los registros de mediciones antropométricas, bioquímicas y de presión arterial. Se ajustaron por modelos multivariantes los análisis de regresión de Cox para posibilitar el análisis entre la asociación del consumo de productos lácteos fermentados y sus subtipos y los componentes del Síndrome metabólico para estimar el riesgo relativo (RR) y los intervalos de confianza del 95% (IC del 95%). Los resultados mostraron que los participantes que eran altos consumidores de productos lácteos fermentados reportaban a su vez, un mayor consumo de frutas, verduras, pescado, nueces y pan integral y un menor consumo de pan blanco, alcohol y galletas, lo que aumentaba la calidad de la dieta. Los participantes clasificados en el cuartil superior mostraron menor prevalencia de tener los valores c-HDL bajos, característica en Síndrome metabólico (RR = 0,88; IC del 95%: 0,78-0,98) que aquellos clasificados en el cuartil más bajo de consumo de fermentados, como el queso. El consumo de queso se asociaba inversamente con la prevalencia de hipertrigliceridemia. Los productos lácteos fermentados totales, el yogur y sus tipos (desnatado, natural, bebido) no se asociaron con ninguno de los componentes del Síndrome metabólico (Mena-Sánchez G et al., 2018). La ingesta dietética de ácido fólico y si había asociación con parámetros de Síndrome metabólico también se determinó para esta población. La ingesta de folato (por 100 mcg/día) se clasificó su consumo en quintiles para los análisis transversales y se estimó utilizando un CFCA validado. Se calculó una puntuación a partir de los valores estandarizados de los parámetros que definen Síndrome metabólico, como se muestra en la fórmula: $[(\text{índice de masa corporal} + \text{relación cintura-altura})/2] + [(\text{presión arterial sistólica} + \text{presión arterial diastólica})/2] + \text{glucosa plasmática en ayunas} - \text{Colesterol HDL} + \text{triglicéridos plasmáticos}$. La puntuación de Síndrome metabólico se utiliza como variable continua y sus siete componentes fueron variables independientes a observar a su vez. Se realizó una regresión lineal robusta múltiple utilizando un estimador tipo MM para evaluar el ajuste de la asociación por posibles factores de confusión. Se observó un aumento de la ingesta de ácido fólico ajustada por energía que se asociaba a una reducción de la puntuación de Síndrome metabólico (β para 100 mcg/día=-0,12; IC del 95 %: -0,19 - -0,05) y la glucosa plasmática en ayunas (β =-0,03; IC95%: -0,05-0,02) independientemente de la adherencia a la dieta mediterránea y otros posibles factores de confusión. También encontramos una asociación positiva con HDL-colesterol (β =0,07; IC del 95%: 0,04-0,10). Estas

asociaciones sugerían que un consumo de ácido fólico superior puede estar asociado a puntuaciones más bajas en Síndrome metabólico (Navarrete-Muñoz EM et al., 2020).

4.8 Análisis longitudinal tras la intervención en los participantes PREDIMED-Plus Valencia

En el estudio PREDIMED-Plus Valencia se aleatorizaron 465 participantes bien al grupo de intervención intensiva con dieta mediterránea reducida en energía y actividad física (al que también se le prestó soporte conductual según el protocolo) o bien al grupo denominado “control” que no recibía la intervención intensiva sino sólo el consejo habitual en el “usual care” para este tipo de participantes con síndrome metabólico y edad avanzada, y por ello alto riesgo cardiovascular consistente en dieta mediterránea. Estos participantes se comenzaron a reclutar en el año 2014, finalizando el reclutamiento en todos los nodos el 31 de diciembre de 2016. Todos estos pacientes fueron intervenidos en sesiones individuales y grupales según la temporalidad correspondiente indicada en el protocolo del estudio y de acuerdo con el grupo de intervención asignado. Además, en todos ellos (salvo las incidencias mencionadas), se recogieron los datos de los diversos cuestionarios, medidas antropométricas, muestras biológicas, acelerometría, electros, etc, de acuerdo con el protocolo del estudio (Tabla 4.39).

Tabla 4.39. Temporalidad para la recogida de cuestionarios y muestras según el protocolo inicial del estudio PREDIMED-Plus

	RUN-IN PERIOD												
	S1	S2	S3	Baseline	M-6	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6	Y-7	Y-8
1. ELIGIBILITY QUESTIONNAIRE	X												
2. 3-DAY FOOD REGISTER	e		X										
3. ANTHROPOMETRIC MEASUREMENTS*	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4. GENERAL QUESTIONNAIRE				X									
5. 143-ITEM FFQ			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
6. MEDITERRANEAN DIET QUESTIONNAIRE (17/14-Items)**				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7. PHYSICAL ACTIVITY QUESTIONNAIRE†	e†		X†	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8. CHAIR TEST (Physical activity evaluation)				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9. ACCELEROMETERS			e	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10. FOLLOW-UP QUESTIONNAIRE					X	X	X	X	X	X	X	X	X
11. ELECTROCARDIOGRAM	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X
12. BLOOD PRESSURE MEASUREMENT	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13. BLOOD SAMPLE COLLECTION				X	X	X		X		X		X	X
14. MORNING SPOT URINE COLLECTION				X	X	X		X		X		X	X
15. NAIL COLLECTION				X		X		X		X		X	X
16. COGNITIVE-NEUROPSYCHOLOGICAL TESTS‡			X				X		X		X		X
17. PSYCHOPATHOLOGICAL QUESTIONNAIRES§	e		X			X	X	X	X	X	X	X	X
18. QUALITY OF LIFE QUESTIONNAIRES¶	e		X			X		X		X		X	

S: Screening visit; FFQ: Food-frequency questionnaire; M: Month; d: Delivery.

* Anthropometric measurements will include: weight, height, waist circumference and hip circumference.

† Short version of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire; PAR-Q, RAPA (RAPA1 and RAPA2) questionnaires; and the NHS sedentary lifestyle questionnaire

‡ Long version of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire.

**Short questionnaires on adherence to the Mediterranean Diet. The control group will use the same 14-item questionnaire that was used in the PREDIMED trial (Schroeder et al., 2011). The intervention group will use the 17-item energy-restricted Mediterranean diet questionnaire (see below).

§Mini-Mental Status Examination, clock test, phonological verbal fluency test (animals + P), the reverse series of digits test (WAIS-III), and the trail making test.

¶Beck Depression Inventory (BDI-II), multidimensional scale of weight locus of control, eating disorders diagnostic criteria, and SF-36 quality of life scale.

Actualmente, tras finalizar diciembre de 2022, todos los participantes en el estudio PREDIMED-Plus han finalizado según protocolo los 6 años de seguimiento con intervención. En el nodo de Valencia, salvo los fallecidos y las incidencias menores de pérdidas de seguimiento mencionadas, todos los participantes han completado los 6 años de seguimiento e intervención. Los participantes que fueron reclutados los primeros meses, han finalizado ya los 8 años de seguimiento, y un número importante de los siguientes participantes ha completado también el séptimo año de seguimiento. La doctoranda ha participado como dietista principal en el estudio, en coordinación con otros investigadores del grupo, reclutando, interviniendo y siguiendo anualmente a todos los participantes en las visitas anuales. A pesar de que se han recogido los datos correspondientes a todos los cuestionarios protocolizados, el estudio PREDIMED-Plus, no es un estudio finalizado. Todavía está en curso. Por ello, dado que esta Tesis Doctoral no se puede demorar más por los plazos de presentación, solamente podemos presentar los resultados autorizados por el Steering Committee del estudio PREDIMED-Plus, que a su vez sigue las recomendaciones del Comité Científico Externo que aconseja

analizar y publicar los mínimos datos de seguimiento hasta que no se finalice por completo en ensayo clínico. Por este motivo todos los nodos tienen que seguir dichas normas y salvo las excepciones ya comentadas en el caso de subestudios con proyectos financiados o el artículo del impacto de la pandemia de COVID-19, no es pertinente analizar y publicar datos más allá de uno o dos años de seguimiento. En esta Tesis presentaremos datos generales hasta dos años de seguimiento en nuestro nodo (todavía no publicados) y posteriormente incluiremos datos del estudio piloto que se publicó en una submuestra de participantes en estudio multicéntrico, así como otro estudio de seguimiento que se publicó para explorar el efecto de la intervención en los cambios en la dieta, en la antropometría y en los fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular a los 6 meses y al año de intervención.

4.8.1 Características generales de la intervención y cambios en la dieta y en la actividad física

Tal como se ha descrito anteriormente, los 465 participantes del nodo de Valencia fueron aleatorizados de manera centralizada en el estudio PREDIMED-Plus a los dos grupos de intervención que denominamos A y B. El grupo A es el grupo con intervención mínima (grupo control) y el grupo B es el grupo con intervención intensiva con dieta mediterránea reducida en energía, promoción de la actividad física y soporte conductual. De estos participantes, 226 fueron asignados al grupo control (A) y 239 fueron asignados al grupo de intervención intensiva (B). Al mostrar los resultados en las gráficas de evolución utilizaremos las denominaciones de grupo A y grupo B tal como nos ha aconsejado el Comité Científico Externo. Cada uno de estos grupos recibía las intervenciones de acuerdo con el protocolo establecido detallado en Métodos.

En la figura 4.34 se presenta el esquema indicando las sesiones de intervenciones individuales y grupales que se realizan en cada grupo según su asignación.

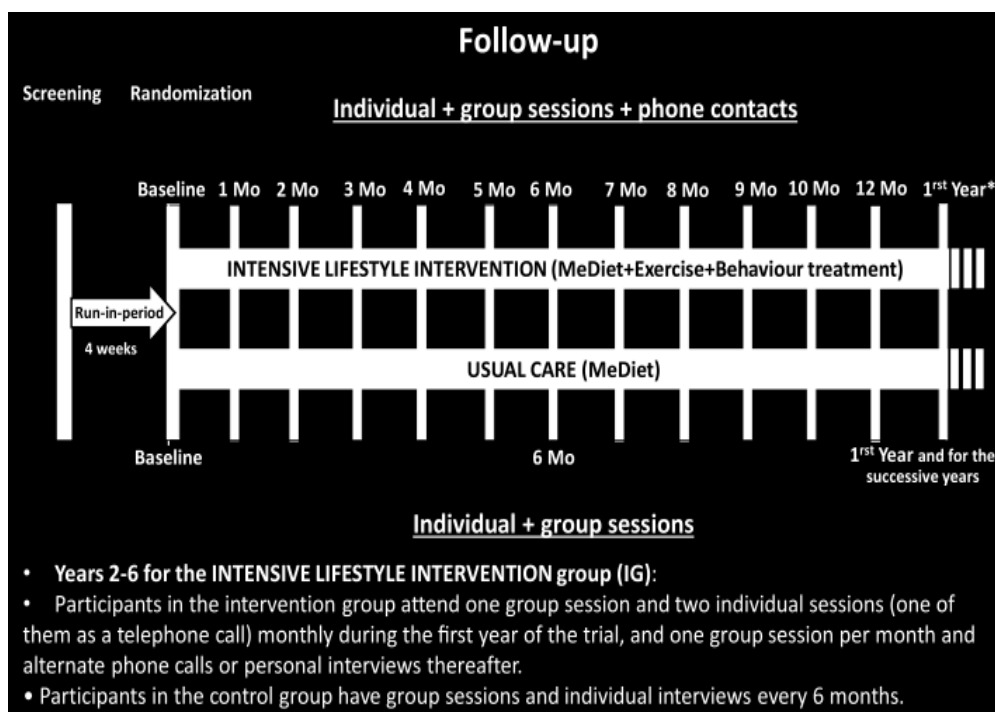


Figura 4.34. Esquema de la distribución anual de las intervenciones individuales y grupales que se han realizado en cada grupo de intervención según protocolo a lo largo de los 6 años de intervención intensiva en el estudio PREDIMED-Plus Valencia

El cumplimiento de las intervenciones se monitorizaba y se reportaba anualmente. En nuestro grupo en el nodo de Valencia el cumplimiento fue bueno durante. Sin embargo, la llegada de la pandemia COVID-19 alteró el protocolo del estudio y se tuvieron que tomar medidas consensuadas con todos los nodos y el Comité Científico Externo para seguir realizando las intervenciones de manera no presencial o con alternativas lo más viables posible. Recientemente, hemos publicado un artículo describiendo estas medidas y el impacto que han tenido en los principales parámetros del estudio. Dichos resultados se presentarán en el apartado siguiente.

La intervención con dieta mediterránea hipocalórica se monitorizaba con los cambios en las puntuaciones del cuestionario de los 17 puntos de adherencia a la dieta mediterránea. Esta intervención se tenía que reflejar en un aumento de la puntuación desde la visita basal a las siguientes visitas. Dicho aumento tenía que ser también superior en el grupo de intervención intensiva con dieta mediterránea

restringida en energía que en el grupo control a pesar de que este también tenía intervención no intensiva con dieta mediterránea. En la figura 4.35 se muestra la evolución de las puntuaciones en la escala de adherencia a la dieta mediterránea de 17 ítems según el grupo de intervención a tiempo cero, a los 6 meses, al año y los dos años de la intervención. Estos resultados están ajustados por sexo, edad y diabetes a nivel basal en un modelo multivariable de medidas repetidas. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la evolución temporal de la adherencia en los dos grupos ($p < 0,001$), subiendo rápidamente en la visita de 6 meses, ya que es cuando se realiza la intervención más intensiva y manteniéndose después anualmente. El valor de p presentado corresponde a la p de la interacción entre el grupo de intervención y el tiempo en el modelo ajustado de medidas repetidas. Podemos observar como el grupo de intervención intensiva con dieta mediterránea restringida en energía alcanza mayores puntuaciones en la escala que el grupo control.

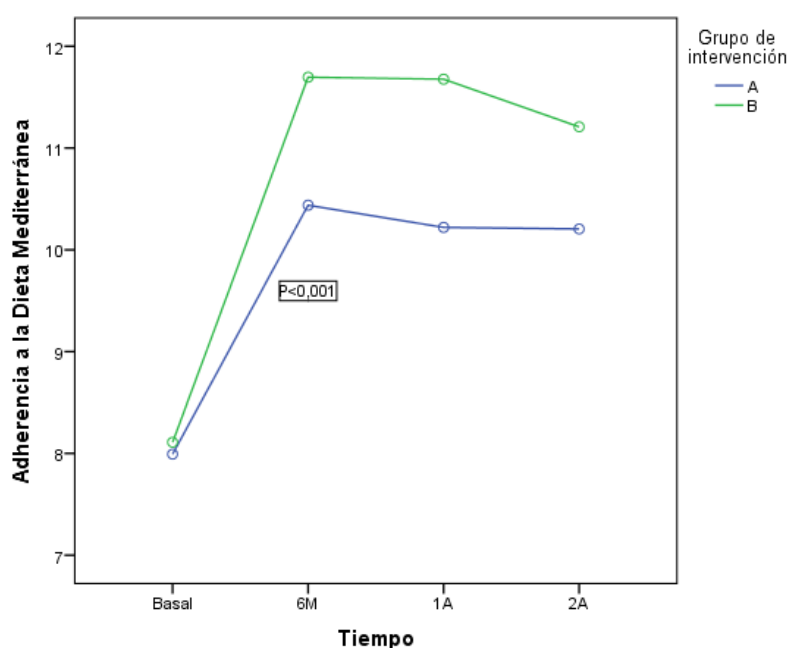


Figura 4.35. Evolución de la adherencia a la dieta mediterránea hipocalórica (escala 17p.) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia en función del grupo de intervención. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal

Para comprobar si la intervención dietética conseguía no sólo un aumento en la adherencia a la dieta mediterránea sino también una reducción en la energía

aportada por la misma, se calculó la energía total aportada por la dieta en cada participante y a cada tiempo mediante los CFCAs. En la figura 4.36 se presenta la evolución de la ingesta energética aportada por la dieta de manera basal, a los 6M, al año y a los 2 años en el nodo de Valencia según el grupo de intervención. Se han eliminado los 2 participantes que de manera basal tenían un aporte de energía superior a las 5000 kcal/d por ser implausible dicha ingesta. Se presenta también un modelo de medidas repetidas ajustado por edad, sexo y diabetes basal. La comparación entre los grupos alcanza las diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todo el período estudiado ($p < 0,001$). El valor de p presentado corresponde a la p de la interacción entre el grupo de intervención y el tiempo en el modelo ajustado de medidas repetidas. Efectivamente se consigue una reducción de la ingesta de energía superior en el grupo de intervención que en el grupo control, aunque esta reducción de la ingesta es menor que la planificada teóricamente en el protocolo del estudio PREDIMED-Plus. Esta observación ha sido común en la mayoría de los nodos del estudio.

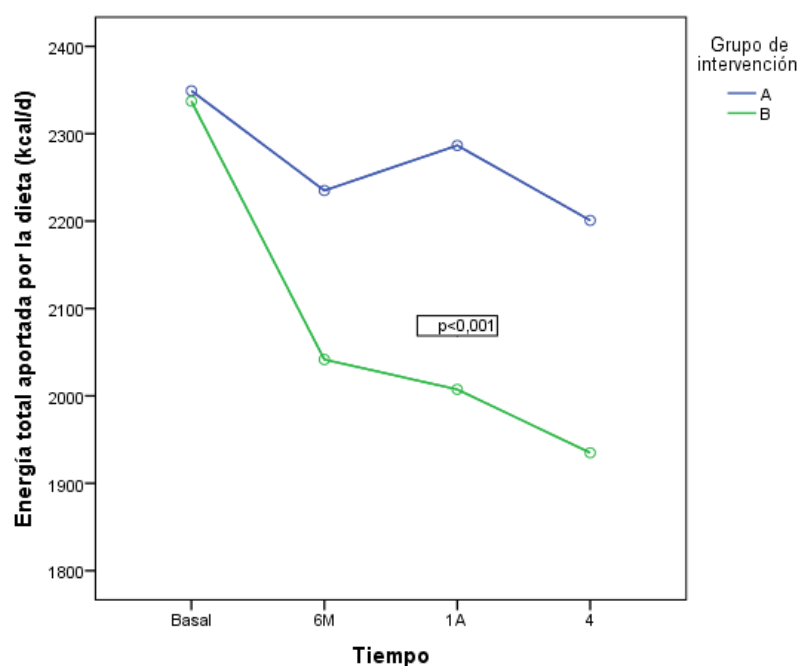


Figura 4.36. Evolución del aporte total de energía (kcal/día) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia en función del grupo de intervención. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal

Además de la intervención con dieta mediterránea hipocalórica, la intervención en el grupo intensivo constaba de la promoción de la actividad física de acuerdo con el protocolo general detallado en métodos. La actividad física realizada en el tiempo basal y en cada tiempo de seguimiento se medía a través de un cuestionario validado tal como se ha descrito en Métodos. Dicho cuestionario permite medir la actividad física total y con distintos grados de intensidad y su validez se ha testado en una submuestra del estudio PREDIMED-Plus que ha llevado acelerómetros para la medida más objetiva de la actividad física realizada (Schröder H et al., 2018). En la figura 4.37 se muestran los valores medios de actividad física realizada medida a través de dicho cuestionario validado en el momento basal, a los 6 meses, al año y a los dos años según el grupo de intervención. Se observa un incremento de la actividad física fundamentalmente en el grupo de intervención intensiva alcanzando diferencias estadísticamente significativas para todo el período de seguimiento ($p=0,001$). El valor de p presentado corresponde a la p de la interacción entre el grupo de intervención y el tiempo en el modelo de medidas repetidas ajustado por sexo, edad y diabetes basal.

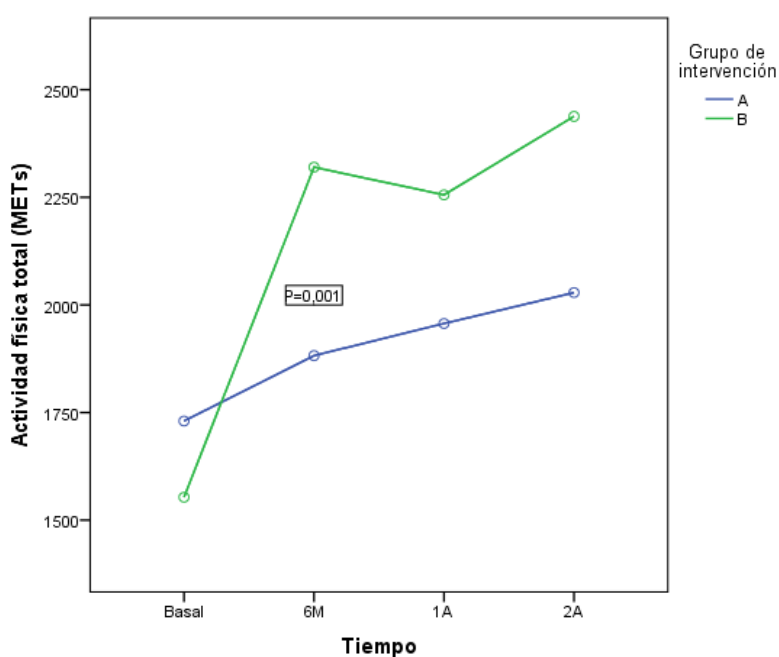


Figura 4.37. Evolución de la actividad física total realizada (medida en METs: equivalentes metabólicos min/sem) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal

4.8.2 Cambios en el peso y otras medidas antropométricas tras la intervención con dieta mediterránea hipocalórica y actividad física

El objetivo principal de la intervención intensiva con dieta mediterránea restringida en energía y el incremento de la actividad física era conseguir una pérdida de peso con diferencias entre el grupo de intervención y el grupo control. Una vez constatada que la intervención realizada conseguía diferencias estadísticamente significativas en la adherencia a la dieta mediterránea, una disminución de calorías y un aumento de la actividad física, pasamos a analizar si estos cambios (que resultaron menores que los que se planificaron en el protocolo general del estudio), tenían un efecto o no en la disminución de peso durante el seguimiento. En la Figura 4.38 se presenta la evolución del peso a tiempo basal, 6 meses, 1 año y 2 años según grupo de intervención. Basalmente, aunque el peso parece inferior en el grupo de intervención, las diferencias no son estadísticamente significativas ($p>0,05$). El cambio de peso más acusado se registra a los 6 meses, mientras que posteriormente cada año, las diferencias de peso se mantienen entre los grupos no observándose un efecto rebote de ganancia de peso en el grupo de intervención intensiva, siendo esto un efecto que preocupaba al comenzar el estudio. Las diferencias de peso son estadísticamente significativas entre los dos grupos a lo largo de la intervención ($p<0,001$). El valor de p presentado corresponde a la p de la interacción entre el grupo de intervención y el tiempo en el modelo de medidas repetidas ajustado por sexo, edad y diabetes basal.

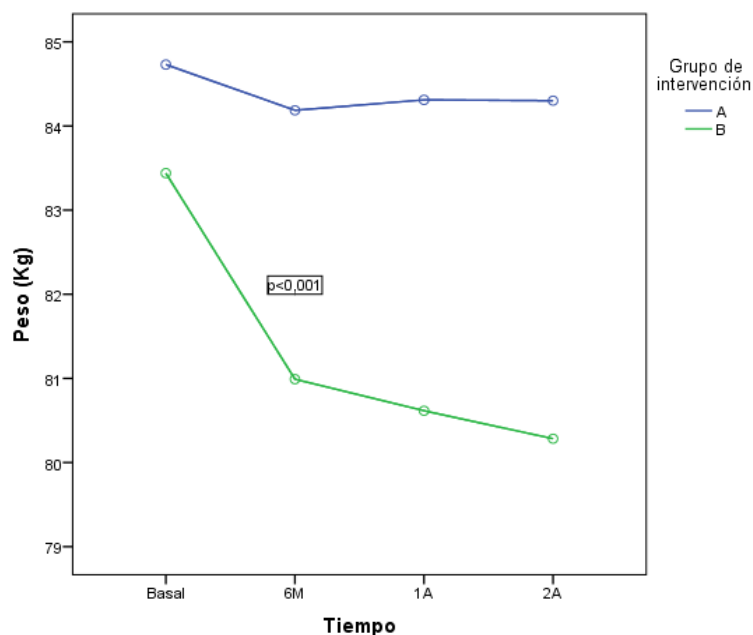


Figura 4.38. Evolución del peso total a tiempo basal, 6 meses, 1 año y 2 años según grupo de intervención) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal

Al analizar otras medidas antropométricas como perímetro de la cintura o IMC, también se observan los mismos cambios estadísticamente significativos en los dos grupos de intervención a lo largo del mismo período de estudio. Esta pérdida de peso ha sido en general un poco inferior a la planificada teóricamente en el protocolo del estudio, pero dadas las dificultades en el cumplimiento de las intervenciones en esta población de elevado riesgo cardiovascular, ha sido considerada satisfactoria y se espera que tenga un resultado positivo en la disminución del riesgo cardiovascular y de otros eventos relacionados con la adiposidad. En el apartado siguiente se mostrarán los resultados publicados de los efectos de la intervención en el estudio multicéntrico PREDIMED-Plus a los 6 meses y al año en el peso y otras medidas antropométricas a nivel global. En dicha publicación se han incluido los datos del nodo de Valencia junto con los demás nodos.

4.8.3 Influencia de la intervención con dieta mediterránea hipocalórica, aumentos de actividad y la pérdida de peso en cambios en la expresión

Dentro de nuestro proyecto específico en el nodo de Valencia, analizamos también si la pérdida de peso tras la intervención se asociaba con cambios en la expresión génica. Para ello utilizamos dos aproximaciones. En primer lugar, utilizar la aproximación de genes candidatos y en segundo lugar utilizar la aproximación de análisis de transcriptoma completo con un array de expresión tal como se ha indicado en métodos.

4.8.3.1 Influencia de la intervención en cambios en la expresión de genes candidatos seleccionados

En primer lugar, seleccionamos un listado de genes candidatos relacionados en estudios previos con respuesta a la dieta, estrés oxidativo o cronobiología y analizamos sus cambios de expresión. Como estos estudios son caros y requieren ARN de gran calidad, para maximizar las diferencias en los resultados de la expresión génica, seleccionamos 25 personas del grupo de intervención que hubieran perdido mucho peso y los comparamos con 25 participantes en el grupo control que no hubieran perdido peso, similares en variables de edad y sexo. Los genes seleccionados fueron PER1 y CLOCK (ritmo circadiano); CAT y GPX3 (estrés oxidativo); DDIT4 (reparación del ADN) y ARRDC3 (diabetes). También analizamos polimorfismos en los genes seleccionados genotipados por el Illumina Human OmniExpress Array. El ARN se aisló de sangre venosa periférica. Como el cambio de peso más rápido tuvo lugar a los 6 meses, se seleccionó este tiempo para el estudio de los cambios de expresión. El ARN se aisló al inicio y 6M de la intervención. La expresión génica se validó mediante RT-qPCR individual y los cambios de expresión entre el grupo control y el grupo de intervención se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las personas seleccionadas por su mayor cambio de peso en el grupo de intervención intensiva perdieron una media de -5-06Kg, mientras que los del grupo control apenas variaron su peso en -0,62Kg, respectivamente ($p < 0.01$). Los resultados obtenidos fueron presentados por la doctoranda en el congreso celebrado en 2018 en Barcelona por la European Society for Clinical Investigation (ESCI).

Detectamos un aumento en la expresión génica a 6M para los genes analizados, pero este aumento fue menor y no estadísticamente significativo en el

grupo control por separado. Este aumento lo podríamos atribuir a que el grupo control también aumenta su adherencia a la dieta mediterránea a los 6 meses, aunque en menor magnitud que el grupo de intervención intensiva. Además, el grupo de intervención lo hemos seleccionado por su mayor pérdida de peso adicional. Esta pérdida de peso, junto con una mayor adherencia a la dieta mediterránea contribuyó a que detectáramos varios cambios estadísticamente significativos en la expresión génica de la mayoría de los genes seleccionados. Así en un modelo multivariable encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes: CLOCK, $p=0,008$; PER1, $p=0,034$; CAT, $p=0,006$; ARRDC3, $p=0,029$ y DDIT4, $p=0,033$ a los 6 meses en este estudio de intervención. Se encontraron resultados en el límite de la significación estadística para el gen GPX3 ($p=0,051$). La figura 4.39 en sus distintos paneles, muestra los cambios de expresión para cada gen a los 6 meses de las intervenciones en función del grupo de intervención a los 6 meses de la misma.

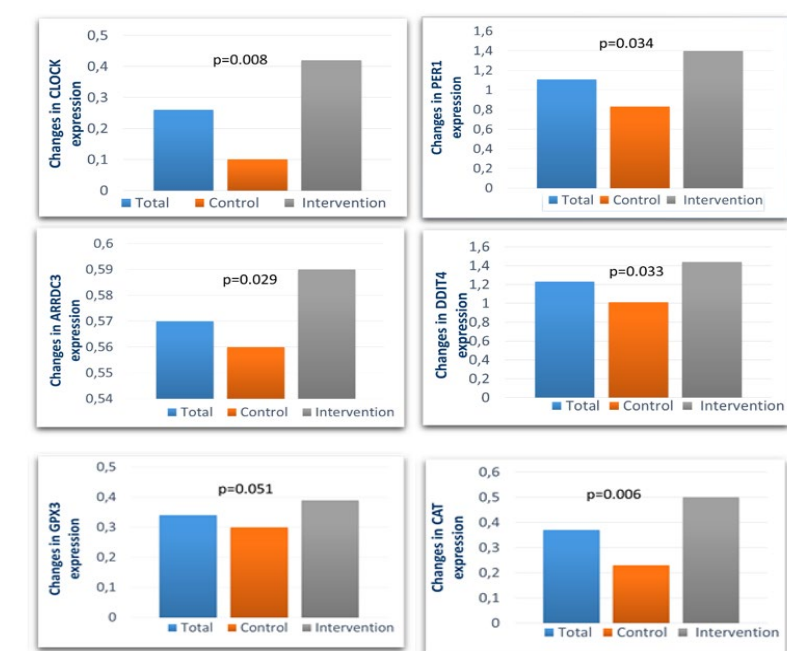


Figura 4.39. Cambios en la expresión de genes seleccionados tras 6 meses de intervención (Total, grupo control o intervención intensiva con pérdida de peso en una muestra seleccionada de participantes del nodo de Valencia, 25 participantes en el grupo de intervención con pérdida grande de peso y 25 participantes en el grupo control). Los valores p se han obtenido en un modelo multivariante ajustado por variables de confusión y se compara la expresión entre los grupos para cada gen indicado en cada panel

4.8.3.2 Influencia de la intervención en cambios en la expresión de genes en un estudio piloto de transcriptoma completo

Posteriormente en lugar de analizar los cambios de expresión en genes seleccionados, realizamos un estudio piloto para identificar a nivel de transcriptoma completo los genes que podían presentar cambios más significativos tras la intervención. En este caso quisimos estudiar los cambios de expresión al año de intervención, en lugar de a los 6 meses. Para ello seleccionamos 36 participantes aleatorizados al grupo de intervención (50% mujeres), que hubieran perdido 2 o más kilos al año. Se aisló el RNA total a partir de sangre, tanto en el momento basal como al año, y analizaron los cambios de expresión con un array de transcriptoma completo (GeneChip Human Transcriptome array 2.0). Se realizaron los análisis estadísticos en Partek Genome Suite, tras los controles de calidad y normalización. En el análisis de transcriptoma completo se detectaron que los cambios de expresión más significativos (top-ranked) se producían en los genes EGR2 (early growth response), $p=1,42 \times 10^{-5}$; VIM (vimentin), $p=1,92 \times 10^{-5}$, EGR3 (early growth response 3), $p=1,42 \times 10^{-4}$ y PPM1B (protein phosphatase, Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1B), $p=1,53 \times 10^{-4}$, seguidos de otros genes como CLP1, DZIP1L, OR1N1, MIR210 y ARHGEF15. Muchos de ellos han sido asociados previamente con obesidad, presentando resultados consistentes que actualmente estamos completando con un mayor tamaño de muestra. Estos resultados del estudio piloto se presentaron en un congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis.

4.8.4 Influencia de la intervención con dieta mediterránea hipocalórica y actividad física en cambios en la metilación de genes

También de manera piloto hemos analizado si la intervención con dieta mediterránea y actividad física se asocia con cambios en metilación en genes seleccionados o a nivel de epigenoma completo al año de la intervención. En ambos casos hemos encontrado algunas diferencias. Sin embargo, los resultados son todavía muy preliminares y estamos aumentando el tamaño de muestra para tener más poder estadístico. Estos análisis son caros e implican tener medidas repetidas para cada persona tanto a nivel basal como al año de la intervención. En el estudio piloto que realizamos para analizar los cambios de expresión al año, en estas mismas personas analizamos los cambios de metilación basal-año con el array

de metilación EPIC (850K). Debido al reducido tamaño de muestra ($n=36$), no encontramos diferencias estadísticamente significativas a nivel de EWAS. Los lugares CpG más diferencialmente metilados tras la intervención fueron los que se muestran en la Tabla 4.40. El lugar CpG más significativo se encontró en el gen PIP4K2A (Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha). Este gen ha sido asociado con cambios en metilación tras pérdida de peso.

Tabla 4.40. Lugares CpG con los valores más significativos al analizar los cambios en la metilación tras el estudio de intervención intensiva con dieta mediterránea hipocalórica y aumento de la act.física en la composición basal-año en 36 participantes del estudio piloto

Probeset ID	Gene Symbol	p-value
cg03473087	PIP4K2A	9,45E-06
cg09028487		2,35E-05
cg02673680		3,09E-05

Valores ajustados por sexo, edad, diabetes, leucocitos y *batch effect*

Actualmente, gracias a la reciente concesión de varios proyectos de investigación, entre ellos un proyecto de medicina personalizada de la convocatoria 2021, estamos ampliando el tamaño de muestra y tenemos previsto analizar los cambios de metilación en 1000 personas de manera basal y tras 1 año de intervención (incluyendo el grupo de intervención y el grupo control) en una muestra seleccionada del estudio multicéntrico.

4.8.5 Influencia de variantes genéticas en los cambios antropométricos tras la intervención

Al igual que hemos indicado para los análisis de metilación, actualmente estamos aumentando el tamaño de muestras junto con participantes de otros nodos para realizar GWAS de pérdida de peso con mayor poder estadístico, ya que aunque hemos realizado GWAS piloto con los participantes en el nodo de Valencia analizando los principales genes que influyen en la pérdida de peso (presentados de manera preliminar en el congreso de integración de ómicas celebrado en el EMBL de Heidelberg en 2019), estos resultados son todavía muy preliminares y necesitan

validación adicional incluyendo un mayor tamaño de muestra que completaremos en breve.

4.8.6 Efectos de la intervención en fenotipos finales en los participantes PREDIMED-Plus-Valencia

Desde el momento en el que los pacientes eran reclutados, aleatorizados e incluidos en el estudio, la doctoranda ha realizado tareas en colaboración con el médico coordinador de la recogida de eventos, relacionadas con la detección y revisión de eventos primarios y secundarios según el protocolo del estudio. Sin embargo, como todavía no ha finalizado el ensayo clínico no podemos realizar análisis de dichos eventos. Sí que podemos aportar la información del número total de eventos registrados y declarados sin especificar el tipo de evento ni a que grupo pertenecen.

En la Figura 4.40 se presenta la evolución anual del número de eventos totales declarados en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia y verificados por el Comité Clínico de Adjudicación de Eventos en cada uno de los años de estudio, desde el inicio hasta el año 2020, año en el que surge la pandemia causada por el virus COVID-19.

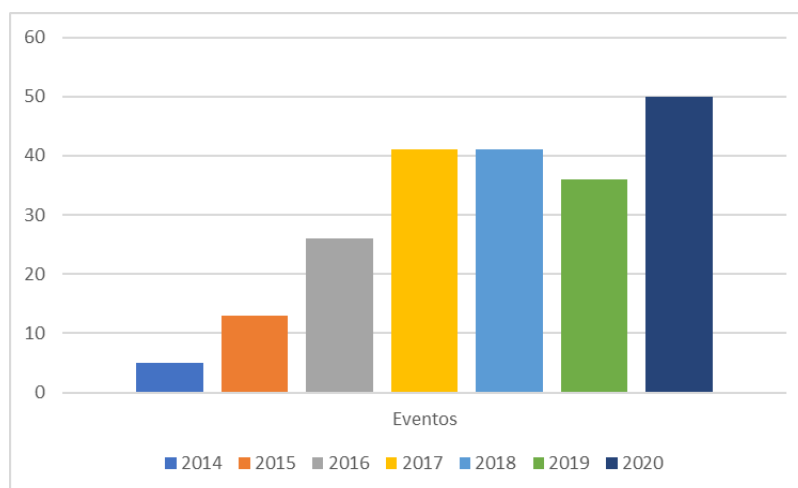


Figura 4.40. Evolución anual del número de eventos totales (primarios y secundarios) declarados y verificados en el nodo de Valencia desde el inicio del estudio PREDIMED-Plus hasta el año 2020

4.9 Análisis conjunto de la intervención en los participantes PREDIMED-PLUS

Los resultados que se presentan en los siguientes apartados corresponden con los obtenidos en el análisis de los efectos de la intervención se observaron durante la primera anualidad (incluyendo también 6 meses) del ensayo PREDIMED-Plus, pero los siguientes años serán evaluados tras completar el periodo estipulado de duración del estudio en su totalidad. Sin embargo, tras la situación excepcional consecuente a la pandemia generada por el virus COVID-19, los efectos de la intervención fueron analizados nuevamente, sin tener en cuenta el grupo de aleatorización de cada participante, haciendo posible la confirmación de si el estudio iba a verse comprometido por los periodos de confinamiento impuestos por las autoridades gubernamentales españolas como medidas de prevención de contagio y de diseminación de la infección vírica.

4.9.1 Efecto de la intervención de PREDIMED-Plus en el estudio piloto

En primer lugar, se realizó el denominado estudio piloto para comprobar si la intervención protocolizada tenía efectos en la pérdida de peso y en las variables de riesgo cardiovascular, incluyendo tanto los parámetros relacionados con la glucemia, como los lípidos plasmáticos y algunos marcadores adicionales que se determinaron específicamente para el estudio piloto. El estudio piloto incluyó los primeros 626 participantes reclutados en los distintos nodos que forman parte del estudio PREDIMED-Plus multicéntrico. Nuestro nodo de Valencia como fue uno de los primeros grupos en comenzar el reclutamiento, incluyó un número importante de participantes. Estos primeros participantes fueron aleatorizados 327 en el grupo de intervención y 299 en el grupo control (Salas-Salvadó J et al., 2018).

Al inicio del estudio, ambos grupos tuvieron una adherencia similar a dieta mediterránea e ingestas calóricas y nutritivas similares. A los 6 y 12 meses, los participantes en el grupo intervención aumentaron su adherencia en 2 puntos en globalidad en el cuestionario de 17p. respecto al ($p < 0,001$). aunque el patrón alimentario general mejoró tanto en un grupo como otro, en grupo intervención mejoró más significativamente. Las reducciones en la ingesta diaria de energía fueron más pronunciadas en el grupo de intervención que en el grupo control

($p=0,05$), como era de esperar al ser intervenidos, y los participantes en el grupo intervención informaron una menor ingesta de carbohidratos y una mayor ingesta de proteínas, grasas totales y grasas monoinsaturadas (tal como se recomendaba). En cuanto a la actividad física, se observó un aumento significativo desde el inicio en el grupo intervención, mientras que disminuyó en el grupo control ($p=0,001$). se detectó una reducción significativa desde el inicio del tiempo sedentario total en ambos grupos, pero el tiempo medio dedicado a ver televisión se redujo significativamente más entre los participantes en el grupo intervención que en el grupo control. Al inicio del estudio, las proporciones de participantes que cumplieron con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud de 2010 de al menos 150 minutos de presión arterial moderada-vigorosa/semana fueron 52,6% en el grupo intervención y 51,5% en el grupo control. a los 12 meses, esta proporción aumentó un 11,5% en el grupo intervención, mientras que disminuyó un 0,7% en el grupo control ($p=0,001$).

En cuanto a la pérdida de peso, los datos de ambos grupos difirieron significativamente con el tiempo (tabla 4.41): a los 6 meses, las pérdidas de peso medias desde el inicio entre los participantes asignados al grupo intervención y grupo control fueron de -2,4 (-2,7%) y -0,4 kg (-0,5%), respectivamente, mientras que los valores respectivos a los 12 meses fueron -3,2 (-3,7%) y -0,7 kg (-0,8%). la diferencia máxima entre los grupos en la pérdida de peso se alcanzó a los 12 meses, con una diferencia media en los cambios de peso entre el grupo intervención y el grupo control de -2,5 kg (-3,1 a -1,9). Los resultados fueron consistentes entre los subgrupos de sexo, edad, IMC, diabetes, uso de insulina, tratamiento con estatinas y nivel educativo. Las reducciones en el IMC desde el inicio hasta los 6 y 12 meses fueron mayores en el grupo intervención (tabla 4.41). los resultados también fueron cualitativamente similares después de ajustar por valores basales.

Tabla 4.41. Pérdida de peso media a los 6 y 12 meses de intervención, expresada como pérdida absoluta de peso corporal (kilogramos), reducción porcentual en relación con el valor basal y cambio absoluto en el IMC por grupo de tratamiento

Criteria	Proportion of participants (%)				Intervention vs. control			
	Intervention group		Control group		Between-group difference			
	Intention-to-treat (MI) (n = 327)	Completers-only (n = 302)	Intention-to-treat (MI) (n = 299)	Completers-only (n = 282)	Intention-to-treat (MI)	P value	Completers-only	P value
At or below baseline weight								
At month 6	81.3 (76.9–85.6)	81.4 (76.6–85.5)	58.4 (52.6–64.2)	58.5 (52.6–64.1)	22.9 (15.5–30.1)	<0.001	22.7 (15.3–30.0)	<0.001
At month 12	84.1 (80.0–88.2)	84.4 (80.3–88.5)	57.9 (52.2–63.7)	58.2 (52.4–63.9)	26.3 (19.1–33.5)	<0.001	26.0 (18.7–33.1)	<0.001
At least 5% below baseline weight								
At month 6	20.7 (16.2–25.3)	20.8 (16.3–25.4)	6.5 (3.6–9.3)	6.4 (3.5–9.2)	14.2 (8.6–19.7)	<0.001	14.5 (8.9–20.0)	<0.001
At month 12	33.7 (28.4–39.1)	34.1 (28.7–39.5)	11.9 (8.1–15.7)	11.7 (7.9–15.5)	21.8 (15.2–28.3)	<0.001	22.4 (15.7–29.0)	<0.001
At least 10% below baseline weight								
At month 6	4.2 (1.8–6.5)	3.6 (1.5–5.8)	0.9 (–0.3 to 2.2)	0.7 (–0.2 to 1.6)	3.3 (0.5–5.9)	0.02	2.9 (0.5–5.3)	0.02
At month 12	6.9 (4.1–9.8)	6.6 (3.8–9.4)	2.2 (0.4–3.9)	2.1 (0.4–3.8)	4.7 (1.3–8.1)	0.007	4.5 (1.2–7.8)	0.008
Change from baseline BMI ≥ 30 to BMI < 30 kg/m ²								
At month 6	11.3 (7.8–14.8)	10.9 (7.3–14.5)	6.3 (3.4–9.1)	6.0 (3.2–8.8)	5.0 (0.4–9.6)	0.03	4.9 (0.3–9.4)	0.03
At month 12	15.7 (11.6–19.7)	15.6 (11.4–19.7)	6.7 (3.7–9.6)	6.4 (3.5–9.2)	9.0 (3.9–14.1)	0.001	9.2 (4.1–14.2)	<0.001

Data are percentage (95% CI). P values for between-groups differences were calculated using linear regression models with robust SE to account for intracluster correlations. MI, multiple imputation.

Se realizó con la intención de tratar (imputación múltiple) y solo completadores. Los datos son medios (IC 95%). Los valores de p para las diferencias entre los grupos se calcularon mediante modelos de regresión lineal con SE robusto para tener en cuenta las correlaciones intracluster. MI: imputación múltiple (Salas-Salvadó J et al., 2019).

Más participantes en el grupo intervención que en el grupo control perdieron peso por debajo de su peso inicial a los 6 meses (81,3% vs. 58,4%; $p < 0,001$) y 12 meses (84,1% vs. 57,9%; $p < 0,001$) (tabla 4.42). En todos los umbrales de pérdida de peso (pérdidas del $\geq 5\%$, o $\geq 10\%$, y cambio del IMC basal ≥ 30 a < 30 kg/m²) a los 6 y 12 meses, las proporciones de participantes que alcanzaron estos objetivos fueron significativamente mayores en el grupo intervención que en el grupo control. a los 12 meses, el 33,7 y el 6,9% de los participantes en el grupo intervención lograron una pérdida de peso del $\geq 5\%$ y de al menos el 10%, respectivamente. respecto a la grasa, cuando se comparaban ambos grupos, grupo intervención mostraba mayores disminuciones en la grasa corporal total. se observaron reducciones significativas en la masa magra total solo en grupo intervención. en comparación con el grupo control, el grupo intervención mostró una mayor mejoría en la relación masa magra total/grasa corporal total (Salas-Salvadó J et al., 2019).

Tabla 4.42. Proporción de participantes (%) que cumplieron diferentes criterios de pérdida de peso a los 6 y 12 meses de intervención por grupo de tratamiento: intención de tratar (imputación múltiple) y solo para completar

Variable	Intervention group		Control group		Intervention vs. control			
					Between-group difference			
	Intention-to-treat (MI) (n = 327)	Completers-only (n = 302)	Intention-to-treat (MI) (n = 299)	Completers-only (n = 282)	Intention-to-treat (MI)	P value	Completers-only	P value
Change in body weight (kg)								
At month 6	-2.4 (-2.8 to -2.0)	-2.4 (-2.8 to -2.0)	-0.4 (-0.8 to -0.1)	-0.4 (-0.8 to -0.1)	-1.9 (-2.4 to -1.4)	<0.001	-2.0 (-2.5 to -1.4)	<0.001
At month 12	-3.2 (-3.7 to -2.8)	-3.3 (-3.8 to -2.8)	-0.7 (-1.1 to -0.3)	-0.7 (-1.2 to -0.3)	-2.5 (-3.2 to -1.9)	<0.001	-2.6 (-3.2 to -1.9)	<0.001
Change in body weight (%)								
At month 6	-2.7 (-3.2 to -2.3)	-2.7 (-3.2 to -2.3)	-0.5 (-0.9 to -0.1)	-0.5 (-0.9 to -0.1)	-2.2 (-2.8 to -1.6)	<0.001	-2.2 (-2.8 to -1.6)	<0.001
At month 12	-3.7 (-4.3 to -3.2)	-3.8 (-4.3 to -3.2)	-0.8 (-1.3 to -0.3)	-0.8 (-1.3 to -0.3)	-3.0 (-3.6 to -2.3)	<0.001	-3.0 (-3.7 to -2.3)	<0.001
Change in BMI (kg/m ²)								
At month 6	-0.9 (-1.0 to -0.8)	-0.9 (-1.0 to -0.8)	-0.2 (-0.3 to -0.1)	-0.2 (-0.3 to -0.1)	-0.7 (-0.9 to -0.5)	<0.001	-0.7 (-0.9 to -0.5)	<0.001
At month 12	-1.2 (-1.4 to -1.0)	-1.2 (-1.4 to -1.1)	-0.3 (-0.4 to -0.1)	-0.3 (-0.4 to -0.1)	-1.0 (-1.2 to -0.7)	<0.001	-1.0 (-1.2 to -0.7)	<0.001

Data are mean (95% CI). P values for between-group differences were calculated using linear regression models with robust SE to account for intracluster correlations. MI, multiple imputation.

Los datos son porcentuales (IC 95%). Los valores de *p* para las diferencias entre los grupos se calcularon utilizando modelos de regresión lineal con SE robusto para tener en cuenta las correlaciones intracluster. MI, imputación múltiple (Salas-Salvado J et al., 2019).

Otros resultados relevantes de esta intervención se determinaron a partir del estudio de los factores de riesgo asociados tanto a Síndrome metabólico como a sus características y/o patologías que lo definen (Salas-Salvado J et al., 2019). En algunos de los factores observados, las diferencias entre los grupos fueron más evidentes a los 12 meses, cuando se alcanzó una diferencia máxima en la pérdida de peso. La circunferencia de la cintura mostró una mayor reducción en el grupo intervención que en el grupo control tanto a los 6 como a los 12 meses. Se observaron reducciones significativas en todos los parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa (glucosa en ayunas, HbA1c, insulina e índice HOMA de resistencia a la insulina [HOMA-IR]) en el grupo intervención después de 12 meses, mientras que no se produjeron cambios en el grupo control. También se observaron mejoras en el grupo intervención en los niveles de colesterol HDL y triglicéridos. La presión arterial sistólica y diastólica y el colesterol total y LDL disminuyeron en los dos grupos, sin diferencias entre los grupos. Para todos los análisis, los resultados también fueron cualitativamente similares después de ajustar por valores basales. Además, hemos realizado análisis de subgrupos estratificados según el estado de la diabetes (glucemia normal, prediabetes y diabetes) para evaluar los cambios en los parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa y el perfil lipídico. Entre los participantes con diabetes (*n*=281) y prediabetes (*n*=181), la intervención obtuvo mejoras en el control glucémico y la sensibilidad a la insulina, junto con una mejoría en los niveles de triglicéridos y colesterol HDL significativamente más altos que el grupo control (*p*<0,05). Los cambios en los medicamentos para controlar la glucosa en sangre, la

dislipidemia o la hipertensión se distribuyeron de manera similar entre los dos grupos.

Los cambios en fenotipos intermedios que condicionan la enfermedad cardiovascular se midieron en este primer año de intervención. Estos nuevos biomarcadores de riesgo cardiovascular se midieron solo al inicio y a los 12 meses, como proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP), interleucina (IL), tumor necrosis factor alfa (TNF- α), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), regulado en activación (RANTES), células T-normales y secretadas. La leptina circulante tuvo una mayor reducción en el grupo intervención que en el grupo control. Los niveles de IL-18 y MCP-1 también disminuyeron significativamente en comparación con grupo control. La proteína C circulante disminuyó significativamente solo en el grupo intervención, pero sin diferencias significativas respecto al control. Los cambios en otros marcadores inflamatorios, como hs-CRP, IL-6, IL-8, TNF- α , RANTES y células T normales expresadas y secretadas, fueron menores y no estadísticamente diferentes entre los grupos (tabla 4.43).

Tabla 4.43. Cambios basales y de 12 meses en los biomarcadores de riesgo cardiovascular por grupo de tratamiento

Markers	Intervention vs control			
	Intervention group	Control group	Between-group difference	P value
Leptin (ng/ml)	n=261	n=236		
Baseline	19.0 (17.0 to 20.9)	20.6 (18.4 to 22.8)		
12-month change	-2.5 (-3.6 to -1.4)	-0.2 (-1.4 to 0.9)	-2.2 (-3.8 to -0.6)	0.006
C-peptide (ng/ml)	n=261	n=236		
Baseline	1.51 (1.44 to 1.56)	1.60 (1.52 to 1.68)		
12-month change	-0.07 (-0.11 to -0.02)	-0.05 (-0.10 to 0.001)	-0.02 (-0.08 to 0.05)	0.62
hs-CRP (mg/L)*	n=258	n=236		
Baseline	2.31 (1.07 to 4.70)	2.41 (1.42 to 5.61)		
12-month change	-0.07 (-1.03 to 0.67)	-0.12 (-1.13 to 1.01)	0.05 (-0.19 to 0.29)	0.68
IL-6 (pg/ml)*	n=261	n=236		
Baseline	1.33 (0.55 to 2.02)	1.31 (0.56 to 2.34)		
12-month change	0 (-0.57 to 0.62)	0.01 (-0.69 to 0.65)	-0.01 (-0.17 to 0.15)	0.90
IL-8 (pg/ml)	n=261	n=236		
Baseline	9.11 (8.40 to 9.82)	9.46 (8.68 to 10.24)		
12-month change	0.25 (-0.72 to 1.23)	1.19 (-0.44 to 2.84)	-0.94 (-2.81 to 0.92)	0.32
IL-18 (pg/ml)	n=261	n=236		
Baseline	90.6 (84.2 to 97.0)	89.1 (82.9 to 95.3)		
12-month change	-5.0 (-7.9 to -2.0)	-0.3 (-3.8 to 3.1)	-4.7 (-9.2 to 0.1)	0.04
TNF- α (pg/ml)*	n=261	n=236		
Baseline	1.78 (0.23 to 3.88)	1.74 (0.23 to 3.88)		
12-month change	-0.01x10 ⁻¹ (-1.55 to 1.13)	-0.05x10 ⁻² (-1.49 to 1.0)	0.0 (-0.03x10 ⁻² to 0.03 x10 ⁻²)	0.99
MCP-1 (pg/ml)	n=261	n=236		
Baseline	69.5 (65.3 to 73.6)	73.6 (68.8 to 78.5)		
12-month change	-1.9 (-4.9 to 1.1)	4.2 (-0.5 to 9.0)	-6.1 (-11.7 to -0.6)	0.03
RANTES (ng/ml)	n=261	n=236		
Baseline	10.2 (10.0 to 10.4)	10.1 (9.8 to 10.3)		
12-month change	0.1 (-0.1 to 0.2)	0.1 (-0.1 to 0.3)	0.1 (-0.3 to 0.2)	0.65

Valores expresados como media (IC del 95%) a menos que se indique lo contrario. *Los valores expresados como mediana (P25, P75) y las diferencias entre los grupos son medianas (IC 95%). Abreviaturas: hs-CRP, proteína C reactiva de alta sensibilidad; IL, interleucina; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; RANTES, regulado en la activación, T normal expresado y secretado. Los valores de p para las diferencias entre los grupos se calcularon mediante pruebas t independientes o análisis de regresión mediana si los datos estaban sesgados (Salas-Salvado J, et al., 2019).

4.9.2 Efecto de la intervención en el estudio PREDIMED-Plus incluyendo todos los participantes en los cambios en dieta, peso y fenotipos de riesgo

Tras realizar el estudio piloto con una submuestra, se siguió con la intervención tal como estaba protocolizada y se analizaron en el total de los participantes los efectos de la intervención en los cambios en la dieta y en los parámetros antropométricos y bioquímicos en el total de los participantes (analizando 6 meses y un año). Los resultados se publicaron en JAMA (Sayón-Orea C et al, 2019). Este estudio mostró que, a nivel del estudio multicéntrico tras un año de intervención, los cambios en la adherencia a la dieta mediterránea reducida en energía eran favorables y que estos cambios en el grupo de intervención intensiva se asociaban con cambios favorables en la reducción del peso y otros parámetros de riesgo cardiovascular, tanto a los 6 meses como al año de intervención (Figura 4.41).

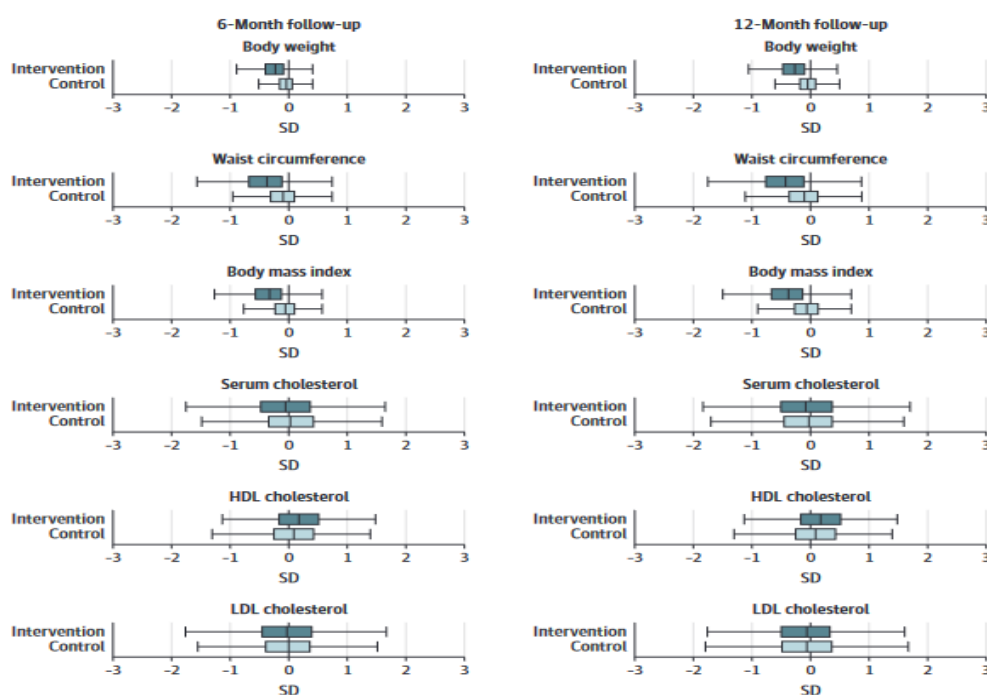


Figura 4.41. Cambios en los parámetros antropométricos y lipídicos a los 6 meses y al año de intervención en el total de participantes del estudio PREDIMED-Plus tras las intervenciones realizadas (Sayon-Orea C et al., 2019)

4.9.3 Efectos de la intervención en otros factores. Influencia de la impulsividad en una submuestra

La intervención durante el primer año también se evaluó como estrategia capaz de modificar rasgos del comportamiento que se ven asociados al sobrepeso/obesidad, como la impulsividad, la adicción a la comida y la presencia de síntomas depresivos. En estos análisis se incluyeron 342 adultos (55-75 años) con sobrepeso/obesidad y síndrome metabólico del estudio PREDIMED-Plus, que habían sido aleatorizados en los grupos de intervención y control. En el momento de reclutamiento se realizaron evaluaciones cognitivas y psicopatológicas y al año de seguimiento de todos los participantes. Al inicio del estudio, se observó que una mayor impulsividad se relacionaba con una mayor adicción a la comida y síntomas depresivos, pero no con el IMC. La adicción a la comida no solo predijo un mayor IMC y síntomas depresivos, sino que también logró un papel mediador entre la impulsividad y el IMC/síntomas depresivos. Después de 1 año de estudio, en que los participantes aleatorizados en grupo intervención ya han y están realizando la intervención, ambos grupos informaron disminuciones significativas en el IMC, la adicción a la comida y la impulsividad, si bien la reducción del IMC y las mejoras en la impulsividad fueron mayores en el grupo intervención. De la misma forma que independientemente del grupo se detectaba una mayor disminución del IMC en individuos menos impulsivos. Las puntuaciones más altas en la adicción a la comida también se relacionaban con una mayor impulsividad posterior a la intervención.

La figura 4.42 muestra el diagrama SEM (*structural equation modelling*) con los coeficientes estandarizados (ajustados por el nivel educativo) de las variables medidas durante el seguimiento. Los resultados de este modelo son similares a los obtenidos en el SEM para el análisis transversal. Con respecto a los resultados posteriores al tratamiento, los puntajes de actividad física fueron más altos para los participantes que informaron puntuaciones más altas en la variable definida como impulsividad (UPPS-P). Además, los participantes en el grupo de intervención informaron niveles más bajos de impulsividad de rasgos y un IMC más bajo. Las puntuaciones de actividad física posteriores al tratamiento mediaron la asociación entre la impulsividad del rasgo y el IMC, es decir, cuanto más impulsivo se es, se asocia a una está mayor actividad física, y una mayor actividad física aumenta el IMC, aunque el aumento de masa por espacio sea muscular. El grupo intervención también logró efectos indirectos sobre la actividad física y el IMC a través del rasgo de impulsividad: estar en el grupo intervención disminuía los niveles de impulsividad y los niveles de impulsividad más bajos se asociaban a una menor actividad física y un IMC más bajo.

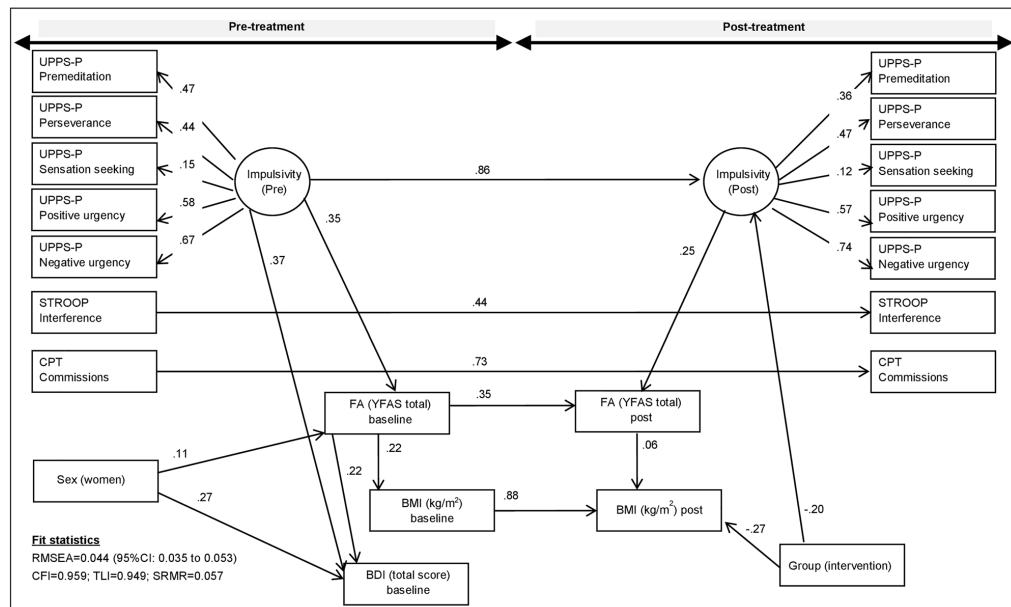


Figura 4.42. Diagrama de de ruta con los coeficientes estandarizados en el SEM durante el seguimiento (ajustado por nivel educativo). Sólo se mantuvieron coeficientes significativos en el modelo. Tamaño de muestra $n=342$ (Mallorquí-Bagué N et al., 2021)

Estos resultados identificaban que, en nuestra población de estudio, los rasgos como la impulsividad, la adicción a la comida y la depresión se asociaban a tener sobrepeso/obesidad, aunque la posibilidad de modificar y/o controlar el efecto de estas variables con estrategias multimodales que contemplen tanto la intervención dietética, como el estilo de vida y la terapia conductual. Si bien es cierto, los participantes que muestran menos impulsividad son los que más reducen su IMC, y, los que mostraban mayor adicción por los alimentos se asociaba a una mayor impulsividad posterior al tratamiento (Mallorquí-Bagué N et al., 2021).

4.9.4 Impacto generado por la pandemia de COVID-19 en el estudio PREDIMED-Plus

La pandemia de COVID-19 ha afectado la implementación y consecución de la mayoría de los ensayos clínicos en funcionamiento de todo el mundo, incluido el marco de realización de esta Tesis doctoral, el estudio PREDIMED-Plus. Cuando comenzó la pandemia, y en consecuencia, el periodo de confinamiento, la preocupación por el riesgo a no poder continuar el seguimiento de los participantes y la propia intervención del grupo aleatorizado como tal, hizo que se idearan estrategias, a nivel de estudio multicéntrico (todos los nodos lo realizaban del mismo modo), que permitieran mantener el contacto con los participantes y continuar fomentando la restricción energética, a pesar de surgir posibles limitaciones en el sentido de no poder salir de las residencias/hogares para caminar y/o asistir a las clases y actividades en el grupo de intervención. Para poder determinar si estas estrategias fueron exitosas se evaluó y se generó un informe, que ha sido publicado en este mismo mes (Paz-Graniel I et al., 2023), que examina los efectos de la pandemia en la prestación de la intervención y como las estrategias han permitido mitigar los efectos adversos del periodo de confinamiento. Para la evaluación se hizo uso de un cuestionario estandarizado, que fue enviado a cada uno de los 23 centros de reclutamiento de PREDIMED-Plus para recopilar datos sobre el funcionamiento del ensayo. El efecto de las restricciones en los componentes de la intervención (dieta y actividad física) se evaluó con los datos obtenidos en las principales fases de confinamiento identificadas por las autoridades gubernamentales españolas: preconfinamiento, confinamiento propiamente dicho y postconfinamiento (figura 4.43).



Figura 4.43. Se evaluaron los periodos de confinamiento y los periodos en los que se evaluaron las medidas antropométricas y los componentes de la intervención PREDIMED-Plus.

*Los cuadros de color verde representan las tres fases de confinamiento establecidas para evaluar los cambios en la adiposidad y los componentes de intervención. Los recuadros de color rojo representan los cinco períodos identificados para construir el cuestionario para evaluar la integridad del estudio PREDIMED-Plus de acuerdo con las restricciones sanitarias prevalentes en España.

Los resultados mostraron que durante el confinamiento (marzo/2020-junio/2021), 4612 participantes (48% mujeres) asistieron a visitas de seguimiento anuales preespecificadas para recibir recomendaciones de estilo de vida y obtener medidas de adiposidad. La media global (DE) de las proporciones informadas por cada centro mostró que el 40,4% (25,4) de los participantes realizaron visitas presenciales, el 39,8% (18,2) de los participantes fueron contactados por teléfono y el 35% (26,3) por medios electrónicos. Los respectivos análisis de datos no tuvieron en cuenta el grupo al que había sido aleatorizado cada participante, ya que de esta forma aumentaba y mantenía la integridad del estudio al no conocer esta información, por eso los participantes se asignaron aleatoriamente en el grupo A o B. Las tasas de seguimiento y recopilación de los participantes aumentaron a lo largo de los periodos de confinamiento (de $\approx 10\%$ al inicio a $\approx 80\%$ al final). En comparación con antes de la pandemia por COVID-19, los resultados a destacar se muestran en la tabla 4.43. En ambos grupos de intervención, se observaron diferencias para la circunferencia de la cintura, la puntuación de 17 puntos de dieta mediterránea con restricción energética y la actividad física en el tiempo libre entre las fases de evaluación. En el Grupo A, el peso corporal disminuyó después del confinamiento. En el Grupo B, se registraron aumentos en el tiempo sedentario durante y después del confinamiento. El peso corporal no cambió durante el

confinamiento (0,01 kg [IC del 95%: -0,10 a 0,13]) y disminuyó después del confinamiento (-0,17 kg [IC del 95%: -0,30 a -0,04]), tal como se muestra en la tabla 4.44.

Por tanto, pudo indicarse que las estrategias de mitigación para hacer cumplir la intervención y seguimiento de los participantes han tenido éxito en preservar la integridad del ensayo y asegurar su continuación, no obstante, los efectos encontrados en variables de adiposidad fueron pequeños (Paz-Graniel I et al., 2023).

Tabla 4.44. Efecto de la pandemia de COVID-19 (media [IC 95%]) sobre las principales variables de intervención en el ensayo PREDIMED-Plus por los dos grupos de intervención (A y B)

	Group A				Group B			
	Pre lockdown (Mar– Dec/2019)	During lockdown (Mar–Dec/2020)	Post lockdown (Mar– Dec/2021)	<i>P-value</i>	Pre lockdown (Mar– Dec/2019)	During lockdown (Mar–Dec/2020)	Post lockdown (Mar– Dec/2021)	<i>P-value</i>
17-point erMedDiet score	<i>n</i> = 1,848				<i>n</i> = 1,970			
	12.9 (12.8–13.0)	12.8 (12.7–12.8)	12.6 (12.5–12.6)	<0.01	10.7 (10.7–10.8)	10.9 (10.8–11.0)	10.7 (10.6–10.8)	<0.01
Leisure-time PA, METs/min/day	<i>n</i> = 1,852				<i>n</i> = 1,989			
	499.1 (488.0–510.1)	484.9 (473.9–496.0)	459.9 (459.9–471.0)	<0.01	388.2 (377.7–398.6)	396.3 (385.8–406.8)	370.6 (360.2–381.1)	<0.01
Sedentary time, h/day	<i>n</i> = 1,852				<i>n</i> = 1,989			
	5.5 (5.4–5.5)	5.5 (5.5–5.6)	5.5 (5.5–5.6)	0.83	5.7 (5.6–5.7)	5.8 (5.7–5.8)	5.8 (5.7–5.9)	0.01
Body weight, kg	<i>n</i> = 1,946				<i>n</i> = 2,061			
	82.7 (82.6–82.8)	82.7 (82.6–82.8)	82.5 (82.4–82.6)	0.02	85.1 (85.0–85.3)	85.2 (85.0–85.3)	85.0 (84.8–85.1)	0.09
BMI, kg/m ²	<i>n</i> = 1,900				<i>n</i> = 2,014			
	31.1 (31.1–31.2)	31.2 (31.1–31.2)	31.1 (31.1–31.2)	0.39	32.2 (32.2–32.3)	32.3 (32.2–32.3)	32.2 (32.2–32.3)	0.50
Waist circumference, cm	<i>n</i> = 1,516				<i>n</i> = 1,601			
	103.5 (103.3–103.6)	104.1 (104.0–104.3)	104.2 (104.1–104.7)	<0.01	107.0 (106.8–107.1)	107.8 (107.6–108.0)	107.7 (107.5–107.8)	<0.01

BMI, body mass index (índice masa corporal); COVID-19, Coronavirus disease 2019 (enfermedad coronarvirus 2019); erMedDiet, energy-restricted MedDiet (dieta mediterránea con restricción energética); MET, metabolic equivalent of task (equivalente metabólico del gasto); PA, physical activity (actividad física). Los datos se presentan como media (IC95%). Las comparaciones grupales (preconfinamiento-COVID-19, durante confinamiento COVID-19 y postconfinamiento-COVID-19 en España) se realizaron utilizando medidas repetidas ANCOVA ajuste por sexo y edad ($p < 0,05$) (Paz-Graniel I et al., 2023).

4.10 Resultados obtenidos durante las estancias para la mención internacional. Subestudio Cognition – E2bN

Dentro del periodo comprendido de estancia de esta Tesis Doctoral, siguiendo el marco de investigación realizada dentro del subproyecto PREDIMED-Plus Cognition, en el que participantes pertinentes al nodo de Valencia también participaban, se realizaron distintas líneas de investigación, por un lado, como parte de la estancia, se estudiaron diversas posibles interacciones gen-dieta, ya que el estudio E2bN estaba implicado en asociar aspectos de la cognición, conducta y comportamiento con la forma en la que nos alimentamos y consumimos alimentos, del mismo modo que se realizaba el aprendizaje necesario para la consecución del estudio. Conocer la metodología implicada en los protocolos de extracción de muestra de ADN de heces y de análisis de datos correspondientes. Como parte de ensayo multicéntrico, los resultados en cuanto a tipos de microorganismos que forman el microbioma en función de la dieta, así como la influencia de ciertos rasgos como ser más impulsivo y el nivel de distintos aspectos cognitivos se han valorado a nivel grupal.

4.10.1 Colaboración en investigaciones conjuntas de interacciones gen-dieta con genes seleccionados para el TDAH y otras patologías/fenotipos

Cada vez hay más pruebas de que el estado nutricional o los factores nutricionales son determinantes del desarrollo y la función del sistema nervioso (Gliedt JA et al., 2017; Martin J et al., 2018). Diversos trabajos han mostrado que el patrón de dieta puede ser determinantes en la posibilidad de mejorar los tratamientos y la prevención de aparición y/o control de ciertas enfermedades mentales (figura 4.44).

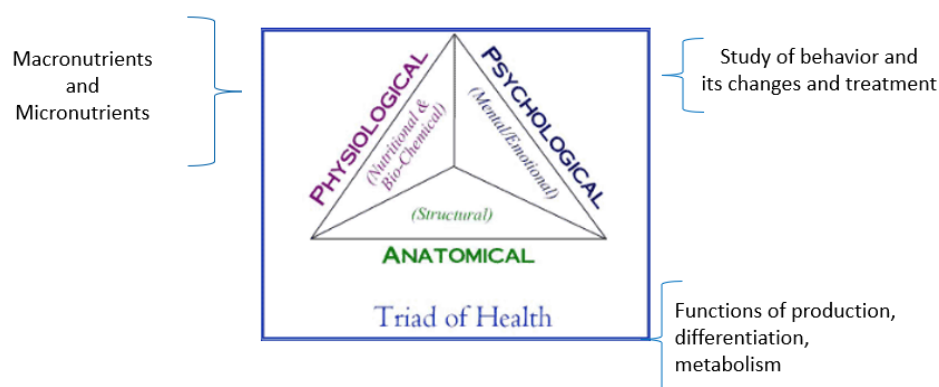


Figura 4.44. Interacción entre los distintos parámetros y/o factores en alteraciones cognitivas, conductuales y metabólicas. Interrelación entre factores fisiológicos, psicológicos y anatómicos (Gliedt JA et al., 2017).

Durante la estancia se realizaron distintas líneas de investigación, pero destacaron los resultados obtenidos la población de estudio de PREDIMED-Plus Valencia y en la ampliación de conocimientos en Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH). Se realizó una revisión completa de la literatura sobre el TDAH y las posibles interacciones y la ingesta de nutrientes y estos trastornos en niños, adultos y ancianos, así como su influencia en la obesidad, lípidos, sabores, calidad de vida, sueño reparador, etc. De esta forma, pudimos determinar la metilación basal de ciertos genes seleccionados y si cambiaban con los cambios de peso. Observamos los polimorfismos de los genes indicados por el artículo de Demontis D et al., y fue el trabajo de investigación que utilizamos para ver posibles asociaciones con diferentes fenotipos en participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia (tabla 4.45) (Demontis D et al., 2019).

Tabla 4.45. Prueba del efecto de los SNP del TDAH del artículo publicado con resultados de genoma completo en participantes con TDAH (Demontis D et al., 2019)

Locus	Chr	BP	Index Variant	Genes	A1	A2	A1 Freq	OR	P-value
1	1	44184192	rs11420276	<i>ST3GAL3, KDM4A, KDM4A-AS1, PTPRF, SLC6A9, ARTN, DPH2, ATP6V0B, B4GALT2, CCDC24, IPO13</i>	G	GT	0.696	1.113	2.14×10^{-13}
2	1	96602440	rs1222063	Intergenic	A	G	0.328	1.101	3.07×10^{-8}
3	2	215181889	rs9677504	<i>SPAG16</i>	A	G	0.109	1.124	1.39×10^{-8}
4	3	20669071	rs4858241	Intergenic	T	G	0.622	1.082	1.74×10^{-8}
5	4	31151456	rs28411770	<i>PCDH7, LINC02497</i>	T	C	0.651	1.09	1.15×10^{-8}
6	5	87854395	rs4916723	<i>LINC00461, MIR9-2, LINC02060, TMEM161B-AS1</i>	A	C	0.573	0.926	1.58×10^{-8}
7	7	114086133	rs5886709	<i>FOXP2, MIR3666</i>	G	GTC	0.463	1.079	1.66×10^{-8}
8	8	34352610	rs74760947	<i>LINC01288</i>	A	G	0.957	0.835	1.35×10^{-8}
9	10	106747354	rs11591402	<i>SORCS3</i>	A	T	0.224	0.911	1.34×10^{-8}
10	12	89760744	rs1427829	<i>DUSP6, POC1B</i>	A	G	0.434	1.083	1.82×10^{-9}
11	15	47754018	rs281324	<i>SEMA6D</i>	T	C	0.531	0.928	2.68×10^{-8}
12	16	72578131	rs212178	<i>LINC01572</i>	A	G	0.883	0.891	7.68×10^{-9}

Se realizó la búsqueda de SNP en nuestra selección de chip de GWAS y proxy de los mismos. Se encontró 1 SNP y 5 proxies con LD= 1 para 4 y 0,95 para 1 (tabla 4.46).

Tabla 4.46. Se muestran las distintas variantes de genes y su ubicación en cromosoma, así como frecuencia alélica y p-valor

Locus	Chr	BP-Index	Variant	Genes	A1	A2	A1-Freq	OR	P-value	Proxy	R ²	Label	CEU-A1	PPN-M	PPVal-MAF
1	1	44184192	rs11420276	ST3GAL3, KDM4A, KDM4A-AS1, PTPRF, SLC6A9, ARTN, DPH2, ATP6V0B, B4GALT2, CCDC24, IPO13	G	GT	0,696	1,113	2.14×10^{-13}	N/F					
2	1	96602440	rs1222063	Intergenic	A	G	0,328	1,101	3.07×10^{-8}						
3	2	215181889	rs9677504	SPAG16	A	G	0,109	1,124	1.39×10^{-8}	rs1912185	1	rs9677504_rs1912185	(G/A)	1/A	0,5751121
4	3	20669071	rs4858241	Intergenic	T	G	0,622	1,082	1.74×10^{-8}	N/F					
5	4	31151456	rs28411770	PCDH7, LINC02497	T	C	0,651	1,09	1.15×10^{-8}	N/F					
6	5	87854395	rs4916723	LINC00461, MIR9-2, LINC02060, TMEM161B-AS1	A	C	0,573	0,926	1.58×10^{-8}	rs4916723	1	rs4916723_rs4916723	N/F	2/C	0,3687783
7	7	114086133	rs5886709	FOXP2, MIR3666	G	GTC	0,463	1,079	1.66×10^{-8}	rs10262192	0,9	rs5886709_rs10262192	(TC/-)	1/A	0,4138702
8	8	34352610	rs74760947	LINC01288	A	G	0,957	0,835	1.35×10^{-8}	rs6990255	1	rs74760947_rs6990255	(A/G)	1/A	0,0429864
9	10	106747354	rs11591402	SORCS3	A	T	0,224	0,911	1.34×10^{-8}	rs11192270	1	rs11591402_rs11192270	(T/A)	1/A	0,2533632
10	12	89760744	rs1427829	DUSP6, POC1B	A	G	0,434	1,083	1.82×10^{-9}	rs2279574	1	rs1427829_rs2279574	(A/G)	1/A	0,4876957
11	15	47754018	rs281324	SEMA6D	T	C	0,531	0,928	2.68×10^{-8}	N/F					
12	16	72578131	rs212178	LINC01572	A	G	0,883	0,891	7.68×10^{-9}	N/F					

Se encontró 1 SNP y 5 proxies con LD= 1 para 4 y 0,95 para 1 (Demontis D et al., 2019).

4.10.1.1 Asociación entre los SNP del TDAH y la diabetes mellitus 2

El alelo menor del gen FOXP2 se asocia con menor prevalencia de la diabetes al inicio del estudio: OR: 0,72; IC 95%: 0,52-9,96; $p=0,024$. Esta asociación sigue siendo estadísticamente significativa después de un ajuste adicional para la edad y el sexo (modelo aditivo para el SNP) (tabla 4.47).

Tabla 4.47. Se muestran p-valores de los genes seleccionados para ver asociación de GWAS de TDAH con nuestra población PREDIMED-Plus Valencia y fenotipo diabetes

CHR	SNP	BP	NMISS	OR	L95	U95	P	MAF	SNP-Function	GENE
7	rs10262192	114091753	447	0,72	0,542	0,958	0,024	0,414137	intron-variant	FOXP2
2	rs11192270	215194668	446	0,615	0,3506	1,079	0,08991	0,141174	intron-variant	SPAG16
10	rs11192270	106761616	446	1,243	0,9058	1,705	0,1779	0,268371	intron-variant	SORCS3
12	rs704061	8,977E+07	445	1,141	0,87	1,497	0,3398	0,499002	----	----
5	rs4916723	8,785E+07	442	1,11	0,8456	1,456	0,4532	0,314896	intron-variant	LINC00461
12	rs2279574	8,975E+07	447	1,107	0,8437	1,453	0,4625	0,466254	missense	DUSP6
8	rs6990255	3,413E+07	442	0,9129	0,467	1,785	0,79	0,099241	----	----

Modelos adicionales ajustados por edad y sexo.

4.10.1.2 Asociación entre los SNP del TDAH y el IMC

Se ha obtenido asociación al límite de la significación estadística con el IMC para 2 SNPs ubicados en el cromosoma 12. Los valores de P fueron $p=0,057$ para el SNP intergénico y $p=0,077$ para el SNP del gen DUSP6. El alelo de menor frecuencia se asoció con el aumento del IMC. Aunque se trató de seguir trabajando en las asociaciones para determinar el posible riesgo genético (GRS) (tabla 4.48).

Tabla 4.48. Se muestran p-valores de los genes seleccionados para ver asociación de GWAS de TDAH con nuestra población PREDIMED-Plus Valencia y fenotipo IMC

CHR	SNP	BP	NMISS	Beta	P	Allele	SNP-CTRL	CHR position	SNP-Function	GENE2
12	rs704061	89771903	445	0,4594	0,05795	C	rs704061	-	----	----
12	rs2279574	89745477	447	0,4275	0,0778	A	rs2279574	+	missense	DUSP6
8	rs6990255	34126948	442	0,7224	0,2236	T	rs6990255	+	----	----
2	rs1912185	2,150E+08	446	-0,468	0,3256	T	rs1912185	+	intron-variant	SPAG16
7	rs10262192	1,140E+08	447	-0,2126	0,3956	A	rs10262192	+	intron-variant	FOXP2
10	rs11192270	1,070E+08	446	0,06855	0,8094	T	rs11192270	+	intron-variant	SORCS3
5	rs4916723	8,785E+07	442	0,003914	0,9872	C	rs4916723	+	intron-variant	LINC00461

4.10.1.3 Asociación entre los SNP del TDAH y el sabor dulce

El SNP en el gen SORCS3 mostró que se asociaba con la percepción del sabor dulce.

Los portadores del alelo de menor frecuencia tenían una menor percepción (baja calificación en los test de detección) del sabor dulce (Beta-valor=-0,26; $p=0,016$ en el modelo aditivo ajustado por edad y sexo) (tabla 4.49).

Tabla 4.49. Se muestran p-valores de los genes seleccionados para ver asociación de GWAS de TDAH con nuestra población PREDIMED-Plus Valencia y fenotipo de percepción de sabor dulce

CHR	SNP	BP	NMISS	Beta	P	Allele	MAF	SNP-CTRL	CHR position	GENE
10	rs11192270	106761616	377	-0,256	0,01653	T	0,26837	rs11192270	+	FOXP2
7	rs10262192	114091753	378	-0,09339	0,3354	A	0,414137	rs10262192	+	SPAG16
12	rs704061	89771903	377	0,06844	0,4571	C	0,499002	rs704061	-	SORCS3
5	rs4916723	8,785E+07	375	-0,06701	0,4769	C	0,314896	rs4916723	+	----
12	rs2279574	8,975E+07	378	0,06481	0,485	A	0,466254	rs2279574	+	LINC00461
8	rs6990255	3,413E+07	374	-0,06502	0,7722	T	0,099241	rs6990255	+	DUSP6
2	rs1912185	2,152E+08	378	0,02363	0,8929	T	0,141174	rs1912185	+	----

Análisis de asociación logística + ajustes adicionales por modelo que añade factores de confusión edad y sexo.

Estos datos fueron de gran interés por mostrar posibles asociaciones entre rasgos de TDAH y fenotipos vinculados a patrones dietéticos y estilo de vida, como eran la presencia de diabetes, el IMC elevado y la percepción por el sabor dulce, sin embargo, se deben investigar más parámetros para medir si existe asociación también con más variables como cintura, grasa corporal, lípidos, etc.

4.10.2 Asociación entre cognición y pérdida de peso

En el trabajo publicado por Soldevila-Domenech N, et al., como parte del estudio multicéntrico PREDIMED-Plus, en el cual nuestra población PREDIMES-Plus Valencia participaba, se realizaron los correspondientes análisis sobre los resultados obtenidos en las pruebas de rendimiento cognitivo evaluado longitudinalmente. En el estudio se observaban las variaciones de peso, entre otros parámetros, pudiendo determinar posibles evidencias de los beneficios cognitivos asociados a una mejor adherencia a una dieta mediterránea. Los resultados también sugirieron que las intervenciones de pérdida de peso adaptadas al perfil cognitivo y al género de los participantes pueden mejorar el mantenimiento y seguimiento. Los principales resultados de este estudio se resumen en la figura 4.45.

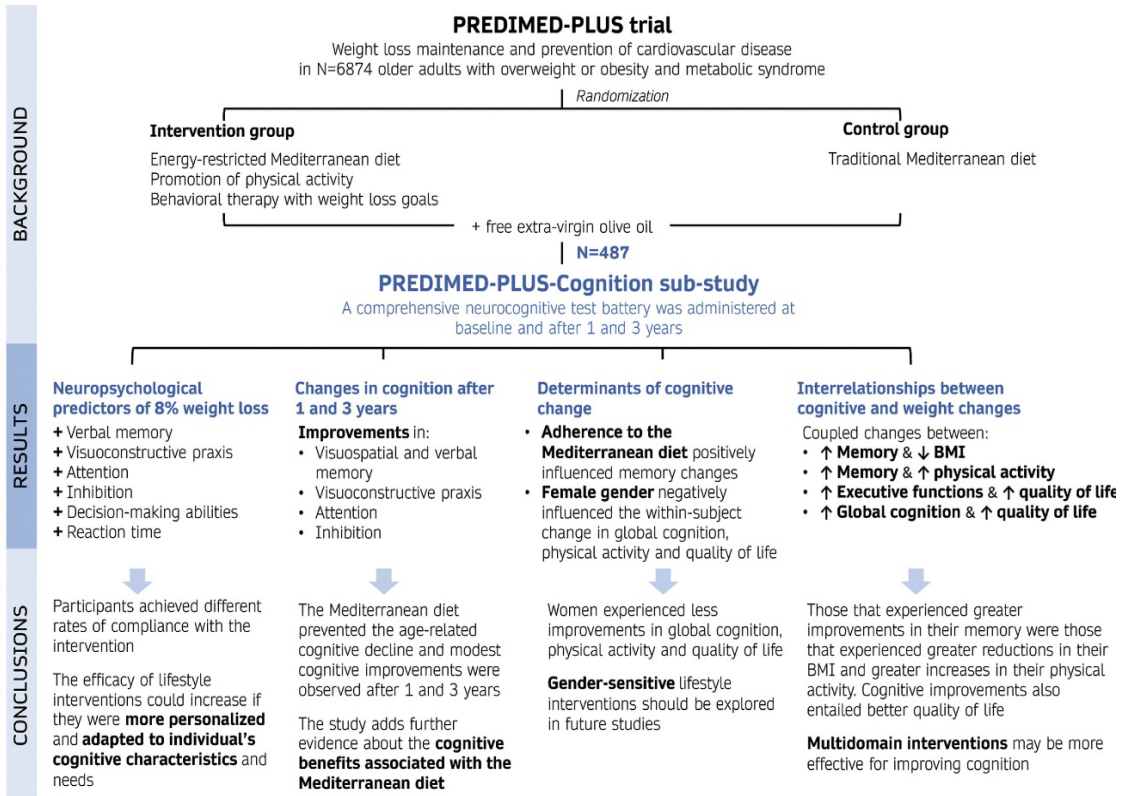


Figura 4.45. Resumen de los principales resultados del presente estudio (Soldevila-Domenech N et al., 2021).

La descripción de la población del subestudio PREDIMED Plus-Cognition participaron un total de 487 individuos, de los cuales 240 pertenecían al grupo de intervención y 247 al grupo control. El 50,5% eran mujeres, la edad media (DE) era de 65,2 (4,7) años, el 53,4% había recibido educación primaria, el 29,2% tenía educación secundaria y el 62,1% estaba jubilado. Asimismo, el 12% eran fumadores activos, el 30,4% padecía diabetes, el 50,3% tomaba medicamentos para el colesterol y el 23,0% usaba tranquilizantes o sedantes. Finalmente, los participantes obtuvieron 28,6 (1,7) puntos en el MMSE al inicio del estudio, por lo que se desempeñaron dentro del rango normal.

Los resultados mostraron que la cognición global aumentaba después de los 3 años de seguimiento de los participantes ($\beta_{STD[\mu\Delta COG]}=0,62$, $p=0,027$), si bien esta mejora de la cognición global después de 1 año de seguimiento no alcanzaba la significación estadística ($\beta_{STD[\mu\Delta COG]}=0,48$, $p=0,073$). Este aumento se debía

principalmente a una mejora en la memoria al año ($\beta_{\text{STD}[\mu\Delta\text{COG}]}=0,88, p=0,002$) y a los 3 años ($\beta_{\text{STD}[\mu\Delta\text{COG}]}=0,87, p<0,001$). La edad ($\beta_{\text{STD}}=-0,44, p<0,001$) y el sexo femenino ($\beta_{\text{STD}}=-0,11, p=0,07$) se asociaron negativamente con la cognición global inicial, mientras que haber estudiado más años ($\beta_{\text{STD}}=0,19, p=0,002$) y un coeficiente intelectual (CI) más alto ($\beta_{\text{STD}}=0,64, p<0,001$) se asociaba a mejor función cognitiva. Además, las mujeres presentaron aumentos menores en la cognición global que los hombres después de 3 años ($\beta_{\text{STD}}=-0,22, p=0,052$). El rendimiento de la memoria de referencia dependía de la edad ($\beta_{\text{STD}}=-0,32, p<0,001$) y el coeficiente intelectual ($\beta_{\text{STD}}=0,75, p<0,001$). Una mayor adherencia a la dieta mediterránea al año se asoció con la mejora de la memoria después de 3 años ($\beta_{\text{STD}}=0,13, p=0,013$). Como esperábamos, las personas con un IMC basal más alto experimentaron mayores reducciones en su IMC después de 1 año ($\beta_{\text{STD}[\beta_2]}=-0,07, p=0,002$) y después de 3 años ($\beta_{\text{STD}[\beta_2]}=-0,06, p=0,020$). La asignación al grupo de intervención acontecía que habría una mayor adherencia a la dieta mediterránea en los siguientes años, por ello el hecho de ser del grupo de intervención, así como tener una edad mayor, predecían que se producirían mayores reducciones en el IMC al cabo de 1 y 3 años. Los niveles más altos de educación y el uso de medicamentos para el tratamiento del colesterol predijeron menos reducciones en el IMC después de 1 y 3 años. Hubo evidencia de cambios correlacionados o acoplados entre el IMC y la memoria al cabo de 1 año ($\beta_{\text{STD}[\delta_2]}=-0,14, p=0,006$), lo que indica que aquellos con mayores mejoras en la memoria eran, en promedio, aquellos con mayores reducciones en el IMC.

Respecto a la actividad física, hubo evidencia de un cambio acoplado entre la memoria y la actividad física después de 3 años de seguimiento ($\beta_{\text{STD}[\delta_2]}=0,13, p=0,036$), por lo que los que presentaron mayores mejoras en la memoria fueron los que experimentaron mayores aumentos en la actividad física. En resumen, al inicio del estudio, los participantes mostraban una función cognitiva normal, y aunque los cambios cognitivos medios después de 1 y 3 años que se obtuvieron fueron pequeños, varias pruebas neuropsicológicas presentaron mejoras en la población general, de acuerdo con estudios previos con dieta mediterránea (Martínez-Lapiscina EH et al., 2013; Valls-Pedret C et al., 2015). Al primer año, se detectaron mejoras pequeñas y marginales en la memoria verbal y visoespacial a corto y largo plazo, así como en la atención e inhibición selectiva y sostenida. Al tercer año se encontraron cambios mayores (pero aún moderados) en el rendimiento cognitivo para todos estos dominios, así como en la parte visuoespacial (Soldevila-Domenech N et al., 2021).

Siguiendo con las colaboraciones con este estudio, se analizó el posible efecto beneficioso en la actividad cognitiva por parte de la metformina como tratamiento farmacológico para la diabetes en la intervención con dieta mediterránea. Nuevamente, los participantes de estudio fueron los participantes del

subestudio PREDIMED-Plus-Cognición evaluados por la doctoranda, siendo la muestra de 487 sujetos (50,5% mujeres, edad media $\pm$ SD de 65,2 $\pm$ 4,7 años), el 30,4 % de ellos ($n=148$) diagnosticado con diabetes. Tal como comentamos en el trabajo anterior, se administró una batería completa de pruebas neurocognitivas al inicio ya los 1 y 3 años de seguimiento del estudio. Las personas con diabetes que mostraban controlar los niveles de glucemia, bien con uso de metformina o no, se compararon entre sí y con personas sin diabetes usando modelos de efectos mixtos con probabilidad inversa de pesos de tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron que antes de participar en la intervención con dieta mediterránea, los sujetos que usaban metformina obtenían mejores resultados en funciones ejecutivas (d de Cohen= 0,51), memoria (d de Cohen= 0,38) y cognición global (d de Cohen= 0,48) que los que no usaban metformina. Sin embargo, estas diferencias no se mantenían durante los 3 años de seguimiento, ya que los individuos que no usaban metformina experimentaron mayores mejoras en la memoria ($\beta=0,38$ vs $\beta=0,10$, $p=0,036$), funciones ejecutivas ($\beta=0,36$ vs $\beta=0,02$, $p=0,005$) y cognición global ($\beta=0,29$ vs. $\beta=-0,02$, $p=0,001$) que se combinaron con una mayor adherencia a dieta mediterránea (12,6 vs. 11,5 puntos, $p=0,031$). Finalmente, los sujetos sin diabetes presentaron mayores mejoras en la memoria que los sujetos con diabetes independientemente de su exposición a metformina ($\beta=0,55$ vs. $\beta=0,10$, $p<0,001$). Sin embargo, los sujetos con diabetes que no usaban metformina, en comparación con los sujetos sin diabetes, presentaron mayores mejoras en las funciones ejecutivas ($\beta=0,33$ vs. $\beta=0,08$, $p=0,032$) y mostraron una mayor adherencia a dieta mediterránea (12,6 puntos vs. 11,6 puntos, $p=0,046$). Estos datos indicaban que, aunque las intervenciones con metformina y restricción calórica con dieta mediterránea son buenas candidatas para trabajos de prevención del deterioro cognitivo, fueron los resultados obtenidos con la mejor adherencia a dieta mediterránea los que remitieron que seguir esta dieta podía incluso superar los posibles efectos neuroprotectores de la metformina en sujetos con diabetes (Soldevila-Domenech N et al., 2021).

4.10.3 Rasgos comportamiento e impulsividad asociados a pérdida de peso

Como parte del subestudio PREDIMED-Plus Cognition, otros tipos de datos que se obtuvieron en las respectivas visitas fueron los resultantes de test de comportamiento impulsivo (UPPS-P), ya que la impulsividad es uno de los rasgos del comportamiento que más se asocian al éxito o no de los tratamientos de pérdida de peso, así como el desarrollo de estados de adicción por determinados alimentos.

El trabajo realizado por Testa G, et al. (2022), como parte de los análisis del ensayo multicéntrico trataba de determinar el papel predictivo de la personalidad impulsiva en una población de adultos mayores con diabetes en el control de peso a largo plazo y el manejo de la glucemia, a través de la hemoglobina glucosilada (HbA1c), tras 3 años de intervención con dieta mediterránea. El nivel de impulsividad se midió a través de los cuestionarios de escala de impulsividad, UPPS-P (las puntuaciones podían ser de: 0–236 puntos). Los resultados mostraron que las puntuaciones más elevadas de estos cuestionarios las obtenían los participantes con diabetes. Se concluyó que, aunque ser más o menos impulsivo en personas con diabetes podía afectar al control del peso, no afectaba al control glucémico (Testa G et al., 2022).

La impulsividad es uno de los rasgos psicológicos que se ha propuesto como uno de los factores más importantes que pueden condicionar los comportamientos alimentarios y, por lo tanto, el aumento o la pérdida de peso y el riesgo de obesidad. Ser más o menos impulsivo, predispone determinadas respuestas frente a impulsos emocionales, a carecer de premeditación y planificación, y a buscar sensaciones nuevas que den cierta satisfacción (Leitch MA et al., 2013; Guerrieri R et al., 2009; Mallorquí-Bagué N et al., 2021). En este sentido, la impulsividad se ha visto asociada a patrones dietéticos menos saludables por acontecer los impulsos asociados al consumo de determinados alimentos, que suelen ser elevados en azúcares simples y grasas saturadas y/o trans (Lumley J et al., 2016; Bénard M et al., 2019; Fonseca NKOD et al., 2020; Gómez-Martínez C et al., 2022). En este trabajo conducido por Gómez-Martínez C et al., los participantes que se analizaron fueron de nuevo, los participantes en el subestudio PREDIMED-Plus Cognition, con 487 sujetos pertinentes a los 4 nodos que lo realizaban (la Universitat Rovira i Virgili, la Universidad de Valencia, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM) y la Universidad-Hospital Bellvitge-IDIBELL). El objetivo de este estudio era poder determinar en gran forma los patrones de consumo de alimentos asociados al rasgo de ser impulsivos de estos participantes. Para ello, los sujetos hubieron de completar tanto el cuestionario UPPS-P como el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) de 143 ítems al inicio, al año y a los 3 años de seguimiento. Se marcaron diez niveles de puntuación que evaluaban patrones dietéticos saludables y no saludables. Se realizaron modelos mixtos lineales ajustando por varios factores de confusión para estudiar las asociaciones longitudinales entre el rasgo de impulsividad y las puntuaciones de adherencia a los patrones dietéticos definidos previamente para el análisis (10 patrones dietéticos: HPB, Dieta saludable basada en plantas; UPB: dieta basada en plantas poco saludable; Med, dieta mediterránea; ERMED, dieta mediterránea restringida en energía, AHEI, índice de alimentación saludable alternativa; Portafolio, Dieta de portafolio; DASH, Enfoques dietéticos para detener la hipertensión; MIND, Intervención de la dieta mediterránea-DASH

para el retraso neurodegenerativo; PHD, Dieta de Salud Planetaria; Occidental, dieta occidental) durante 3 años de seguimiento (evaluando también las interacciones por sexo, edad y grupo de intervención). Los resultados obtenidos mostraron que la impulsividad se asociaba negativamente a la adherencia de las dietas a los 3 años de seguimiento, en concreto a la HPB [$\beta = -0.92$ (95% CI -1.67, -0.16)], Med [$\beta = -0.43$ (95% CI -0.79, -0.07)], ERMEd [$\beta = -0.76$ (IC del 95 % -1.16, -0.37)], AHEI [$\beta = -0.88$ (IC del 95 % -1.52, -0.23)], Portafolio [$\beta = -0.57$ (IC del 95 % -0.91, -0.22)], y DASH [$\beta = -0.50$ (IC 95% -0.79, -0.22)], mientras que la impulsividad se relacionó positivamente con la adherencia a la dieta occidental (Western Diet) poco saludable [$\beta = 1.59$ (IC del 95%: 0.59 a 2.58)] a lo largo del tiempo de estudio (figura 4.46). Otros resultados destacados fueron que se encontró interacción por grupo de intervención, siendo los participantes impulsivos que habían sido aleatorizados en el grupo de intervención los que tenían menor adherencia a varios patrones dietéticos saludables.

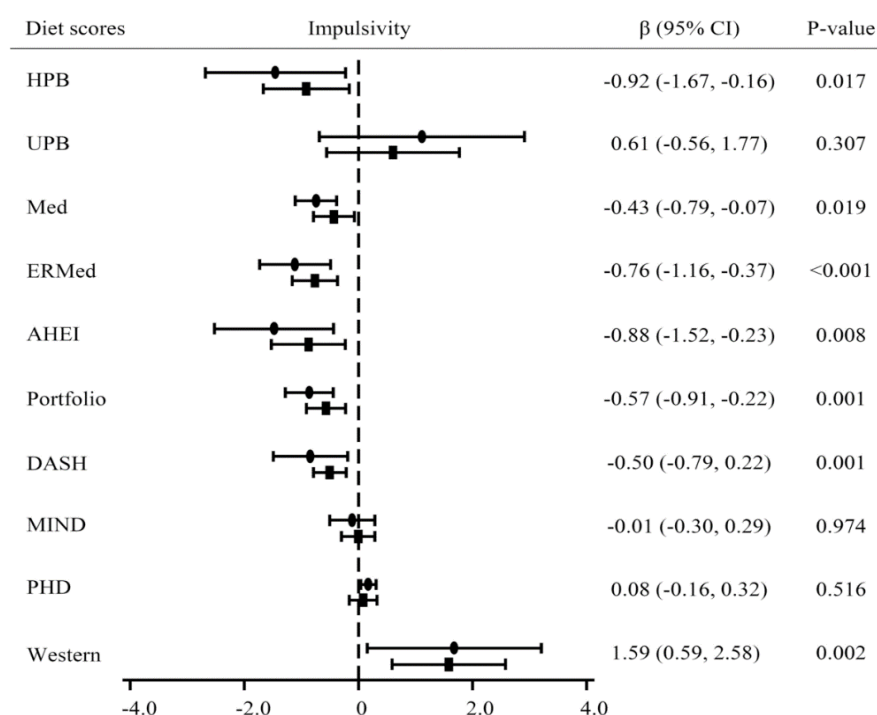


Figura 4.46. Asociaciones longitudinales entre la impulsividad y las puntuaciones de patrones dietéticos (n=438).

HPB, Dieta saludable basada en plantas; UPB: dieta basada en plantas poco saludable; Med, dieta mediterránea; ERMed, dieta mediterránea restringida en energía, AHEI, índice de alimentación saludable alternativa; Portafolio, Dieta de portafolio; DASH, Enfoques dietéticos para detener la hipertensión; MIND, Intervención de la dieta mediterránea-DASH para el retraso neurodegenerativo; PHD, Dieta de Salud Planetaria; Western, dieta occidental. La impulsividad se evaluó utilizando UPPS-P. Se utilizaron modelos mixtos lineales para evaluar las asociaciones y los coeficientes Beta, que se multiplicaron por 100, con inserción de las estimaciones de varianza para tener en cuenta las correlaciones intracluster. A la derecha de la figura se muestran los coeficientes beta del modelo 2 y los valores p. Los círculos representan los análisis para el modelo 1: las asociaciones se ajustaron por sexo, edad (años) y grupo de intervención al inicio del estudio. Los cuadrados muestran los análisis para el modelo 2: las asociaciones se ajustaron aún más por nivel de educación (escuela primaria o menos; escuela superior o universidad), estado civil (soltero, divorciado, separado o viudo; casado) y estado de tabaquismo (nunca fumó; ex fumador o actual) al inicio del estudio, mientras que la actividad física (MET min/semana), IMC (kg/m²), consumo de alcohol (g/d) y la ingesta de energía (kcal/d) en cada punto temporal. Todas las asociaciones significativas permanecieron significativas después de la corrección de Benjamini-Hochberg tanto en el modelo 1 como en el modelo 2 (Gómez-Martínez C et al., 2022).

Los datos resultantes del trabajo de Gómez-Martínez C et al., indicaron que el rasgo marcado de impulsividad se asociaba a una menor adherencia a patrones dietéticos saludables, y en general, a un mayor seguimiento de la dieta Occidental (*Western Diet*) durante el seguimiento de 3 años. Estos resultados también reflejaron la importancia de considerar la impulsividad como factor relevante en el éxito de la intervención (Gómez-Martínez C et al., 2022).

4.10.4 Colaboración en análisis de la microbiota

El subestudio PREDIMED-Plus Cognition tiene una parte importante del análisis de la microbiota intestinal. Estos resultados están todavía en curso con las muestras de Valencia, pero la doctoranda ha colaborado en trabajos relacionados. Entre ellos, ha colaborado como autora en un estudio en el que se determinó si el patrón alimentario de estilo mediterráneo inducía cambios positivos en la microbiota intestinal. Los datos antropométricos, bioquímicos y el análisis de la microbiota intestinal en heces mediante el análisis del ADN y la secuenciación del ARNr 16S microbiano intestinal, se analizaron al inicio (n = 362) y al año de seguimiento de los participantes (n=343). Los participantes del grupo de intervención tuvieron una pérdida de peso de 4,2 (IQR, -6,8, -2,5) kg en comparación con 0,2 (IQR, -2,1, 1,4) kg en el grupo control ($p<0,001$). Se concluyó que se producía una disminución de *Butyricicoccus*, *Haemophilus*, *Ruminiclostridium 5* y *Eubacterium hallii* en el grupo de intervención en

comparación con el control. Además de los mencionados, otros géneros cambiaron en la misma dirección dentro de ambos grupos de intervención, lo que indica un efecto general al seguir la dieta mediterránea. Las disminuciones en *Haemophilus*, *Coprococcus* 3 y algunos otros géneros se asociaron con una disminución en los parámetros de adiposidad en ambos grupos de intervención. Los cambios en *Lachnospiraceae* NK4A136 se asociaron positivamente con cambios en la adherencia trabajo concluía que la pérdida de peso inducida por dieta mediterránea con restricción energética y la realización de actividad física modulan cambios en la microbiota intestinal. El papel de los cambios inducidos en los participantes podría ser debido al seguimiento del patrón mediterráneo más específicamente ya que la actividad de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se ve fomentada con patrones dietéticos que contemplan el consumo de alimentos ricos en carbohidratos complejos y en fibra, de hecho, en muchos estudios de participantes con sobrepeso u obesidad, los AGCC son los que se ven más fomentados, pero los grupos de bacterias capaces de producir distintos tipos de AGCC son muchas, y en el estudio de estos tipos de bacterias dónde puede residir la diferencia entre los cambios producidos en la microbiota por seguir un patrón de consumo de alimentos determinado o por hacer restricción energética. En la restricción dietética deben determinarse los alimentos que son ingeridos para poder predecir y ver las bacterias nuevas que colonizarían ese intestino, modulando el tipo de microbiota intestinal (De Filippis F et al., 2016; Tanca A et al, 2018; Muralidharan J et al., 2021). Por tanto, este subestudio permitió iniciar conocimientos sobre los posibles beneficios vinculados a la dieta mediterránea en el tipo de bacterias que conforman el microbioma intestinal humano.

Posteriormente, se colaboró en otro trabajo similar realizado por el trabajo realizado por Atzeni A et al., los participantes se estratificaron por terciles para los valores de IMC basales y para los cambios en el peso corporal después de la intervención con dieta mediterránea hipocalórica y promoción de actividad física durante 12 meses. En este periodo de un año se recogieron valoraciones generales, mediciones antropométricas y bioquímicas y muestras de heces en las distintas visitas. La secuenciación de ARNr 16S y el posterior análisis mostraron que existía un nivel de abundancia diferencial para las familias de *Prevotella* 9, *Lachnospiraceae* UCG-001 y *Bacteroides*. Estos tipos de bacterias se asociaban a una mayor pérdida de peso después de 12 meses de seguimiento cuando se realizaba el análisis de manera longitudinal, mientras que, en el análisis transversal, las familias *Prevotella* 2 y *Bacteroides* eran las que mostraban un enriquecimiento en el tercil más bajo del IMC basal. De esta forma pudo determinarse que existe un papel relevante por parte de la microbiota en el control de peso corporal y formula argumentos que apoyan la idea de potenciar el consumo de géneros de bacterias específicos que podrían hacer aún más personalizada la nutrición y medicina de precisión en tratamientos de obesidad y síndrome

metabólico, pero se requieren métodos de identificación taxonómica más profundos y resolutivos y ampliar la información a nivel de metabolómica (Atzeni A et al., 2021). Actualmente estamos realizando investigaciones específicas en el nodo de Valencia con otros marcadores e incluyendo también un estudio piloto para el análisis de parásitos.

5

DISCUSIÓN

Esta Tesis doctoral se ha desarrollado en el marco del estudio multicéntrico PREDIMED-Plus, centrada en los participantes del nodo de Valencia. Ello ha permitido incorporar un gran nivel de innovación y generar nuevo conocimiento. El estudio PREDIMED-Plus es el primer ensayo randomizado multicéntrico de intervención a nivel mundial que está examinando el efecto de la intervención intensiva con dieta mediterránea restringida en calorías, junto con el incremento de actividad física en la reducción de peso a largo plazo en personas con síndrome metabólico y mejora de parámetros cardiometabólicos que finalmente se hipotetiza resultarán en una reducción de la incidencia de eventos cardiovascular y de otros eventos relacionados. Como el estudio PREDIMED-Plus todavía está en curso, no podemos conocer todavía los principales efectos en eventos finales, pero sí hemos podido valorar la viabilidad en la realización del ensayo de intervención, tanto en el nodo de Valencia como su comparación e integración con otros nodos del estudio multicéntrico. Además, hemos podido testar la influencia de las intervenciones en la pérdida de peso y en otros parámetros antropométricos y cardiometabólicos, constatando un efecto favorable. Es más, en plena era de la medicina de precisión y salud de precisión, como proyecto específico el nodo de Valencia, hemos podido incorporar distintas ómicas en este estudio (genómica, epigenómica, metabolómica, transcriptómica y metagenómica), y analizar su posible contribución e interacción con los marcadores clásicos. Es más, dentro de otro proyecto específico del nodo de Valencia hemos analizado de manera novedosa la importancia del estudio de las variables de percepción y preferencias de los distintos sabores en los patrones de dieta, así como en los fenotipos antropométricos y de riesgo cardiovascular, generando resultados muy novedosos y de gran interés.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación muestran la necesidad e importancia de considerar estos posibles efectos y modulaciones en las pautas de prevención y tratamiento de patologías crónicas, como es el Síndrome Metabólico y las características que lo conforman, que, a su vez, son también enfermedades y suponen comorbilidades en las personas que lo padecen (Alberti KG et al., 2009; Brown AE et al., 2016; Choe SS et al., 2016). El síndrome metabólico está compuesto por un perfil de parámetros metabólicos alterados que

responden al exceso de tejido adiposo ubicado en el perímetro abdominal, este tejido adiposo promueve la producción de citoquinas proinflamatorias y exceso de ácidos grasos en el torrente sanguíneo (dislipemias), que viajan como triglicéridos y como moléculas de colesterol de baja densidad (LDL) (reduciendo las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en proporción) y se asocian directamente al estado de resistencia a la insulina. A su vez, si esta resistencia a la insulina condicionada por el sobrepeso u obesidad central se perpetúa durante cierto período de tiempo se determina y diagnóstica como diabetes mellitus 2 y requerirá un tratamiento farmacológico generalmente para su control. Además, estas citoquinas y el exceso de ácidos grasos por el sistema circulatorio promueven la aterogénesis, haciendo los vasos más rígidos y aumentando la presión arterial (hipertensión). Estas alteraciones y patologías se asocian unas con otras cuando el exceso de tejido adiposo está presente. Es por ello que la prevención de la obesidad resulta clave para la reducción de la estimación del riesgo, tanto de estas alteraciones y patologías que trastocan el metabolismo y se traducen en riesgo de enfermedad cardiovascular.

Entre las estrategias que fomentan la pérdida de peso encontramos a la dieta como uno de los factores clave. El éxito en el seguimiento de un plan dietético reside en aportar la energía suficiente, ser variada y completa (aportar todos los micronutrientes esenciales) para asegurar que el individuo acepte en buen grado el seguimiento y realización de dicho plan o dieta. Se ha observado que, si la restricción de ingesta calórica se une al aumento del gasto energético por la realización de ejercicio y actividad física, los beneficios que se alcanzan son mayores, ya que además de ayudar en el control de diversos parámetros bioquímicos (Bray GA et al., 2020; Bray GA et al., 2016;), también permite el mantenimiento, e incluso creación, de masa muscular, protegiendo el sistema óseo de futuras fracturas osteoporóticas (Cashman KD et al., 2007; Muñoz-Garach A et al., 2020; Wilson DJ, 2019) y/u otras alteraciones como en el sistema cognitivo (Valls-Pedret C et al., 2015; Hueston CM et al., 2017; Siervo M et al., 2021) o con la regulación de los niveles de glucemia, ayudando al control de la diabetes, incluso invirtiendo su aparición (Lau DC et al., 2013) y variaciones en la presión arterial (Schwingshackl L et al., 2018; Panagiotakos DB et al., 2006). Sin embargo, las tasas de éxito en las estrategias de pérdida de peso mantenida difieren mucho del tipo de estudio y de su diseño. Cuando se desea el mantenimiento de los efectos obtenidos tras el seguimiento de cualquier plan dietético son múltiples factores los que ejercen su función en la posibilidad de llevarlo a cabo, por ello, en la medida que estas variables sean computadas y formen parte del diseño de las estrategias, la tasa de efectividad puede mejorar notablemente (Salas-Salvadó J et al., 2019). Y si, además, a este valor le sumamos la capacidad de tener en cuenta la posible predisposición genética por algunos efectos que pueden producirse por la presencia de un polimorfismo (SNP) de un gen o genes concretos (o diversos SNP en distintos genes) y el grado de metilación de los genes, si se ha visto modificada su

expresión o no, a partir de la influencia a la exposición por algún factor externo, el aumento de los beneficios es aún mayor (Corella D et al., 2018). En este contexto, encontramos la nutrición personalizada y medicina de precisión como solución frente al aumento de la prevalencia de la obesidad, de Síndrome Metabólico y de enfermedad cardiovascular. Los términos personalizada y precisión hacen referencia a la importancia de conocer las características específicas de cada paciente o participante para poder ofrecer una pauta de alimentación y de ejercicios y actividades personalizados a sus necesidades (Corella D, 2022).

En 2014, ante la necesidad de encontrar suficiente evidencia sobre las estrategias y planes dietéticos pueden resultar más efectivos en la prevención de la enfermedad cardiovascular, primera causa de muerte en el mundo (INE, 2019), nace el estudio PREDIMED-Plus, cuyos objetivos principales eran evaluar las competencias de la dieta mediterránea con restricción calórica en la prevención de la etiología cardiovascular y otros fenotipos asociados (Martínez-González MA et al., 2019; Salas-Salvadó J et al., 2019). En este estudio en el que se reclutaron 6874 participantes de toda España, con edades comprendidas entre los 55-75 años los hombres y 60-75 años las mujeres y presentaban características de Síndrome Metabólico, sobrepeso y/u obesidad, se ha realizado un seguimiento y una intervención protocolada según el grupo al que era aleatorizado. De esta forma podía observarse si la dieta mediterránea con restricción calórica resulta beneficiosa ante la aparición de tales patologías frente a otros planes dietéticos generalmente recomendados, sin tener en cuenta los aspectos anteriormente comentados, es decir, sin tener presente el abanico de posibilidades de aumentar la tasa de éxito con la medicina de precisión.

En el marco de realización de esta Tesis doctoral, nuestro grupo de trabajo, como parte del estudio multicéntrico, reclutó 465 participantes, que fueron aleatorizados en sus respectivos grupos de intervención y se siguieron sus evoluciones a lo largo de los años. De manera basal y en las consiguientes visitas hemos podido recoger la información de diversas variables y características de los pacientes (capacidad de percepción de sabores y preferencia por alimentos y sabores, hábitos y estilo de vida, rasgos de personalidad y comportamiento, calidad y descanso asociados al sueño, cronotipo, estado de ánimo, etc.), elementos que nos ha permitido poder determinar si existe una asociación e interacción entre algunos de los mismos, y que podrían explicar a su vez, si se alcanzan los objetivos de pérdida de peso y de prevención cardiovascular que demanda el protocolo del estudio a nivel multicéntrico. De esta forma, se ha analizado en nuestra muestra de participantes las variables mencionadas, y gracias a la evolución de las ciencias ómicas y bioinformática se han analizado variables genéticas, como la presencia de SNP, variaciones epigenéticas y de metabolitos, y como éstos pueden vincularse a otras características y fenotipos intermedios, como ocurre con determinados

parámetros bioquímicos que pueden verse modulados por variables de estilo de vida, como la dieta, el ejercicio o el tabaquismo.

El desarrollo de la tecnología de las ciencias ómicas, los avances en la genómica, aspectos epigenómicos (metilación del ADN, modificaciones de histonas, microARN y otros reguladores emergentes), transcriptómicos (genes seleccionados y transcriptoma completo), metabolómicos y metagenómicos de los últimos años ha permitido dar respuestas concisas y consistentes para muchas patologías/alteraciones y trazos-fenotipos (Corella D et al, 2018; Mahajan A et al., 2018). Los GWAS, por ejemplo, cada vez pueden detectar un número mayor de SNP en un mismo chip o matriz, resultando matrices más informativas, reforzados por la imputación de paneles de referencia grandes y densos, lo cual ha permitido que se amplíe el alcance, pudiendo incluir variantes con frecuencias alélicas menores <1% (Mahajan A et al., 2018). Los paneles de genotipado a medida (como la matriz de exomas) y la secuenciación directa (predominantemente de exomas) han proporcionado acceso para el análisis de asociación a variantes aún más raras (Fuchsberger C et al., 2016). En un GWAS suelen incluirse datos de una gran cantidad de sujetos que padecen una alteración o patología y sujetos que no la padecen, pero que por las demás características son comparables (en la medida que las otras variables no sean idénticas deberán ajustarse los análisis por los necesarios factores de confusión). Los genes donde se observe que hay diferencias constantes de SNP permite identificar un lugar o región del genoma que debe de participar en el riesgo de padecer la enfermedad. La eficacia de los GWAS reside en que nos aporta más conocimiento que la antigua búsqueda de genes candidatos, en la que siempre acechaba el riesgo a no seleccionar correctamente al candidato y no resultar un análisis útil. Pero si bien los GWAS permiten identificar de manera masiva el conjunto de genes que puede estar implicado en el desarrollo de una enfermedad, el nivel de metilación del ADN, que se analiza con puede indicarnos si estos genes se expresan de manera diferente. Los grupos metilos activan o desactivan genes al perturbar las interacciones entre el ADN y otras proteínas. Guiándose por estas etiquetas o señales, las células pueden recordar qué genes están activados o desactivados. La metilación se considera una forma de marcar epigenéticamente el genoma.

En los últimos años, diversos estudios han reportado perfiles epigenómicos o perfiles de marcas epigenéticas que se asocian con mayor riesgo cardiovascular o envejecimiento (Keating ST et al., 2016), así como obesidad (Lai CQ et al., 2018), hiperglucemia o resistencia a insulina (Hancock ML et al., 2019), dislipemia (Corella D, 2022), hipertensión (Cárdenas-Fuentes G et al., 2021) y otras alteraciones metabólicas asociadas a Síndrome Metabólico (Iqbal J et al., 2018). Aunque en relación a los patrones dietéticos no hay muchos estudios de investigación que hayan observado estas posibles asociaciones (Corella D et al., 2018), estudios recientes han identificado que las marcas epigenéticas son

reversibles y pueden permitir una rápida adaptación al exposoma (dieta, estilo de vida, presencia de factores de riesgo, etc.).

En este trabajo de Tesis doctoral se han presentado resultados obtenidos a través de la realización de estos tipos de análisis de asociación con el genoma y el epigenoma de los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia.

El estudio llevado a cabo en este tipo de participantes, sujetos mediterráneos mayores con síndrome metabólico, en el que además de GWAS, se realizaron pruebas de percepción de los distintos sabores y de preferencia por éstos y por consumir unos alimentos frente a otros, aporta nuevos conocimientos sobre la preferencia por el sabor, concretamente, el dulce y las variables relacionadas que agregan más pistas al campo emergente de la percepción del gusto, las preferencias gustativas y la ingesta dietética para una nutrición personalizada (Rodgers GP et al., 2020; Busch CL et al., 2020). Encontramos que la preferencia por el sabor dulce en estos sujetos es muy alta, solo superada por el sabor salado. Además, hemos observado una fuerte asociación entre la preferencia por el sabor dulce y la preferencia reportada por los alimentos azucarados en esta población. Sin embargo, no detectamos una diferencia significativa en la percepción del dulzor y la preferencia por el sabor dulce. Estudios previos que analizan esta asociación han reportado resultados diversos dependiendo de la población analizada y la metodología utilizada (Petty S et al., 2020; Drewnowski A et al., 2012; Jayasinghe SN et al., 2017; Mennella JA et al., 2015). Contextualizar la edad de la población es importante a la hora de realizar estudios sobre la percepción del gusto o las preferencias gustativas, ya que puede haber diferencias clave en los resultados obtenidos y, en las conclusiones, extraídos. La mayoría de los estudios sobre la percepción del gusto y las preferencias gustativas se han llevado a cabo en niños o en la población joven o de mediana edad (Murray RD, 2017; Mennella JA et al., 2016; Tan SY et al., 2019; Petty S et al., 2020; Ventura AK et al., 2011; Drewnowski A, 1997; Mennella JA et al., 2015; Cicerale S et al., 2012), por lo que es valioso proporcionar más información sobre la preferencia gustativa en la población de edad avanzada, tal como lo hacemos en el presente trabajo.

Los estudios indican que la preferencia por diferentes sabores varía según la edad y que la preferencia por el sabor dulce es mayor en los niños (Mennella JA et al., 2015; Desor JA et al., 1987). También se sabe que existen diferencias de edad en la capacidad de percibir los gustos, y así, en un estudio previo que se realizó en una población mediterránea con sujetos entre 18 y 80 años (Barragán R et al., 2018), pudimos demostrar que, en general, hay una disminución de la agudeza gustativa con la edad, que es más notable para algunos gustos que para otros, pero que, en general, la "puntuación total de sabor" que refleja la contribución de los cinco gustos disminuyó significativamente con la edad. Además de la edad, las características de la población en términos de la existencia o inexistencia de

patologías también son importantes (Diószegi J et al., 2019). Por lo tanto, una característica importante puede ser la presencia de sujetos con diabetes tipo 2 en la población estudiada. Aunque generalmente se cree que las personas con diabetes pueden diferir de los sujetos no diabéticos en su capacidad para percibir gustos, o en sus preferencias por ciertos gustos, los estudios realizados sobre este aspecto han sido escasos y las conclusiones son diversas (De Carli L et al., 2018; Neiers F et al., 2016; Gondivkar SM et al., 2009; Perros P et al., 1996; Wasalathanthri S et al., 2014; Pugnaroni S et al., 2020; Venditti C et al., 2020). Gracias a la realización de este estudio se observó que los sujetos con diabetes tienen una percepción del gusto ligeramente menor para todos los gustos combinados en la "puntuación de sabor total" calculada, siendo el sabor amargo, la única calidad de sabor que muestra diferencias estadísticamente significativas. El deterioro de la sensación gustativa se ha descrito mucho antes en sujetos diabéticos tipo 2 (Perros P et al., 1996) y existe cierto acuerdo (De Carli L et al., 2018; Perros P et al., 1996; Pugnaroni S et al., 2020) en estudios recientes sobre la disminución de la percepción general del gusto, pero persistieron las diferencias entre los estudios sobre la calidad del sabor más afectada en sujetos diabéticos (De Carli L et al., 2018; Neiers F et al., 2016; Gondivkar SM et al., 2009; Perros P et al., 1996; Wasalathanthri S et al., 2014; Pugnaroni S et al., 2020; Venditti C et al., 2020).

Por otro lado, en el presente estudio detectamos una preferencia estadísticamente significativa ligeramente mayor por el sabor dulce en sujetos con diabetes. Aunque generalmente se pensaba que los pacientes con diabetes preferían sabores dulces, hay pocos datos disponibles (Venditti C et al., 2020). Pugnaroni S et al., (Pugnaroni S et al., 2020) plantearon la hipótesis de que una amplia alteración de la función del gusto puede llevar a los pacientes con diabetes a buscar alimentos ricos en azúcar más ricos en azúcares, lo que aumenta el riesgo dietético. De acuerdo con esta hipótesis, cuando analizamos la ingesta de alimentos en el presente análisis del estudio centrado en los alimentos azucarados incluidos en nuestra escala de dieta mediterránea (Schröder H et al., 2021), encontramos algunas asociaciones significativas entre una mayor preferencia por el sabor dulce y una mayor ingesta de bebidas azucaradas y dulces-pasteles en sujetos diabéticos tipo 2. Sin embargo, la ingesta de azúcar añadido tendió a ser menor en sujetos diabéticos tipo 2 con una alta preferencia por el sabor dulce (principalmente debido al uso de edulcorantes bajos en calorías en lugar de azúcar añadido). No se detectaron asociaciones entre la preferencia por el sabor dulce y los alimentos analizados en los participantes no diabéticos. Por lo tanto, la diabetes debe ser un rasgo a considerar al comparar los resultados de la percepción del sabor dulce, las preferencias de sabor dulce y la ingesta de alimentos azucarados entre diferentes poblaciones y para la posterior nutrición personalizada. Varios estudios han reportado un mayor consumo de alimentos azucarados en sujetos con una mayor preferencia por los dulces (Drewnowski A, 1997; Drewnowski A et al., 2012;

Mennella JA et al., 2015; Jayasinghe SN et al., 2017; Beauchamp GK, 2019) y posteriormente, una dieta alta en alimentos azucarados se ha relacionado con la obesidad y un mayor riesgo de diabetes tipo 2 (Te Morenga L et al., 2012; Debras C et al., 2020; Gao M et al., 2021). Sin embargo, esta asociación es compleja y altamente dependiente del contexto (Drewnowski A, 1997; Tan SY et al., 2019; Diószegi J et al., 2019; Venditti C et al., 2020). Por lo tanto, se necesita más estandarización y enfoque en las características de la población en estudios adicionales.

Aunque los factores genéticos se consideran relevantes para las preferencias de sabor dulce (Reed DR et al., 2010; von Molitor E et al., 2021; Jang JH et al., 2021), los principales genes y variantes genéticas asociadas con la preferencia por el sabor dulce siguen siendo en su mayoría poco explorados a nivel de GWAS. Muy pocas cohortes que realizan GWAS han medido la variable de preferencia de sabor dulce (Hwang LD et al., 2019; Kawafune K et al., 2020). Por lo tanto, varios sustitutos de la preferencia dulce, como la ingesta de alimentos azucarados, se han analizado en el pequeño número de GWAS realizados (Hwang LD et al., 2019; Suzuki T et al., 2021; Zhong VW et al., 2019). Debido a la heterogeneidad del estudio, la consistencia en los SNP mejor clasificados identificados es muy baja. Además, el origen geográfico de la población y las diferencias de ascendencia pueden tener una influencia relevante al comparar los resultados. Teniendo en cuenta que se han llevado a cabo muy pocos GWAS en las poblaciones mediterráneas del sur de Europa y que esta población puede diferir en varias características de ascendencia de las poblaciones del norte de Europa (Novembre J et al., 2008), se necesitan estudios específicos en la población mediterránea para una mejor medicina de precisión. Aunque el tamaño de nuestra muestra es pequeño, realizamos un estudio exploratorio de GWAS en esta población para obtener resultados preliminares y algunas pistas relacionadas con los principales SNP y genes relacionados con la preferencia por el sabor dulce en sujetos mediterráneos mayores con síndrome metabólico. En un GWAS previo realizado en esta población pudimos detectar una asociación estadísticamente significativa entre la percepción del sabor amargo y los SNP en el gen TAS2R38 (Coltell O et al., 2019). A pesar de que no se espera que la asociación entre la preferencia por el sabor dulce y los factores genéticos sea tan fuerte como la relación entre el sabor amargo, obtuvimos un resultado estadísticamente significativo a nivel de todo el genoma. Identificamos varios SNPs en el gen PTPRN2 (situado en el cromosoma 7), significativamente asociados con la preferencia por el sabor dulce. El SNP alcanzado fue el SNP rs2091718, permaneciendo estadísticamente significativo a nivel de todo el genoma después del ajuste por varios factores, incluida la diabetes tipo 2 ($p=2,28 \times 10^{-8}$). Para minimizar el hecho de que el hallazgo podría deberse al azar, se ajustaron varios modelos de regresión (incluido un GWAS sobre el Factor 2 combinado vinculado a

la preferencia de sabor dulce en el contexto de otros gustos) y controlamos la estratificación de la población, obteniendo resultados similares. Además, realizamos un GWAS adicional basado en genes para la preferencia de sabor dulce y el gen PTPRN2 fue el segundo mejor clasificado en el nivel sugestivo de significación en este análisis. Esta es la primera vez que se informa que este gen está asociado con la preferencia por el sabor dulce y se necesitan más estudios en esta y otras poblaciones para la replicación o para ampliar los hallazgos. En general, el gen PTPRN2 es un gen candidato prometedor. Este gen, codifica un importante autoantígeno de los islotes en la diabetes tipo 1 y desempeña un papel importante en la secreción de insulina en respuesta a los estímulos de glucosa (Bian X et al., 2017; Suckale J et al., 2010) y la transcripción y proliferación de células β (Ferri G et al., 2019).

En modelos animales, la eliminación del gen PTPRN2 se asoció con una reducción en la secreción de insulina, así como con una disminución de los neurotransmisores serotonina, norepinefrina y dopamina, lo que influye en los cambios en el aprendizaje y el comportamiento en ratones (Nishimura T et al., 2009). Existen estudios previos en humanos, que relacionan este gen con la adicción a la cocaína y la depresión (Yang BZ et al., 2011), así como con los trastornos bipolares (Curtis D et al., 2011) y con los trastornos del desarrollo en los niños (Mosca SJ et al., 2016). Además, se ha publicado que uno de los genes en el genoma humano que contiene más "repeticiones en tándem de número variable" (VNTR), un tipo de variante reguladora estructural, es el gen PTPRN2 (Linthorst J et al., 2020). Las variantes VNTR están relacionadas con muchas enfermedades, que afectan principalmente al sistema nervioso y a varios fenotipos de obesidad (De Roeck A et al., 2018; Say YH et al., 2017; Vincent JB, 2016). Otras características para la funcionalidad de los VNTRs sobre la patogenicidad que cumple el PTPRN2, es la localización subtelomérica (el PTPRN2 se posiciona dentro de los subtelómeros de los cromosomas 7 y 8), así como una expresión génica predominante en el cerebro (Linthorst J et al., 2020), como hemos observado en el análisis de expresión génica funcional que hemos llevado a cabo en este estudio. Estas características funcionales del gen PTPRN2 están de acuerdo con nuestro nuevo hallazgo que relaciona este gen con la preferencia por el sabor dulce. Se necesita trabajo adicional para caracterizar mejor los mecanismos moleculares involucrados.

Además, se ha acumulado nueva información considerable en los últimos años sobre el papel de PTPRN2 en la regulación epigenética de enfermedades metabólicas, neurodegeneración y cánceres. En algunos estudios se ha informado de metilación diferencial del gen PTPRN2 y mayor riesgo de obesidad en niños (Lee S, 2019), diabetes tipo 2 (Ouni M et al., 2020), deterioro cognitivo (Chuang YH et al., 2019), riesgo cardiovascular futuro (Agha G, et al., 2019) y cáncer (Lee EJ et al., 2015; Wielscher M et al., 2015). En el presente trabajo no analizamos la metilación y no sabemos si la asociación entre los SNP PTPRN2 mejor clasificados

y la preferencia por el sabor dulce está modulada por este mecanismo epigenético. Curiosamente, en el presente estudio, el SNP principal rs2091718 en el gen PTPRN2 se ha asociado significativamente con la prevalencia de la diabetes. Los portadores del alelo G menor para esta variante presentaron una menor probabilidad de diabetes. Del mismo modo, los portadores G tenían una menor preferencia de sabor dulce. Aunque varios estudios en animales y estudios de metilación en humanos han reportado asociaciones entre el gen PTPRN2 y la diabetes tipo 2 (Bian X et al., 2017; Suckale J et al., 2010; Ouni M et al., 2020; Hendricks WJAJ et al., 2013; Awamleh Z et al., 2021), las asociaciones genéticas a nivel de SNP son muy escasas. En ausencia de investigación mecanicista, es difícil saber si la asociación entre el polimorfismo rs2091718-PTPRN2 y la diabetes tipo 2 es causa o consecuencia. Sin embargo, cuando hemos examinado la asociación entre el SNP rs2091718-PTPRN2 y la preferencia de sabor dulce dependiendo del estado de la diabetes, obtuvimos asociaciones estadísticamente significativas tanto en sujetos no diabéticos como diabéticos tipo 2.

Otro trabajo interesante para mencionar aquí es el estudio llevado a cabo en participantes en la misión Mars-500 para investigar los cambios en el Psico-Epigenoma-Metabolismo durante la adaptación al aislamiento a largo plazo (Liang F et al., 2019). Analizaron los patrones longitudinales de metilación del ADN para explorar los sitios de metilación del ADN sincronizados con la glucosa y el estado de ánimo en condiciones extremas de aislamiento. Curiosamente, se encontró consistentemente que el gen PTPRN2 cubre los sitios de metilación del ADN cambiando sincrónicamente con la glucosa y el estado de ánimo. Este resultado apoya nuestro hallazgo que sugiere que el gen PTPRN2 es un nuevo gen relevante para determinar la preferencia por el sabor dulce, y también potencialmente asociado con la glucosa en ayunas. Curiosamente, en un estudio reciente, el gen PTPRN2 ha sido identificado como uno de los genes más relevantes relacionados con la arquitectura genómica de la eficiencia alimentaria en pollos (Marchesi JAP et al., 2021).

Con respecto a otros determinantes genéticos de las preferencias de sabor dulce, los estudios iniciales analizaron asociaciones entre varios SNP en genes candidatos como TAS1R1, TAS1R2, TAS1R3, GRM1, SLC2A2, DRD2, OPRM1, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SCNN1D, TRPV1 y GNAT3, entre otros) con resultados mixtos (Diószegi J et al., 2019; Bachmanov AA et al., 2014; Nolden AA et al., 2020; Smail HO 2019; Yang L et al., 2020; Jang JH et al., 2021; Bachmanov AA et al., 2011; Park S et al., 2020; Suzuki T et al., 2021). En nuestros GWAS no detectamos ninguno de estos genes como de alto rango, lo que indica una pequeña asociación, si es que la hay. Se llevará a cabo un análisis detallado centrado en estas variantes para evaluar más a fondo tales asociaciones potenciales y la posible modulación por diabetes tipo 2. Comprender las preferencias individuales por el sabor dulce y los factores relacionados con la ingesta de alimentos es de creciente

interés e importancia para la nutrición personalizada y la medicina de precisión en diversas poblaciones (Vesnina A et al., 2020; Ordovás JM et al., 2018).

En cuanto al EWAS realizado, examinamos las firmas de metilación del ADN del tabaquismo (incluidos los nunca fumadores, los exfumadores y fumadores actuales) en estos mismos participantes, población mediterránea española de mayor edad con Síndrome Metabólico. Este es el primer estudio en esta población que investiga los sitios de CpG metilados diferencialmente en la sangre asociados con diversas exposiciones al tabaquismo utilizando la matriz de metilación EPIC 850K de alta densidad. En comparación con otras poblaciones europeas, la población mediterránea española ha recibido relativamente poca atención en el análisis de marcadores ómicos, particularmente epigenómicos. Por lo tanto, es informativo obtener datos sobre las características de esta población del sur de Europa para comprender mejor la validez externa de los biomarcadores reportados en otras poblaciones (Fatumo S et al., 2022; Salas LA et al., 2021; Fraser HB et al., 2012). Un estudio previo realizado en una cohorte mediterránea reclutada en la provincia de Girona perfiló la metilación del ADN asociada con el tabaquismo utilizando la matriz 450K y difería del presente estudio en varios aspectos (Sayols-Baixeras S et al., 2015). En el presente estudio, la muestra se enriqueció con los datos de participantes exfumadores, lo que nos permite analizar tres niveles distintos de exfumadores en función del tiempo transcurrido desde el abandono del hábito de fumar. Pudiendo identificar que el número promedio de años que los fumadores habían fumado era muy alto (38 años). El EWAS principal en toda la población consideró 5 niveles de estado para la variable fumador en función de los años que se fumaba o había fumado y reveló efectos cuantitativos sobre la metilación del ADN de los sitios CpG metilados diferencialmente mejor clasificados. En este EWAS, detectamos 46 CpG metiladas diferencialmente en el nivel de significación de todo el epigenoma (Mansell G et al., 2019). La asociación más fuerte (hipometilada en fumadores) se observó en el intergénico cg21566642 (representado en las matrices de metilación 450K y EPIC 850K) ubicada en la región 2q37.1, cerca del gen ALPPL2. El segundo mejor clasificado fue cp01940273, también ubicado en la misma región. Similar a nuestros resultados, el sitio de metilación cg21566642 fue reportado previamente como el más afectado por Christiansen C, et al., (Christiansen C et al., 2021) analizando sujetos del Reino Unido utilizando la matriz EPIC 850K. Otros estudios también informaron este sitio de CpG como uno de los resultados más significativos (Zeilinger S et al., 2013; Sayols-Baixeras S et al., 2015; Cardenas A et al., 2022; Baglietto L et al., 2017). Además del gen ALPPL2, otros dos genes que codifican genes de fosfatasa alcalina estrechamente relacionados, placentario (ALPP) e intestinal (ALPI) se encuentran dentro de la región 2q37.1. Las fosfatasas alcalinas se conocen como glicoproteínas unidas a la membrana plasmática que han estado involucradas en varias enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares e

inflamatorias, entre otras (Coleman JE, 1992; Hosseini-Nasab N et al., 2022). Los mecanismos por los cuales fumar tabaco puede conducir a la hipometilación de la cg21566642 y otras CpG en esta región aún no se comprenden bien. Se ha postulado una relación compleja entre el tabaquismo, la glicosilación de inmunoglobulina G y la metilación del ADN en el sitio cg21566642 (Wahl A et al., 2018). Sin embargo, se requiere investigación adicional sobre estas vías y cómo la hipometilación en este sitio se asocia con el riesgo de enfermedad. Además del impacto estadísticamente significativo (cg21566642) en nuestro EWAS primario, detectamos como estadísticamente significativas otras 45 CpG metiladas diferencialmente adicionales perfiladas con las matrices de metilación 450K o EPIC. Utilizamos la recientemente actualizada base de datos "The EWAS Catalog: a database of epigenome-wide association studies" para verificar la novedad de estas CpG (Battram T et al., 2022). Todas las CpG descubiertas en nuestro EWAS como estadísticamente significativas en toda la muestra habían sido reportadas previamente en otros estudios (Breitling LP et al., 2011; Shenker NS et al., 2013; Philibertm RA et al., 2013; Zeilinger S et al., 2013; Tsaprouni LG et al., 2014; Dogan MV et al., 2014; Reynolds LM et al., 2015; Harlid S et al., 2014; Sayols-Baixeras S et al., 2015; Li S et al., 2018; Hulls PM et al., 2020; Sun YQ et al., 2021; Mishra PP et al., 2020; Barcelona V et al., 2019; Wen D et al., 2022; Cardenas A et al., 2022; Dugué PA et al., 2020; Langdon RJ et al., 2021; Christiansen C et al., 2021; Baglietto L et al., 2017; Battram T et al., 2022; Joehanes R et al., 2016; Domingo-Relloso A et al., 2020), excepto el cg15533935 en el gen NUDT4P2 (solo presente en la matriz EPIC 850K), que se describe por primera vez aquí. A pesar de que las CpG que solo se encuentran en la matriz EPIC 850K son más recientes, también se han informado en estudios previos que han utilizado esta matriz (Domingo-Relloso A et al., 2020; Sun YQ et al., 2021; Christiansen C et al., 2021; Cardenas A et al., 2022). Este resultado confirma la alta consistencia en el efecto del tabaquismo sobre la metilación del ADN en diversas poblaciones. Sin embargo, vale la pena señalar que, a pesar de la consistencia en la detección de varias CpG como estadísticamente significativas, la contribución de cada una de ellas puede diferir y ser más específica para cada población. En consecuencia, a pesar de obtener resultados estadísticamente significativos para los PRSS23, RARA, F2RL3, AHRR, GFI1, GNG12, ARRB1, GPR15, ANPEP, LRRN3, MGAT3, ITPK1, LRP5, ATP9A, MTSS1, NUDT4, ETV6, UXS1, XYLT1, SEMA7A y LMO2 (Battram T et al., 2022), el rango en esta población mediterránea fue distinto y más relacionado con las características de la población (sexo, edad, tabaquismo y diversos factores ambientales, entre otros). En la mayoría de los estudios previos (Battram T et al., 2022), se ha encontrado que el sitio cg05575921 en el gen AHRR es el primer sitio de metilación diferencial asociado con el tabaquismo. Sin embargo, ocupó el undécimo lugar en el EWAS para toda nuestra población. Esto se puede explicar teniendo en cuenta lo que descubrimos cuando examinamos la modulación de la

metilación en los sitios de tabaquismo-CpG debido a la adherencia a la dieta mediterránea. El sitio cg05575921 en el gen AHRR ocupó un lugar alto cuando la adherencia a la dieta mediterránea fue baja en el EWAS estratificado considerando dos estratos de adherencia (baja y alta). En un modelo jerárquico ajustado por covariables, encontramos un término de interacción estadísticamente significativo entre el tabaquismo y la adherencia a la dieta mediterránea para determinar la metilación del ADN en el sitio cg05575921.

Una mayor adherencia a la dieta mediterránea aumentó el nivel de metilación en el sitio cg05575921 en fumadores actuales, ayudando a contrarrestar la hipometilación inducida por el tabaquismo. Se sabe que la dieta puede tener un efecto sobre la metilación del ADN (Maugeri A 2020; Fareed MM et al., 2022; Ungaro P et al., 2022; Li X et al., 2022), aunque estos efectos no se han determinado del todo y siguen sin comprenderse bien. Y si bien, este es el primer estudio que se centra en el efecto de la dieta mediterránea en la metilación del ADN a nivel de todo el genoma, otros estudios sí que han examinado el impacto de alimentos/nutrientes específicos en la metilación en las CpG en el gen AHRR dependiendo del estado de tabaquismo (Tsuboi Y et al., 2022; Shorey-Kendrick LE et al., 2017). Así, Tsuboi Y et al. (Tsuboi Y et al., 2022) informaron en una población japonesa que la ingesta dietética de verduras y frutas ricas en provitamina A aumentaba el porcentaje de metilación del gen AHRR en fumadores actuales. Del mismo modo, Shorey-Kendrick et al (Shorey-Kendrick LE et al., 2017) en un ensayo clínico informaron que los suplementos de vitamina C durante el embarazo previnieron la hipometilación del ADN de la descendencia en el gen AHRR y otros genes asociados con el tabaquismo materno. Aunque nuestro estudio en la población mediterránea fue exploratorio, y se requiere un análisis más detallado de los efectos de la dieta mediterránea en la modulación del perfil de metilación del tabaquismo, los hallazgos son muy interesantes y pueden explicar las diferencias encontradas entre las poblaciones, así como los diferentes riesgos de enfermedad entre los fumadores en función de la dieta. En nuestro análisis exploratorio, también detectamos que el efecto modulador de la dieta mediterránea era más específico para ciertas CpGs como la mencionada cg05575921 en el gen AHRR, para el cp09936388 en el gen GFII1 o para el cg01901332 en el gen ARRB1. No se encontró una interacción significativa entre la adherencia a la dieta mediterránea y el tabaquismo para el cg21566642 más afectado en la región 2q37.1. Esto contribuye a explicar la fuerte asociación entre el tabaquismo y la metilación en este sitio en el presente estudio. Asimismo, en esta población, el sitio cg21566642 tuvo una capacidad discriminativa muy alta para identificar fumadores actuales versus nunca fumadores (ROC-AUC= 0,97; IC95%: 0,94-0,99). En el análisis de subgrupos que comparó los efectos EWAS de los fumadores nunca fumadores versus los fumadores actuales, también encontramos el sitio cg2156664 como el principal éxito para la significación estadística. Para esta comparación, encontramos una lista similar de CpG tan estadísticamente

significativas como cuando se analiza toda la población, pero con algunas diferencias en la clasificación y los sitios. Dos CpG más (en los genes MYH6 y NOS1AP) alcanzaron significación estadística de todo el genoma. Los 43 sitios metilados diferencialmente en la comparación de nunca fumadores vs. fumadores actuales fueron hipometilados en fumadores actuales y se habían informado previamente en otras poblaciones. Sin embargo, la firma global es específica para esta población mediterránea considerando que, en esta población, no observamos como estadísticamente significativos varios de los 25 sitios CpG (en HIVEP3 como el hit o en SGIP1, SKI, CUGBP1, SFRS13A, FAM102A, THAP11, SNORD58A, SLC20A1, CYTH4, EDC3, TRAF7, SORBS1 y CTTN1), listados como los 25 genes más significativos en el metaanálisis realizado por Joehanes R, et al., (Joehanes R et al., 2016) en 16 cohortes internacionales, y detectando 2623 CpGs (anotadas a 1405 genes) como metiladas diferencialmente significativamente significativas en la comparación entre fumadores actuales y nunca fumadores. En este metanálisis, el cg05575921 en el gen AHRR ocupó el puesto 36. Observamos 24 CpG metiladas diferencialmente en el análisis de subgrupos que comparó a ex fumadores versus fumadores actuales, confirmando la reversión de la hipometilación relacionada con los fumadores actuales (Dugué PA et al., 2020; Wahl A et al., 2018). En esta comparación se informó por primera vez una asociación novedosa que alcanzó la significación estadística a nivel de EWAS. Fue el sitio cg12093781 anotado al gen KIF26B. Este sitio de CpG no se incluyó en el Catálogo EWAS actualizado (Battaram T et al., 2022). KIF26B se ha identificado como un oncogén en varios tumores (Sun F et al., 2022) y hay un estudio que examina la relación entre la exposición temprana al humo del tabaco y las variantes genéticas en este gen sobre la hiperreactividad bronquial en el asma (Dizier MH et al., 2019). En el análisis de subgrupos en mujeres, también descubrimos una nueva CpG asociada con el tabaquismo (5 niveles). Esta es la primera vez que el cg25966498 en el gen SPATA17 ha sido reportado involucrado en dicha asociación. En estudios anteriores, el gen SPATA17 se ha relacionado con la apoptosis de células germinales en ratones transgénicos (Nie DS et al., 2013), la anorexia nerviosa (Nakabayashi K et al., 2009) y con enfermedades degenerativas (Haenig C et al., 2020). Se necesitan más estudios para replicar y caracterizar estos nuevos hallazgos en esta y otras poblaciones. Comprender la relación entre la metilación diferencial en los principales sitios de CpG asociados con el tabaquismo y el riesgo de enfermedad es otro tema importante. Algunos estudios han examinado varias asociaciones con el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o la mortalidad obteniendo resultados mixtos (Reynolds LM et al., 2015; Baglietto L et al., 2017; Grieshober L et al., 2020; Zhang Y et al., 2016; Cappozzo A et al., 2022; Tsuboi Y et al., 2022). Una limitación de nuestro estudio es que no tenemos estos resultados de la enfermedad para analizar la asociación. En cambio, realizamos análisis de enriquecimiento funcional de las CpG metiladas diferencialmente y encontramos fuertes asociaciones con vías asociadas con varios

tipos de cáncer, inflamación, metabolismo de la insulina y enfermedades cardiovasculares, de acuerdo con estudios previos (Christiansen C et al., 2021; Joehanes R et al., 2016). De hecho, uno de nuestros trabajos publicados en la revista *Metabolism* en 2021 (Giménez-Alba I et al., 2021), se analizaron las firmas y vías de metilación en este grupo de participantes dependiendo del estado de diagnóstico de diabetes que presentaban y del tratamiento farmacológico que recibían. Para ello se clasificaban en función al tipo de fármaco o si eran diabéticos, pero no lo tenía pautado o no eran diabéticos. Los sucesivos análisis de enriquecimiento de vías identificaban vías de reparación por escisión de bases, señalización mTOR, carcinoma basocelular, y las vías que resultaron significativas cuando se comparaban los sujetos con los que llevaban diversos tratamientos farmacológicos eran las vías de miocardiopatía dilatada e hipertrófica, estos resultados coinciden con algunos trabajos que han encontrado que estas rutas se asociaban a distintos eventos cardiovasculares y a la intolerancia a la glucosa (Li J et al., 2021; Sun Y et al., 2021; Feng J et al., 2022). La intolerancia a la glucosa (IGT) es el estadio previo a la enfermedad diabetes, que implica la aparición y progresión de anomalías en las células β , que incluyen principalmente una disminución significativa en el número de células β pancreáticas y en la función de las mismas para secretar y sintetizar insulina. La disminución en el número de β pancreáticos se relaciona con el trastorno del ciclo celular β (Westwell-Roper CY et al., 2014), pero la disminución o pérdida de la función se asocia con la desdiferenciación celular, motivo por el que surge la glucotoxicidad causada por altas concentraciones de glucosa que no es capaz de entrar en la célula correspondiente (Gosselin D et al., 2014). Tras esto sucederán los estados de lipotoxicidad e inflamación crónica en el tejido de los islotes (Dinneen S et al., 1992; Criscimanna A et al., 2014). En el trabajo realizado por Feng J et al. determinaron las distintas vías metabólicas que se vieron enriquecidas en la patogenia de la diabetes como resultado del análisis del uso de un fármaco nuevo (Feng J et al., 2022). Entre los resultados de este trabajo destaca la detección de la reducción de la expresión de RRAGD (Ras related GTP binding D), que produce una desregulación en la señalización de la vía de mTOR, afectando a la sensibilidad a la insulina (Zoncu R et al., 2010), vía metabólica que también resulta significativa en nuestra población de estudio (Giménez-Alba I et al., 2021). Nuestro análisis de EWAS en sujetos diabéticos, tratados para la hiperglucemia de manera distinta, fueron clasificados en cinco grupos según el tipo de tratamiento, mostrando variaciones epigenéticas a partir de su estado de diabetes. Los lugares de metilación más significativos: cg27024081 ($p=3,4 \times 10^{-14}$); cg06611426 ($p=6,8 \times 10^{-9}$) y cg17385679 ($p=1,1 \times 10^{-8}$) (Giménez-Alba I et al., 2021).

Otro trabajo realizado con EWAS en nuestra población de estudio, observó que existían marcas epigenéticas específicas en relación al lugar de nacimiento los participantes. Dependiendo de si los participantes referían haber nacido y crecido

(al menos la primera etapa de la infancia) en un entorno urbano, con un gran número de habitantes, o rural, un pueblo más pequeño, villa o aldea, presentaban variaciones en la metilación de genes concretos. Las islas o sitios CpG que presentaron mayor significación estadística se encontraban en las regiones de los genes NCKAP5, CNM2, KRBOX1-AS1 y KRBOX1, DPEP3, MACROD2-IT1, TBL2 y ELANE. Estos genes se han visto asociados en distintos estudios con diferentes patrones de conducta y de parámetros bioquímicos, que, a su vez, pueden ser o haber convergido en enfermedad. NCKAP5 se considera uno de los genes candidato más prometedor en el estudio del desorden bipolar, además el análisis GO y KEGG indican que las vías metabólicas más enriquecidas también se ven asociadas a otros espectros cognitivos alterados (autismo ($p<0,006$) y esquizofrenia ($p=0,015$)) (Forstner AJ et al., 2020), también ha resultado útil en el diagnóstico del cáncer de pulmón (Chen K et al., 2023). CNM2 es un gen asociado directamente a la hipomagnesemia, mutaciones concretas en este gen conllevan a sufrir convulsiones y discapacidad intelectual (HSMR), además se ha visto asociado a obesidad severa en la gran mayoría de pacientes (89%) (Franken GAC et al., 2021). En otros estudios de GWAS los resultados vinculaban el locus CNM2 con rasgos cardiovasculares como la presión arterial (Li C et al., 2017), alteraciones en las arterias coronarias (Dichgans M et al., 2014) y el infarto de miocardio (Matsuoka R et al., 2015). También se ha detectado asociación con los rasgos glucémicos e índice de masa corporal (Hruby A et al., 2013; Lv WQ et al., 2017). Además, las variantes comunes dentro del locus CNM2 se han asociado con trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia y el trastorno bipolar, igual que NCKAP5 (Grigoriu-Serbanescu M et al., 2015; Lotan A et al., 2014). KRBOX1 resultó ser un gen relevante en la identificación de mecanismos moleculares y biomarcadores en las regiones de la aurícula izquierda para el diagnóstico y tratamiento de la fibrilación auricular valvular (FAV) (Wu J et al., 2020). En un estudio reciente identificaron que la expresión del DPEP3 es significativa en los testículos; sin embargo, se desconoce su función y DPEP3 no es esencial para la fertilidad masculina (Xie Y et al., 2019). La expresión de DPEP3 se ve limitada en los hombres. En las mujeres se ha observado que la expresión DPEP3 es elevada en el cáncer de ovario, lo que presenta una oportunidad para una terapia dirigida (Hayashi K et al., 2020). La expresión reducida de MACROD2 en el trabajo realizado con GWAS por Zhou ZJ et al. predijo la recurrencia del tumor y una supervivencia general deficiente (Zhou ZJ et al., 2020). Las deleciones frecuentes (~30%) de MACROD2 en el cáncer colorrectal humano causan una actividad de la transferasa PARP1 alterada de una manera dependiente de la dosis del gen. La *haploinsuficiencia* MACROD2 altera la reparación del ADN y la sensibilidad al daño del ADN y da como resultado inestabilidad cromosómica (Sakthianandeswaren A et al., 2018). Así como MACROD2 se ha asociado a distintos tipos de cáncer, las variaciones en la expresión de TBL2 se vinculan a hipercolesterolemia. Un estudio reciente

demostró que los participantes con hipercolesterolemia tenían una metilación más baja de TBL2. Los resultados sugieren que la metilación del ADN de TBL2 puede disminuir el riesgo de niveles de colesterol LDL elevados en humanos. ELANE se ha asociado a estados de neutropenia concretos, incluyendo la congénita y la cíclica, que son trastornos hematológicos primarios caracterizados por fiebre recurrente, inflamación de la piel y la orofaringe (es decir, úlceras bucales, gingivitis, sinusitis y faringitis) y adenopatía cervical. Las complicaciones infecciosas suelen ser más graves en la neutropenia congénita, que existe el riesgo de derivar en una mielodisplasia (MDS) o en leucemia mielógena aguda (AML), que, en la neutropenia cíclica, que no se asocia con riesgo de malignidad o conversión a leucemia (Dale DC et al., 2018). Y aunque estas asociaciones deben continuar investigándose, todos estos genes se veían involucrados en diversas enfermedades no transmisibles (ENT o crónicas).

En nuestro trabajo que tenía presente si el entorno de nacimiento era un medio rural o urbano, se analizaron además las rutas metabólicas con KEGG y las que resultaron más significativas fueron la del metabolismo de la Taurina e Hipotaurina y la de biosíntesis de Glicosaminoglicanos (GAG). Curiosamente, en algunos trabajos que han investigado como influye el clima y las condiciones del entorno en el metabolismo es en la industria alimentaria. Un estudio reciente sobre pollos que se criaban en condiciones de temperaturas extremas, climas tropicales y subtropicales, determinó cambios significativos en la biosíntesis primaria de ácidos biliares y el metabolismo de la taurina y la hipotaurina, lo que indica que la síntesis de grasas se veía afectada, reduciendo la calidad de la carne (Zhou Y et al., 2020). Un segundo trabajo que identificaba como el estrés producido por las condiciones climáticas del entorno afectaba a nivel molecular a la especie *Camellia sinensis*, una variedad de té. Nuevamente las principales vías metabólicas que se ven afectadas son la de la taurina e hipotaurina, lo que indica que el estrés generado por el entorno podría afectar al té (Wang Y et al., 2017). En el caso de los Glicosaminoglicanos, GAG, algunos trabajos han asociado estas moléculas y como cambios en estos se asocian a los distintos procesos de envejecimiento (Lee DH et al., 2016), lo que podría verse asociado a su vez a influencias del entorno. Los GAG también se han encontrado en el colon humano en forma libre y como parte de los proteoglicanos, y sus beneficios en el microbioma son conocidos y se utiliza en diversos tratamientos para colonización y proliferación de bacterias intestinales deseables (Rawat PS et al., 2022). Estos ejemplos reflejan la relación con el lugar donde nos desarrollamos y encontramos influye en la regulación y proceso de diversas vías metabólicas, entre ellas las detectadas en nuestro análisis.

Los resultados que se determinaron con el análisis de Gene Ontology (GO) fueron múltiples procesos biológicos y funciones moleculares las vías que se vieron más enriquecidas, mostrando que el carácter rural-urbano influye en la metilación, incluso en los casos que los participantes habían referido cambiar de tipo de residencia respecto a su lugar de nacimiento. La asociación entre la

urbanización o factores del urbanismo y las enfermedades no transmisibles (ENT) está impulsada predominantemente por las características del entorno urbano y los factores de comportamiento. Los factores ambientales asociados con la urbanización que se conocen que aumentan directamente el riesgo de ENT incluyen una mayor exposición a la contaminación y las toxinas ocupacionales (Gakidou E et al., 2017; WHO, 2018). Los factores conductuales asociados a la urbanización que contribuyen a un mayor riesgo de ENT incluyen una mayor disponibilidad de alimentos (NCD-RisC, 2017), una disminución de la actividad física (WHO, 2018), una mayor porción de ingesta de energía proveniente de grasas (Dehghan M et al., 2017), proteínas de origen animal (Department of Health of South Africa, 2016) y alimentos procesados (Swinburn BA et al., 2019), una reducción de la energía consumida relativa de los carbohidratos (Dehghan M et al., 2017) y aumento de tejido adiposo en consecuencia (Swinburn BA et al., 2019). Si bien se sabe que el consumo de tabaco y alcohol contribuyen al riesgo de ENT, su relación con la urbanización es más compleja (Gakidou E et al., 2017). La urbanización coincide con una mayor compra de productos de tabaco comerciales y la exposición a publicidad que fomenta el tabaco, mientras que la inhalación de humo de segunda mano tiende a reducirse (Department of Health of South Africa, 2016; Chow CK et al., 2017; Brathwaite R et al., 2017). Y aunque las personas que viven en entornos urbanos tienen menos probabilidades de estar sujetas al consumo excesivo de alcohol, es más probable que lo consuman a lo largo de su vida (Department of Health of South Africa, 2016; Dixon MA et al., 2016). La urbanización también se ha visto asociado con un mayor estrés psicosocial como resultado de la inequidad y la exclusión social, la inseguridad laboral y la creciente preocupación por la violencia y el crimen (Pikhart H et al., 2015; Miranda JJ et al., 2019). El acceso a la educación, por otro lado, disminuye el riesgo de ENT (Jacobs DR Jr et al., 2019). Todos los factores mencionados pueden inducir cambios epigenéticos en la expresión de distintos genes que promuevan la aparición de la alteración fenotípica y posible patología (Cronjé HT et al., 2020).

En estos participantes también se han realizado los respectivos cuestionarios sobre frecuencia de consumo de alimentos y cuestionarios de adherencia a la Dieta Mediterránea, de manera basal y en las respectivas visitas de seguimiento, para identificar el patrón alimentario y de consumo de alimentos de estos pacientes, y poder detectar si se presentaban asociaciones con los niveles de parámetros bioquímicos y riesgo de desarrollo de enfermedades no transmisibles y el consumo de ciertos alimentos o seguimiento de patrones y tipos específicos de dieta (Rees K et al., 2019). La forma de proceder a investigar la manera en la que nos alimentamos se ha centrado en las últimas décadas más en los patrones de combinación de alimentos que en alimentos/nutrientes individuales debido a los posibles efectos sinérgicos/antagonistas de los componentes en un modelo conjunto dietético que se corresponde con el patrón o perfil dietético/alimentario

(Domínguez LJ et al., 2021). Varios patrones dietéticos se han asociado con beneficios para la salud, pero la mayor evidencia la encontramos en los estudios que han analizado los hábitos dietéticos tradicionales y de estilo de vida mediterráneos. Después del estudio del estudio de los 7 países de Keys A (Keys A et al., 1986), muchos investigadores trataron de explicar las razones por las que se obtenían beneficios en cuanto a la prevención y/o tratamiento de ENT asociadas a la edad, como son enfermedad cardiovascular y metabólicas, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, depresión, enfermedades respiratorias y fracturas por fragilidad (Martínez-González MA et al., 2015). Además, la dieta mediterránea es ecológicamente sostenible por lo que puede considerarse un bien inmaterial perdurable, que debemos potenciar y promocionar su seguimiento (Domínguez LJ et al., 2021; Lutz M, 2021). Con la dieta mediterránea la gran mayoría de los beneficios que se han determinado se deben al consumo frecuente de ciertos micronutrientes y macronutrientes presentes en los alimentos que la representan. El aceite extra virgen de oliva (Mazzocchi A et al., 2019), los vegetales (Román GC et al., 2019; Głąbska D et al., 2020), proteínas de origen animal reducidas, pero de buena calidad, con poca parte grasa, consumo frecuente de pescado respecto a carne (Sala-Vila A et al., 2016; Román GC et al., 2019) y consumir los cereales sin refinar (Kelly SA et al., 2017) son las premisas que formulan esta dieta, lo que se traduce en la entrada directa al organismo de componentes que resultan beneficiosos para nuestro estado de salud (ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), tocoferoles, polifenoles), pero también hay una serie de beneficios indirectos sobre el sistema inmunitario y las respuestas inflamatorias por mantener un equilibrio y control en el consumo de ciertos alimentos (grasas saturadas bajas, relación ácido linoleico/alfa linolénico bien equilibrado) (Martínez-González MA, 2016; Mazzocchi A et al., 2019; Cena H et al., 2020). El estudio PREDIMED demostró los beneficios a nivel cardiovascular (Salas-Salvadó J et al., 2018; Li J et al., 2020) y diversos tipos de cáncer, reducción de la diabetes, así como tasa de mortalidad menor general tras seguir una dieta mediterránea frente a otras dietas en las que no se consumían estos mismos tipos de alimentos a estos mismos niveles, y no se cocinaba con AOVE (tradición y cultura de los países mediterráneos), sino que se utilizaban otros tipos de aceites con grasas más poliinsaturadas y saturadas (Martínez-González MA et al., 2015; García-Arellano A et al., 2019) y no se llegaba a las recomendaciones de frutas y verduras que sí se computan en dieta mediterránea, asegurando de esta forma el aporte de compuestos antioxidantes que reducen la formación de radicales libres y compuestos ROS (Singh RB et al., 2022), que también se han visto asociados a su vez a la prevención de cáncer (Rubino R et al., 2022). Y si bien es cierto, una dieta para ser beneficiosa no necesariamente debe ser completamente mediterránea, sí que hay suficiente evidencia que las alternativas más saludables coinciden en que deben contener más alimentos de origen vegetal, y parte de estos productos vegetales deben ser consumidos en fresco, los cereales han de ser integrales, y deben

consumirse regularmente legumbres, semillas y frutos secos, y menos alimentos de origen animal, fomentando el consumo de pescado, huevos y lácteos fermentados, y disminuyendo el consumo de carnes más grasas y procesadas (Sala-Vila A et al., 2016; Rees K et al., 2019; Salas-Salvadó J et al., 2019; Mirabelli M et al., 2020), pero es el patrón mediterráneo el que además de los beneficios dietéticos, también aporta beneficios psico-conductuales. En la dieta mediterránea se fomentan el consumo de los alimentos acompañado, disfrutando de la acción de “comer”, además el buen clima de esta región promueve la realización de actividades y movimiento, por tanto, son múltiples los efectos positivos que se le asocian (Serra-Majem L et al., 2006).

En cuanto a la intervención en pérdida de peso, dieta mediterránea también ha mostrado su efectividad frente a otras dietas (Razquin C et al., 2009; Estruch R et al., 2018; Salas-Salvadó J et al., 2019), ya que su alta palatabilidad permite su mantenimiento en el tiempo (Murphy KJ et al., 2018). Su fortaleza principal reside en que es una dieta sencilla de seguir y que es agradable para los individuos que la realizan. Se considera una forma de alimentación completa, ya que aporta todos los nutrientes esenciales que se requieren para mantener un estado óptimo de salud (Patterson R et al., 2018; Ge L et al., 2020), y también se reconoce como variada y sostenible, puesto que los alimentos que se consumen, en gran medida, cambian por temporada y estación, ya que su procedencia y/u origen puede variar según ciertos momentos, y se respeta la época de producción permitiendo una buena gestión y uso de los recursos básicos en la producción (Nelson ME et al., 2016; D'Innocenzo S et al., 2019). De esta forma los platos raramente son repetitivos y hay múltiples opciones de consumo dentro de un grupo de alimentos. Además, sus características promueven que sea una dieta que controla en buena forma los índices de glucemia, por lo que se aconseja en perfiles de hiperglucemia y deficiencia en la secreción de insulina (Kelly S et al., 2004; Bulló M et al., 2011; Ros E et al., 2014; Clar C et al., 2017; Jenkins D et al., 2018; Estruch R et al., 2018; Rees K et al., 2019; Salas-Salvadó J et al., 2019). La dieta mediterránea también ha resultado ser exitosa en las intervenciones de pérdida de peso por ser más factible su mantenimiento en el peso respecto a una dieta muy baja o baja en carbohidratos. Reducir drásticamente los hidratos de carbono permite alcanzar pérdidas de peso iniciales rápidas, y son motivadoras para los individuos obesos o con sobrepeso que deciden seguirlas, pero requieren cambios importantes en las elecciones de alimentos habituales, que pueden ser difíciles de mantener, al fin y al cabo, la base de nuestra alimentación y porcentaje principal de macronutrientes es representado por los carbohidratos (Ordovas JM et al., 2018). El metaanálisis llevado a cabo por Ge L et al., que examinaba la pérdida de peso y los cambios en los factores de riesgo cardiovascular después de 6 y 12 meses de seguimiento de diversas dietas populares, identificó que, aunque inicialmente la pérdida de peso media de 2kg (en relación con la dieta habitual) puede parecer trivial, el

mantenimiento de esta pérdida frente a la opción de recuperar el peso perdido, es la que realmente promueve los posibles beneficios en el estado de salud. Por esto, los nuevos tratamientos y estrategias de prevención de sobrepeso y obesidad deben centrarse en la mejor manera de mantener cualquier pérdida de peso lograda (Ordovas JM et al., 2018; Ge L et al., 2020; Truby H et al., 2020) y deben personalizar sus recomendaciones a las necesidades específicas del individuo. Además, conocer características genéticas, tanto genotipos como variaciones en la expresión de ciertos genes, permite hacer aún más individualizadas estas recomendaciones y potenciar los posibles beneficios entre interacciones Gen x Entorno o ambiente (GxE) evidenciadas y conocidas (Ordovas JM et al., 2018; Di Renzo et al., 2019). En nuestro análisis de expresión génica, los participantes que habían perdido más peso en comparación a los que habían perdido menos (-5,06kg vs -0,62kg), mostraron un aumento de la expresión de los genes: CLOCK y PER1, asociados al ritmo circadiano; CAT, al estrés oxidativo; ARRDC3, a la reparación del ADN y DDIT4, con diabetes. En un segundo análisis realizado en nuestra población de estudio, cuya submuestra se seleccionó a partir de los sujetos que habían sido aleatorizados en el grupo de intervención y habían perdido 2kg o más, se realiza el chip de análisis de transcriptoma completo y se detectan cambios destacados en la expresión de los genes EGR2, EGR3, VIM y PPM1B y otros menos relevantes en CLP1, DZIP1L, OR1N1, MIR210 y ARHGEF15. Muchos de estos genes se han visto asociados al estado fisiopatológico de obesidad, lo que puede indicar la necesidad de realizar análisis de mayor profundidad en esta línea de investigación (Goodarzi MO, 2018; Loos RJ, 2018; Ezzaty Mirhashemi M et al., 2021; Yu Y et al., 2022; Kiani AK et al., 2022).

Otros trabajos de investigación en el estudio de la obesidad encuentran asociaciones con otros factores asociados a los ritmos circadianos, horarios a los que duermen y despiertan, franjas horarias en las que se realizan las ingestas de alimentos, e incluso momentos en los que se realiza el ejercicio o la actividad física (Stutz J et al., 2019; Moreno-Reyes P et al., 2020; Barragán R et al., 2021; Panagiotou M et al., 2021; Glavin EE et al., 2021). En nuestra población de estudio, PREDIMED-Plus Valencia, se han realizado múltiples análisis y estudios en relación a estas variables vinculadas al sueño y a la calidad del mismo, así como la identificación del cronotipo de los participantes y las posibles interacciones con otros parámetros presentes. En estos sujetos pudimos determinar que los que eran cronotipo vespertino tenían puntuaciones más elevadas en los cuestionarios de respuesta a síntomas depresivos (BDI), y que estos síntomas con una adherencia elevada a la dieta mediterránea podrían invertirse. Estos resultados coincidían con otros de estudios previos (Fang H et al., 2019; Guan Q et al., 2020; McKinnon AC et al., 2019; Kaur S et al., 2019; Song D et al., 2021). En cuanto estudios de metilación relacionados con el tipo de cronotipo, pudimos analizar nuestra muestra. Evaluando los horarios a los que dormían y duración del sueño. Tras seleccionar

los genes candidato vinculados al reloj biológico central se observaron varias asociaciones estadísticamente significativas entre la metilación de estos genes y la duración del sueño, resultados similares se observaron en estudios previos (Massart R et al., 2014; Arnardottir ES et al., 2014; Trivedi MS et al., 2017; Gaine ME et al., 2018).

Del mismo modo que el conjunto que responde al sueño influye en rasgos cognitivos, algunas concentraciones de metabolitos, parte de nuestros procesos biológicos, se han visto vinculados a la capacidad cognitiva (Traini E et al., 2013; Parnetti L et al., 2001) y distintos resultados en test de cognición (Sheelakumari R et al., 2018; Zhong C et al., 2021), observando en nuestra población de estudio que, los sujetos que presentaban niveles más bajos de colina y derivados, también presentaban puntuaciones más bajas en estos test de evaluación de capacidades cognitivas. Estudios previos han asociado la colina y derivados, así como su uso como suplemento en tratamientos de degeneraciones cognitivas como Alzheimer y Parkinson (Traini E et al., 2013; Parnetti L et al., 2001; Chaudhary S et al., 2021; Han SH et al., 2022; Wang X et al., 2022) y otras comorbilidades (Al-Sulaiti H et al., 2019; Javadi S et al., 2021). Con espectroscopia de RMN también se analizaron en nuestra muestra PREDIMED-Plus Valencia, la medición de GlycA. GlycA se considera un biomarcador de la inflamación sistémica y del riesgo cardiovascular (Conelly MA et al., 2017; Gruppen EG et al., 2019; Ballout RA et al., 2020; Puig-Jové C et al., 2022), y en nuestros participantes los valores de GlycA en suero se asociaron a diversos parámetros relacionados con enfermedad cardiovascular (riesgo de diabetes ($p=0,005$), IMC alto, triglicéridos altos, c-HDL bajos. Se determinó mediante GWAS que genes podían estar implicados a los niveles de GlycA en suero y los SNPs que resultaron significativos se encontraban en genes reconocidos por su asociación a estados de inflamación, por tanto, en nuestra población mediterránea con Síndrome Metabólico también podríamos indicar que GlycA funciona como biomarcador del riesgo cardiovascular (Conelly MA et al., 2017; Gruppen EG et al., 2019; Ballout RA et al., 2020; Puig-Jové C et al., 2022).

Los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) son aminoácidos esenciales implicados en el metabolismo de la glucosa, se encuentran en suero y se estudiaron en nuestra población y una muestra de población más joven (Yang P et al., 2016; Tobias DK et al., 2018; van den Berg EH et al., 2019; Kubacka J et al., 2021; Orozco-Ruiz X et al., 2022). Los resultados mostraron que, así como en personas jóvenes los valores de BCAA se asociaban estrechamente a diversos parámetros de obesidad (IMC ($p=1,7 \times 10^{-7}$), perímetro cintura ($p=4 \times 10^{-6}$), riesgo obesidad (OR:2,34; IC95%1,60-3,42, $p=1 \times 10^{-5}$), en sujetos mayores, pacientes PREDIMED-Plus Valencia las asociaciones con estas variables se atenuaban, sólo se observaban asociaciones pequeñas con algunos BCAA y la circunferencia de la cintura (con isoleucina $p=0,015$, con leucina $p=0,036$). Estos datos indicaban que la edad era relevante para considerar los BCAA como biomarcador de parámetros de

obesidad y diabetes. Diversos estudios han identificado que la modulación de la vía catabólica de BCAA altera los procesos metabólicos clave que afectan la homeostasis de la glucosa (Lynch CJ et al., 2014; Bloomgarden Z et al., 2018; White PJ et al., 2021; Vanweert F et al., 2022; Bragg F et al., 2022). Tras reacciones de transaminación, descarboxilación y desfosforilación de los BCAA se obtienen moléculas de Acetil-CoA y Succinil-CoA que se incorporan en el ciclo tricarboxílico (TCA) produciendo estados de anaplerosis (Vanweert F et al., 2022; Bragg F et al., 2022). En pacientes con resistencia a insulina, los BCAA no se metabolizan eficientemente (las mitocondrias son más deficientes) y se acumulan en el plasma. Esto podría indicar la diferencia entre su valor como indicador en relación a la edad, ya que las mitocondrias también han mostrado su pérdida de funcionalidad a medida que envejecemos y por este motivo los BCAA pueden perder fuerza a la hora de funcionar como indicador de este suceso (Janikiewicz J et al., 2018; Vernier M et al., 2019; Annesley SJ et al., 2019). También se ha observado que la vía mTOR/70S6K es estimulada por la presencia de insulina en exceso y la acumulación de BCAA en plasma, siendo capaces de activar esta vía independientemente de la fosforilación (Zhenyukh O et al., 2018; Bragg F et al., 2022), lo que se asocia a diversos estados de inflamación (Zhou M et al., 2018; Guo FX et al., 2019) que aumentan el riesgo cardiovascular.

Los resultados obtenidos en nuestra muestra de estudio, pacientes mayores de 65 años con obesidad o sobrepeso y síndrome metabólico, indican como las estrategias de pérdida de peso deben tener presente múltiples factores que pueden influir en el éxito y predisposición a su seguimiento y realización. La pérdida de peso mantenida en el tiempo funciona como herramienta de prevención de la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular. En estas premisas residen los objetivos principales que llevaron al diseño y consecución del estudio multicéntrico PREDIMED-Plus, por ello, aunque en nuestro trabajo de Tesis doctoral se muestran los números de eventos sucedidos por año de estudio no discernimos en el tipo de evento (Salas-Salvadó J et al., 2019; Martínez-González MA et al., 2019). El recuento de eventos totales como muestra multicéntrica formará parte de los resultados finales del estudio cuando termine su realización completamente. Pero, aunque para poder ver los resultados de mayor magnitud que derivarán del seguimiento de este estudio debamos esperar algún tiempo, a lo largo de estos años se han podido realizar distintos análisis del cómputo multicéntrico que han identificado algunas de las variables que podían influir en la explicación de los resultados finales. Algunos de las variables que se identificaron en los sujetos de estudio de PREDIMED-Plus a nivel multicéntrico mostraron la relevancia del lugar de residencia, área geográfica, nivel socioeconómico y nivel de estudios (Cano-Ibáñez N et al., 2018; Cano-Ibáñez N et al., 2020). Estos resultados fueron similares a los obtenidos alrededor del mundo, tratando de identificar las causas que incrementan las tasas de obesidad y enfermedad cardiovascular (Pucci G et al.,

2017; Pathirana TI et al., 2018; Blanquet M et al., 2019; Kim Y et al., 2021). El sueño, del mismo modo que en los participantes de nuestro nodo el tipo vespertino se asociaba a parámetros de obesidad, en el análisis de muestra multicéntrico identificó que los pacientes que dormían menos horas mostraban asociaciones con parámetros de sobrepeso, obesidad y diabetes (Rosique-Esteban N et al., 2018). Este mismo perfil de riesgo, de dormir menos tiempo del que se recomienda y presencia de este tipo de parámetros se ha investigado en diversos estudios con trabajadores del turno de noche, cuyo riesgo de aparecer una enfermedad cardiovascular es mayor (Lunde LK et al., 2020; Thosar SS et al., 2018; Gohari A et al., 2021; Boivin DB et al., 2014; Gusmão WDP et al., 2022; Wei R et al., 2022). En la muestra total de pacientes también se realizaron estudios sobre los patrones alimentarios e identificación del tipo de alimentos que se consumían en mayor medida frente a otros, y si existían asociaciones con determinados parámetros bioquímicos en los participantes, así como con otros tipos de variables. Se observó que el consumo de frutas se asociaba a parámetros más reducidos de Síndrome Metabólico, y que el color de las mismas podía influir en la prevención del riesgo cardiovascular y del Síndrome Metabólico (Becerra-Tomás N et al., 2021). El consumo de frutas se ha investigado como una herramienta altamente eficaz en la reducción de aparición de diversas alteraciones en distintos grupos de edad (Esposito K et al., 2004; Giugliano D et al., 2006), no solo adultos o ancianos, en niños se ha determinado que es capaz de disminuir la sintomatología del espectro autista (Dreher ML, 2018) El color de las frutas es la propiedad física que indica la presencia de ciertos componentes fitoquímicos que tienen propiedades beneficiosas para la salud (Chang SK et al., 2019; Mohammed SG et al., 2020). El consumo de bebidas también se evaluó como estudio multicéntrico, determinando la ingesta de agua (Paz-Graniel I et al., 2019) y de café, y en el caso de este último, si existe relación entre el consumo de café (con cafeína) y resolución de tareas cognitivas (Paz-Graniel I et al., 2020).

Del mismo modo que otros trabajos residieron en identificar si el consumo de ciertos alimentos se asociaba a otros valores de interés (productos fermentados (Mena-Sánchez G et al., 2018) y la ingesta dietética de ácido fólico con características de Síndrome Metabólico (Navarrete-Muñoz EM et al., 2020). Tanto los productos fermentados como la suplementación con ácido fólico se ha observado que existen beneficios tras su consumo o pauta de prescripción. El estudio de alimentos fermentados, sobretodo leche y derivados se está investigando en la actualidad, ya que los beneficios que aportan a la microbiota intestinal son múltiples, entre ellos, la disminución del riesgo de aparición de ciertos tipos de cáncer digestivos (Barrubés L et al., 2019) y mejoras en parámetros de Síndrome Metabólico (Mena-Sánchez G et al., 2019), como la hipertensión (Aoyagi Y et al., 2017; Yoo D et al., 2020), la diabetes (Álvarez-Bueno C et al., 2019) y la enfermedad cardiovascular (Fontecha J et al., 2019). El ácido fólico ha mostrado

ser beneficiosos en personas mayores con tratamiento cardiovascular (Tian T et al., 2017), así como degeneraciones cognitivas como el Alzheimer (Ma F et al., 2019; Chen H et al., 2016) y estados como la depresión (Bender A et al., 2016).

En cuanto a los resultados obtenidos como ensayo multicéntrico en pérdida de peso se publicaron los del primer año de la intervención, mostrando que la intervención intensiva en el estilo de vida es efectiva para producir una pérdida de peso clínicamente significativa entre adultos con sobrepeso/obesidad con características de Síndrome Metabólico. La pérdida de peso fue máxima después de 6 meses y se mantuvo a los 12 meses, cuando las mejoras en los factores de riesgo fueron más evidentes, lo que sugiere una fuerte relación entre la magnitud de la pérdida de peso lograda y los cambios en el riesgo cardiovascular. En la mayoría de los estudios de pérdida de peso a largo plazo, la pérdida de peso máxima se logró típicamente a los 6 meses de intervención y, a partir de entonces suele producirse una recuperación de peso (Knowler WC et al., 2009; Wing RR et al., 2013; Franz MJ et al., 2007; Johnston BC et al., 2014). No obstante, en nuestro estudio, la ventaja sobre otros estudios es que no se produce el efecto rebote de recuperación de peso y la tendencia es a que se mantenga en años posteriores como hemos mostrado a los 2 años para los participantes en el nodo de Valencia. Se evidenció un aumento en la adherencia a la puntuación de dieta mediterránea con restricción energética después de 12 meses en ambos grupos, con un aumento neto a favor del grupo de intervención. Además, el aumento en el porcentaje de personas que lograron las metas para cada uno de los 17 ítems de puntuación se evidenciaba a medida que transcurre la intervención del estudio. Estos cambios se explican por un aumento mayor y sostenido del consumo de frutos secos, cereales integrales y pescado junto con una mayor reducción del consumo de cereales refinados, carnes rojas, bollería, bollería y dulces en los participantes adscritos al grupo de intervención en comparación con los del grupo control. Estos datos demuestran el efecto de la intervención aumentando el consumo de alimentos típicos de la dieta mediterránea y disminuyendo el consumo de aquellos propios de un patrón dietético no saludable (carnes rojas y procesadas, refrescos y azúcares refinados). Respecto a la actividad física, en comparación con el control, se observó en el grupo de intervención una disminución significativa en el tiempo dedicado a ver televisión y un mayor aumento en la actividad física en el tiempo libre, y estos cambios fueron más evidentes a los 12 meses. Los resultados indicaron que la proporción de participantes que cumplieron con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud de 2010 de al menos 150 min de actividad física moderada-vigorosa/semana fue máxima a los 12 meses y mayor en el grupo de intervención que en el grupo control. Pero, aunque observamos un efecto de pérdida de peso mantenido en el tiempo, solo se logró una disminución mediana del peso corporal del 3,7 % en el grupo de intervención en comparación con la disminución del 8% que se propuso como objetivo en el diseño

del estudio. Además, solo se observó una diferencia del 3% entre los grupos en la pérdida de peso en comparación con el objetivo del 5%. El modesto efecto de la intervención PREDIMED-Plus sobre el peso corporal y el perímetro de cintura en relación con nuestros objetivos a priori puede explicarse en parte porque nuestra población era envejecida, tenía un bajo nivel educativo (~50% solo tiene nivel de primaria), y el 45 % de los participantes tenía diabetes al inicio del estudio. Todos estos factores han sido reconocidos como predictores de adherencia y eficacia subóptimas de la intervención en ensayos de pérdida de peso (Leung AWY et al., 2014). Sin embargo, una de las fortalezas a considerar es que hubo muy pocos abandonos en comparación con ensayos previos de pérdida de peso, hecho que se observa en los participantes reclutados en el nodo de Valencia (<1% de abandonos). La alta retención en el ensayo proporciona evidencia sólida de la palatabilidad a largo plazo y la sostenibilidad de una dieta mediterránea con restricción energética. Además, la programación de las sesiones individuales y grupales y su asistencia durante el seguimiento también fue mayor que en los ensayos de pérdida de peso anteriores, lo que aumentaba la retención y ayudaba a recuperar la motivación en los casos de participantes en lo que podía verse más reducida la disposición a continuar la intervención del estudio. En PREDIMED-Plus, el grupo de intervención logró una pérdida de peso especialmente a expensas de la grasa corporal total. Los participantes en el grupo de intervención mostraron mejoras en la proporción de masa corporal magra/grasa corporal total, que generalmente se considera una composición corporal más favorable, lo que sugiere que las intervenciones en el estilo de vida para perder peso deben incluir el uso de estrategias de conservación de la masa corporal magra (p. ej., la realización de actividad física) para prevenir o retrasar la sarcopenia al fomentar la producción y mantenimiento de la masa muscular.

Muchos ensayos multicéntricos que persiguen diseñar estrategias efectivas en pérdida de peso, han informado los efectos beneficiosos de perder entre un 5 y un 10% del peso corporal independientemente de la intervención sobre los factores de riesgo cardiovascular asociados con el sobrepeso/la obesidad, incluida la adiposidad abdominal, la presión arterial, los triglicéridos, el colesterol HDL y la resistencia a la insulina (Pi-Sunyer X et al., 2007; Zomer E et al., 2016). Estos estudios también identifican que los beneficios son posibles a partir del mantenimiento de esa pérdida de peso. La pérdida de peso moderada en nuestros participantes tuvo los mismos efectos beneficiosos en estos parámetros a excepción de la presión arterial. Estos hallazgos sugieren que una intervención de estilo de vida de pérdida de peso intensiva basada en una dieta mediterránea con restricción energética y un aumento de actividad física es una estrategia segura para tratar el Síndrome Metabólico y mejorar algunos factores de riesgo cardiovascular asociados, así como la prevención cardiovascular. Las dietas bajas en carbohidratos para perder peso suelen ser ricas en ácidos grasos saturados y colesterol y, por lo

tanto, tienen el efecto no deseado de aumentar el colesterol LDL (Foreyt JP et al., 2009; Mansoor N et al., 2016), un factor de riesgo potente y reconocido para la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Sin embargo, al igual que en otros estudios que utilizaron dietas bajas en grasas (Wing RR et al., 2011) o variaciones de dieta mediterránea (Shai I et al., 2008; Estruch R et al., 2006), en el presente estudio no se observaron efectos nocivos de la pérdida de peso sobre el colesterol LDL. Un efecto beneficioso relevante de la intervención en nuestro estudio se produjo sobre la glucosa en ayunas, los niveles de insulina y la HbA1c, reforzando la hipótesis de que una intervención de ERdieta mediterránea tiene efectos beneficiosos a largo plazo sobre la resistencia a la insulina y el control de la glucosa en personas mayores con sobrepeso y obesidad con alto riesgo de eventos cardiovasculares. En los pacientes con valores en sus analíticas de glucosa elevada, tras la intervención, aunque la pérdida de peso era modesta, resultó suficiente para mejorar el control glucémico y la sensibilidad a la insulina, también promovió mejoras en los niveles de triglicéridos y colesterol HDL. Por tanto, los resultados obtenidos en los análisis anuales de PREDIMED-Plus respaldan los resultados anteriores de otros ensayos multicéntricos (Knowler WC et al., 2009; Wing RR et al., 2011; Wing RR et al., 2013), que confirman el potencial de las intervenciones intensivas de estilo de vida basadas en la pérdida de peso en el control de la diabetes, así como en el retraso o la prevención de la diabetes en aquellas personas en riesgo. Sin embargo, la intervención en nuestro estudio no resultaba suficiente para controlar tanto la glucosa como otra serie de parámetros bioquímicos con dieta y estilo de vida, sino que el tratamiento farmacológico continuaba siendo necesario. Posiblemente en este tipo de casos se requiere que la pérdida de peso sea mayor y sostenida a lo largo del tiempo para poder reducir el uso de medicamentos.

Estos resultados también demostraron efectos beneficiosos de la intervención intensiva sobre algunos parámetros proinflamatorios circulantes relacionados con la obesidad, como la leptina y la IL-18. La leptina es una proteína proinflamatoria producida principalmente por los adipocitos, que refleja el grado de adiposidad y resistencia a la insulina y está implicada en la patogenia de varias de sus principales complicaciones (Correia ML de G et al., 2004). IL-18 es otra citocina proinflamatoria producida por macrófagos y otras células que se ha demostrado que aumenta en la obesidad (Zilverschoon GRC et al. 2008) y disminuye después de la pérdida de peso (Scherthaner GH et al., 2006). La reducción de leptina e IL-18 tras el año de intervención puede explicarse por la pérdida de peso, y por los efectos derivados de la mayor adherencia a la dieta mediterránea y el aumento de la realización de actividad física. La intervención también se asoció con concentraciones reducidas de MCP-1, una de las proteínas clave que regulan la inflamación a través de la migración y la infiltración de monocitos/macrófagos (Kanda H et al., 2006). Esta proteína se observa elevada en las personas con obesidad y diabetes y se detecta su reducción ante la pérdida de

peso (Scherthaner GH et al., 2006). Dado que los niveles altos de MCP-1 e IL-18 también están implicados en el desarrollo de la aterosclerosis (Scherthaner GH et al., 2006; Gerszten RE et al., 1999), su reducción sostenida en el tiempo podría estar asociada con una disminución de los eventos cardiovasculares.

Al obtener esta serie de resultados en la consecución del estudio PREDIMED-Plus durante el primer año, se hipotetiza que el mantenimiento de la pérdida de peso a largo plazo en respuesta al programa de estilo de vida PREDIMED-Plus podría proporcionar el mismo beneficio o incluso mayor en términos de eventos cardiovasculares duros.

Pero los resultados de la primera anualidad se publicaron algún tiempo antes que ocurriera la situación excepcional de confinamiento causada por la pandemia del virus SARS-CoV-2, o como es conocido, COVID-19, que hacía peligrar la hipótesis de alcanzar estos objetivos de pérdida de peso y el éxito en su mantenimiento (Paz-Graniel I et al., 2023). Por esta razón, a partir del primer estado de confinamiento instaurado por el Gobierno español se decidió tomar información a los participantes sobre distintas variables relacionadas de un modo u otro con las nuevas pautas marcadas por la situación de pandemia, de esta manera podía identificarse el efecto del confinamiento y de las restricciones sociales en relación a la prestación de las intervenciones en el estudio PREDIMED-Plus y el seguimiento de los participantes, así como su asistencia, ya que muchos de los nodos visitaban a los pacientes en sus respectivos centros de salud. Para mitigar estos efectos se diseñaron estrategias que fueron evaluadas en su efectividad, y gracias a esto, a pesar de las estrictas órdenes de confinamiento impuestas en nuestro país, la intervención no se interrumpió en ningún momento de la pandemia (Paz-Graniel I et al., 2023). Y aunque desde marzo de 2020 se aplicaban en España medidas ininterrumpidas contra el COVID-19, el grado de restricciones sanitarias, bloqueos y toques de queda ha ido variando a lo largo del tiempo en el territorio español, difiriendo de unas comunidades autónomas a otras, hecho que también indujo que se unificaran las estrategias de mitigación de este efecto. Las diferencias en la severidad de las restricciones y en los recursos humanos y económicos ayudaron en la determinación de los métodos y herramientas utilizados de los brindados en cada centro durante el confinamiento. Estas condiciones han afectado el trabajo de campo de PREDIMED-Plus, por lo que hubo que modificar los métodos de administración de la intervención, pero la pronta respuesta de los investigadores del estudio permitió que el ensayo continuara. Aunque el trabajo de campo cara a cara se vio sustancialmente afectado, se realizó asesoramiento nutricional y de actividad física individual en todos los centros de reclutamiento a través de enfoques alternativos, cosa que permitió el mantenimiento de los objetivos y de consecución del ensayo de manera multicéntrica. El uso de la tecnología para la entrega remota de asesoramiento individual sobre nutrición y recomendaciones de actividad física permitió que el personal del estudio llegara a

una gran proporción de participantes. El uso de medios electrónicos, ha sido previamente reportado como una alternativa adecuada para la promoción nutricional y de actividad física y la recolección de datos (Singh JA et al., 2020; Orkin AM et al., 2021; FDA, 2020), en adultos españoles (Mignogna C et al., 2020), y la estrategia preferida por los participantes de mayor edad (Fitzgibbon M et al., 2021).

En cuanto a los objetivos de pérdida de peso, cuando empezó el confinamiento, los participantes se encontraban en fase de mantenimiento del adelgazamiento, pero pudo identificarse que tanto el peso corporal, la circunferencia de la cintura, la adherencia a ERdieta mediterránea, la actividad física en el tiempo libre y el tiempo sedentario mostraban variaciones entre los períodos de confinamiento. Sin embargo, los ligeros aumentos en las medidas de adiposidad observados fueron clínicamente irrelevantes. Además, tras el confinamiento, ambos indicadores antropométricos disminuyeron. Se ha informado que la pandemia y el confinamiento afectaron las conductas alimentarias de muchas personas (Mignogna C et al., 2020). Curiosamente, los cambios en la dieta durante la pandemia fueron beneficiosos en los participantes del estudio PREDIMED-Plus, ya que se observó un aumento en la adherencia a la intervención prevista con dieta mediterránea con restricción energética. Esto puede explicarse por: (a) el asesoramiento continuo recibido por los participantes sobre comportamientos alimentarios saludables, (b) los mensajes que se les proporcionan sobre el posible efecto protector de una dieta saludable y la pérdida de peso frente a las complicaciones de la COVID-19, y (c) el cierre temporal de cafeterías, bares y restaurantes y prohibición de encuentros sociales. Sin embargo, también se ha reportado un aumento en el consumo de ciertos grupos de alimentos “poco saludables” (Ammar A et al., 2020) o alcohol (Vanderbruggen N et al., 2020), y un aumento en la prevalencia de conductas alimentarias como picoteo o consumo excesivo de alimentos ultraprocesados (Mignogna C et al., 2020, Papandreou C et al., 2020; Bonaccio M et al., 2022). La actividad física fue otro de los indicadores más estudiado en el tiempo de confinamiento, ya que durante el primer trimestre de confinamiento severo los deportes al aire libre estaban prohibidos y los pacientes no podían salir a realizar su pauta de actividad física. Durante la fase de transición, justo después del confinamiento inicial, se observó un aumento del número de personas, más de lo habitual, en las calles realizando actividad física. Esta observación está en línea con resultados previos de otros estudios (Ruggiero E et al., 2021). Además, la mitad de los participantes de PREDIMED-Plus estaban recibiendo un programa de promoción de actividad física y consejos para aumentar el ejercicio en sus hogares, razón por la que cuando pudieron salir al exterior, estaban motivados y aumentaron esta actividad física. Aun así, también hay que señalar que tras el confinamiento observamos una disminución de la intensidad de la actividad física en el tiempo libre. Esto podría explicarse en parte por la renuncia de los participantes a realizar actividad física de manera grupal en interiores o

exteriores. Estos resultados mostraron que, aunque las visitas remotas y la intervención tienen limitaciones, cuando se aplicaban en el estudio PREDIMED-Plus demostraban ser factibles y útiles en gran medida para retener a los participantes de la investigación y mantener el ensayo en curso en un entorno impredecible (Paz-Graniel I et al., 2023).

Dentro del estudio PREDIMED-Plus se desarrolló un subproyecto, PREDIMED-Plus Cognition, que a su vez formaba parte del conjunto de ensayos que forman parte del estudio E2bN. La doctoranda eligió este subproyecto para realizar su estancia internacional en el laboratorio del Dr. Alejandro Arias en Holanda. El Dr. Arias es el coordinador del proyecto E2bN en Europa. Además de la estancia que se realizó en dos años consecutivos, posteriormente se ha seguido colaborando en diversos artículos tal como se indica. Los objetivos de E2bN residen en asociar aspectos de la cognición, conducta y comportamiento con la forma en la que nos alimentamos y consumimos alimentos. Resultados que se describen en el trabajo presentado por Soldevila-Domenech N et al., donde se evaluaron los perfiles cognitivos que estaban asociados con el objetivo de lograr una pérdida de peso de al menos un 8% y estudiar el impacto de la reducción de peso en la cognición de los participantes. Entre los resultados destacó que solo un tercio de los participantes del grupo de intervención logró la meta de reducción de peso después de 1 y 3 años de seguimiento. Las mayores probabilidades de alcanzar la meta de reducción de peso del 8% se encontraba entre las personas con un mejor desempeño en la memoria verbal, el tiempo de reacción y las habilidades de toma de decisiones al inicio del estudio. Al mantenimiento de los efectos de la intervención, eran las personas que mostraban una mayor praxis y atención visoconstructiva y una menor impulsividad. También se observó que varias habilidades cognitivas mejoraban después de 1 y 3 años de seguimiento en la población general, incluida la memoria verbal y visuoespacial a corto y largo plazo, la atención selectiva y sostenida, la inhibición y la praxis visoconstructiva. Las mejoras cognitivas presentaron diferencias interindividuales y por adherencia a la dieta mediterránea, género, edad y diagnóstico de diabetes. También encontramos evidencia de cambios correlacionados entre la cognición y algunos resultados de la intervención; específicamente, las asociaciones de mayores mejoras en la cognición con mayores reducciones en el IMC y mayores mejoras en presión arterial y en las puntuaciones de cuestionarios de calidad de vida (SF36). Estos resultados coinciden con los ensayos que muestran como reducciones moderadas de peso mejoran además de múltiples factores metabólicos, como la presión arterial, la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina, el perfil de lípidos, el estrés oxidativo y la inflamación, también tienen un impacto positivo en la salud mental y la calidad de vida (Ryan DH et al., 2017; Veronese N et al., 2017). En los tratamientos de intervención dietética es plausible detectar que la capacidad de adherirse a un estilo de vida saludable y lograr el mantenimiento de la pérdida de

peso se ve influenciada por factores psicológicos y cognitivos (Varkevisser RDM et al., 2019). Los pacientes que muestran capacidad de autorregulación, capacidad de dirigir la atención y el comportamiento de manera autónoma, son los que suelen lograr el mantenimiento de los objetivos a largo plazo. En cambio, algunos trabajos han mostrado que las personas con sobrepeso u obesidad pueden presentar algunas alteraciones cognitivas que pueden interferir en el seguimiento de las intervenciones en el estilo de vida. De hecho, los hallazgos más consistentes están relacionados con medidas de funciones ejecutivas, incluyendo alteraciones en la flexibilidad cognitiva, impulsividad/inhibición, sesgo atencional, toma de decisiones o memoria de trabajo (Fagundo AB et al., 2012; Valls-Pedret C et al., 2015), velocidad psicomotora y atención compleja (Cheke LG et al., 2017; Sellbom KS et al., 2012). Como tal, el rendimiento cognitivo podría influir en las habilidades necesarias para mantener un estilo de vida saludable, pero se necesita más investigación para identificar los predictores cognitivos claves del mantenimiento de la pérdida de peso. Estudios como PREDIMED-Plus resultan beneficiosos en su realización en este sentido para los participantes del grupo de intervención, puesto que existe evidencia que indica que la adherencia a patrones dietéticos saludables específicos como la dieta mediterránea (Veronese N et al., 2017; Okubo H et al., 2017; Siervo M et al., 2011) y la realización de actividad física (Daimiel L et al., 2020; Xu L et al., 2011), se han asociado con tasas más lentas de deterioro cognitivo, reducción del riesgo de la demencia y mejoras en algunas funciones cognitivas. Además, la pérdida de peso se ha asociado con mejoras en el funcionamiento ejecutivo/atención y la memoria (Siervo M et al., 2011). Es más, la adherencia a la intervención con dieta mediterránea mostró resultados de efectos neuroprotectores superiores a los obtenidos con el tratamiento de Metformina en personas diabéticas con síndrome metabólico y sobrepeso u obesidad (Soldevila-Domenech N et al., 2021).

Además de las habilidades cognitivas, en el subproyecto PREDIMED-Plus Cognition también se evaluaban rasgos de la personalidad y patrones de comportamiento (Gómez-Martínez C et al., 2022), el análisis longitudinal de los resultados de los distintos años en los participantes identificó que la impulsividad se asociaba negativamente con varias puntuaciones de dieta saludable y se relacionó positivamente con la adherencia a un patrón dietético poco saludable, concretamente se asociaba positivamente con mayores aumentos en la adherencia a un estilo de dieta occidental a lo largo del tiempo, un patrón alimentario típico relacionado con un mayor riesgo de enfermedades crónicas (Uribarri J et al., 2010; Lumley J et al., 2016; Gómez-Martínez C et al., 2022). Y aunque no hay muchos estudios que hayan investigado si existe relación entre los patrones dietéticos y la impulsividad, los resultados de los que sí se han publicado son similares a los obtenidos en nuestra población de estudio (Benard M et al., 2019). Los participantes con mayor impulsividad tienden a seguir fácilmente una dieta que

incluye una menor adherencia al consumo de grupos de alimentos saludables (como cereales integrales, frutas, verduras, pescado, frutos secos y legumbres) y una mayor adherencia al consumo de alimentos no saludables (como granos refinados, comidas rápidas, carnes rojas y procesadas, mantequillas, bebidas azucaradas, dulces y postres) con el tiempo. Estos se explicaban recordando los rasgos que definen la impulsividad, que se caracteriza por una tendencia a actuar precipitadamente bajo emociones positivas o negativas, falta de perseverancia y premeditación, y la búsqueda de experiencias y sentimientos (Moeller FG et al., 2001; Lynam DR et al., 2006). Estos atributos pueden predisponer a los sujetos a tener mayores dificultades para seguir un patrón dietético saludable que podría percibirse como menos apetecible o presentar restricciones a los grupos de alimentos que socialmente son más placenteros y se consumen comúnmente. Además, la impulsividad se ha relacionado con el sistema de recompensa y la adicción a la comida (Maxwell AL et al., 2020; Loxton NJ, 2018), y se ha sugerido que los alimentos sabrosos afectan el sistema de recompensa de la misma manera que otros tipos de adicciones como el alcoholismo o el abuso de drogas (Fletcher PC et al., 2018). Por lo tanto, el rasgo de impulsividad puede ser un factor de riesgo de enfermedades de salud a través de la toma de decisiones relacionadas con el consumo de alimentos (Gómez-Martínez C et al., 2022) de los participantes.

En el subproyecto Cognition, compartiendo objetivos con el estudio E2bN, se iniciaron los análisis de muestras fecales como parte del estudio de la microbiota intestinal y de las posibles interacciones existentes entre el modo en el que nos comportamos, la dieta y el estilo de vida y los microorganismos que lo conforman. Las primeras investigaciones han mostrado evidencia de un impacto considerable de alimentación, y, por consiguiente, de la nutrición en comportamientos como la impulsividad y la compulsividad. Por lo tanto, se trabaja en conocer cómo los componentes de la dieta (incluidos el contenido de azúcar, grasas y proteínas, los suplementos vitamínicos y minerales, los aditivos alimentarios y los probióticos) y los factores del estilo de vida (incluido el ejercicio) influyen en la salud general, la función cerebral y el comportamiento de las personas. De esta forma, identificando los impulsos asociados al modo de alimentarnos y las variaciones en el estilo de vida que podrían prevenir los efectos nocivos vinculados a rasgos como la impulsividad y la compulsividad, así como el tipo de microorganismos que habitan en nuestro intestino y promueven efectos metabólicos, podríamos comprender la relación del eje intestino-cerebro (Wang HX et al., 2016). En los participantes del estudio PREDIMED-Plus Cognition se recogieron y analizaron muestras fecales de los participantes de los distintos nodos que accedieron a participar y firmaron, por consiguiente, el respectivo consentimiento informado (Muralidharan J et al., 2021).

Estos resultados se publicaron recientemente por Muralidharan J et al., en los que se informó sobre el efecto de una gran intervención de pérdida de peso basada en el estilo de vida a largo plazo con dieta mediterránea con restricción dietética y aumento de la actividad física en la microbiota intestinal. Se observaron varios cambios en la abundancia relativa de géneros dentro y entre los participantes del grupo de intervención que pueden atribuirse a la pérdida de peso, la dieta y la actividad física. Los cambios observados en el perfil de la microbiota intestinal también se asociaron con cambios en algunos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Los cambios significativos en la abundancia relativa de miembros pertenecientes al filo Firmicutes (disminuyendo: *Butyricoccus*, *Ruminiclostridium* 5 y *E. hallii*; aumentando: *Ruminococcaceae* NK4A214, *Coprobacter*) y el aumento significativo en la B/F en el grupo de intervención en comparación con el grupo control, puede explicarse en parte por la mayor pérdida de peso en el grupo de intervención en comparación con el grupo control. Aunque ampliamente debatido, se ha informado que, durante la pérdida de peso, el B/F aumenta, lo que sugiere que puede responder a la restricción energética (Crovesy L et al., 2020; Remely M et al., 2015; Fragiadakis GK et al., 2020). También se ha informado un aumento en B/F con una mayor adherencia a dieta mediterránea, así como una baja ingesta de proteínas animales (García-Mantrana I et al., 2018). Otros resultados del estudio de adherencia a dieta mediterránea anterior (García-Mantrana I et al., 2018), que indican un aumento en la abundancia relativa de *Dorea*, *Roseburia* y *Coproccoccus* (todos informados como productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de la familia Lachnospiraceae), también coincidieron con nuestros resultados solo en el grupo control. Sin embargo, en el grupo de intervención observamos que estos taxones se reducen en 1 año de intervención. En consecuencia, también observamos una disminución en las vías de fermentación predichas en el grupo de intervención en comparación con el grupo control. Aunque la reducción en estos productores de AGCC que utilizan carbohidratos/fibras podría indicar hallazgos contradictorios, algunos estudios han observado un aumento en la producción intestinal de AGCC en personas obesas en comparación con individuos de peso normal (Teixeira TF et al., 2012; Rahat-Rozenbloom S et al., 2014). Queda por dilucidar si este aumento en los productores de AGCC puede ser una de las causas o consecuencias de la obesidad. Las capacidades de obtención de alta energía de las bacterias que utilizan carbohidratos/polisacáridos podrían crear un exceso de energía neta para el huésped, lo que contribuiría a la obesidad. Sin embargo, los AGCC, especialmente el butirato y sus productores, se han asociado bien con varios efectos beneficiosos para la salud (Sanna S et al., 2019); por lo tanto, se requiere una evaluación cuidadosa de su composición y cantidad para inferir más. Y si bien hubo reducciones en ciertos productores de AGCC en el grupo de intervención, observamos dentro del mismo grupo un aumento selectivo en otros productores de SCFA (Louis P et al., 2017) como el grupo *Lachnospiraceae*

NK4A136 y *Ruminococcaceae* (UCG-003, UCG-002), que también fueron asociado positivamente con la puntuación del cuestionario de adherencia a dieta mediterránea (Muralidharan J et al., 2021). También observamos que algunos géneros productores de AGCC (*Lachnospira*, grupo *Lachnospiraceae* NK4A136 y *Alistipes*) cambiaron en la misma dirección dentro de ambos grupos de intervención, lo que refleja en general el efecto de dieta mediterránea en la microbiota intestinal. Los aumentos de proteínas, polifenoles y grasas insaturadas han mostrado actividades inhibitoras de ciertos géneros bacterianos (Zhao J et al., 2019; Duda-Chodak A et al., 2012; Wolters M et al., 2019). Paralelamente, en el grupo de intervención, los participantes consumieron más proteínas, polifenoles y grasas insaturadas en comparación con los del grupo control, lo que posiblemente condujo a un enriquecimiento selectivo en ciertos productores de AGCC en comparación con otros que podrían inhibirse por una sinergia de los componentes mencionados. Se ha demostrado en un estudio con ratones que la restricción calórica podría limitar las enzimas butirogénicas y promover las enzimas propiogénicas, lo que podría conducir a la competencia y al crecimiento selectivo de los productores de AGCC (Tanca A et al., 2018; De Filippis F et al., 2016). Los cambios en *Coprococcus* 3 se asociaron positivamente con cambios en el peso, el colesterol total y los triglicéridos y negativamente con el colesterol HDL en la población general. De acuerdo con nuestros resultados, el enriquecimiento del género *Coprococcus* se ha asociado con un alto perfil de riesgo de enfermedad cardiovascular a lo largo de la vida en los participantes del estudio Bogalusa Heart, así como con el fenotipo obeso (Castaner O et al., 2018). No solo *Coprococcus*, sino también otros géneros pertenecientes principalmente a la familia *Lachnospiraceae* (*Blautia*, *Dorea*, *Roseburia*, *Coprococcus* 3) y *Ruminococcus* 1 se observaron cambiando en direcciones opuestas en el grupo de intervención y el grupo control. Observamos una asociación positiva para cambios en la abundancia relativa de *Coprococcus* 3 y *Dorea* con cambios en el peso de manera significativa en la población general y no significativa en ambos grupos de intervención, de acuerdo con un estudio sueco (Ottoosson F et al., 2018). Este estudio también informó una asociación positiva de estos géneros con los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en plasma, que generalmente se ven aumentados en la diabetes y Síndrome Metabólico (Floegel A et al., 2013; Würtz P et al., 2012) y sirve de indicador de riesgo cardiovascular (Vanweert F et al., 2022). Se realizaron observaciones similares en la cohorte METSIM (METabolic Syndrome In Men), en la que *Blautia* se asoció con un IMC más alto y también con una mayor cantidad de BCAA circulantes, mientras que la abundancia del grupo *Chistensenellaceae* R-7 se asoció negativamente con los BCAA (Org E et al., 2017). De la misma forma, se encontró una asociación negativa en el grupo *Chistensenellaceae* R-7 con cambios en el peso, IMC, triglicéridos y glucosa plasmática. Otros estudios demostraron que la dieta mediterránea enriquecida con aceite de oliva virgen extra reduce las concentraciones circulantes de BCAA y se asocia con un menor riesgo

de diabetes (Ruiz-Canela M et al., 2018). Teniendo en cuenta estos hallazgos, sospechamos que los BCAA son una de las vías para la regulación de la glucosa en el intestino grueso a través de la pérdida de peso asociada con dieta mediterránea y los cambios correspondientes en la microbiota intestinal (Newgard CB et al., 2009; Karusheva Y et al., 2019). Estos resultados también podrían indicar que, incluso siguiendo el mismo patrón dietético, factores como la restricción energética y la actividad física podrían desempeñar un papel beneficioso adicional en las personas con sobrepeso/obesidad al alterar la regulación de la glucosa a través de los BCAA (Pedersen HK et al., 2016). En el grupo de intervención, también observaron cambios en algunas bacterias previamente asociadas con ácidos biliares, como *Lachnoclostridium* (que contiene miembros con capacidad de deshidroxilación de 7 α) y *Bilophila* (desconjugador de taurina-ácido biliar), que han demostrado controlar el metabolismo de los lípidos y la glucosa en estudios en ratones (Li F et al., 2013; Parseus A et al., 2017). Del mismo modo que se identificó una asociación positiva (no significativa) entre *Lachnoclostridium* y la glucosa, lo que indica que la restricción calórica junto con un aumento en la actividad física podría modular las bacterias relacionadas con la bilis (Cerdá B et al., 2016). La adherencia a la dieta mediterránea también ha mostrado su interacción con el microbioma tras analizar la asociación entre variantes genéticas relacionadas con microbiomas relevantes (Mi-RSNP) y los valores de glucosa en ayunas y presencia de diabetes (Asensio EM et al., 2022). Las funciones metagenómicas difieren entre adultos con diferente peso corporal y estado de salud. Las bacterias adaptan sus funciones a la restricción energética aumentando las vías de biosíntesis, especialmente la biosíntesis de carbohidratos y nucleótidos. En los participantes analizados, a medida que aumentaba la ingesta de proteínas y grasas en el grupo de intervención, se detectaba una disminución en la biosíntesis de aminoácidos y lípidos, lo que indica una adaptación a la dieta. Estos resultados son de especial interés ya que se ha informado que la restricción calórica podría alterar la microbiota intestinal y su funcionalidad independientemente de un régimen dietético (Fabbiano S et al., 2018; Wu J et al., 2016).

Y a excepción de algunos estudios destacados que han observado el efecto en intervenciones dietéticas (Ghosh TS et al., 2020; Heianza Y et al., 2018), en el estudio PREDIMED-Plus Cognition se exploró el efecto de una intervención de estilo de vida saludable en la microbiota intestinal en una población de muestra comparativamente grande y seguida en el tiempo (García-Mantrana I et al., 2018; De Filippis F et al., 2016; Haro C et al., 2016). Las diferencias significativas observadas entre los grupos de participantes en todos los componentes de la intervención (pérdida de peso, adherencia a dieta mediterránea y actividad física) en la dirección esperada, permitió probar los efectos potenciales de la intervención en la microbiota intestinal para una población mediterránea con Síndrome Metabólico y sobrepeso/obesidad. Pero aunque este trabajo identifica que, incluso con patrones dietéticos saludables similares, la adición de un programa de

intervención con restricción calórica y fomento de la actividad física podría tener un efecto beneficioso en los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular potencialmente modulados a través de la microbiota intestinal, todavía existe bastante desconocimiento en la taxonomía de las bacterias a nivel especie para poder inferir correctamente en las vías metabólicas que pueden verse alteradas y en el conocimiento de los metabolitos residuales.

El exponencial crecimiento de la metagenómica y de los estudios de análisis de información genética de bacterias que forman parte de nuestro sistema digestivo ha permitido ampliar el conocimiento en términos de microbiota intestinal y su relación con distintas patologías. Y puesto que nuestra adaptación llega al punto que incluso la biosíntesis de algunas vitaminas depende del metabolismo de estas bacterias en nuestro organismo, la necesidad de conocer la posible interacción con las distintas funciones podría permitir la mejora de tratamientos y sintomatologías. Cada día se publican nuevos resultados sobre la influencia de la microbiota intestinal, fundamentalmente bacteriana, en diferentes fenotipos de enfermedades cardiometabólicas, así como otras enfermedades (Shi X et al., 2022; Rahman MM et al., 2022; Liu CF et al., 2022; Huang R, 2022; Scheithauer TPM et al., 2020; Tokarek J et al., 2021; Jian C et al., 2022; Amabebe E et al., 2020; Verhaar BJH et al., 2022; Connell E et al., 2022; Zhang B et al., 2022; Hashimoto K, 2022; Knuesel T et al., 2021; Chadchan SB et al., 2022; Aghamajidi A et al., 2022; Gubatan J et al., 2022; Yan Q et al., 2022), la colitis ulcerosa y la artritis reumatoide (Kurilshikov A et al., 2021), por ejemplo, se han vinculado al microbioma, así como diversas alteraciones y enfermedades cognitivas como el TDAH (Dam SA et al., 2019), esquizofrenia (Samochowiec J et al., 2021; McGuinness AJ et al., 2022), espectro autista (Ristori MV et al., 2019; Fattorusso A et al., 2019) entre otras (Nikolova VL et al., 2021). Y en todas ellas, los estudios realizados recientemente han sugerido un papel importante del eje intestino-cerebro (GBA) y la microbiota intestinal en la modulación del riesgo de las mismas (Cryan JF et al., 2019; Mörl S et al., 2020).

El trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) es un trastorno común del neurodesarrollo caracterizado por falta de atención, impulsividad e hiperactividad. Es una de las alteraciones o trastornos cognitivos estudiados dentro del estudio E2bN, permitiendo dilucidar los efectos beneficiosos posibles, así como control en los episodios de peor sintomatología. La etiología del TDAH es multifactorial, con un enfoque principal en los factores genéticos, aunque investigaciones emergentes muestran la participación de cambios y desequilibrios en la microbiota intestinal (Bundgaard-Nielsen C et al., 2020; Kalenik A et al., 2021), así como otros identifican el tipo de dieta o patrón alimentario en esta posible interacción y efecto en los tipos de síntomas (Konikowska K et al., 2012; Pelsser LM et al., 2017; Cenit MC et al., 2017).

Durante las estancias realizadas en el centro de investigación Radboud UMC, lugar especializado en el estudio y análisis de diversos trastornos cognitivos, donde tratan de descifrar los puntos de la etiología y fisiopatología de la enfermedad que aún no se conocen del todo. Los estudios en animales, así como en humanos, haciendo uso de tecnologías de alto rendimiento como escáneres cerebrales y RMN para determinar las diferencias entre los pacientes que presentan esta serie de características y los individuos sanos. Junto el grupo de investigación del Dr. Arias Vásquez, IP del estudio E2bN, aprendimos y estudiamos parte de estos trastornos y como realizar su investigación, ya que en el estudio PREDIMED-Plus, como parte de E2bN, se atienden distintos cuestionarios que responden aspectos cognitivos y rasgos de comportamiento y personalidad de los participantes y su posible interacción con el tipo de alimentación que realizan o patrón dietético siguen en mayor forma. Pudimos observar que, a pesar de las diferencias en los síntomas conductuales centrales entre algunos de estos trastornos, muchos de ellos se superponen con otros, indicando que podría existir una etiología compartida. Por ejemplo, en el caso del espectro autista (TEA) y TDAH, existen indicios de esta superposición. De hecho, la investigación indica que estos trastornos son altamente comórbidos (Thapar A et al., 2016; Frazier JA et al., 2001; Holtmann M et al., 2007; Hattori J et al., 2016; Simonoff E et al., 2016; Pelsser LM et al., 2010). Los estudios genéticos han brindado información al mostrar una etiología genética común en ambos trastornos (Rommelse NNJ et al., 2010; Lichtenstein P et al., 2010). Aunque la etiología del TEA y el TDAH sigue siendo en gran parte desconocida, se cree que una interacción compleja de factores genéticos y ambientales contribuye al desarrollo de ambas (Thapar A et al., 2016; Mandy W et al., 2016; Sandin S et al., 2014). Y dentro de este conjunto de factores ambientales encontramos como uno de los más relevantes, la dieta (Bale TL et al., 2010). La nutrición tiene un impacto en el neurodesarrollo, la cognición y el comportamiento y, por lo tanto, podría desempeñar un papel importante en los trastornos del neurodesarrollo (Bellisle, F, 2004; Dauncey MJ et al., 2009; Goyal MS et al., 2015). Las intervenciones dietéticas que se han sometido a ensayos clínicos incluyen varias formas de dietas de eliminación e intervenciones de suplementación (Stevenson J et al., 2014; Sonuga-Barke EJS et al., 2013; Elder J et al., 2015; Bozzatello P et al., 2016). Las dietas de eliminación vienen en diferentes formas y varían en su rigor y en los alimentos que se eliminan. Curiosamente, las formas de dietas de eliminación que se están investigando difieren entre el TEA y el TDAH. En el TEA, se ha investigado principalmente la dieta sin gluten y/o sin caseína (GFCF), mientras que, en el TDAH, los ensayos clínicos examinaron los efectos de las dietas de exclusión de aditivos alimentarios y las dietas oligoantígenas (Ly V et al., 2017). Y tal como se ha mencionado anteriormente, el microbioma intestinal participa en la regulación del apetito, la utilización de energía, la digestión y la absorción de nutrientes (Yatsunencko T et al., 2012;

Sonnenburg JL et al., 2005), además, desempeña un papel al influir en la función inmunitaria, el metabolismo de los fármacos y la protección contra patógenos (Olszak T et al., 2012; Candela M et al., 2008; Fukuda S et al., 2011). La alteración de la composición del microbioma o disbiosis se ha asociado con las enfermedades inflamatorias del intestino, el cáncer, la obesidad, el síndrome metabólico y trastornos neurológicos (Dicksveld J et al., 2008; Frank DN et al., 2007; Lupton JR, 2004; Louis P et al., 2014; Ley RE et al., 2006; Turnbaugh PJ et al., 2016; Zhang C et al., 2009; Gonzalez A et al., 2011). La evidencia actual de estudios en animales muestra de manera convincente que la composición del microbioma tiene un impacto (co-)determinando el estado de ánimo, la respuesta al estrés y varios aspectos del comportamiento (Mayer EA, 2011; Neufeld KM et al., 2011; Neufeld KM et al., 2011; Bercik P et al., 2016). Por tanto, la dieta es un determinante importante de la composición y el funcionamiento de la microbiota intestinal que está fuertemente relacionado con las respuestas psicopatológicas (Sharma S et al., 2013; Li W et al., 2009; Bruce-Keller AJ et al., 2015), sugiriendo que existe un vínculo entre la dieta, la composición del microbioma intestinal y los trastornos mentales. Los efectos del microbioma sobre la función, el comportamiento y las enfermedades del cerebro pueden estar mediados por diferentes vías del llamado eje microbioma-intestino-cerebro, que involucra mecanismos neurales, metabólicos, inmunológicos y endocrinos (Mayer EA, 2011; Borre YE et al., 2014; Diaz-Heijtz RD et al., 2011; Rogers GB et al., 2016).

Los últimos trabajos han identificado al menos tres vías que parecen vincular el microbioma intestinal con la función cerebral. La primera vía indica una conexión directa entre el cerebro y el sistema intestinal a través del nervio vago, un nervio principal del sistema nervioso parasimpático. El microbioma podría influir en la función cerebral mediante la inervación del nervio vago. El nervio vago diferencia entre bacterias no patógenas y patógenas y media señales que pueden inducir efectos ansiogénicos y ansiolíticos dependiendo del estímulo, implicando mecanismos inmunomoduladores (Forsyth P et al., 2014). En la segunda vía, el microbioma podría influir en la función cerebral a través de interacciones con el sistema inmunitario (Severance EG et al., 2016; Bailey MT et al., 2011). Las especies bacterianas afectan al sistema inmunitario a través de la producción de metabolitos inmunorreguladores, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Furusawa Y et al., 2013; Smith PM et al., 2013; Donohoe DR et al., 2016). Las alteraciones en la regulación de los productos o metabolitos bacterianos neuroactivos pueden alterar la expresión génica, influir en el sistema inmunitario e interactuar con las células nerviosas al estimular el sistema nervioso simpático (MacFabe DF, 2015; Kimura I et al., 2011; Nøhr MK et al., 2013). En tercer lugar, la composición del microbioma podría influir en los niveles de neurotransmisores y, por lo tanto, en los procesos del cerebro. Por ejemplo, las cepas bacterianas pueden influir en la síntesis y la liberación de serotonina, neurotransmisor que desempeña un papel importante en las regulaciones gastrointestinales y

neuroconductuales (Desbonnet L et al., 2016; O'Mahony SM et al., 2015; Yano JM et al., 2015). Estas tres vías parecen dar respuestas a la conexión microbioma-intestino-cerebro. El desarrollo de las mismas ocurre temprano, y aunque la colonización del intestino por las bacterias se completa entorno a los tres años de edad, se inicia tras el nacimiento (Grenham S et al., 2011; Palmer C et al., 2007; Mackie RI et al., 1999). El hecho de que la colonización completa se da en las primeras edades de la infancia ha permitido establecer paralelismos entre el desarrollo del microbioma y el del sistema nervioso central, lo que sugiere que algunos problemas en el neurodesarrollo podrían estar relacionadas con la colonización del microbioma (Borre YE et al., 2014; Rogers GB et al., 2016).

En personas con TEA, se ha demostrado una composición alterada de la microbiota intestinal (Adams JB et al., 2011; Finegold SM et al., 2002; Song Y et al., 2004; Kang DW et al., 2013; Williams BL et al., 2011), han encontrado que los grupos de bacterias *Clostridium* o *Desulfovibrio* están en mayor cantidad en niños con molestias gastrointestinales en comparación con niños con molestias gastrointestinales similares pero con un desarrollo neuroconductual típico (Song Y et al., 2004; Finegold SM et al., 2010; Parracho HMRT et al., 2005). En TDAH falta evidencia directa para caracterizar la modificación que se ha podido producir en la conexión microbioma-intestino-cerebro, se han descrito aumentos en el género *Bifidobacterium*, pudiendo contribuir a los síntomas del TDAH (Verlaet AAJ et al., 2014; Borre YE et al., 2014) pero son necesarios más estudios que permitan identificar todas las colonias y géneros de bacterias que pueden modular la fisiopatología de la enfermedad o trastorno cognitivo.

En el TDAH destaca uno de sus rasgos principales en el comportamiento, que es la impulsividad. Entre los resultados indicados en este trabajo de Tesis doctoral, se ha comentado anteriormente, que los sujetos más impulsivos son los que muestran peor adherencia a patrones alimentarios saludables como es el seguimiento de la dieta mediterránea, y más fácilmente se adhieren a patrones poco saludables, como el consumo de alimentos más dulces, más grasos, con índices de glucemia elevados y con sabores potenciados. Por ello, durante la realización de la estancia en el centro de investigación Radboud UMC, ubicado en Nijmegen, Países Bajos, pudimos investigar en nuestra muestra de pacientes PREDIMED-Plus Valencia, si existía interacción de SNPs de genes identificados en TDAH y algunas de las características de nuestros participantes, así como con variables de estudio únicas de nuestro grupo, como los datos de percepción de sabores y preferencia de alimentos.

Para ello hicimos uso de los datos publicados recientemente por Demontis D et al., del metanálisis de GWAS de TDAH que permite el uso de los genes referenciados como genes candidato en el estudio de este trastorno cognitivo (Demontis D et al., 2019). Gracias a la realización de este GWAS a gran escala del

TDAH se identificaron los primeros loci de riesgo significativos en todo el genoma, específicamente, aquellos que representan un papel importante para las variantes comunes en la arquitectura poligénica del TDAH. Para ello, se realizó el metanálisis de GWAS de 12 cohortes de estudios, contando con la información genética de 55.374 participantes. Varios de los loci identificados están ubicados en/o cerca de genes que implican procesos de desarrollo neurológico que probablemente sean relevantes para el TDAH, como FOXP2, SORCS3 y DUSP6. Pero este trabajo también detectó fuertes asociaciones en cada locus, especialmente el locus líder en el cromosoma 1, que se complica por el amplio LD y la heterogeneidad sustancial entre el metanálisis principal del TDAH y el análisis del estado del TDAH autoinformado. De esta forma, fueron 12 los loci más destacados, pero solo capturaban una parte de la variante común del riesgo de TDAH. Los OR para el alelo de riesgo creciente en los SNP en los 12 loci significativos son modestos, oscilando entre 1,077 y 1,198. Estos valores están dentro del rango de tamaños del efecto para variantes genéticas comunes que se ha observado para otros trastornos psiquiátricos poligénicos, como la esquizofrenia (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Una proporción considerablemente mayor de la heredabilidad del TDAH puede explicarse por todas las variantes comunes ($h^2_{\text{SNP}}=0,22$, $DE=0,01$), del mismo modo sucede con otros trastornos como también en esquizofrenia ($h^2_{\text{SNP}}=0.23-0.26$) (The Brainstorm Consortium, 2018; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013). Como cabría suponer para un trastorno psiquiátrico, estos efectos se enriquecen en regiones conservadas y regiones que contienen potenciadores y promotores de la expresión en tejidos del sistema nervioso central, en consonancia con observaciones previas en otros estudios (Finucane HK et al., 2015).

Junto con la poligenicidad, la selección y las presiones evolutivas podrían ser una característica importante de la arquitectura de la genética del TDAH. Se determinaron algunos aspectos curiosos del TDAH como que las variantes de riesgo están fuertemente enriquecidas en las regiones genómicas conservadas en los mamíferos (Lindblad-Toh K et al., 2011), y los genes restringidos que conservan su función están asociados con el TDAH (Lek M et al., 2016). También se encontró que la variante común del riesgo de TDAH está genéticamente correlacionada con tener hijos más jóvenes y tener más hijos, en consonancia con los hallazgos epidemiológicos de un mayor comportamiento sexual de riesgo (Flory K et al., 2006; Marsh LE et al., 2012; Hosain GM et al., 2012) y un mayor riesgo de TDAH en niños nacidos de padres jóvenes (Chudal R et al., 2015; Chang Z et al., 2014; Østergaard SD et al., 2017). El TDAH se asocia a su vez a calificaciones escolares y nivel educativo más bajos, estas correlaciones también se encuentran a su vez en niños cuyos padres tienen un nivel escolar más bajo. El GWAS también mostraba una correlación genética positiva del TDAH con el trastorno depresivo mayor y los síntomas depresivos respaldando hallazgos previos

que sugieren una superposición genética positiva entre esos fenotipos (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013; The Brainstorm Consortium, 2018; Bulik-Sullivan B et al., 2015). Las correlaciones genéticas positivas entre el TDAH y los comportamientos de riesgo para la salud, como fumar y la obesidad, son consistentes con el aumento observado en esos comportamientos entre las personas con TDAH (Lee SS et al., 2011; Halfon N et al., 2013; Chen AY et al., 2010; Cortese S et al., 2016) y son indicativos de una base genética compartida para estos rasgos. En nuestra muestra de pacientes analizados PREDIMED-Plus Valencia, cuyo genotipado se realizó al inicio de nuestro estudio con el chip de GWAS de Genotyping Illumina Array Human OmniExpress, que son pacientes con sobrepeso u obesidad y Síndrome Metabólico, y la gran mayoría de ellos presentan hiperglucemia o han sido diagnosticados de diabetes, se observaron si estos 12 loci identificados en el GWAS de TDAH resultaban significativos ante algunas variables posibles de nuestra población mediterránea con riesgo cardiovascular. Y aunque en nuestra población solo se encontró 1 SNP y 5 proxies con respaldo LD, se observó que los portadores del alelo de menor frecuencia con el gen FOXP2 se asociaban con una prevalencia menor de diabetes ($p=0,024$). Para el IMC y TDAH se identificaron dos SNPs, uno intergénico ($p=0,057$) y otro en el gen DUSP6 ($p=0,077$), ubicados en el cromosoma 12, que se asociaban significativamente con aumentos del IMC. Los portadores del alelo menos frecuente se asocian a valores de IMC más elevados. Los resultados más destacados los obtuvimos con la información que poseemos de los pacientes en percepción de sabores. En el análisis de asociación entre SNPs de TDAH y la percepción del sabor dulce, identificamos que un SNP en el gen SORCS3 se asocia con la menor percepción de este sabor. Los portadores del alelo de menor frecuencia muestran una percepción más reducida (o puntuaciones de evaluación de la percepción más bajas) que los portadores del alelo frecuente ($\beta=-0,26$; $p=0,016$). Estos resultados cobran relevancia cuando observamos distintos estudios realizados en trastornos de la conducta, tanto TDAH como esquizofrenia (Mitchell AJ et al., 2011; McWhinney SR et al., 2022), autismo (Bădescu GM et al., 2016; Hill AP et al., 2015), trastorno bipolar (Miola A et al., 2022; Beyer JL et al., 2015; Liu YK et al., 2022), depresión (Milaneschi Y et al., 2018; Luppino FS et al., 2010; Jantarantotai N et al., 2016), etc. Todos ellos con construcción poligénica que explica los múltiples factores que influyen en la construcción de la arquitectura de la enfermedad y en la variabilidad de la sintomatología, entre pacientes y a lo largo de la vida de un mismo paciente (Martin J et al., 2014; Schweren LJS et al., 2021).

En otros trabajos de investigación recientes se han observado correlaciones genéticas positivas tanto en el TDAH como con otros trastornos de los mencionados con los problemas de sueño y el insomnio (Owens JA, 2009), pero esta relación no parece generalizarse con todos los fenotipos relacionados con el sueño ni en todos los trastornos en el mismo tiempo. Aunque estas correlaciones

genéticas no muestran resultados generalizados en todos los entornos sí que indican que hay diversas variantes ejerciendo un efecto sumatorio y que construyen el perfil de fenotipos del trastorno. El riesgo poligénico de TDAH se ha asociado en otros ensayos aleatorizados previos con una variación de los rasgos de falta de atención e hiperactividad/impulsividad por debajo de los umbrales clínicos en la población general (Martin J et al., 2014). En anorexia nerviosa se han observado que diversos rasgos del comportamiento, como disminución de capacidades de autorregulación e impulsividad, se asocian a variantes de riesgo genético similares a TDAH y otros trastornos que influyen en el comportamiento alimentario. Esto promueve las líneas de investigación que tratan de identificar estas variantes de riesgo genético asociadas a comportamientos precipitados e impulsividad en la elección del consumo de alimentos, que permitirían diseñar estrategias personalizadas para evitar a lo largo del tiempo los comportamientos de riesgo (Cortese S et al., 2013; Ortal S et al., 2015).

Aunque la investigación sobre el Síndrome metabólico ha crecido exponencialmente en las últimas décadas, muchos aspectos de esta entidad clínica aún no se comprenden por completo, y muchas preguntas siguen sin respuesta hasta la fecha, por lo que se debe seguir incentivando la realización de investigación en este tipo de pacientes con riesgo cardiovascular (Yanai H et al., 2021; Hill MA et al., 2021; Fahed G et al., 2022). Además, el hecho de ser una población mediterránea en la que no se han realizado muchas investigaciones ómicas en comparación con otros países de Europa o de América del Norte, aumenta la necesidad de seguir trabajando en el diseño y consecución de estudios de análisis con métodos ómicos que permitan caracterizar adecuadamente esta población para aportar de manera válida unas recomendaciones más personalizadas y adaptadas a sus características. Además, el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral tiene una importante continuación en futuras investigaciones tanto con mayor incorporación de ómicas como con la generación de nuevos resultados de seguimiento y de fenotipos finales suponiendo una gran oportunidad en salud de precisión y en la incorporación de la perspectiva de género.

6

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. La valoración de la factibilidad de la realización, en personas de edad avanzada con síndrome metabólico y sobrepeso/obesidad, de un ensayo randomizado de intervención intensiva con dieta mediterránea reducida en energía y promoción de la actividad física con apoyo conductual en comparación con un grupo control sin intervención intensiva con dieta mediterránea hipocalórica ni promoción de la actividad física en el nodo de Valencia, ha sido muy buena. El intenso esfuerzo en el reclutamiento ha permitido conseguir una gran participación, obteniendo el segundo lugar en el número de pacientes aleatorizados de los 23 nodos integrantes del ensayo multicéntrico. Igualmente, la participación en las visitas de seguimiento anuales en el estudio ha sido muy buena y han funcionado las estrategias de intervención para cada uno de los grupos de acuerdo con el protocolo, así como la cumplimentación de cuestionarios, la obtención de muestras biológica y de otras medidas realizadas en el estudio de manera longitudinal. El análisis de los cambios de adherencia en la dieta mediterránea restringida en energía con el instrumento protocolizado para ello (la escala de 17 puntos) mostró una mayor puntuación en el grupo de intervención intensiva que en el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas en el período de seguimiento. Del mismo modo la medición de la actividad física con el cuestionario validado también mostró una mayor realización de actividad física total en el grupo de intervención intensiva que en el grupo control, alcanzando diferencias significativas en cada tiempo de seguimiento analizado, contribuyendo al incremento de la factibilidad del ensayo clínico randomizado en nuestro nodo.
2. La intervención intensiva con dieta mediterránea restringida en energía y con aumento de la promoción de la actividad física en el grupo de intervención, en comparación con el grupo control en el nodo de Valencia, ha resultado en diferencias estadísticamente significativas en el aporte de

energía total de la dieta consumida por ambos grupos medida a través de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos. Esta disminución del aporte de energía por la dieta en el grupo de intervención intensiva se ha constatado de manera rápida en la visita de 6 meses, manteniéndose en general, con alguna pequeña reducción en los años posteriores. La disminución de la ingesta calórica junto con el incremento de la actividad física se ha asociado también a una disminución del peso corporal en el seguimiento. En la visita de los 6 meses es cuando se produce la disminución más rápida de peso entre el grupo de intervención intensiva y el grupo control, manteniéndose las diferencias estadísticamente significativas de peso entre ambos grupos a lo largo del seguimiento anual estudiado. Igualmente se han detectado disminuciones en el perímetro de la cintura e índice de masa corporal. Aunque la pérdida de peso en los participantes en nuestro nodo ha sido inferior a la teórica esperada (observación que tenido lugar de manera similar en otros nodos) estos cambios en los parámetros antropométricos se han asociado de manera favorable a disminuciones de factores de riesgo cardiovascular en el estudio piloto multicéntrico al año de intervención destacando las disminuciones en la glucemia, en las concentraciones plasmáticas de lípidos (descensos de triglicéridos y aumentos de c-HDL significativos), y en mejoras significativas ($p < 0,05$) en otros marcadores metabólicos de riesgo como leptina, interleukina-18 y en las concentraciones de proteína quimiotáctica de monocitos-1 ($p < 0,05$).

3. El análisis de otros factores menos estudiados en los ensayos clínicos nutricionales nos ha permitido caracterizar el perfil de percepción del sabor en los participantes en el nodo de Valencia y constatar que existen asociaciones importantes entre la intensidad de percepción de los distintos sabores (dulce, salado, amargo, ácido y umami) y parámetros de adiposidad basales, difiriendo entre ellos. Es más, la creación de la denominada “total taste score” como indicador de percepción global del sabor nos ha permitido conocer que tiene una fuerte asociación inversa con la adiposidad ($p < 0,001$). El estudio de las preferencias por sabores y por alimentos se asocia más con perfiles de dieta y de prevalencia de diabetes. Adicionalmente, los metabolitos seleccionados determinados basalmente como las concentraciones séricas de aminoácidos ramificados y las concentraciones de GlycA se asocian significativamente con parámetros de riesgo cardiovascular clásicos y constituyen indicadores potentes para seguir siendo analizados longitudinalmente. El cronotipo y parámetros de sueño son también variables relevantes que se asocian con varios fenotipos intermedios de relevancia para el ensayo clínico. Igualmente, las variables cognitivas y rasgos de personalidad como la impulsividad, han presentado

asociaciones significativas junto con otros nodos, destacando que una mayor impulsividad se asociaba con un patrón alimentario menos saludable y menor disminución en parámetros de riesgo cardiometabólico.

4. La realización de GWAS para investigar la influencia de los marcadores genómicos en la percepción de los 5 sabores en los participantes del nodo de Valencia, ha permitido confirmar la fuerte influencia genética en la capacidad de percibir el sabor amargo, detectando como más significativos a nivel de GWAS ($p < 5 \times 10^{-8}$) varios polimorfismos en el gen TAS2R38. Para los demás sabores, la influencia genética es menor fuerte no superando ningún SNP el valor de GWAS de significación estadística. Sin embargo, varios SNPs han alcanzado niveles sugestivos de significación estadística ($p < 1 \times 10^{-5}$), que necesitan replicación en estudios posteriores. Entre ellos queremos destacar por su novedad un SNP (rs6592657) en el gen LRRC32 asociado con la puntuación total de percepción del sabor. En los GWAS para detectar variantes genéticas asociadas con las preferencias por los distintos sabores, los resultados más relevantes los hemos obtenido con el sabor dulce. Para este sabor, hemos identificado varios SNP en el gen PTPNR2 (rs2091718, entre ellos), superando la significación estadística a nivel de GWAS. Es la primera vez que se describe dicho gen asociado con preferencia de sabor y nuestros análisis post-GWAS de posible funcionalidad (alta expresión en cerebro, consistencia entre distintas aproximaciones de análisis), indican que se trata de un buen candidato para seguir siendo analizado y valorar su influencia en los fenotipos del estudio a largo plazo. Otros GWAS realizados con fenotipos intermedios en esta población han identificado asociaciones significativas como los SNPs asociados con la bilirrubina. Sin embargo, en el estudio piloto para explorar genes asociados con pérdida de peso, se requiere más poder estadístico a nivel de GWAS.
5. Hemos detectado una importante influencia de factores del exposoma en la metilación del ADN de los participantes del nodo de Valencia, por lo que es interesante profundizar en el análisis de marcadores epigenómicos en futuros estudios. Concretamente, hemos encontrado una asociación muy potente entre el estado de fumador y la metilación del ADN, caracterizando la huella metilómica de exposición al tabaco (fumadores, exfumadores y nunca fumadores) en esta población mediante EWAS, identificando de 46 CpG diferencialmente metiladas a nivel de significación estadística de EWAS. La asociación más fuerte se observó con el lugar cg21566642 ($p = 2,2 \times 10^{-32}$) en el cromosoma 2. Además, hemos descrito por primera vez que una mayor adherencia a la dieta mediterránea puede contrarrestar la hipometilación de los principales lugares CpG asociados con el consumo

de tabaco. Igualmente, pero con menor significación estadística hemos encontrado lugares CpG diferencialmente metilados según el lugar de nacimiento rural/urbano de la población y según perfiles de variables relacionadas con diabetes. En el análisis de cambios de metilación al año en una submuestra del grupo de intervención intensiva, hemos detectado diferencias importantes en el porcentaje de metilación de CpGs específicas que necesitan confirmación con mayor tamaño de muestra.

6. En los análisis de expresión génica hemos observado que la intervención intensiva con dieta mediterránea reducida en energía e incremento de la actividad física resulta en cambios significativos ($p < 0,05$) en la expresión genes específicos seleccionados (PER1, CLOCK, CAT, DDIT4 y ARRDC3). Además, en un análisis piloto de transcriptoma de genoma completo pudimos observar que la intervención intensiva con dieta mediterránea y actividad física tras un año mostraba cambios significativos en varios genes relacionados con la adiposidad, diabetes y metabolismo. Entre ellos los más significativos fueron EGR2, VIM, EGR3 y PPM1B.
7. La pandemia de COVID-19 que tuvo lugar durante las visitas de seguimiento de este ensayo clínico tuvo un impacto al inicio del confinamiento ya que no se pudieron llevar a cabo las intervenciones y visitas de seguimiento en nuestro nodo tal como estaba previsto. Sin embargo, a nivel general en el estudio PREDIMED-Plus, se propusieron medidas de contingencia para realizar las intervenciones online y otras alternativas exitosas que han podido mitigar el impacto de la pandemia. Todo ello se ha presentado con detalle en un artículo recientemente publicado incluyendo todos los nodos. Tras superar la pandemia, se ha podido continuar sin incidencia el ensayo clínico y seguir recogiendo eventos, a los que además de los primarios y secundarios reportados inicialmente en el protocolo, se ha incluido la declaración de eventos COVID-19.
8. Los análisis realizados para la consecución de cada uno de los objetivos específicos han puesto de manifiesto la importancia de realizar una integración de los conocimientos derivados de cada uno ellos, sí como como el gran interés de seguir integrando datos ómicos (genómicos, epigenómicos, metabolómicos, transcriptómicos y metagenómicos), no sólo de manera basal sino también en el seguimiento con estrategias computacionales de mayor complejidad, tanto para los fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular como para los eventos finales (cuando finalice en ensayo clínico y se puedan analizar). Completar estos análisis en un mayor tamaño de muestra e integrar la perspectiva de género con la ayuda de un

proyecto financiado de reciente concesión, nos permitirá generar nuevos resultados para una mejor prevención cardiometabólica en la futura salud de precisión.

7

BIBLIOGRAFÍA

En este Capítulo se han incluido todas las referencias utilizadas en esta Tesis según el orden alfabético:

Abderrahmani A, Yengo L, Caiazzo R, Canouil M, Cauchi S, Raverdy V, Plaisance V, Pawlowski V, Lobbens S, Mailet J, Rolland L, Boutry R, Queniat G, Kwapich M, Tenenbaum M, Bricambert J, Saussenthaler S, Anthony E, Jha P, Derop J, Sand O, Rabearivelo I, Leloire A, Pigeyre M, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chaloin S, Dayeh T, Lassailly G, Mathurin P, Staels B, Auwerx J, Schürmann A, Postic C, Schafmayer C, Hampe J, Bonnefond A, Pattou F, Froguel P. Increased Hepatic PDGF-AA Signaling Mediates Liver Insulin Resistance in Obesity-Associated Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2018 Jul;67(7):1310-1321. doi: 10.2337/db17-1539.

Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*. 2011 Mar 16;11:22. doi: 10.1186/1471-230X-11-22.

Adams RC, Sedgmond J, Maizey L, Chambers CD, Lawrence NS. Food Addiction: Implications for the Diagnosis and Treatment of Overeating. *Nutrients*. 2019 Sep 4;11(9):2086. doi: 10.3390/nu11092086.

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 2006 Jun;17(3):238-46. doi: 10.1097/01.mol.0000226115.97436.c0.

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jul;28(7):1225-36. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.160192.

Aggarwal A., Rehm C.D., Monsivais P., Drewnowski A. Importance of taste, nutrition, cost and convenience in relation to diet quality: Evidence of nutrition resilience among US adults using National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007–2010. *Prev. Med.* 2016;90:184–192. doi: 10.1016/j.ypmed.2016.06.030.

Agha G, Mendelson MM, Ward-Caviness CK, Joehanes R, Huan T, Gondalia R, Salfati E, Brody JA, Fiorito G, Bressler J, Chen BH, Ligthart S, Guarnera S, Colicino E, Just AC, Wahl S, Gieger C, Vandiver AR, Tanaka T, Hernandez DG, Pilling LC, Singleton AB, Sacerdote C, Krogh V, Panico S, Tumino R, Li Y, Zhang G, Stewart JD, Floyd JS, Wiggins KL, Rotter JJ, Multhaup M, Bakulski K, Horvath S, Tsao PS, Absher DM, Vokonas P, Hirschhorn J, Fallin MD, Liu C, Bandinelli S, Boerwinkle E, Dehghan A, Schwartz JD, Psaty BM, Feinberg AP, Hou L, Ferrucci L, Sotoodehnia N, Matullo G, Peters A, Fornage M, Assimes TL, Whitsel EA, Levy D, Baccarelli AA. Blood Leukocyte DNA Methylation Predicts Risk of Future Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2019 Aug 20;140(8):645-657. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039357. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31424985; PMCID: PMC6812683. Aghamajidi A, Maleki Vareki S. The Effect of the Gut Microbiota on Systemic and Anti-

Tumor Immunity and Response to Systemic Therapy against Cancer. *Cancers* (Basel). 2022 Jul 22;14(15):3563. doi: 10.3390/cancers14153563.

Aguilera CM, Gil-Campos M, Cañete R, Gil A. Alterations in plasma and tissue lipids associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(3):183-193. doi:10.1042/CS20070115

Ahmad T, Lee IM, Paré G, Chasman DI, Rose L, Ridker PM, Mora S. Lifestyle interaction with fat mass and obesity-associated (FTO) genotype and risk of obesity in apparently healthy U.S. women. *Diabetes Care*. 2011 Mar;34(3):675-80. doi: 10.2337/dc10-0948.

Ahmed SAH, Ansari SA, Mensah-Brown EPK, Emerald BS. The role of DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Clin Epigenetics*. 2020 Jul 11;12(1):104. doi: 10.1186/s13148-020-00896-4.

Akbartabartoori M, Lean ME, Hankey CR. The associations between current recommendation for physical activity and cardiovascular risks associated with obesity. *Eur J Clin Nutr*. 2008 Jan;62(1):1-9. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602693. Akoumianakis I, Antoniadis C. Impaired Vascular Redox Signaling in the Vascular Complications of Obesity and Diabetes Mellitus. *Antioxid. Redox Signal*. 2019;30:333-353. doi: 10.1089/ars.2017.7421.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640-5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006 May;23(5):469-80. Review.

AlJohani AM, Syed DN, Ntambi JM. Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 Dec;28(12):831-842. doi: 10.1016/j.tem.2017.10.003.

Allen CG, Lenert L, Hunt K, Jackson A, Levin E, Clinton C, Clark JT, Garrison K, Gallegos S, Wager K, He W, Sterba K, Ramos PS, Melvin C, Ford M, Catchpole K, McMahon L, Judge DP. Lessons Learned from the Pilot Phase of a Population-Wide Genomic Screening Program: Building the Base to Reach a Diverse Cohort of 100,000 Participants. *J Pers Med*. 2022 Jul 27;12(8):1228. doi: 10.3390/jpm12081228.

Allum F, Grundberg E. Capturing functional epigenomes for insight into metabolic diseases. *Mol Metab*. 2020 Aug;38:100936. doi: 10.1016/j.molmet.2019.12.016.

Al-Sulaiti H, Diboun I, Agha MV, Mohamed FFS, Atkin S, Dömling AS, Elrayess MA, Mazloun NA. Metabolic signature of obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes. *J Transl Med*. 2019 Oct 22;17(1):348. doi: 10.1186/s12967-019-2096-8.

Alvarez-Bueno C, Cervero-Redondo I, Martinez-Vizcaino V, Sotos-Prieto M, Ruiz JR, Gil A. Effects of Milk and Dairy Product Consumption on Type 2 Diabetes: Overview of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Adv Nutr*. 2019 May 1;10(suppl_2):S154-S163. doi: 10.1093/advances/nmy107.

Amabebe E, Robert FO, Agbalalah T, Orubu ESF. Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *Br J Nutr*. 2020 May 28;123(10):1127-1137. doi: 10.1017/S0007114520000380.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37 Suppl 1:S14-80. doi: 10.2337/dc14-S014.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, (4th ed., text revision). Washington, DC. 2000:85-93.

Ammar A, Brach M, Trabelsi K, Chtourou H, Boukhris O, Masmoudi L, Bouaziz B, Bentlage E, How D, Ahmed M, Müller P, Müller N, Aloui A, Hammouda O, Paineiras-Domingos LL, Braakman-Jansen A, Wrede C, Bastoni S, Pernambuco CS, Mataruna L, Taheri M, Irandoust K, Khacharem A, Bragazzi NL, Chamari K, Glenn JM, Bott NT, Gargouri F, Chaari L, Batatia H, Ali GM, Abdelkarim O, Jarraya M, Abed KE, Souissi N, Van Gemert-Pijnen L, Riemann BL, Riemann L, Moalla W, Gómez-Raja J, Epstein M, Sanderman R, Schulz SV, Jerg A, Al-Horani R, Mansi T, Jmail M, Barbosa F, Ferreira-Santos F, Šimunič B, Pišot R, Gaggioli A, Bailey SJ, Steinacker JM, Driss T, Hoekelmann A. Effects of COVID-19 Home Confinement on Eating Behaviour and Physical Activity: Results of the ECLB-COVID19 International Online Survey. *Nutrients*. 2020 May 28;12(6):1583. doi: 10.3390/nu12061583.

Ancellin R. Bénéfices de l'activité physique pour les patients atteints de cancer [Benefits of physical activity for cancer patients]. *Rev Prat*. 2019 Apr;69(4):438-443.

Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torekov SS, Wegner L, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Rasmussen SS, Clausen JO, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen L, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes*. 2008 Jan;57(1):95-101. doi: 10.2337/db07-0910.

Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 2019 Jul 5;8(7):680. doi: 10.3390/cells8070680.

Aoyagi Y, Park S, Matsubara S, Honda Y, Amamoto R, Kushiro A, Miyazaki K, Shephard RJ. Habitual intake of fermented milk products containing *Lactobacillus casei* strain Shirota and a reduced risk of hypertension in older people. *Benef Microbes*. 2017 Feb 7;8(1):23-29. doi: 10.3920/BM2016.0135.

Aranceta-Bartolina J, Partearroyo T, López-Sobaler AM, Ortega RM, Varela-Moreiras G, Serra-Majem L, Pérez-Rodrigo C; Collaborative Group for the Dietary Guidelines for the Spanish Population (SENC). Updating the Food-Based Dietary Guidelines for the Spanish Population: The Spanish Society of Community Nutrition (SENC) Proposal. *Nutrients*. 2019 Nov 5;11(11):2675. doi: 10.3390/nu11112675.

Archero F, Ricotti R, Solito A, Carrera D, Civello F, Di Bella R, Bellone S, Prodam F. Adherence to the Mediterranean Diet among School Children and Adolescents Living in Northern Italy and Unhealthy Food Behaviors Associated to Overweight. *Nutrients*. 2018 Sep 18;10(9):1322. doi: 10.3390/nu10091322.

Arnardottir ES, Nikonova EV, Shockley KR, Podtelezhnikov AA, Anafi RC, Tanis KQ, Maislin G, Stone DJ, Renger JJ, Winrow CJ, Pack AI. Blood-gene expression reveals reduced circadian rhythmicity in individuals resistant to sleep deprivation. *Sleep*. 2014 Oct 1;37(10):1589-600. doi: 10.5665/sleep.4064.

Aschard H, Chen J, Cornelis MC, Chibnik LB, Karlson EW, Kraft P. Inclusion of gene-gene and gene-environment interactions unlikely to dramatically improve risk prediction for complex diseases. *Am J Hum Genet*. 2012 Jun 8;90(6):962-72. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.04.017. Epub 2012 May 24. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2012 Jun 8;90(6):1116.

Asensio EM, Ortega-Azorín C, Barragán R, Alvarez-Sala A, Sorlí JV, Pascual EC, Fernández-Carrión R, Villamil LV, Corella D, Coltell O. Association between Microbiome-Related Human Genetic Variants and Fasting Plasma Glucose in a High-Cardiovascular-Risk Mediterranean Population. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Sep 7;58(9):1238. doi: 10.3390/medicina58091238.

Ashley, E.A. Towards Precision Medicine. *Nat Rev Genet* 2016, 17, 507–522, doi:10.1038/nrg.2016.86.

Assmann G, Nofer JR, Schulte H. Cardiovascular risk assessment in metabolic syndrome: view from PROCAM. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004 Jun;33(2):377-92, table of contents. doi: 10.1016/j.ecl.2004.03.017.

Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 1996 Jul;124 Suppl:S11-20. doi: 10.1016/0021-9150(96)05852-2.

Atzeni A, Galié S, Muralidharan J, Babio N, Tinahones FJ, Vioque J, Corella D, Castañer O, Vidal J, Moreno-Indias I, Torres-Collado L, Fernández-Carrión R, Fitó M, Olbeya R, Martínez-González MA, Bulló M, Salas-Salvado J. Gut Microbiota Profile and Changes in Body Weight in Elderly Subjects with Overweight/Obesity and Metabolic Syndrome. *Microorganisms.* 2021 Feb 10;9(2):346. doi: 10.3390/microorganisms9020346.

Avery CL, He Q, North KE, Ambite JL, Boerwinkle E, Fornage M, Hindorff LA, Kooperberg C, Meigs JB, Pankow JS, Pendergrass SA, Psaty BM, Ritchie MD, Rotter JI, Taylor KD, Wilkens LR, Heiss G, Lin DY. A phenomics-based strategy identifies loci on APOC1, BRAP, and PLCG1 associated with metabolic syndrome phenotype domains. *PLoS Genet.* 2011 Oct;7(10):e1002322. doi: 10.1371/journal.pgen.1002322.

Awamleh Z, Butcher DT, Hanley A, Retnakaran R, Haertle L, Haaf T, Hamilton J, Weksberg R. Exposure to Gestational Diabetes Mellitus (GDM) alters DNA methylation in placenta and fetal cord blood. *Diabetes Res Clin Pract.* 2021 Apr;174:108690. doi: 10.1016/j.diabres.2021.108690.

Bachmanov AA, Bosak NP, Floriano WB, Inoue M, Li X, Lin C, Murovets VO, Reed DR, Zolotarev VA, Beauchamp GK. Genetics of sweet taste preferences. *Flavour Fragr J* 2011, 26, 286–294. 10.1002/ffj.2074.

Bachmanov AA, Bosak NP, Lin C, Matsumoto I, Ohmoto M, Reed DR, Nelson TM. Genetics of taste receptors. *Curr Pharm Des* 2014, 20, 2669–2683. 10.2174/13816128113199990566.

Bachmanov AA, Inoue M, Ji H, Murata Y, Tordoff MG, Beauchamp GK. Glutamate taste and appetite in laboratory mice: physiologic and genetic analyses. *Am J Clin Nutr.* 2009 Sep;90(3):756S-763S. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462L.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 2;101(44):15718-23. doi: 10.1073/pnas.0407076101.

Bădescu GM, Filfan M, Sandu RE, Surugiu R, Ciobanu O, Popa-Wagner A. Molecular mechanisms underlying neurodevelopmental disorders, ADHD and autism. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(2):361-6.

Baglietto L, Ponzi E, Haycock P, Hodge A, Bianca Assumma M, Jung CH, Chung J, Fasanelli F, Guida F, Campanella G, Chadeau-Hyam M, Grankvist K, Johansson M, Ala U, Provero P, Wong EM, Joo J, English DR, Kazmi N, Lund E, Faltus C, Kaaks R, Risch A, Barrdahl M, Sandanger TM, Southey MC, Giles GG, Johansson M, Vineis P, Polidoro S, Relton CL, Severi G. DNA methylation changes measured in pre-diagnostic peripheral blood samples are associated with smoking and lung cancer risk. *Int J Cancer.* 2017 Jan 1;140(1):50-61. doi: 10.1002/ijc.30431.

Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet.* 2005 Oct 8;366(9493):1267-78. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67394-1.

Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun*. 2011 Mar;25(3):397-407. doi: 10.1016/j.bbi.2010.10.023.

Bale TL, Baram TZ, Brown AS, Goldstein JM, Insel TR, McCarthy MM, Nemeroff CB, Reyes TM, Simerly RB, Susser ES, Nestler EJ. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry*. 2010 Aug 15;68(4):314-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.05.028.

Ballout RA, Remaley AT. GlycA: A New Biomarker for Systemic Inflammation and Cardiovascular Disease (CVD) Risk Assessment. *J Lab Precis Med*. 2020 Apr;5:17. doi: 10.21037/jlpm.2020.03.03.

Bamba V. Update on screening, etiology, and treatment of dyslipidemia in children. *JCEM*. 2014;99:3093–3102. doi: 10.1210/jc.2013-3860.

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011 Mar;21(3):381-95. doi: 10.1038/cr.2011.22.

Bansal A, Li C, Xin F, Duemler A, Li W, Rashid C, Bartolomei MS, Simmons RA. Transgenerational effects of maternal bisphenol: a exposure on offspring metabolic health. *J Dev Orig Health Dis*. 2019 Apr;10(2):164-175. doi: 10.1017/S2040174418000764.

Barandouzi ZA, Starkweather AR, Henderson WA, Gyamfi A, Cong XS. Altered Composition of Gut Microbiota in Depression: A Systematic Review. *Front Psychiatry*. 2020 Jun 10;11:541. doi: 10.3389/fpsy.2020.00541.

Baratta F, Pastori D, Polimeni L, Bucci T, Ceci F, Calabrese C, Ernesti I, Pannitteri G, Violi F, Angelico F, Del Ben M. Adherence to Mediterranean Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effect on Insulin Resistance. *Am J Gastroenterol*. 2017 Dec;112(12):1832-1839. doi: 10.1038/ajg.2017.371.

Barcelona V, Huang Y, Brown K, Liu J, Zhao W, Yu M, Kardias SLR, Smith JA, Taylor JY, Sun YV. Novel DNA Methylation Sites Associated with Cigarette Smoking among African Americans. *Epigenetics* 2019, 14, 383–391, doi:10.1080/15592294.2019.1588683.

Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology*. 2000 Jan 15;53(2):555-74. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00258-7.

Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med*. 2018 Jan;32(1):9-25. doi: 10.1111/jvim.14875

Barouki R, Audouze K, Coumoul X, Demenais F, Gauguier D. Integration of the Human Exposome with the Human Genome Advance Medicine. *Biochimie* 2018, 152, 155–158, doi:10.1016/j.biochi.2018.06.023.

Barragán R, Coltell O, Portolés O, Asensio EM, Sorlí JV, Ortega-Azorín C, González JI, Sáiz C, Fernández-Carrión R, Ordovas JM, Corella D. Bitter, Sweet, Salty, Sour and Umami Taste Perception Decreases with Age: Sex-Specific Analysis, Modulation by Genetic Variants and Taste-Preference Associations in 18 to 80 Year-Old Subjects. *Nutrients*. 2018 Oct 18;10(10):1539. doi: 10.3390/nu10101539.

Barragán R, Zuraikat FM, Tam V, Scaccia S, Cochran J, Li S, Cheng B, St-Onge MP. Actigraphy-Derived Sleep Is Associated with Eating Behavior Characteristics. *Nutrients*. 2021 Mar 5;13(3):852. doi: 10.3390/nu13030852.

Barrès R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K, Krook A, Zierath JR. Non-CpG methylation of the PGC-1 α promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab*. 2009 Sep;10(3):189-98. doi: 10.1016/j.cmet.2009.07.011.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263-5. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457.

Barrett JC. Some estimates of the surface tension of curved surfaces using density functional theory. *J Chem Phys*. 2006 Apr 14;124(14):144705. doi: 10.1063/1.2179425.

Barrubés L, Babio N, Becerra-Tomás N, Rosique-Esteban N, Salas-Salvadó J. Association Between Dairy Product Consumption and Colorectal Cancer Risk in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *Adv Nutr*. 2019 May 1;10(suppl_2):S190-S211. doi: 10.1093/advances/nmy114.

Barter PJ. Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atheroscler Suppl*. 2002 Dec;3(4):39-47. doi: 10.1016/s1567-5688(02)00041-7.

Bartkiene E, Steibliene V, Adomaitiene V, Juodeikiene G, Cernauskas D, Lele V, Klupsaite D, Zadeike D, Jarutiene L, Guiné, RPF. Factors Affecting Consumer Food Preferences: Food Taste and Depression-Based Evoked Emotional Expressions with the Use of Face Reading Technology. *Biomed. Res. Int*. 2019, 2019, 2097415.

Barton SJ, Melton PE, Titcombe P, Murray R, Rauschert S, Lillycrop KA, Huang RC, Holbrook JD, Godfrey KM. In Epigenomic Studies, Including Cell-Type Adjustments in Regression Models Can Introduce Multicollinearity, Resulting in Apparent Reversal of Direction of Association. *Front Genet* 2019, 10, 816, doi:10.3389/fgene.2019.00816.

Batterink L, Yokum S, Stice E. Body mass correlates inversely with inhibitory control in response to food among adolescent girls: an fMRI study. *Neuroimage*. 2010 Oct 1;52(4):1696-703. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.05.059.

Batram T, Yousefi P, Crawford G, Prince C, Sheikhal Babaei M, Sharp G, Hatcher C, Vega-Salas MJ, Khodabakhsh S, Whitehurst O, Langdon R, Mahoney L, Elliott HR, Mancano G, Lee MA, Watkins SH, Lay AC, Hemani G, Gaunt TR, Relton CL, Staley JR, Suderman M. The EWAS Catalog: a database of epigenome-wide association studies. *Wellcome Open Res*. 2022 May 31;7:41. doi: 10.12688/wellcomeopenres.17598.2.

Beauchamp GK. Why do we like sweet taste: A bitter tale? *Physiol Behav* 2016, 164, 432–437. doi:10.1016/j.physbeh.2016.05.007.

Becerra-Tomás N, Paz-Graniel I, Tresserra-Rimbau A, Martínez-González MÁ, Barrubés L, Corella D, Muñoz-Martínez J, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Bernal-López MR, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, García-Ríos A, Riquelme Gallego B, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martín P, Daimiel L, Velilla-Zancada S, Vidal J, Vázquez C, Ros E, Buil-Cosiales P, Babio N, Fernández-Carrión R, Pérez-Vega KA, Morey M, Torres-Collado L, Tojal-Sierra L, Pérez-López J, Abete I, Cabrera JP, Casas R, Fernández-García JC, Santos-Lozano JM, Esteve-Luque V, Bouzas C, Fernandez-Lazaro CI, Sorlí JV, Freixer G, Martín M, Muñoz MG, Salaverria-Lete I, Toledo E, Castañer O, Salas-Salvadó J; PREDIMED-Plus Investigators. Fruit consumption and cardiometabolic risk in the PREDIMED-plus study: A cross-sectional analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2021 Jun 7;31(6):1702-1713. doi: 10.1016/j.numecd.2021.02.007.

Bednarski T, Olichwier A, Opasinska A, Pyrkowska A, Gan AM, Ntambi JM, Dobrzyn P. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency reduces lipid accumulation in the heart by activating lipolysis independently of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochim Biophys Acta*. 2016 Dec;1861(12 Pt A):2029-2037. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.10.005.

Bekdash RA. Methyl Donors, Epigenetic Alterations, and Brain Health: Understanding the Connection. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 25;24(3):2346. doi: 10.3390/ijms24032346.

Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawatr T, Berria R, DeFronzo RA, Cusi K. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1640-8. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1640.

Belinda Lennerz, Jochen K Lennerz, Food Addiction, High-Glycemic-Index Carbohydrates, and Obesity, *Clinical Chemistry*, Volume 64, Issue 1, 1 January 2018, Pages 64–71, doi: 10.1373/clinchem.2017.273532.

Belizário JE, Faintuch J. Microbiome and Gut Dysbiosis. *Exp Suppl*. 2018;109:459-476. doi: 10.1007/978-3-319-74932-7_13.

Bell CG, Finer S, Lindgren CM, Wilson GA, Rakyan VK, Teschendorff AE, Akan P, Stupka E, Down TA, Prokopenko I, Morison IM, Mill J, Pidsley R; International Type 2 Diabetes 1q Consortium; Deloukas P, Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy MI, Beck S, Hitman GA. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. *PLoS One*. 2010 Nov 18;5(11):e14040. doi: 10.1371/journal.pone.0014040.

Bellia A, Giardina E, Lauro D, Tesauro M, Di Fede G, Cusumano G, Federici M, Rini GB, Novelli G, Lauro R, Sbraccia P. "The Linosa Study": epidemiological and heritability data of the metabolic syndrome in a Caucasian genetic isolate. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 Sep;19(7):455-61. doi: 10.1016/j.numecd.2008.11.002.

Bellisle, F. (2004). Effects of diet on behaviour and cognition in children. *British Journal of Nutrition*, 92(S2), S227-S232. doi:10.1079/BJN20041171

Bénard M, Bellisle F, Kesse-Guyot E, Julia C, Andreeva VA, Etile F, Reach G, Dechelotte P, Tivolacci MP, Hercberg S, Péneau S. Impulsivity is associated with food intake, snacking, and eating disorders in a general population. *Am J Clin Nutr*. 2019 Jan 1;109(1):117-126. doi: 10.1093/ajcn/nqy255.

Bender A, Hagan KE, Kingston N. The association of folate and depression: A meta-analysis. *J Psychiatr Res*. 2017 Dec;95:9-18. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.07.019.

Benzinou M, Creemers JW, Choquet H, Lobbens S, Dina C, Durand E, Guerardel A, Boutin P, Jouret B, Heude B, Balkau B, Tichet J, Marre M, Potoczna N, Horber F, Le Stunff C, Czernichow S, Sandback A, Lauritzen T, Borch-Johnsen K, Andersen G, Kiess W, Körner A, Kovacs P, Jacobson P, Carlsson LM, Walley AJ, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O, Meyre D, Froguel P. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet*. 2008 Aug;40(8):943-5. doi: 10.1038/ng.177.

Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, Deng Y, Blennerhassett P, Macri J, McCoy KD, Verdu EF, Collins SM. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*. 2011 Aug;141(2):599-609, 609.e1-3. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.052.

Bergman BC, Perreault L, Strauss A, Bacon S, Kerege A, Harrison K, Brozinick JT, Hunerdosse DM, Playdon MC, Holmes W, Bui HH, Sanders P, Siddall P, Wei T, Thomas MK, Kuo MS, Eckel RH. Intramuscular triglyceride synthesis: importance in muscle lipid partitioning in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2018 Feb 1;314(2):E152-E164. doi: 10.1152/ajpendo.00142.2017.

Beyer JL, Payne ME. Nutrition and Bipolar Depression. *Psychiatr Clin North Am*. 2016 Mar;39(1):75-86. doi: 10.1016/j.psc.2015.10.003.

Bhat B, Jones GT. Data Analysis of DNA Methylation Epigenome-Wide Association Studies (EWAS): A Guide to the Principles of Best Practice. *Methods Mol Biol* 2022, 2458, 23–45, doi:10.1007/978-1-0716-2140-0_2.

Bhawra J, Kirkpatrick SI, Hall MG, Vanderlee L, Thrasher JF, Jáuregui de la Mota A, Hammond D. A five-country study of front- and back-of-package nutrition label awareness and use: patterns and correlates from the 2018 International Food Policy Study. *Public Health Nutr.* 2023 Jan;26(1):275-286. doi: 10.1017/S1368980022002257.

Bian X, Wasserfall C, Wallstrom G, Wang J, Wang H, Barker K, Schatz D, Atkinson M, Qiu J, LaBaer J. Tracking the Antibody Immunome in Type 1 Diabetes Using Protein Arrays. *J Proteome Res* 2017, 16, 195–203. 10.1021/acs.jproteome.6b00354.

Biddle SJ, Asare M. Physical activity and mental health in children and adolescents: a review of reviews. *Br J Sports Med.* 2011 Sep;45(11):886-95. doi: 10.1136/bjsports-2011-090185.

Biddle SJ, Fox KR. Motivation for physical activity and weight management. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998 Aug;22 Suppl 2:S39-47.

Bier DM. Dietary Sugars: Not as Sour as They Are Made Out to Be. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* 2020, 95, 100–111.

Biesiekierski JR, Jalanka J, Staudacher HM. Can Gut Microbiota Composition Predict Response to Dietary Treatments? *Nutrients* (Internet). 2019 May 22;11(5):1134.

Blanquet M, Legrand A, Pélessier A, Mourgues C. Socio-economics status and metabolic syndrome: A meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr.* 2019 May-Jun;13(3):1805-1812. doi: 10.1016/j.dsx.2019.04.003.

Blüch D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA.* 2009 Feb 4;301(5):513-21. doi: 10.1001/jama.2009.50.

Bloomgarden Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J Diabetes.* 2018 May;10(5):350-352. doi: 10.1111/1753-0407.12645.

Boender AJ, van Rozen AJ, Adan RA. Nutritional state affects the expression of the obesity-associated genes *Etv5*, *Faim2*, *Fto*, and *Negr1*. *Obesity* (Silver Spring). 2012 Dec;20(12):2420-5. doi: 10.1038/oby.2012.128.

Boivin DB, Boudreau P. Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms. *Pathol Biol (Paris).* 2014 Oct;62(5):292-301. doi: 10.1016/j.patbio.2014.08.001.

Bonaccio M, Costanzo S, Bracone F, Gialluisi A, Di Castelnuovo A, Ruggiero E, Esposito S, Olivieri M, Persichillo M, Cerletti C, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; Moli-LOCK Study Investigators. Psychological distress resulting from the COVID-19 confinement is associated with unhealthy dietary changes in two Italian population-based cohorts. *Eur J Nutr.* 2022 Apr;61(3):1491-1505. doi: 10.1007/s00394-021-02752-4.

Bonaccio M, Iacoviello L, de Gaetano G, Moli-Sani Investigators. The Mediterranean diet: the reasons for a success. *Thromb Res.* 2012 Mar;129(3):401-4. doi: 10.1016/j.thromres.2011.10.018.

Borre YE, O'Keefe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med.* 2014 Sep;20(9):509-18. doi: 10.1016/j.molmed.2014.05.002.

Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int J Sports Med.* 2021 Mar;42(3):199-214. doi: 10.1055/a-1263-0898.

Bozec A, Bakiri L, Jimenez M, Rosen ED, Catalá-Lehnen P, Schinke T, Schett G, Amling M, Wagner EF. Osteoblast-specific expression of Fra-2/AP-1 controls adiponectin and osteocalcin expression and affects metabolism. *J Cell Sci*. 2013 Dec 1;126(Pt 23):5432-40. doi: 10.1242/jcs.134510.

Bozzatello P, Brignolo E, De Grandi E, Bellino S. Supplementation with omega-3 fatty acids in psychiatric disorders: a review of literature data. *J Clin Med*. 2016;5:67. doi: 10.3390/jcm5080067.

Bragg F, Kartsonaki C, Guo Y, Holmes M, Du H, Yu C, Pei P, Yang L, Jin D, Chen Y, Schmidt D, Avery D, Lv J, Chen J, Clarke R, Hill MR, Li L, Millwood IY, Chen Z. The role of NMR-based circulating metabolic biomarkers in development and risk prediction of new onset type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2022 Sep 5;12(1):15071. doi: 10.1038/s41598-022-19159-8.

Brathwaite R, Addo J, Kunst AE, Agyemang C, Owusu-Dabo E, de-Graft Aikins A, Beune E, Meeks K, Klipstein-Grobusch K, Bahendeka S, Mockenhaupt FP, Amoah S, Galbete C, Schulze MB, Danquah I, Smeeth L. Smoking prevalence differs by location of residence among Ghanaians in Africa and Europe: The RODAM study. *PLoS One*. 2017 May 5;12(5):e0177291. doi: 10.1371/journal.pone.0177291.

Braun KVE, Dhana K, de Vries PS, Voortman T, van Meurs JBJ, Uitterlinden AG; BIOS consortium; Hofman A, Hu FB, Franco OH, Dehghan A. Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: the Rotterdam Study. *Clin Epigenetics*. 2017 Feb 7;9:15. doi: 10.1186/s13148-016-0304-4.

Bravo-Merodio L, Acharjee A, Russ D, Bisht V, Williams JA, Tsaprouni LG, Gkoutos GV. Translational Biomarkers in the Era of Precision Medicine. *Adv Clin Chem* 2021, 102, 191–232, doi:10.1016/bs.acc.2020.08.002.

Bray GA, Frühbeck G, Ryan DH, Wilding JP. Management of obesity. *Lancet*. 2016 May 7;387(10031):1947-56. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00271-3.

Bray GA, Ryan DH. Evidence-based weight loss interventions: Individualized treatment options to maximize patient outcomes. *Diabetes Obes Metab*. 2021 Feb;23 Suppl 1:50-62. doi: 10.1111/dom.14200.

Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-Smoking-Related Differential DNA Methylation: 27K Discovery and Replication. *Am J Hum Genet* 2011, 88, 450–457, doi:10.1016/j.ajhg.2011.03.003.

Brieger K., Schiavone S., Miller F.J., Jr., Krause K.H. Reactive oxygen species: From health to disease. *SwissMed.Wkly*. 2012;142:w13659.doi: 10.4414/smw.2012.13659

Bromfield S, Muntner P. High blood pressure: the leading global burden of disease risk factor and the need for worldwide prevention programs. *Curr Hypertens Rep*. 2013 Jun;15(3):134-6. doi: 10.1007/s11906-013-0340-9.

Brown AE, Walker M. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2016 Aug;18(8):75. doi: 10.1007/s11886-016-0755-4.

Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard E 4th, Taylor CM, Welsh DA, Berthoud HR. Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry*. 2015 Apr 1;77(7):607-15. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.012.

Bruegel M, Nagel D, Funk M, Fuhrmann P, Zander J, Teupser D. Comparison of Five Automated Hematology Analyzers in a University Hospital Setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000 and Sysmex XN-2000. *Clin Chem Lab Med* 2015, 53, 1057–1071, doi:10.1515/cclm-2014-0945.

Buckland G, Bach A, Serra-Majem L. Obesity and the Mediterranean diet: A systematic review of observational and interventional studies. *Obesity Review*. 2008; 9: 582–93. doi: 10.1111/j.1467-789X.2008.00503.x

Bufe B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, Kim UK, Drayna D, Meyerhof W. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol*. 2005 Feb 22;15(4):322-7. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.047. PMID: 15723792; PMCID: PMC1400547.

Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Anttila V, Gusev A, Day FR, Loh PR; ReproGen Consortium; Psychiatric Genomics Consortium; Genetic Consortium for Anorexia Nervosa of the Wellcome Trust Case Control Consortium 3; Duncan L, Perry JR, Patterson N, Robinson EB, Daly MJ, Price AL, Neale BM. An atlas of genetic correlations across human diseases and traits. *Nat Genet*. 2015 Nov;47(11):1236-41. doi: 10.1038/ng.3406.

Bulló M, Lamuela-Raventós R, Salas-Salvadó J. Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as important sources of fat and antioxidants. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(14):1797-810. doi: 10.2174/156802611796235062.

Bundgaard-Nielsen C, Knudsen J, Leutscher PDC, Lauritsen MB, Nyegaard M, Hagström S, Sørensen S. Gut microbiota profiles of autism spectrum disorder and attention deficit/hyperactivity disorder: A systematic literature review. *Gut Microbes*. 2020 Sep 2;11(5):1172-1187. doi: 10.1080/19490976.2020.1748258.

Bush CL, Blumberg JB, El-Sohemy A, Minich DM, Ordovás JM, Reed DG, Behm VAY. Toward the Definition of Personalized Nutrition: A Proposal by The American Nutrition Association. *J Am Coll Nutr*. 2020 Jan;39(1):5-15. doi: 10.1080/07315724.2019.1685332.

Camargo A, Vals-Delgado C, Alcalá-Díaz JF, Villasanta-Gonzalez A, Gomez-Delgado F, Haro C, Leon-Acuña A, Cardelo MP, Torres-Peña JD, Guler I, Malagon MM, Ordovas JM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Lopez-Miranda J. A Diet-Dependent Microbiota Profile Associated with Incident Type 2 Diabetes: From the CORDIOPREV Study. *Mol Nutr Food Res*. 2020 Oct 16:e2000730. doi: 10.1002/mnfr.202000730.

Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004 Jun;33(2):351-75, table of contents. doi: 10.1016/j.ecl.2004.03.005.

Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey JY, Ponikowski P, Rutten FH. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2010 Oct;31(19):2369-429. doi: 10.1093/eurheartj/ehq278.

Campbell AM LV. Genetics of obesity. *Aust Fam Physician*. 2017;46(7):456-459.

Campbell SDI, Brosnan BJ, Chu AKY, Skeaff CM, Rehner NJ, Perry TL, Peddie MC. Sedentary Behavior and Body Weight and Composition in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Studies. *Sports Med*. 2018 Mar;48(3):585-595. doi: 10.1007/s40279-017-0828-6.

Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciatì R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*. 2008 Jul 31;125(3):286-92. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012.

Cano-Ibáñez N, Bueno-Cavanillas A, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Zomeño MD, García-de-la-Hera M, Romaguera D, Martínez JA, Barón-López FJ, García-Ríos A, Estruch R, García-Molina

L, Alonso Gómez Á, Tur JA, Tinahones F, Serra-Majem L, Cubelos-Fernández N, Lapetra J, Vázquez C, Pintó X, Vidal J, Daimiel L, Gaforio JJ, Matía P, Ros E, Díez-Espino J, Fernández-Carrión R, Basora J, Fitó M, Zazo JM, Colom A, Toledo E, Díaz-López A, Muñoz MÁ, Ruiz-Canela M, Gea A. Dietary Intake in Population with Metabolic Syndrome: Is the Prevalence of Inadequate Intake Influenced by Geographical Area? Cross-Sectional Analysis from PREDIMED-Plus Study. *Nutrients*. 2018 Nov 4;10(11):1661. doi: 10.3390/nu10111661..

Cano-Ibáñez N, Bueno-Cavanillas A, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Corella D, Freixes GL, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, García-Ríos A, García-Molina L, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martin P, Daimiel L, Martín-Sánchez V, Vidal J, Vázquez C, Ros E, Bartolomé-Resano J, Palau-Galindo A, Portoles O, Torres L, Miquel-Fiol, Sánchez MTC, Sorto-Sánchez C, Moreno-Morales N, Abete I, Álvarez-Pérez J, Sacanella E, Bernal-López MR, Santos-Lozano JM, Fanlo-Maresma M, Bouzas C, Razquin C, Becerra-Tomás N, Ortega-Azorin C, Llimona R, Morey M, Román-Maciá J, Goicolea-Güemez L, Vázquez-Ruiz Z, Barrubés L, Fitó M, Gea A. Effect of changes in adherence to Mediterranean diet on nutrient density after 1-year of follow-up: results from the PREDIMED-Plus Study. *Eur J Nutr*. 2020 Sep;59(6):2395-2409. doi: 10.1007/s00394-019-02087-1.

Cano-Ibáñez N, Gea A, Ruiz-Canela M, Corella D, Salas-Salvadó J, Schröder H, Navarrete-Muñoz EM, Romaguera D, Martínez JA, Barón-López FJ, López-Miranda J, Estruch R, Riquelme-Gallego B, Alonso-Gómez Á, Tur JA, Tinahones FJ, Serra-Majem L, Martín V, Lapetra J, Vázquez C, Pintó X, Vidal J, Daimiel L, Gaforio JJ, Matía P, Ros E, Fernández-Carrión R, Díaz-López A, Zomeño MD, Candela I, Konieczna J, Abete I, Buil-Cosiales P, Basora J, Fitó M, Martínez-González MA, Bueno-Cavanillas A. Diet quality and nutrient density in subjects with metabolic syndrome: Influence of socioeconomic status and lifestyle factors. A cross-sectional assessment in the PREDIMED-Plus study. *Clin Nutr*. 2020 Apr;39(4):1161-1173. doi: 10.1016/j.clnu.2019.04.032.

Cappozzo A, McCrory C, Robinson O, Freni Sterrantino A, Sacerdote C, Krogh V, Panico S, Tumino R, Iacoviello L, Ricceri F, Sieri S, Chiodini P, McKay GJ, McKnight AJ, Kee F, Young IS, McGuinness B, Crimmins EM, Arpawong TE, Kenny RA, O'Halloran A, Polidoro S, Solinas G, Vineis P, Ieva F, Fiorito G. A blood DNA methylation biomarker for predicting short-term risk of cardiovascular events. *Clin Epigenetics*. 2022 Sep 29;14(1):121. doi: 10.1186/s13148-022-01341-4.

Cardello A.V., Maller O. Relationships Between Food Preferences and Food Acceptance Ratings. *J. Food Sci*. 1982;47:1553–1557. doi: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb04981.x.

Cardenas A, Ecker S, Fadadu RP, Huen K, Orozco A, McEwen LM, Engelbrecht HR, Gladish N, Kobor MS, Rosero-Bixby L, Dow WH, Rehkopf DH. Epigenome-wide association study and epigenetic age acceleration associated with cigarette smoking among Costa Rican adults. *Sci Rep*. 2022 Mar 11;12(1):4277. doi: 10.1038/s41598-022-08160-w.

Cárdenas-Fuentes G, Lassale C, Martínez-González MÁ, Grau M, Salas-Salvadó J, Corella D, Serra-Majem L, Wärnberg J, Konieczna J, Estruch R, Pintó X, Martínez JA, Vázquez C, Vidal J, Tur JA, Díaz-López A, Lancova H, Fitó M, Schröder H. Anthropometric Variables as Mediators of the Association of Changes in Diet and Physical Activity With Inflammatory Profile. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021 Oct 13;76(11):2021-2029. doi: 10.1093/gerona/glab072.

Carletti C, Pani P, Monasta L, Knowles A, Cattaneo A. Introduction of Complementary Foods in a Cohort of Infants in Northeast Italy: Do Parents Comply with WHO Recommendations? *Nutrients*. 2017 Jan 4;9(1):34. doi: 10.3390/nu9010034.

Carlyle M, Jones OB, Kuo JJ, Hall JE. Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2 Pt 2):496-501. doi: 10.1161/hy0202.104398.

- Carrasco-Ramiro F, Peiró-Pastor R, Aguado B. Human genomics projects and precision medicine. *Gene Ther.* 2017 Sep;24(9):551-561. doi: 10.1038/gt.2017.77.
- Carroll MD, Fryar CD, Nguyen DT. Total and High-density Lipoprotein Cholesterol in Adults: United States, 2015-2016. *NCHS Data Brief.* 2017 Oct;(290):1-8.
- Cashman KD. Diet, nutrition, and bone health. *J Nutr.* 2007 Nov;137(11 Suppl):2507S-2512S. doi: 10.1093/jn/137.11.2507S.
- Castaner O, Goday A, Park YM, Lee SH, Magkos F, Shio ST, Schröder H. The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. *Int J Endocrinol.* 2018 Mar 22;2018:4095789. doi: 10.1155/2018/4095789.
- Cena H, Calder PC. Defining a Healthy Diet: Evidence for The Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients.* 2020 Jan 27;12(2):334. doi: 10.3390/nu12020334.
- Cenit MC, Nuevo IC, Codoñer-Franch P, Dinan TG, Sanz Y. Gut microbiota and attention deficit hyperactivity disorder: new perspectives for a challenging condition. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2017 Sep;26(9):1081-1092. doi: 10.1007/s00787-017-0969-z.
- Cerdá B, Pérez M, Pérez-Santiago JD, Tornero-Aguilera JF, González-Soltero R, Larrosa M. Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? *Front Physiol.* 2016 Feb 18;7:51. doi: 10.3389/fphys.2016.00051.
- Chadchan SB, Singh V, Kommagani R. Female reproductive dysfunctions and the gut microbiota. *J Mol Endocrinol.* 2022 Aug 4;69(3):R81-R94. doi: 10.1530/JME-21-0238.
- Chambers TJG, Morgan MD, Heger AH, Sharpe RM, Drake AJ. High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent-of-origin specific manner. *Sci Rep.* 2016 Aug 23;6:31857. doi: 10.1038/srep31857.
- Chan DC, Pang J, McQuillan BM, Hung J, Beilby JP, Barrett PH, Watts GF. Plasma Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 as a Predictor of Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Adults. *Heart Lung Circ.* 2016 May;25(5):520-5. doi: 10.1016/j.hlc.2015.10.017.
- Chan DC, Watts GF, Redgrave TG, Mori TA, Barrett PH. Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration. *Metabolism.* 2002 Aug;51(8):1041-6. doi: 10.1053/meta.2002.33339.
- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience.* 2015 Feb 25;4:7. doi: 10.1186/s13742-015-0047-8.
- Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects - A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(10):1580-1604. doi: 10.1080/10408398.2017.1422111.
- Chang Z, Lichtenstein P, D'Onofrio BM, Almqvist C, Kuja-Halkola R, Sjölander A, Larsson H. Maternal age at childbirth and risk for ADHD in offspring: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol.* 2014 Dec;43(6):1815-24. doi: 10.1093/ije/dyu204.
- Chatterjee A, Rodger EJ, Morison IM, Eccles MR, Stockwell PA. Tools and Strategies for Analysis of Genome-Wide and Gene-Specific DNA Methylation Patterns. *Methods Mol Biol* 2017, 1537, 249–277, doi:10.1007/978-1-4939-6685-1_15.

Chattopadhyay M., Khemka V.K., Chatterjee G., Ganguly A., Mukhopadhyay S., Chakrabarti S. Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol. Cell. Biochem.* 2015;399:95–103. doi: 10.1007/s11010-014-2236-7.

Chaudhary S, Kumaran SS, Goyal V, Kalaivani M, Kalojiya GS, Sagar R, Mehta N, Srivastava AK, Jagannathan NR. Frontal lobe metabolic alterations characterizing Parkinson's disease cognitive impairment. *Neurol Sci.* 2021 Mar;42(3):1053-1064. doi: 10.1007/s10072-020-04626-9.

Chauveau P, Aparicio M, Bellizzi V, Campbell K, Hong X, Johansson L, Kolko A, Molina P, Sezer S, Wanner C, Ter Wee PM, Teta D, Fouque D, Carrero JJ; European Renal Nutrition (ERN) Working Group of the European Renal Association–European Dialysis Transplant Association (ERA-EDTA). Mediterranean diet as the diet of choice for patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2018 May 1;33(5):725-735. doi: 10.1093/ndt/gfx085.

Cheke LG, Bonnici HM, Clayton NS, Simons JS. Obesity and insulin resistance are associated with reduced activity in core memory regions of the brain. *Neuropsychologia.* 2017 Feb;96:137-149. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2017.01.013.

Chen AY, Kim SE, Houtrow AJ, Newacheck PW. Prevalence of obesity among children with chronic conditions. *Obesity (Silver Spring)* 18, 210–213 (2010).

Chen H, Liu S, Ji L, Wu T, Ji Y, Zhou Y, Zheng M, Zhang M, Xu W, Huang G. Folic Acid Supplementation Mitigates Alzheimer's Disease by Reducing Inflammation: A Randomized Controlled Trial. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:5912146. doi: 10.1155/2016/5912146.

Chen J, Sun M, Adeyemo A, Pirie F, Carstensen T, Pomilla C, Doumatey AP, Chen G, Young EH, Sandhu M, Morris AP, Barroso I, McCarthy MI, Mahajan A, Wheeler E, Rotimi CN, Motala AA. Genome-wide association study of type 2 diabetes in Africa. *Diabetologia.* 2019 Jul;62(7):1204-1211. doi: 10.1007/s00125-019-4880-7.

Chen K, Ye C, Gao Z, Hu J, Chen C, Xiao R, Lu F, Wei K. Immune infiltration patterns and identification of new diagnostic biomarkers GDF10, NCKAP5, and RTKN2 in non-small cell lung cancer. *Transl Oncol.* 2023 Jan 9;29:101618. doi: 10.1016/j.tranon.2023.101618.

Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:508409. doi: 10.1155/2015/508409.

Chen L, Zhang YH, Wang S, Zhang Y, Huang T, Cai YD. Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology and KEGG pathways. *PLoS One.* 2017 Sep 5;12(9):e0184129. doi: 10.1371/journal.pone.0184129.

Chen QY, Alarcon S, Tharp A, Ahmed OM, Estrella NL, Greene TA, Rucker J, Breslin PA. Perceptual variation in umami taste and polymorphisms in TAS1R taste receptor genes. *Am J Clin Nutr.* 2009 Sep;90(3):770S-779S. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462N.

Cheung LP, Ma RC, Lam PM, Lok IH, Haines CJ, So WY, Tong PC, Cockram CS, Chow CC, Goggins WB. Cardiovascular risks and metabolic syndrome in Hong Kong Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2008 Jun;23(6):1431-8. doi: 10.1093/humrep/den090.

Cheung SG, Goldenthal AR, Uhlemann AC, Mann JJ, Miller JM, Sublette ME. Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. *Front Psychiatry.* 2019 Feb 11;10:34. doi: 10.3389/fpsy.2019.00034.

Chilamakuri R, Agarwal S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells.* 2021 Jan 21;10(2):206. doi: 10.3390/cells10020206.

Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Apr 13;7:30. doi: 10.3389/fendo.2016.00030.

Choquet H, Kasberger J, Hamidovic A, Jorgenson E. Contribution of common PCSK1 genetic variants to obesity in 8,359 subjects from multi-ethnic American population. *PLoS One*. 2013;8(2):e57857. doi: 10.1371/journal.pone.0057857.

Chow CK, Corsi DJ, Gilmore AB, Kruger A, Igumbor E, Chifamba J, Yang W, Wei L, Iqbal R, Mony P, Gupta R, Vijayakumar K, Mohan V, Kumar R, Rahman O, Yusoff K, Ismail N, Zatonska K, Altuntas Y, Rosengren A, Bahonar A, Yusufali A, Dagenais G, Lear S, Diaz R, Avezum A, Lopez-Jaramillo P, Lanus F, Rangarajan S, Teo K, McKee M, Yusuf S. Tobacco control environment: cross-sectional survey of policy implementation, social unacceptability, knowledge of tobacco health harms and relationship to quit ratio in 17 low-income, middle-income and high-income countries. *BMJ Open*. 2017 Mar 31;7(3):e013817. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013817.

Chowdhury SKR, Sangle GV, Xie XP, Stelmack GL, Halayko AJ, Shen GX. Effects of extensively oxidized low-density lipoprotein on mitochondrial function and reactive oxygen species in porcine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010;298:E89–E98. doi: 10.1152/ajpendo.00433.2009.

Christian P, Su Q. MicroRNA regulation of mitochondrial and ER stress signaling pathways: implications for lipoprotein metabolism in metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Nov 1;307(9):E729–37. doi: 10.1152/ajpendo.00194.2014.

Christiansen C, Castillo-Fernandez JE, Domingo-Relloso A, Zhao W, El-Sayed Moustafa JS, Tsai PC, Maddock J, Haack K, Cole SA, Kardia SLR, Molokhia M, Suderman M, Power C, Relton C, Wong A, Kuh D, Goodman A, Small KS, Smith JA, Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Ploubidis GB, Hardy R, Bell JT. Novel DNA methylation signatures of tobacco smoking with trans-ethnic effects. *Clin Epigenetics*. 2021 Feb 16;13(1):36. doi: 10.1186/s13148-021-01018-4.

Chuang YH, Lu AT, Paul KC, Folle AD, Bronstein JM, Bordelon Y, Horvath S, Ritz B. Longitudinal Epigenome-Wide Methylation Study of Cognitive Decline and Motor Progression in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2019;9(2):389–400. doi: 10.3233/JPD-181549.

Chudal R, Joelsson P, Gyllenberg D, Lehti V, Leivonen S, Hinkka-Yli-Salomäki S, Gissler M, Sourander A. Parental age and the risk of attention-deficit/hyperactivity disorder: a nationwide, population-based cohort study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2015 Jun;54(6):487–94.e1. doi: 10.1016/j.jaac.2015.03.013.

Chung J, Jun GR, Dupuis J, Farrer LA. Comparison of methods for multivariate gene-based association tests for complex diseases using common variants. *Eur J Hum Genet*. 2019 May;27(5):811–823. doi: 10.1038/s41431-018-0327-8.

Churchill S, Jessop DC. Reflective and non-reflective antecedents of health-related behaviour: exploring the relative contributions of impulsivity and implicit self-control to the prediction of dietary behaviour. *Br J Health Psychol*. 2011 May;16(Pt 2):257–72. doi: 10.1348/135910710X498688.

Cicerale S, Riddell LJ, Keast RSJ. The association between perceived sweetness intensity and dietary intake in young adults. *J Food Sci* 2012, 77, H31–35. 10.1111/j.1750-3841.2011.02473.x.

Clar C, Al-Khudairy L, Loveman E, Kelly SA, Hartley L, Flowers N, Germanò R, Frost G, Rees K. Low glycaemic index diets for the prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jul 31;7(7):CD004467. doi: 10.1002/14651858.CD004467.pub3

Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, Haskard DO. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation*. 2001 Jan 2;103(1):108-12. doi: 10.1161/01.cir.103.1.108.

Colares-Bento FC, Souza VC, Toledo JO, Moraes CF, Alho CS, Lima RM, Cordova C, Nobrega OT. Implication of the G145C polymorphism (rs713598) of the TAS2R38 gene on food consumption by Brazilian older women. *Arch Gerontol Geriatr*. 2012 Mar-Apr;54(2):e13-8. doi: 10.1016/j.archger.2011.05.019.

Coleman JE. Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992, 21, 441–483, doi:10.1146/annurev.bb.21.060192.002301.

Coltell O, Alvarez-Sala A, Gimenez-Alba I, de la Camara E, Fernández-Carrión R, Sorlí J, Corella D. The Eveningness Chronotype and Lower Adherence to the Mediterranean Diet Are Associated With Depressive Symptoms in Older Subjects With Metabolic Syndrome. *Curr Dev Nutr*. 2021 Jun 7;5(Suppl 2):901. doi: 10.1093/cdn/nzab049_014. PMID: PMC8181508.

Coltell O, Asensio EM, Sorlí JV, Barragán R, Fernández-Carrión R, Portolés O, Ortega-Azorín C, Martínez-LaCruz R, González JI, Zanón-Moreno V, Gimenez-Alba I, Fitó M, Ros E, Ordovas JM, Corella D. Genome-Wide Association Study (GWAS) on Bilirubin Concentrations in Subjects with Metabolic Syndrome: Sex-Specific GWAS Analysis and Gene-Diet Interactions in a Mediterranean Population. *Nutrients*. 2019 Jan 4;11(1):90. doi: 10.3390/nu11010090. PMID: 30621171; PMID: PMC6356696.

Coltell O, Asensio EM, Sorlí JV, Fernández-Carrión R, Giménez-Alba JI, Ordovas J, Corella D. Low Serum Choline Concentrations Are Associated with Worse Cognitive Performance in Subjects with Metabolic Syndrome. *Curr Dev Nutr*. 2020 May 29;4(Suppl 2):1200. doi: 10.1093/cdn/nzaa057_016. PMID: PMC7258305.

Coltell O, Sorlí JV, Asensio EM, Barragán R, González JI, Giménez-Alba IM, Zanón-Moreno V, Estruch R, Ramírez-Sabio JB, Pascual EC, Ortega-Azorín C, Ordovas JM, Corella D. Genome-Wide Association Study for Serum Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids: Exploratory Analysis of the Sex-Specific Effects and Dietary Modulation in Mediterranean Subjects with Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2020 Jan 24;12(2):310. doi: 10.3390/nu12020310. PMID: 31991592; PMID: PMC7071282.

Coltell O, Sorlí JV, Asensio EM, Fernández-Carrión R, Barragán R, Ortega-Azorín C, Estruch R, González JI, Salas-Salvadó J, Lamón-Fava S, Lichtenstein AH, Corella D. Association between taste perception and adiposity in overweight or obese older subjects with metabolic syndrome and identification of novel taste-related genes. *Am J Clin Nutr*. 2019 Jun 1;109(6):1709-1723. doi: 10.1093/ajcn/nqz038.

Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. 2014 Dec 24;7(1):17-44. doi: 10.3390/nu7010017.

Connell E, Le Gall G, Pontifex MG, Sami S, Cryan JF, Clarke G, Müller M, Vauzour D. Microbial-derived metabolites as a risk factor of age-related cognitive decline and dementia. *Mol Neurodegener*. 2022 Jun 17;17(1):43. doi: 10.1186/s13024-022-00548-6.

Connelly MA, Otvos JD, Shalurova I, Playford MP, Mehta NN. GlycA, a novel biomarker of systemic inflammation and cardiovascular disease risk. *J Transl Med*. 2017 Oct 27;15(1):219. doi: 10.1186/s12967-017-1321-6.

Conners CK. 1995. Conners' continuous performance test. Toronto: Multi-Health Systems.

Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, De Backer G, Jousilahti P, Keil U, Thomsen T, Whincup P, Graham IM; SCORE investigators. HDL cholesterol protects against cardiovascular

disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):611-6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.041.

Cooper ME. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *Am. J. Hypertens*. 2004;17:16S–20S. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.08.004. quiz A12-14.

Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei YZ, Lastra G, Manrique C, Stas S, Sowers JR. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am. J. Physiol. Heart C*. 2007;293:H2009–H2023. doi: 10.1152/ajpheart.00522.2007.

Corella D, Coltell O, Macian F, Ordovás JM. Advances in Understanding the Molecular Basis of the Mediterranean Diet Effect. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2018 Mar 25;9:227-249. doi: 10.1146/annurev-food-032217-020802.

Corella D, Coltell O, Portolés O, Sotos-Prieto M, Fernández-Carrión R, Ramírez-Sabio JB, Zanón-Moreno V, Mattei J, Sorlí JV, Ordovas JM. A Guide to Applying the Sex-Gender Perspective to Nutritional Genomics. *Nutrients*. 2018 Dec 20;11(1):4. doi: 10.3390/nu11010004.

Corella D, González JI, Bulló M, Carrasco P, Portolés O, Díez-Espino J, Covas MI, Ruiz-Gutierrez V, Gómez-Gracia E, Arós F, Fiol M, Herrera MC, Santos JM, Sáez G, Lamuela R, Lahoz C, Vinyoles E, Ros E, Estruch R. Polymorphisms cyclooxygenase-2 -765G>C and interleukin-6 -174G>C are associated with serum inflammation markers in a high cardiovascular risk population and do not modify the response to a Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil or nuts. *J Nutr*. 2009 Jan;139(1):128-34. doi: 10.3945/jn.108.093054.

Corella D, Ordovás JM. How does the Mediterranean diet promote cardiovascular health? Current progress toward molecular mechanisms: gene-diet interactions at the genomic, transcriptomic, and epigenomic levels provide novel insights into new mechanisms. *Bioessays*. 2014 May;36(5):526-37. doi: 10.1002/bies.201300180. Epub 2014 Apr 7.

Corella D. Why is it important to know DNA methylation patterns in people with hypertriglyceridaemia? *Clin Investig Arterioscler*. 2022 Jan-Feb;34(1):33-35. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arteri.2022.01.001.

Corella, D.; Ordovas, J.M. Basic Concepts in Molecular Biology Relatedo Genetics and Epigenetics. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2017, 70, 744–753, doi:10.1016/j.rec.2017.05.011.

Corella, D.; Ordovas, J.M. Integration of Environment and Disease into “omics” Analysis. *Curr Opin Mol Ther* 2005, 7, 569–576.

Correia ML, Haynes WG. Leptin, obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004 Mar;13(2):215-23. doi: 10.1097/00041552-200403000-00010.

Cortese S, Comencini E, Vincenzi B, Speranza M, Angriman M. Attention-deficit/hyperactivity disorder and impairment in executive functions: a barrier to weight loss in individuals with obesity? *BMC Psychiatry*. 2013 Nov 7;13:286. doi: 10.1186/1471-244X-13-286.

Cortese S, Moreira-Maia CR, St Fleur D, Morcillo-Peñalver C, Rohde LA, Faraone SV. Association Between ADHD and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Psychiatry*. 2016 Jan;173(1):34-43. doi: 10.1176/appi.ajp.2015.15020266.

Criscimanna A, Coudriet GM, Gittes GK, Piganelli JD, Esni F. Activated macrophages create lineage-specific microenvironments for pancreatic acinar- and β -cell regeneration in mice. *Gastroenterology*. 2014 Nov;147(5):1106-18.e11. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.008.

Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Sep 28;12(11):722-34. doi: 10.1038/nrm3198.

Cronjé HT, Elliott HR, Nienaber-Rousseau C, Pieters M. Leveraging the urban-rural divide for epigenetic research. *Epigenomics.* 2020 Jun;12(12):1071-1081. doi: 10.2217/epi-2020-0049.

Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat. Genet.* 45, 984–994 (2013).

Crovesy L, Masterson D, Rosado EL. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur J Clin Nutr.* 2020 Sep;74(9):1251-1262. doi: 10.1038/s41430-020-0607-6.

Crovesy L, Masterson D, Rosado EL. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* (Internet). 2020; doi: 10.1038/s41430-020-0607-6.

Crujeiras AB, Campion J, Díaz-Lagares A, Milagro FI, Goyenechea E, Abete I, Casanueva FF, Martínez JA. Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: a translational study. *Regul Pept.* 2013 Sep 10;186:1-6. doi: 10.1016/j.regpep.2013.06.012.

Cruz KJC, de Oliveira ARS, Morais JBS, Severo JS, Marreiro PhD DDN. Role of microRNAs on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. *Nutrition.* 2017 Mar;35:28-35. doi: 10.1016/j.nut.2016.10.003.

Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cusotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'Connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev.* 2019 Oct 1;99(4):1877-2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018.

Curtis D, Vine AE, McQuillin A, Bass NJ, Pereira A, Kandaswamy R, Lawrence J, Anjorin A, Choudhury K, Datta SR, Puri V, Krasucki R, Pimm J, Thirumalai S, Quested D, Gurling HM. Case-case genome-wide association analysis shows markers differentially associated with schizophrenia and bipolar disorder and implicates calcium channel genes. *Psychiatr Genet.* 2011 Feb;21(1):1-4. doi: 10.1097/YPG.0b013e3283413382.

Cutler DM. Early Returns From the Era of Precision Medicine. *JAMA* 2020, 323, 109–110, doi:10.1001/jama.2019.20659.

Daimiel L, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Schröder H, Vioque J, Romaguera D, Martínez JA, Wärnberg J, Lopez-Miranda J, Estruch R, Cano-Ibáñez N, Alonso-Gómez A, Tur JA, Tinahones FJ, Serra-Majem L, Micó-Pérez RM, Lapetra J, Galdón A, Pintó X, Vidal J, Micó V, Colmenarejo G, Gaforio JJ, Matía P, Ros E, Buil-Cosiales P, Vázquez-Ruiz Z, Sorlí JV, Graniel IP, Cuenca-Royo A, Gisbert-Sellés C, Galmes-Panades AM, Zulet MA, García-Ríos A, Díaz-López A, de la Torre R, Galilea-Zabalza I, Ordovás JM. Physical fitness and physical activity association with cognitive function and quality of life: baseline cross-sectional analysis of the PREDIMED-Plus trial. *Sci Rep.* 2020 Feb 26;10(1):3472. doi: 10.1038/s41598-020-59458-6.

Dale DC, Makaryan V. *ELANE*-Related Neutropenia. 2002 Jun 17 [updated 2018 Aug 23]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023.

D'Alessandro A, De Pergola G. Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease: A Critical Evaluation of A Priori Dietary Indexes. *Nutrients.* 2015 Sep 16;7(9):7863-88. doi: 10.3390/nu7095367.

Dam SA, Mostert JC, Szopinska-Tokov JW, Bloemendaal M, Amato M, Arias-Vasquez A. The Role of the Gut-Brain Axis in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019 Sep;48(3):407-431. doi: 10.1016/j.gtc.2019.05.001.

Dauncey MJ. New insights into nutrition and cognitive neuroscience. *Proc Nutr Soc*. 2009;68:408-415. doi: 10.1017/S0029665109990188.

Davegårdh C, García-Calzón S, Bacos K, Ling C. DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Mol Metab*. 2018 Aug;14:12-25. doi: 10.1016/j.molmet.2018.01.022.

Davis C, Patte K, Curtis C, Reid C. Immediate pleasures and future consequences. A neuropsychological study of binge eating and obesity. *Appetite*. 2010 Feb;54(1):208-13. doi: 10.1016/j.appet.2009.11.002.

de Boer B.J, van Hooft EAJ, Bakker, AB. (2011). Stop and Start Control: A Distinction within Self-Control. *European Journal of Personality*, 25(5), 349-362. doi: 10.1002/per.796

De Carli L, Gambino R, Lubrano C, Rosato R, Bongiovanni D, Lanfranco F, Broglio F, Ghigo E, Bo S. Impaired taste sensation in type 2 diabetic patients without chronic complications: a case-control study. *J Endocrinol Invest* 2018, 41, 765-772. 10.1007/s40618-017-0798-4.

De Cosmi V, Scaglioni S, Agostoni C. Early taste experience and later food choices. *Nutrients*. 2017;9:107. doi: 10.3390/nu9020107.

De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Stora A, Laghi L, Serrazanetti DI, Di Cagno R, Ferrocino I, Lazzi C, Turrone S, Cocolin L, Brigidi P, Neviani E, Gobetti M, O'Toole PW, Ercolini D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1812-1821. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309957.

de Leeuw CA, Mooij JM, Heskes T, Posthuma D. MAGMA: generalized gene-set analysis of GWAS data. *PLoS Comput Biol*. 2015 Apr 17;11(4):e1004219. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004219.

de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 Feb 16;99(6):779-85. doi: 10.1161/01.cir.99.6.779.

de Luis DA, Aller R, Izaola O, de la Fuente B, Conde R, Sagrado MG, Primo D. Evaluation of weight loss and adipocytokines levels after two hypocaloric diets with different macronutrient distribution in obese subjects with rs9939609 gene variant. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012 Nov;28(8):663-8. doi: 10.1002/dmrr.2323.

De Pergola G, D'Alessandro A. Influence of Mediterranean Diet on Blood Pressure. *Nutrients*. 2018 Nov 7;10(11):1700. doi: 10.3390/nu10111700.

de Toro-Martín J, Guénard F, Tchernof A, Deshaies Y, Pérusse L, Hould FS, Lebel S, Marceau P, Vohl MC. Methylation quantitative trait loci within the TOMM20 gene are associated with metabolic syndrome-related lipid alterations in severely obese subjects. *Diabetol Metab Syndr*. 2016 Jul 29;8:55. doi: 10.1186/s13098-016-0171-3.

de Wit H. Impulsivity as a determinant and consequence of drug use: a review of underlying processes. *Addict Biol*. 2009 Jan;14(1):22-31. doi: 10.1111/j.1369-1600.2008.00129.x.

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115:1285-1295. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.

Debras C, Chazelas E, Srouf B, Kesse-Guyot E, Julia C, Zelek L, Agaësse C, Druet-Pecollet N, Galan P, Hercberg S, Latino-Martel P, Deschasaux M, Touvier M. Total and added sugar intakes, sugar types, and cancer risk: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *Am J Clin Nutr*. 2020 Nov 11;112(5):1267-1279. doi: 10.1093/ajcn/nqaa246.

Deepankumar S, Karthi M, Vasanth K, Selvakumar S. Insights on modulators in perception of taste modalities: a review. *Nutr Res Rev*. 2019 Dec;32(2):231-246. doi: 10.1017/S0954422419000118.

Dehghan M, Mente A, Zhang X, Swaminathan S, Li W, Mohan V, Iqbal R, Kumar R, Wentzel-Viljoen E, Rosengren A, Amma LI, Avezum A, Chifamba J, Diaz R, Khatib R, Lear S, Lopez-Jaramillo P, Liu X, Gupta R, Mohammadifard N, Gao N, Oguz A, Ramli AS, Seron P, Sun Y, Szuba A, Tsolekile L, Wielgosz A, Yusuf R, Hussein Yusufali A, Teo KK, Rangarajan S, Dagenais G, Bangdiwala SI, Islam S, Anand SS, Yusuf S; Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study investigators. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*. 2017 Nov 4;390(10107):2050-2062. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32252-3.

Dekkers KF, van Iterson M, Sliker RC, Moed MH, Bonder MJ, van Galen M, Mei H, Zernakova DV, van den Berg LH, Deelen J, van Dongen J, van Heemst D, Hofman A, Hottenga JJ, van der Kallen CJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Tigchelaar EF, Uitterlinden AG, Willemsen G, Zernakova A, Franke L, 't Hoen PA, Jansen R, van Meurs J, Boomsma DI, van Duijn CM, van Greevenbroek MM, Veldink JH, Wijmenga C; BIOS Consortium; van Zwet EW, Slagboom PE, Jukema JW, Heijmans BT. Blood lipids influence DNA methylation in circulating cells. *Genome Biol*. 2016 Jun 27;17(1):138. doi: 10.1186/s13059-016-1000-6.

Delgado-Morales R, Esteller M. Opening up the DNA Methylome of Dementia. *Mol Psychiatry* 2017, 22, 485–496, doi:10.1038/mp.2016.242.

Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, Baldursson G, Belliveau R, Bybjerg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M, Cerrato F, Chambert K, Churchhouse C, Dumont A, Eriksson N, Gandal M, Goldstein JL, Grasby KL, Grove J, Gudmundsson OO, Hansen CS, Hauberg ME, Hollegaard MV, Howrigan DP, Huang H, Maller JB, Martin AR, Martin NG, Moran J, Pallesen J, Palmer DS, Pedersen CB, Pedersen MG, Poterba T, Poulsen JB, Ripke S, Robinson EB, Satterstrom FK, Stefansson H, Stevens C, Turley P, Walters GB, Won H, Wright MJ; ADHD Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (PGC); Early Lifecourse & Genetic Epidemiology (EAGLE) Consortium; 23andMe Research Team; Andreassen OA, Asherson P, Burton CL, Boomsma DI, Cormand B, Dalsgaard S, Franke B, Gelernter J, Geschwind D, Hakonarson H, Haavik J, Kranzler HR, Kuntsi J, Langley K, Lesch KP, Middeldorp C, Reif A, Rohde LA, Roussos P, Schachar R, Sklar P, Sonuga-Barke EJS, Sullivan PF, Thapar A, Tung JY, Waldman ID, Medland SE, Stefansson K, Nordentoft M, Hougaard DM, Werge T, Mors O, Mortensen PB, Daly MJ, Faraone SV, Børglum AD, Neale BM. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet*. 2019 Jan;51(1):63-75. doi: 10.1038/s41588-018-0269-7.

Denis GV, Obin MS. 'Metabolically healthy obesity': origins and implications. *Mol Aspects Med*. 2013 Feb;34(1):59-70. doi: 10.1016/j.mam.2012.10.004.

Denson JL, Gillet AS, Zu Y, Brown M, Pham T, Yoshida Y, Mauvais-Jarvis F, Douglas IS, Moore M, Tea K, Wetherbie A, Stevens R, Lefante J, Shaffer JG, Armaignac DL, Belden KA, Kaufman M, Heavner SF, Danesh VC, Cheruku SR, St Hill CA, Boman K, Deo N, Bansal V, Kumar VK, Walkey AJ, Kashyap R; Society of Critical Care Medicine Discovery Viral Infection and Respiratory Illness Universal Study (VIRUS): COVID-19 Registry Investigator Group. Metabolic Syndrome and Acute Respiratory Distress Syndrome in Hospitalized Patients With COVID-19. *JAMA Netw Open*. 2021 Dec 1;4(12):e2140568. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.40568.

Department of Health (South Africa), Statistics South Africa, South African Medical Research Council, & International Coach Federation. **South Africa Demographic and Health Survey 2016**. National Department of Health, Pretoria, South Africa (2019).

Desai AD, Lavelle M, Boursiquot BC, Wan EY. Long-term complications of COVID-19. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022 Jan 1;322(1):C1-C11. doi: 10.1152/ajpcell.00375.2021.

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*. 2008 Dec;43(2):164-74. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.03.009.

Desor JA, Beauchamp GK. Longitudinal changes in sweet preferences in humans. *Physiol Behav* 1987, 39, 639–641. 10.1016/0031-9384(87)90166-1.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):881-887. doi:10.1038/nature05488

Dhawan S, Natarajan R. Epigenetics and Type 2 Diabetes Risk. *Curr Diab Rep*. 2019 Jun 27;19(8):47. doi: 10.1007/s11892-019-1168-8.

Di Daniele N, Noce A, Vidiri MF, Moriconi E, Marrone G, Annicchiarico-Petruzzelli M, D'Urso G, Tesaro M, Rovella V, De Lorenzo A. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):8947-8979. doi: 10.18632/oncotarget.13553.

Di Renzo L, Cinelli G, Dri M, Gualtieri P, Attinà A, Leggeri C, Cennamo G, Esposito E, Pujia A, Chiricolo G, Salimei C, De Lorenzo A. Mediterranean Personalized Diet Combined with Physical Activity Therapy for the Prevention of Cardiovascular Diseases in Italian Women. *Nutrients*. 2020 Nov 11;12(11):E3456. doi: 10.3390/nu12113456.

Di Renzo L, Gualtieri P, Romano L, Marrone G, Noce A, Pujia A, Perrone MA, Aiello V, Colica C, De Lorenzo A. Role of Personalized Nutrition in Chronic-Degenerative Diseases. *Nutrients*. 2019 Jul 24;11(8):1707. doi: 10.3390/nu11081707.

Diaz KM, Shimbo D. Physical activity and the prevention of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013 Dec;15(6):659-68. doi: 10.1007/s11906-013-0386-8.

Diaz-Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 15;108(7):3047-52. doi: 10.1073/pnas.1010529108.

Dichgans M, Malik R, König IR, Rosand J, Clarke R, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Mitchell BD, Assimes TL, Levi C, O'Donnell CJ, Fornage M, Thorsteinsdottir U, Psaty BM, Hengstenberg C, Seshadri S, Erdmann J, Bis JC, Peters A, Boncoraglio GB, März W, Meschia JF, Kathiresan S, Ikram MA, McPherson R, Stefansson K, Sudlow C, Reilly MP, Thompson JR, Sharma P, Hopewell JC, Chambers JC, Watkins H, Rothwell PM, Roberts R, Markus HS, Samani NJ, Farrall M, Schunkert H; METASTROKE Consortium; CARDIoGRAM Consortium; C4D Consortium; International Stroke Genetics Consortium. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants. *Stroke*. 2014 Jan;45(1):24-36. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002707.

Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, Meduri E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, Waldenberger M, Peters A, Erdmann J, Hengstenberg C, Cambien F, Goodall AH, Ouwehand WH, Schunkert H, Thompson JR, Spector TD, Gieger C, Trégouët DA, Deloukas P, Samani NJ. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet*. 2014 Jun 7;383(9933):1990-8. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62674-4. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24630777.

Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, Järnerot G, Tysk C, Apajalahti J, Engstrand L, Jansson JK. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J*. 2008 Jul;2(7):716-27. doi: 10.1038/ismej.2008.37.

Ding B, Gibbs PE, Brookes PS, Maines MD. The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters β -adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *FASEB J*. 2011 Jan;25(1):301-13. doi: 10.1096/fj.10-166454.

Dinneen S, Gerich J, Rizza R. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1992 Sep 3;327(10):707-13. doi: 10.1056/NEJM199209033271007.

D'Innocenzo S, Biagi C, Lanari M. Obesity and the Mediterranean Diet: A Review of Evidence of the Role and Sustainability of the Mediterranean Diet. *Nutrients*. 2019 Jun 9;11(6):1306. doi: 10.3390/nu11061306.

Diószegi, J.; Llanaj, E.; Ádány, R. Genetic Background of Taste Perception, Taste Preferences, and Its Nutritional Implications: A Systematic Review. *Front Genet* 2019, 10, 1272. 10.3389/fgene.2019.01272.

Ditano-Vázquez P, Torres-Peña JD, Galeano-Valle F, Pérez-Caballero AI, Demelo-Rodríguez P, Lopez-Miranda J, Katsiki N, Delgado-Lista J, Alvarez-Sala-Walther LA. The Fluid Aspect of the Mediterranean Diet in the Prevention and Management of Cardiovascular Disease and Diabetes: The Role of Polyphenol Content in Moderate Consumption of Wine and Olive Oil. *Nutrients*. 2019 Nov 19;11(11):2833. doi: 10.3390/nu11112833.

Dixon MA, Chartier KG. Alcohol Use Patterns Among Urban and Rural Residents: Demographic and Social Influences. *Alcohol Res*. 2016;38(1):69-77.

Dizier MH, Margaritte-Jeannin P, Pain L, Sarnowski C, Brossard M, Mohamdi H, Lavielle N, Babron MC, Just J, Lathrop M, Laprise C, Bouzigon E, Demenais F, Nadif R. Interactive effect between ATPase-related genes and early-life tobacco smoke exposure on bronchial hyper-responsiveness detected in asthma-ascertained families. *Thorax*. 2019 Mar;74(3):254-260. doi: 10.1136/thoraxjnl-2018-211797.

Dogan MV, Shields B, Cutrona C, Gao L, Gibbons FX, Simons R, Monick M, Brody GH, Tan K, Beach SR, Philibert RA. The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. *BMC Genomics*. 2014 Feb 22;15:151. doi: 10.1186/1471-2164-15-151.

Domingo-Relloso A, Riffo-Campos AL, Haack K, Rentero-Garrido P, Ladd-Acosta C, Fallin DM, Tang WY, Herreros-Martinez M, Gonzalez JR, Bozack AK, Cole SA, Navas-Acien A, Tellez-Plaza M. Cadmium, Smoking, and Human Blood DNA Methylation Profiles in Adults from the Strong Heart Study. *Environ Health Perspect*. 2020 Jun;128(6):67005. doi: 10.1289/EHP6345.

Dominguez LJ, Di Bella G, Veronese N, Barbagallo M. Impact of Mediterranean Diet on Chronic Non-Communicable Diseases and Longevity. *Nutrients*. 2021 Jun 12;13(6):2028. doi: 10.3390/nu13062028.

Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, Bultman SJ. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 2011 May 4;13(5):517-26. doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.018.

Dotson CD, Vignes S, Steinle NI, Munger SD. T1R and T2R receptors: the modulation of incretin hormones and potential targets for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010 Apr;11(4):447-54.

Doty RL. Epidemiology of smell and taste dysfunction. *Handb Clin Neurol*. 2019;164:3-13. doi: 10.1016/B978-0-444-63855-7.00001-0.

Drake AJ, McPherson RC, Godfrey KM, Cooper C, Lillycrop KA, Hanson MA, Meehan RR, Seckl JR, Reynolds RM. An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Dec;77(6):808-15. doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04453.x.

- Dreher ML. Whole Fruits and Fruit Fiber Emerging Health Effects. *Nutrients*. 2018 Nov 28;10(12):1833. doi: 10.3390/nu10121833.
- Drew BG, Rye KA, Duffy SJ, Barter P, Kingwell BA. The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Jan 24;8(4):237-45. doi: 10.1038/nrendo.2011.235.
- Drewnowski A, Almiron-Roig E. Human Perceptions and Preferences for Fat-Rich Foods. In: Montmayeur JP, le Coutre J, editors. *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 11.
- Drewnowski A, Mennella JA, Johnson SL, Bellisle F. Sweetness and food preference. *J Nutr* 2012, 142, 1142S–8S. 10.3945/jn.111.149575.
- Drewnowski A. Taste preferences and food intake. *Annu Rev Nutr* 1997, 17, 237–253. 10.1146/annurev.nutr.17.1.237.
- Dron JS, Hegele RA. Genetics of Triglycerides and the Risk of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Jul;19(7):31. doi: 10.1007/s11883-017-0667-9.
- Du J, Xu Z, Liu Q, Yang Y, Qian H, Hu M, Fan Y, Li Q, Yao W, Li H, Qian G, He B, Zhou D, Mao C, Wang G. ATG101 Single-Stranded Antisense RNA-Loaded Triangular DNA Nanoparticles Control Human Pulmonary Endothelial Growth via Regulation of Cell Macroautophagy. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(49):42544–55.
- Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, Lin SM. Comparison of Beta-Value and M-Value Methods for Quantifying Methylation Levels by Microarray Analysis. *BMC Bioinformatics* 2010, 11, 587, doi:10.1186/1471-2105-11-587.
- Duda G, Wichura-Demska A. Wybrane czynniki ryzyka zespołu metabolicznego a zaburzenia zmysłu smaku [Selected risk factors of metabolic syndrome and disorders of taste perception]. *Wiad Lek*. 2010;63(4):358-68. Polish.
- Duda-Chodak A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol*. 2012 Oct;63(5):497-503.
- Dugué PA, Jung CH, Joo JE, Wang X, Wong EM, Makalic E, Schmidt DF, Baglietto L, Severi G, Southey MC, English DR, Giles GG, Milne RL. Smoking and blood DNA methylation: an epigenome-wide association study and assessment of reversibility. *Epigenetics*. 2020 Apr;15(4):358-368. doi: 10.1080/15592294.2019.1668739.
- Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, Hatsukami TS, Higashida RT, Johnston SC, Kidwell CS, Lutsep HL, Miller E, Sacco RL; American Heart Association; American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2009 Jun;40(6):2276-93. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.192218.
- Eastwood SV, Tillin T, Dehbi HM, Wright A, Forouhi NG, Godsland I, Whincup P, Sattar N, Hughes AD, Chaturvedi N. Ethnic differences in associations between fat deposition and incident diabetes and underlying mechanisms: the SABRE study. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Mar;23(3):699-706. doi: 10.1002/oby.20997.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66378-7.

Eckstrom E, Neukam S, Kalin L, Wright J. Physical Activity and Healthy Aging. *Clin Geriatr Med*. 2020 Nov;36(4):671-683. doi: 10.1016/j.cger.2020.06.009.

Ehrenwald M, Wasserman A, Shenhar-Tsarfaty S, Zeltser D, Friedensohn L, Shapira I, Berliner S, Rogowski O. Exercise capacity and body mass index - important predictors of change in resting heart rate. *BMC Cardiovasc Disord*. 2019 Dec 21;19(1):307. doi: 10.1186/s12872-019-01286-2.

Ekelund U, Tarp J, Steene-Johannessen J, Hansen BH, Jefferis B, Fagerland MW, Whincup P, Diaz KM, Hooker SP, Chernofsky A, Larson MG, Spartano N, Vasani RS, Dohrn IM, Hagströmer M, Edwardson C, Yates T, Shiroma E, Anderssen SA, Lee IM. Dose-response associations between accelerometry measured physical activity and sedentary time and all cause mortality: systematic review and harmonised meta-analysis. *BMJ*. 2019 Aug 21;366:l4570. doi: 10.1136/bmj.l4570.

Elder J, Kreider C, Schaefer N, DeLaosa M. A review of gluten- and casein-free diets for treatment of autism: 2005–2015. *Nutr Diet Suppl*. 2015;2015(7):87. doi: 10.2147/NDS.S74718.

Elliott HR, Burrows K, Min JL, Tillin T, Mason D, Wright J, Santorelli G, Davey Smith G, Lawlor DA, Hughes AD, Chaturvedi N, Relton CL. Characterisation of ethnic differences in DNA methylation between UK-resident South Asians and Europeans. *Clin Epigenetics*. 2022 Oct 15;14(1):130. doi: 10.1186/s13148-022-01351-2.

Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc*. 2000 Aug;32(8):1431-7. doi: 10.1097/00005768-200008000-00011.

El-Sohemy A, Stewart L, Khataa L, Fontaine-Bisson B, Kwong P, Ozsungur S, Cornelis MC. Nutrigenomics of taste - impact on food preferences and food production. *Forum Nutr*. 2007;60:176-182. doi: 10.1159/000107194.

El-Sohemy A. Nutrigenetics. *Forum Nutr*. 2007;60:25-30. doi: 10.1159/000107064.

Emery RL, Levine MD. Questionnaire and behavioral task measures of impulsivity are differentially associated with body mass index: A comprehensive meta-analysis. *Psychol Bull*. 2017 Aug;143(8):868-902. doi: 10.1037/bul0000105.

Escobedo J, Schargrodsky H, Champagne B, Silva H, Boissonnet CP, Vinuesa R, Torres M, Hernandez R, Wilson E. Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol*. 2009 Sep 26;8:52. doi: 10.1186/1475-2840-8-52.

Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA*. 2004 Sep 22;292(12):1440-6. doi: 10.1001/jama.292.12.1440.

Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract*. 2014;105:141–150. doi: 10.1016/j.diabres.2014.04.006.

Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater MC, Vinyoles E, Arós F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Sáez G, Ros E; PREDIMED

Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 Jul 4;145(1):1-11. doi: 10.7326/0003-4819-145-1-200607040-00004.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Fitó M, Gea A, Hernán MA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med*. 2018 Jun 21;378(25):e34. doi: 10.1056/NEJMoa1800389.

Estruch R, Ros E. The role of the Mediterranean diet on weight loss and obesity-related diseases. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020 Sep;21(3):315-327. doi: 10.1007/s11154-020-09579-0.

Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: The experience of the PREDIMED study. *Proceedings of the Nutritional Society*. 2010; 69(3): 333–40. doi: 10.1017/S0029665110001539

EUFIC. Visto 6 de octubre de 2020: <https://www.eufic.org/en/healthy-living/article/9-proven-benefits-of-physical-activity>

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486-97. doi: 10.1001/jama.285.19.2486.

Ezzaty Mirhashemi M, Shah RV, Kitchen RR, Rong J, Spahillari A, Pico AR, Vitseva O, Levy D, Demarco D, Shah S, Iafrafi MD, Larson MG, Tanriverdi K, Freedman JE. The Dynamic Platelet Transcriptome in Obesity and Weight Loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Feb;41(2):854-864. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315186.

Fabbiano S, Suárez-Zamorano N, Chevalier C, Lazarević V, Kieser S, Rigo D, Leo S, Veyrat-Durebex C, Gaia N, Maresca M, Merkler D, Gomez de Agüero M, Macpherson A, Schrenzel J, Trajkovski M. Functional Gut Microbiota Remodeling Contributes to the Caloric Restriction-Induced Metabolic Improvements. *Cell Metab*. 2018 Dec 4;28(6):907-921.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.005.

Fagundo AB, de la Torre R, Jiménez-Murcia S, Agüera Z, Granero R, Tárrega S, Botella C, Baños R, Fernández-Real JM, Rodríguez R, Forcano L, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Tinahones FJ, Fernández-García JC, Casanueva FF, Fernández-Aranda F. Executive functions profile in extreme eating/weight conditions: from anorexia nervosa to obesity. *PLoS One*. 2012;7(8):e43382. doi: 10.1371/journal.pone.0043382.

Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, Assi HI. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 12;23(2):786. doi: 10.3390/ijms23020786.

Fang H, Tu S, Sheng J, Shao A. Depression in sleep disturbance: A review on a bidirectional relationship, mechanisms and treatment. *J Cell Mol Med*. 2019 Apr;23(4):2324-2332. doi: 10.1111/jcmm.14170.

Fareed MM, Ullah S, Qasmi M, Shityakov S. The Role of Vitamins in DNA Methylation as Dietary Supplements or Nutraceuticals: A Systematic Review. *Curr Mol Med* 2022, doi:10.2174/1566524023666221004140858.

Farinetti A, Zurlo V, Manenti A, Coppi F, Mattioli AV. Mediterranean diet and colorectal cancer: A systematic review. *Nutrition*. 2017 Nov-Dec;43-44:83-88. doi: 10.1016/j.nut.2017.06.008.

Farrell SW, Pavlovic A, Barlow CE, Leonard D, DeFina JR, Willis BL, DeFina LF, Haskell WL. Functional Movement Screening Performance and Association With Key Health Markers in Older Adults. *J Strength Cond Res*. 2019 Dec 27. doi: 10.1519/JSC.0000000000003273.

Fattorusso A, Di Genova L, Dell'Isola GB, Mencaroni E, Esposito S. Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. *Nutrients*. 2019 Feb 28;11(3):521. doi: 10.3390/nu11030521.

Fatumo S, Chikowore T, Choudhury A, Ayub M, Martin AR, Kuchenbaecker K. A Roadmap to Increase Diversity in Genomic Studies. *Nat Med* 2022, 28, 243–250, doi:10.1038/s41591-021-01672-4.

FDA. Guidance on Conduct of Clinical Trials of Medical Products During COVID-19 Public Health Emergency: Guidance for Industry, Investigators, and Institutional Review Boards. Silver Spring, MD: FDA (2020).

Federación de diabetes internacional, FDI. Atlas de la diabetes de la FID. 2015. Consultado en 4 de abril de 2020 en https://www.fundaciondiabetes.org/upload/publicaciones_ficheros/95/IDF_Atlas_2015_SP_WEB_oct2016.pdf

Feero WG. Introducing “Genomics and Precision Health.” *JAMA* 2017, 317, 1842–1843, doi:10.1001/jama.2016.20625.

Feng J, Zhou Y, Liao L, Yu L, Yuan P, Zhang J. Network Pharmacology and Transcriptomics Reveal the Mechanism of GualouQuMaiWan in Treatment of Type 2 Diabetes and Its Active Small Molecular Compound. *J Diabetes Res*. 2022 Oct 6;2022:2736504. doi: 10.1155/2022/2736504.

Fernández JM, Rosado-Álvarez D, Da Silva Grigoletto ME, Rangel-Zúñiga OA, Landaeta-Díaz LL, Caballero-Villarraso J, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Fuentes-Jiménez F. Moderate-to-high-intensity training and a hypocaloric Mediterranean diet enhance endothelial progenitor cells and fitness in subjects with the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Sep;123(6):361-73. doi: 10.1042/CS20110477.

Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, Perez-Bauer M, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Martín-Moreno JM. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br J Nutr*. 2010 Jun;103(12):1808-16. doi: 10.1017/S0007114509993837.

Fernández-Bergés D, Cabrera de León A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, Vega-Alonso T, Félix-Redondo FJ, Ortiz-Marrón H, Rigo F, Lama C, Gavrila D, Segura-Fragoso A, Lozano L, Marrugat J. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012 Mar;65(3):241-8. English, Spanish. doi: 10.1016/j.recresp.2011.10.015.

Fernández-Carrión R, Gimenez-Alba IM, Sorli JV, Pascual EC, Ortega-Azorin C, Portoles O, Martinez-Lacruz R, Alvarez-Sala A, Barragan R, Coltell O, Corella D. Taste Perception and Sweet Taste Preference in Type-2 Diabetic Subjects: Genomic And Metabolomic Factors Involved. *Metabolism* 2021, 116, 154641, doi: 10.1016/j.metabol.2020.154641.

Fernández-Carrión R, Sorli JV, Coltell O, Pascual EC, Ortega-Azorin C, Barragán R, Giménez-Alba IM, Alvarez-Sala A, Fitó M, Ordovas JM, Corella D. Sweet Taste Preference: Relationships with Other Tastes, Liking for Sugary Foods and Exploratory Genome-Wide Association Analysis in Subjects with Metabolic Syndrome. *Biomedicine*. 2021 Dec 31;10(1):79. doi: 10.3390/biomedicine10010079.

Fernández-Carrión R, Sorli JV, Pascual Castelló EC, Ortega-Azorin C, Barragán R, Asensio EM, Villamil Penagos LV, Corella D, Coltell O. DNA-Methylation Signature of MicroRNA Coding Genes Associated with

Chronological Age in a High-Cardiovascular Risk Mediterranean Population. Sex-Specific Analysis. *American Heart Journal*, 254, 2022: 256. doi: 10.1016/j.ahj.2022.10.059.

Ferrer M, Alonso J. The use of the Short Form (SF)-36 questionnaire for older adults. *Age Ageing*. 1998 Nov;27(6):755-6. doi: 10.1093/ageing/27.6.755. PMID: 10408673.

Ferri G, Digiacomo L, Lavagnino Z, Occhipinti M, Bugliani M, Cappello V, Caracciolo G, Marchetti P, Piston DW, Cardarelli F. Insulin secretory granules labelled with phogrin-fluorescent proteins show alterations in size, mobility and responsiveness to glucose stimulation in living β -cells. *Sci Rep*. 2019 Feb 27;9(1):2890. doi: 10.1038/s41598-019-39329-5.

Ferri N, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and metabolic syndrome: insights on insulin resistance, inflammation, and atherogenic dyslipidemia. *Endocrine*. 2016 Dec;54(3):588-601. doi: 10.1007/s12020-016-0939-0.

Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA 3rd. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010 Aug;16(4):444-53. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.06.008.

Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, McTeague M, Sandler R, Wexler H, Marlowe EM, Collins MD, Lawson PA, Summanen P, Baysallar M, Tomzynski TJ, Read E, Johnson E, Rolfe R, Nasir P, Shah H, Haake DA, Manning P, Kaul A. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis*. 2002 Sep 1;35(Suppl 1):S6-S16. doi: 10.1086/341914.

Finucane HK, Bulik-Sullivan B, Gusev A, Trynka G, Reshef Y, Loh PR, Anttila V, Xu H, Zang C, Farh K, Ripke S, Day FR; ReproGen Consortium; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium; RACI Consortium; Purcell S, Stahl E, Lindstrom S, Perry JR, Okada Y, Raychaudhuri S, Daly MJ, Patterson N, Neale BM, Price AL. Partitioning heritability by functional annotation using genome-wide association summary statistics. *Nat Genet*. 2015 Nov;47(11):1228-35. doi: 10.1038/ng.3404.

Fischer ME, Cruickshanks KJ, Pankow JS, Pankratz N, Schubert CR, Huang GH, Klein BE, Klein R, Pinto A. The associations between 6-n-propylthiouracil (PROP) intensity and taste intensities differ by TAS2R38 haplotype. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2014;7(3):143-52. doi: 10.1159/000371552.

Fischer ME, Cruickshanks KJ, Schubert CR, Pinto A, Huang GH, Klein BE, Klein R, Pankow JS. The association of taste with change in adiposity-related health measures. *J Acad Nutr Diet*. 2014 Aug;114(8):1195-202. doi: 10.1016/j.jand.2014.04.013.

Fitzgibbon M, Blumstein L, Schiffer L, Antonic MA, McLeod A, Dakers R, Restrepo L, Boots EA, Sanchez-Flack JC, Tussing-Humphreys L, Lamar M. Adapting to the COVID-19 pandemic on Building Research in Diet and Cognition (BRIDGE) trial. *Trials*. 2021 Jul 16;22(1):459. doi: 10.1186/s13063-021-05383-6.

Fletcher PC, Kenny PJ. Food addiction: a valid concept? *Neuropsychopharmacology*. 2018 Dec;43(13):2506-2513. doi: 10.1038/s41386-018-0203-9.

Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost HG, Fritsche A, Häring HU, Hrabě de Angelis M, Peters A, Roden M, Prehn C, Wang-Sattler R, Illig T, Schulze MB, Adamski J, Boeing H, Pischon T. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes*. 2013 Feb;62(2):639-48. doi: 10.2337/db12-0495.

Flory K, Molina BS, Pelham WE Jr, Gnagy E, Smith B. Childhood ADHD predicts risky sexual behavior in young adulthood. *J Clin Child Adolesc Psychol*. 2006 Dec;35(4):571-7. doi: 10.1207/s15374424jccp3504_8.

Fonseca NKOD, Molle RD, Costa MA, Gonçalves FG, Silva AC, Rodrigues Y, Price M, Silveira PP, Manfro GG. Impulsivity influences food intake in women with generalized anxiety disorder. *Braz J Psychiatry*. 2020 Aug;42(4):382-388. doi: 10.1590/1516-4446-2019-0556.

Fontecha J, Calvo MV, Juarez M, Gil A, Martínez-Vizcaino V. Milk and Dairy Product Consumption and Cardiovascular Diseases: An Overview of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Adv Nutr*. 2019 May 1;10(suppl_2):S164-S189. doi: 10.1093/advances/nmy099.

Foreyt JP, Salas-Salvado J, Caballero B, Bulló M, Gifford KD, Bautista I, Serra-Majem L. Weight-reducing diets: are there any differences? *Nutr Rev*. 2009 May;67 Suppl 1:S99-101. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00169.x.

Fornari E, Maffei C. Treatment of Metabolic Syndrome in Children. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Oct 15;10:702. doi: 10.3389/fendo.2019.00702.

Forstner AJ, Fischer SB, Schenk LM, Strohmaier J, Maaser-Hecker A, Reinbold CS, Sivalingam S, Hecker J, Streit F, Degenhardt F, Witt SH, Schumacher J, Thiele H, Nürnberg P, Guzman-Parra J, Orozco Diaz G, Auburger G, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, González MJ, Gil Flores S, Cabaleiro Fabeiro FJ, Del Río Noriega F, Perez Perez F, Haro González J, Rivas F, Mayoral F, Bauer M, Pfennig A, Reif A, Herms S, Hoffmann P, Pirooznia M, Goes FS, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S. Whole-exome sequencing of 81 individuals from 27 multiply affected bipolar disorder families. *Transl Psychiatry*. 2020 Feb 4;10(1):57. doi: 10.1038/s41398-020-0732-y.

Forsyth P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol*. 2014;817:115–133. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_5.

Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig E.J, Greenwood CM, Hansen KD. Functional Normalization of 450k Methylation Array Data Improves Replication in Large Cancer Studies. *Genome Biol* 2014, 15, 503, 966 doi:10.1186/s13059-014-0503-2.

Foscolou A, Critselis E, Panagiotakos D. Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas*. 2018 Dec;118:60-66. doi: 10.1016/j.maturitas.2018.10.013.

Foster MC, Hwang SJ, Massaro JM, Hoffmann U, DeBoer IH, Robins SJ, Vasan RS, Fox CS. Association of subcutaneous and visceral adiposity with albuminuria: the Framingham Heart Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1284-9. doi: 10.1038/oby.2010.308.

Fox CS, Golden SH, Anderson C, Bray GA, Burke LE, de Boer IH, Deedwania P, Eckel RH, Ershow AG, Fradkin J, Inzucchi SE, Kosiborod M, Nelson RG, Patel MJ, Pignone M, Quinn L, Schauer PR, Selvin E, Vafiadis DK; American Heart Association Diabetes Committee of the Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, Council on Quality of Care and Outcomes Research; American Diabetes Association. Update on Prevention of Cardiovascular Disease in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus in Light of Recent Evidence: A Scientific Statement From the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2015 Sep;38(9):1777-803. doi: 10.2337/dci15-0012.

Fox KR, Hillsdon M. Physical activity and obesity. *Obes Rev*. 2007 Mar;8 Suppl 1:115-21. doi: 10.1111/j.1467-789X.2007.00329.x.

Fragiadakis GK, Wastyk HC, Robinson JL, Sonnenburg ED, Sonnenburg JL, Gardner CD. Long-term dietary intervention reveals resilience of the gut microbiota despite changes in diet and weight. *Am J Clin Nutr*. 2020 Jun 1;111(6):1127-1136. doi: 10.1093/ajcn/nqaa046.

Francois ME, Pistawka KJ, Halperin FA, Little JP. Cardiovascular benefits of combined interval training and post-exercise nutrition in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2018 Feb;32(2):226-233. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.10.002.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21;104(34):13780-5. doi: 10.1073/pnas.0706625104.

Franken GAC, Müller D, Mignot C, Keren B, Lévy J, Tabet AC, Germanaud D, Tejada MI, Kroes HY, Nivelstein RAJ, Brimble E, Ruzhnikov M, Claverie-Martin F, Szczepańska M, Čuk M, Latta F, Konrad M, Martínez-Cruz LA, Bindels RJM, Hoenderop JGJ, Schlingmann KP, de Baaij JHF. The phenotypic and genetic spectrum of patients with heterozygous mutations in cyclin M2 (CNNM2). *Hum Mutat*. 2021 Apr;42(4):473-486. doi: 10.1002/humu.24182.

Franz MJ, Boucher JL, Rutten-Ramos S, VanWormer JJ. Lifestyle weight-loss intervention outcomes in overweight and obese adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Acad Nutr Diet*. 2015 Sep;115(9):1447-63. doi: 10.1016/j.jand.2015.02.031.

Franz MJ, VanWormer JJ, Crain AL, Boucher JL, Histon T, Caplan W, Bowman JD, Pronk NP. Weight-loss outcomes: a systematic review and meta-analysis of weight-loss clinical trials with a minimum 1-year follow-up. *J Am Diet Assoc*. 2007 Oct;107(10):1755-67. doi: 10.1016/j.jada.2007.07.017.

Fraser H.B, Lam LL, Neumann SM, Kobor MS. Population-Specificity of Human DNA Methylation. *Genome Biol* 2012, 13, R8, doi:10.1186/gb-2012-13-2-r8.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007 May 11;316(5826):889-94.

Frazier JA, Biederman J, Bellordre CA, Garfield SB, Geller DA, Coffey BJ, Faraone SV. Should the diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder be considered in children with pervasive developmental disorder? *J Atten Disord*. 2001;4:203–211. doi: 10.1177/108705470100400402.

Frei A, Senn O, Chmiel C, Reissner J, Held U, Rosemann T. Implementation of the chronic care model in small medical practices improves cardiovascular risk but not glycemic control. *Diabetes Care*. 2014 Apr;37(4):1039-47. doi: 10.2337/dc13-1429.

Friese M, Hofmann W. Control me or I will control you: Impulses, trait self-control, and the guidance of behavior. *J Res. Personal*. 2009, 43, 795–805. doi: 10.1016/j.jrp.2009.07.004

Friso S, Pizzolo F, Choi SW, Guarini P, Castagna A, Ravagnani V, Carletto A, Pattini P, Corrocher R, Olivieri O. Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension. *Atherosclerosis*. 2008 Aug;199(2):323-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.029.

Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton KJ, Ma C, Fontanillas P, Moutsianas L, McCarthy DJ, Rivas MA, Perry JRB, Sim X, Blackwell TW, Robertson NR, Rayner NW, Cingolani P, Locke AE, Tajos JF, Highland HM, Dupuis J, Chines PS, Lindgren CM, Hartl C, Jackson AU, Chen H, Huyghe JR, van de Bunt M, Pearson RD, Kumar A, Müller-Nurasyid M, Grarup N, Stringham HM, Gamazon ER, Lee J, Chen Y, Scott RA, Below JE, Chen P, Huang J, Go MJ, Stitzel ML, Pasko D, Parker SCJ, Varga TV, Green T, Beer NL, Day-Williams AG, Ferreira T, Fingerlin T, Horikoshi M, Hu C, Huh I, Ikram MK, Kim BJ, Kim Y, Kim YJ, Kwon MS, Lee J, Lee S, Lin KH, Maxwell TJ, Nagai Y, Wang X,

Welch RP, Yoon J, Zhang W, Barzilai N, Voight BF, Han BG, Jenkinson CP, Kuulasmaa T, Kuusisto J, Manning A, Ng MCY, Palmer ND, Balkau B, Stančáková A, Abboud HE, Boeing H, Giedraitis V, Prabhakaran D, Gottesman O, Scott J, Carey J, Kwan P, Grant G, Smith JD, Neale BM, Purcell S, Butterworth AS, Howson JMM, Lee HM, Lu Y, Kwak SH, Zhao W, Danesh J, Lam VKL, Park KS, Saleheen D, So WY, Tam CHT, Afzal U, Aguilar D, Arya R, Aung T, Chan E, Navarro C, Cheng CY, Palli D, Correa A, Curran JE, Rybin D, Farook VS, Fowler SP, Freedman BI, Griswold M, Hale DE, Hicks PJ, Khor CC, Kumar S, Lehne B, Thuillier D, Lim WY, Liu J, van der Schouw YT, Loh M, Musani SK, Puppala S, Scott WR, Yengo L, Tan ST, Taylor HA Jr, Thameem F, Wilson G Sr, Wong TY, Njølstad PR, Levy JC, Mangino M, Bonnycastle LL, Schwarzmayr T, Fadista J, Surdulescu GL, Herder C, Groves CJ, Wieland T, Bork-Jensen J, Brandslund I, Christensen C, Koistinen HA, Doney ASF, Kinnunen L, Esko T, Farmer AJ, Hakaste L, Hodgkiss D, Kravic J, Lyssenko V, Hollensted M, Jørgensen ME, Jørgensen T, Ladenvall C, Justesen JM, Käräjämäki A, Kriebel J, Rathmann W, Lannfelt L, Lauritzen T, Narisu N, Linneberg A, Melander O, Milani L, Neville M, Orho-Melander M, Qi L, Qi Q, Roden M, Rolandsson O, Swift A, Rosengren AH, Stirrups K, Wood AR, Mihailov E, Blancher C, Carneiro MO, Maguire J, Poplin R, Shakir K, Fennell T, DePristo M, de Angelis MH, Deloukas P, Gjesing AP, Jun G, Nilsson P, Murphy J, Onofrio R, Thorand B, Hansen T, Meisinger C, Hu FB, Isomaa B, Karpe F, Liang L, Peters A, Huth C, O'Rahilly SP, Palmer CNA, Pedersen O, Rauramaa R, Tuomilehto J, Salomaa V, Watanabe RM, Syvänen AC, Bergman RN, Bharadwaj D, Bottinger EP, Cho YS, Chandak GR, Chan JCN, Chia KS, Daly MJ, Ebrahim SB, Langenberg C, Elliott P, Jablonski KA, Lehman DM, Jia W, Ma RCW, Pollin TI, Sandhu M, Tandon N, Froguel P, Barroso I, Teo YY, Zeggini E, Loos RJF, Small KS, Ried JS, DeFronzo RA, Grallert H, Glaser B, Metspalu A, Wareham NJ, Walker M, Banks E, Gieger C, Ingelsson E, Im HK, Illig T, Franks PW, Buck G, Trakalo J, Buck D, Prokopenko I, Mägi R, Lind L, Farjoun Y, Owen KR, Gloyn AL, Strauch K, Tuomi T, Kooner JS, Lee JY, Park T, Donnelly P, Morris AD, Hattersley AT, Bowden DW, Collins FS, Atzmon G, Chambers JC, Spector TD, Laakso M, Strom TM, Bell GI, Blangero J, Duggirala R, Tai ES, McVean G, Hanis CL, Wilson JG, Seielstad M, Frayling TM, Meigs JB, Cox NJ, Sladek R, Lander ES, Gabriel S, Burt NP, Mohlke KL, Meitinger T, Groop L, Abecasis G, Florez JC, Scott LJ, Morris AP, Kang HM, Boehnke M, Altshuler D, McCarthy MI. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016 Aug 4;536(7614):41-47. doi: 10.1038/nature18642.

Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011 Jan 27;469(7331):543-7. doi: 10.1038/nature09646.

Funato H, Tsai AL, Willie JT, Kisanuki Y, Williams SC, Sakurai T, Yanagisawa M. Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metab*. 2009 Jan 7;9(1):64-76. doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.010.

Fundación Dieta Mediterránea. Dieta Mediterránea, Avances en Alimentación, Nutrición y Dietética. 2015. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (SEDCA). Visto en 4 enero de 2021 en <https://nutricion.org/wp-content/uploads/2019/04/Dieta-Mediterranea-Avances-2014.pdf>

Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*. 2009 Mar 3;119(8):1093-100. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816736.

Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446-50. doi: 10.1038/nature12721.

Gaillard D, Barlow LA. A Mechanistic Overview of Taste Bud Maintenance and Impairment in Cancer Therapies, *Chemical Senses*, Volume 46, 2021, bjab011, doi: 10.1093/chemse/bjab011.

Gaine ME, Chatterjee S, Abel T. Sleep Deprivation and the Epigenome. *Front Neural Circuits*. 2018 Feb 27;12:14. doi: 10.3389/fncir.2018.00014.

Galloza J, Castillo B, Micheo W. Benefits of Exercise in the Older Population. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2017 Nov;28(4):659-669. doi: 10.1016/j.pmr.2017.06.001.

Gallstone Disease: Diagnosis and Management of Cholelithiasis, Cholecystitis and Choledocholithiasis. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2014 Oct.

Gao M, Jebb SA, Aveyard P, Ambrosini GL, Perez-Cornago A, Carter J, Sun X, Piernas C. Associations between dietary patterns and the incidence of total and fatal cardiovascular disease and all-cause mortality in 116,806 individuals from the UK Biobank: a prospective cohort study. *BMC Med*. 2021 Apr 22;19(1):83. doi: 10.1186/s12916-021-01958-x.

Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, Nieman DC, Swain DP; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Jul;43(7):1334-59. doi: 10.1249/MSS.0b013e318213febf.

Garcia-Arellano A, Martínez-González MA, Ramallal R, Salas-Salvado J, Hébert JR, Corella D, Shivappa N, Forga L, Schröder H, Muñoz-Bravo C, Estruch R, Fiol M, Lapetra J, Serra-Majem L, Ros E, Rekondo J, Toledo E, Razquin C, Ruiz-Canela M; SUN and PREDIMED Study Investigators. Dietary inflammatory index and all-cause mortality in large cohorts: The SUN and PREDIMED studies. *Clin Nutr*. 2019 Jun;38(3):1221-1231. doi: 10.1016/j.clnu.2018.05.003.

Garcia-Bailo B, Toguri C, Eny KM, El-Sohehy A. Genetic variation in taste and its influence on food selection. *OMICS*. 2009 Feb;13(1):69-80. doi: 10.1089/omi.2008.0031.

García-García E, Vázquez López MA, Galera Martínez R, Alias E, Martín González MA, Bonillo Perales A. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes de 2 a 16 años. *Endocrinol Nutric*. 2013;60:121-6. doi:10.1016/j.endonu.2012.09.014

Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*. 2018 May 7;9:890. doi: 10.3389/fmicb.2018.00890.

García-Marchena N, Ladrón de Guevara-Miranda D, Pedraz M, Araos PF, Rubio G, Ruiz JJ, Pavón FJ, Serrano A, Castilla-Ortega E, Santín LJ, Rodríguez de Fonseca F. Higher Impulsivity As a Distinctive Trait of Severe Cocaine Addiction among Individuals Treated for Cocaine or Alcohol Use Disorders. *Front Psychiatry*. 2018 Feb 13;9:26. doi: 10.3389/fpsy.2018.00026.

Gareau MG. Cognitive Function and the Microbiome. *Int Rev Neurobiol*. 2016;131:227-246. doi: 10.1016/bs.im.2016.08.001.

Garland R. The Mid-Point on a Rating Scale: Is it Desirable? *Mark. Bull*. 1991;2:66-70.

Gast KB, Tjeerdema N, Stijnen T, Smit JW, Dekkers OM. Insulin resistance and risk of incident cardiovascular events in adults without diabetes: meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(12):e52036. doi: 10.1371/journal.pone.0052036.

Gaudet P, Logie C, Lovering RC, Kuiper M, Lægreid A, Thomas PD. Gene Ontology representation for transcription factor functions. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2021 Nov-Dec;1864(11-12):194752. doi: 10.1016/j.bbarm.2021.194752.

GBD 2016 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2016: a systematic

analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017 Sep 16;390(10100):1345-1422. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32366-8.

Ge L, Sadeghirad B, Ball GDC, da Costa BR, Hitchcock CL, Svendrovski A, Kiflen R, Quadri K, Kwon HY, Karamouzian M, Adams-Webber T, Ahmed W, Damanhoury S, Zeraatkar D, Nikolakopoulou A, Tsuyuki RT, Tian J, Yang K, Guyatt GH, Johnston BC. Comparison of dietary macronutrient patterns of 14 popular named dietary programmes for weight and cardiovascular risk factor reduction in adults: systematic review and network meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 2020 Apr 1;369:m696. doi: 10.1136/bmj.m696.

Gearhardt AN, Corbin WR, Brownell KD. Preliminary validation of the Yale Food Addiction Scale. *Appetite*. 2009 Apr;52(2):430-6. doi: 10.1016/j.appet.2008.12.003.

Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D1049-56. doi: 10.1093/nar/gku1179.

Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D330-D338. doi: 10.1093/nar/gky1055.

Genick UK, Kutalik Z, Ledda M, Destito MC, Souza MM, Cirillo CA, Godinot N, Martin N, Morya E, Sameshima K, Bergmann S, le Coutre J. Sensitivity of genome-wide-association signals to phenotyping strategy: the PROP-TAS2R38 taste association as a benchmark. *PLoS One*. 2011;6(11):e27745. doi: 10.1371/journal.pone.0027745..

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):718-23. doi: 10.1038/19546.

Gervis J, Coltell O, Fernández-Carrión R, Asensio E, Barragán R, Corella D, Lichtenstein A. Association of Taste Perception for Sweet, Salt, Sour, Bitter and Umami and Food Intake Among Community-dwelling Adults in the PREDIMED-PLUS Trial (P18-065-19). *Curr Dev Nutr*. 2019 Jun 13;3(Suppl 1):nzz039.P18-065-19. doi: 10.1093/cdn/nzz039.P18-065-19.

Gervis JE, Chui KKH, Ma J, Coltell O, Fernández-Carrión R, Sorlí JV, Barragán R, Fitó M, González JJ, Corella D, Lichtenstein AH. Data-Driven Clustering Approach to Derive Taste Perception Profiles from Sweet, Salt, Sour, Bitter, and Umami Perception Scores: An Illustration among Older Adults with Metabolic Syndrome. *J Nutr*. 2021 Sep 4;151(9):2843-2851. doi: 10.1093/jn/nxab160.

Gervis, JE; Coltell, O; Fernández-Carrión, R; Asensio, EM; Barragán, R; Corella D; Lichtenstein, AH. Association of Taste Perception for Sweet, Salt, Sour, Bitter and Umami with Fruit and Vegetable Intake Among Community-dwelling Men and Women in the PREDIMED-PLUS Trial: Abstract MP42. *Circulation*, 2019, 139, Suppl_1, American Heart Association. doi: 10.1161/circ.139.suppl_1.MP42

Gery S, Tanosaki S, Hofmann WK, Koppel A, Koeffler HP. C/EBPdelta expression in a BCR-ABL-positive cell line induces growth arrest and myeloid differentiation. *Oncogene*. 2005;24(9):1589-97. doi: 10.1038/sj.onc.1208393.

Ghosh TS, Rampelli S, Jeffery IB, Santoro A, Neto M, Capri M, Giampieri E, Jennings A, Candela M, Turróni S, Zoetendal EG, Hermes GDA, Elodie C, Meunier N, Brugere CM, Pujos-Guillot E, Berendsen AM, De Groot LCPGM, Feskens EJ, Kaluza J, Pietruszka B, Bielak MJ, Comte B, Maijo-Ferre M, Nicoletti C, De Vos WM, Fairweather-Tait S, Cassidy A, Brigidi P, Franceschi C, O'Toole PW. Mediterranean diet intervention alters the gut microbiome in older people reducing frailty and improving health status: the NU-AGE 1-year dietary intervention across five European countries. *Gut*. 2020 Jul;69(7):1218-1228. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319654.

Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Faliva MA, Gerbi V, La Vecchia C, Negri E, Opizzi A, Perna S, Pezzotti M, Rondanelli M. Mediterranean Way of Drinking and Longevity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(4):635-40. doi: 10.1080/10408398.2012.747484.

Gianoudis J, Bailey CA, Daly RM. Associations between sedentary behaviour and body composition, muscle function and sarcopenia in community-dwelling older adults. *Osteoporos Int*. 2015 Feb;26(2):571-9. doi: 10.1007/s00198-014-2895-y.

Gibbs RA. The Human Genome Project Changed Everything. *Nat Rev Genet* 2020, 21, 575–576, doi:10.1038/s41576-020-0275-3.

Gillespie LD, Robertson MC, Gillespie WJ, Sherrington C, Gates S, Clemson LM, Lamb SE. Interventions for preventing falls in older people living in the community. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Sep 12;2012(9):CD007146. doi: 10.1002/14651858.CD007146.pub3.

Gimenez-Alba IM, Sorlí JV, Fernandez-Carrión R, Pascual EC, González-Monge I, Francés F, Álvarez-Sala A, Ortega-Azorín C, Guillem-Saiz P, Corella D, Coltell O. Epigenome-Wide Association Study Identifies Differentially Methylated Sites and Pathways Associated with Antidiabetic Drugs in Subjects with Metabolic Syndrome. *Metabolism* 2021, 116, 154657, doi: 10.1016/j.metabol.2020.154657.

Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity* (Silver Spring). 2006 Feb;14 Suppl 1:41S-49S. doi: 10.1038/oby.2006.281.

Ginsburg GS, Phillips KA. Precision Medicine: From Science To Value. *Health Aff (Millwood)*. 2018 May;37(5):694-701. doi: 10.1377/hlthaff.2017.1624.

Ginter E, Kajaba I. Danger of very high HDL levels. *Bratisl Lek Listy*. 2017;118(6):319-320. doi: 10.4149/BLL_2017_061.

Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Aug 15;48(4):677-85. doi: 10.1016/j.jacc.2006.03.052.

Głąbska D, Guzek D, Groele B, Gutkowska K. Fruit and Vegetable Intake and Mental Health in Adults: A Systematic Review. *Nutrients*. 2020 Jan 1;12(1):115. doi: 10.3390/nu12010115.

Glavin EE, Ceneus M, Chanowitz M, Kantilierakis J, Mendelow E, Mosquera J, Spaeth AM. Relationships between sleep, exercise timing, and chronotype in young adults. *J Health Psychol*. 2021 Nov;26(13):2636-2647. doi: 10.1177/1359105320926530.

Glied JA, Schneider MJ, Evans MW, King J, Eubanks JE Jr. The biopsychosocial model and chiropractic: a commentary with recommendations for the chiropractic profession. *Chiropr Man Therap*. 2017 Jun 7;25:16. doi: 10.1186/s12998-017-0147-x.

Global Recommendations on Physical Activity for Health. Geneva: World Health Organization; 2010.

Goddard KAB, Lee K, Buchanan AH, Powell BC, Hunter JE. Establishing the Medical Actionability of Genomic Variants. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2022, 23, 173–192, doi:10.1146/annurev-genom-111021-032401.

Gohari A, Wiebe D, Ayas N. Shift working and cardiovascular health. *Chronobiol Int*. 2021 Jun 8;1-6. doi: 10.1080/07420528.2021.1933000.

Golden CJ. 1994. Stroop. Test de Colores y Palabras. Madrid: TEA ediciones.

Gómez-Martínez C, Babio N, Júlvez J, Nishi SK, Fernández-Aranda F, Martínez-González MÁ, Cuenca-Royo A, Fernández-Carrión R, Jiménez-Murcia S, de la Torre R, Pintó X, Bloemendaal M, Fitó M, Corella D, Arias A, Salas-Salvadó J. Impulsivity is longitudinally associated with healthy and unhealthy dietary patterns in individuals with overweight or obesity and metabolic syndrome within the framework of the PREDIMED-Plus trial. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2022 Aug 8;19(1):101. doi: 10.1186/s12966-022-01335-8.

Gondivkar SM, Indurkar A, Degwekar S, Bhawate R. Evaluation of gustatory function in patients with diabetes mellitus type 2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 108, 876–880. 10.1016/j.tripleo.2009.08.015.

Gonzalez A, Stombaugh J, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Gordon JI, Knight R. The mind-body-microbial continuum. *Dialogues Clin Neurosci.* 2011;13(1):55-62. doi: 10.31887/DCNS.2011.13.1/agonzalez.

Gonzalez-Jaramillo V, Portilla-Fernandez E, Glisic M, Voortman T, Bramer W, Chowdhury R, Roks AJM, Jan Danser AH, Muka T, Nano J, Franco OH. The role of DNA methylation and histone modifications in blood pressure: a systematic review. *J Hum Hypertens.* 2019 Oct;33(10):703-715. doi: 10.1038/s41371-019-0218-7.

Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018 Mar;6(3):223-236. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30200-0.

Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 28;19(3):686. doi: 10.3390/ijms19030686.

Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, Chun HB, Garner H, Geissmann F, Glass CK. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell.* 2014 Dec 4;159(6):1327-40. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.023.

Goyal MS, Venkatesh S, Milbrandt J, Gordon JI, Raichle ME. Feeding the brain and nurturing the mind: Linking nutrition and the gut microbiota to brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 17;112(46):14105-12. doi: 10.1073/pnas.1511465112.

Grau M, Elosua R, Cabrera de León A, Guembe MJ, Baena-Díez JM, Vega Alonso T, Javier Félix F, Zorrilla B, Rigo F, Lapetra J, Gavrilu D, Segura A, Sanz H, Fernández-Bergés D, Fitó M, Marrugat J. Cardiovascular risk factors in Spain in the first decade of the 21st Century, a pooled analysis with individual data from 11 population-based studies: the DARIOS study. *Rev Esp Cardiol.* 2011 Apr;64(4):295-304. doi: 10.1016/j.recesp.2010.11.005.

Grenham S, Clarke G, Cryan J, Dinan T. Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Front Physiol.* 2011;2:94. doi: 10.3389/fphys.2011.00094.

Grieshaber L, Graw S, Barnett MJ, Thornquist MD, Goodman GE, Chen C, Koestler DC, Marsit CJ, Doherty JA. AHRM Methylation in Heavy Smokers: Associations with Smoking, Lung Cancer Risk, and Lung Cancer Mortality. *BMC Cancer* 2020, 20, 905, doi:10.1186/s12885-020-07407-x.

Griffin JH, Fernández JA, Lyden PD, Zlokovic BV. Activated protein C promotes neuroprotection: mechanisms and translation to the clinic. *Thromb Res.* 2016 May;141 Suppl 2(Suppl 2):S62-4. doi: 10.1016/S0049-3848(16)30368-1.

Grigoriu-Serbanescu M, Diaconu CC, Heilmann-Heimbach S, Neagu AI, Becker T. Association of age-of-onset groups with GWAS significant schizophrenia and bipolar disorder loci in Romanian bipolar I patients. *Psychiatry Res.* 2015 Dec 30;230(3):964-7. doi: 10.1016/j.psychres.2015.11.008.

Grosso G, Marventano S, Yang J, Micek A, Pajak A, Scalfi L, Galvano F, Kales SN. A comprehensive meta-analysis on evidence of Mediterranean diet and cardiovascular disease: Are individual components equal? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 Oct 13;57(15):3218-3232. doi: 10.1080/10408398.2015.1107021.

Grundberg E, Meduri E, Sandling JK, Hedman AK, Keildson S, Buil A, Busche S, Yuan W, Nisbet J, Sekowska M, Wilk A, Barrett A, Small KS, Ge B, Caron M, Shin SY; Multiple Tissue Human Expression Resource Consortium; Lathrop M, Dermitzakis ET, McCarthy MI, Spector TD, Bell JT, Deloukas P. Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. *Am J Hum Genet*. 2013 Nov 7;93(5):876-90. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.004.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2735-52. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404.

Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, Braun LT, de Ferranti S, Faiella-Tommasino J, Forman DE, Goldberg R, Heidenreich PA, Hlatky MA, Jones DW, Lloyd-Jones D, Lopez-Pajares N, Ndumele CE, Orringer CE, Peralta CA, Saseen JJ, Smith SC Jr, Sperling L, Virani SS, Yeboah J. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 Jun 18;139(25):e1082-e1143. doi: 10.1161/CIR.0000000000000625.

Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc. Med*. 2016;26:364–373. doi: 10.1016/j.tcm.2015.10.004.

Gruppen EG, Kunutsor SK, Kieneker LM, van der Vegt B, Connelly MA, de Bock GH, Gansevoort RT, Bakker SJL, Dullaart RPF. GlycA, a novel pro-inflammatory glycoprotein biomarker is associated with mortality: results from the PREVEND study and meta-analysis. *J Intern Med*. 2019 Nov;286(5):596-609. doi: 10.1111/joim.12953.

Guallar-Castillón P, Pérez RF, López García E, León-Muñoz LM, Aguilera MT, Graciani A, Gutiérrez-Fisac JL, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Magnitud y manejo del síndrome metabólico en España en 2008-2010: Estudio ENRICA. *Revista Española de Cardiología* 2014, 67, 367–373, doi:10.1016/j.recesp.2013.08.014.

Guan Q, Hu X, Ma N, He H, Duan F, Li X, Luo Y, Zhang H. Sleep Quality, Depression, and Cognitive Function in Non-Demented Older Adults. *J Alzheimers Dis*. 2020;76(4):1637-1650. doi: 10.3233/JAD-190990.

Guarisco G, Leonetti F. Covid-19 and diabetes: when a pandemic cross another pandemic. *Eat Weight Disord*. 2021 Jun;26(5):1283-1286. doi: 10.1007/s40519-020-00958-9.

Guasch-Ferré M, Merino J, Sun Q, Fitó M, Salas-Salvado J. Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6723931. doi: 10.1155/2017/6723931.

Guay SP, Légaré C, Houde AA, Mathieu P, Bossé Y, Bouchard L. Acetylsalicylic acid, aging and coronary artery disease are associated with ABCA1 DNA methylation in men. *Clin Epigenetics*. 2014 Jul 29;6(1):14. doi: 10.1186/1868-7083-6-14.

Gubatan J, Boye TL, Temby M, Sojwal RS, Holman DR, Sinha SR, Rogalla SR, Nielsen OH. Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Role in Pathogenesis, Dietary Modulation, and Colitis-Associated Colon Cancer. *Microorganisms*. 2022 Jul 7;10(7):1371. doi: 10.3390/microorganisms10071371.

Guerrieri R, Nederkoorn C, Jansen A. The interaction between impulsivity and a varied food environment: its influence on food intake and overweight. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Apr;32(4):708-14. doi: 10.1038/sj.ijo.0803770.

Guerrieri R, Nederkoorn C, Schrooten M, Martijn C, Jansen A. Inducing impulsivity leads high and low restrained eaters into overeating, whereas current dieters stick to their diet. *Appetite*. 2009 Aug;53(1):93-100. doi: 10.1016/j.appet.2009.05.013.

Gündogan K, Bayram F, Capak M, Tanriverdi F, Karaman A, Ozturk A, Altunbas H, Gökce C, Kalkan A, Yazici C. Prevalence of metabolic syndrome in the Mediterranean region of Turkey: evaluation of hypertension, diabetes mellitus, obesity, and dyslipidemia. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009 Oct;7(5):427-34. doi: 10.1089/met.2008.0068.

Guo FX, Wu Q, Li P, Zheng L, Ye S, Dai XY, Kang CM, Lu JB, Xu BM, Xu YJ, Xiao L, Lu ZF, Bai HL, Hu YW, Wang Q. The role of the LncRNA-FA2H-2-MLKL pathway in atherosclerosis by regulation of autophagy flux and inflammation through mTOR-dependent signaling. *Cell Death Differ*. 2019 Sep;26(9):1670-1687. doi: 10.1038/s41418-018-0235-z.

Guo SS, Wu W, Chumlea WC, Roche AF. Predicting overweight and obesity in adulthood from body mass index values in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr*. 2002 Sep;76(3):653-8. doi: 10.1093/ajcn/76.3.653.

Gusmão WDP, Pureza IROM, Moreno CRC. Shift Work and Early Arterial Stiffness: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Nov 6;19(21):14569. doi: 10.3390/ijerph192114569.

Gustafsson J. Metabolic syndrome in children. *Acta Paediatr*. 2019 Mar;108(3):394-395. doi: 10.1111/apa.14677.

Gutierrez R, Fonseca E, Simon SA. The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. *Cell. Mol. Life Sci*. 2020, 77, 3469–3502.

Haenig C, Atias N, Taylor AK, Mazza A, Schaefer MH, Russ J, Riechers SP, Jain S, Coughlin M, Fontaine JF, Freibaum BD, Brusendorf L, Zenkner M, Porras P, Stroedicke M, Schnoegl S, Arnsburg K, Boeddrich A, Pigazzini L, Heutink P, Taylor JP, Kirstein J, Andrade-Navarro MA, Sharan R, Wanker EE. Interactome Mapping Provides a Network of Neurodegenerative Disease Proteins and Uncovers Widespread Protein Aggregation in Affected Brains. *Cell Rep*. 2020 Aug 18;32(7):108050. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108050.

Halfon N, Larson K, Slusser W. Associations between obesity and comorbid mental health, developmental, and physical health conditions in a nationally representative sample of US children aged 10 to 17. *Acad Pediatr*. 2013 Jan-Feb;13(1):6-13. doi: 10.1016/j.acap.2012.10.007.

Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011 Dec;32(23):2999-3054. doi: 10.1093/eurheartj/ehr236.

Han SH, Chul Youn Y. Quantitative electroencephalography changes in patients with mild cognitive impairment after choline alphoscerate administration. *J Clin Neurosci*. 2022 Aug;102:42-48. doi: 10.1016/j.jocn.2022.06.006.

Hanafi MY, Abdelkhalek TM, Saad MI, Saleh MM, Haiba MM, Kamel MA. Diabetes-induced perturbations are subject to intergenerational transmission through maternal line. *J Physiol Biochem*. 2016 Jun;72(2):315-26. doi: 10.1007/s13105-016-0483-7.

Hancock ML, Meyer RC, Mistry M, Khetani RS, Wagschal A, Shin T, Ho Sui SJ, Näär AM, Flanagan JG. Insulin Receptor Associates with Promoters Genome-wide and Regulates Gene Expression. *Cell*. 2019 Apr 18;177(3):722-736.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.030. Epub 2019 Apr 4.

Hannon BA, Khan NA, Teran-Garcia M. Nutrigenetic Contributions to Dyslipidemia: A Focus on Physiologically Relevant Pathways of Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Nutrients*. 2018 Oct 2;10(10). pii: E1404. doi: 10.3390/nu10101404.

Harlid S, Xu Z, Panduri V, Sandler DP, Taylor JA. CpG Sites Associated with Cigarette Smoking: Analysis of Epigenome-Wide Data from the Sister Study. *Environ Health Perspect* 2014, 122, 673–678, doi:10.1289/ehp.1307480.

Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Quintana-Navarro GM, Tinahones FJ, Landa BB, López-Miranda J, Camargo A, Pérez-Jiménez F. Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Jan;101(1):233-42. doi: 10.1210/jc.2015-3351.

Harriden B, D'Cunha NM, Kellett J, Isbel S, Panagiotakos DB, Naumovski N. Are dietary patterns becoming more processed? The effects of different dietary patterns on cognition: A review. *Nutr Health*. 2022 Sep;28(3):341-356. doi: 10.1177/02601060221094129.

Hashimoto K. Gut-microbiota-brain axis by bile acids in depression. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2022 Jul;76(7):281. doi: 10.1111/pcn.13370.

Haskell WL. Cardiovascular disease prevention and lifestyle interventions: effectiveness and efficacy. *J Cardiovasc Nurs*. 2003 Sep-Oct;18(4):245-55. doi: 10.1097/00005082-200309000-00003.

Hattori J, Ogino T, Abiru K, Nakano K, Oka M, Ohtsuka Y. Are pervasive developmental disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder distinct disorders? *Brain Dev*. 2006 Jul;28(6):371-4. doi: 10.1016/j.braindev.2005.11.009.

Hauck C, Cook B, Ellrott T. Food addiction, eating addiction and eating disorders. *Proc Nutr Soc*. 2020 Feb;79(1):103-112. doi: 10.1017/S0029665119001162.

Hayashi K, Longenecker KL, Koenig P, Prashar A, Hampf J, Stoll V, Vivona S. Structure of human DPEP3 in complex with the SC-003 antibody Fab fragment reveals basis for lack of dipeptidase activity. *J Struct Biol*. 2020 Jul 1;211(1):107512. doi: 10.1016/j.jsb.2020.107512.

Heianza Y, Sun D, Smith SR, Bray GA, Sacks FM, Qi L. Changes in Gut Microbiota-Related Metabolites and Long-term Successful Weight Loss in Response to Weight-Loss Diets: The POUNDS Lost Trial. *Diabetes Care*. 2018 Mar;41(3):413-419. doi: 10.2337/dc17-2108.

Hellmuth C, Demmelmair H, Schmitt I, Peissner W, Blüher M, Koletzko B. Association between plasma nonesterified fatty acids species and adipose tissue fatty acid composition. *PLoS One*. 2013 Oct 2;8(10):e74927. doi: 10.1371/journal.pone.0074927.

Hendriks WJAJ, Pulido R. Protein tyrosine phosphatase variants in human hereditary disorders and disease susceptibilities. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832, 1673–1696. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.05.022.

Hernsdorff HH, Mansego ML, Campión J, Milagro FI, Zulet MA, Martínez JA. TNF- α promoter methylation in peripheral white blood cells: relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine*. 2013 Oct;64(1):265-71. doi: 10.1016/j.cyto.2013.05.028.

Hershberger AR, Um M, Cyders MA. The relationship between the UPPS-P impulsive personality traits and substance use psychotherapy outcomes: A meta-analysis. *Drug Alcohol Depend*. 2017 Sep 1;178:408-416. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2017.05.032.

Hidalgo B, Irvin MR, Sha J, Zhi D, Aslibekyan S, Absher D, Tiwari HK, Kabagambe EK, Ordovas JM, Arnett DK. Epigenome-wide association study of fasting measures of glucose, insulin, and HOMA-IR in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network study. *Diabetes*. 2014 Feb;63(2):801-7. doi: 10.2337/db13-1100.

Hidalgo-Mora JJ, García-Vigara A, Sánchez-Sánchez ML, García-Pérez MÁ, Tarín J, Cano A. The Mediterranean diet: A historical perspective on food for health. *Maturitas*. 2020 Feb;132:65-69. doi: 10.1016/j.maturitas.2019.12.002.

Hill AP, Zuckerman KE, Fombonne E. Obesity and Autism. *Pediatrics*. 2015 Dec;136(6):1051-61. doi: 10.1542/peds.2015-1437.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003 Feb 13;348(7):593-600. doi: 10.1056/NEJMoa022287.

Hill MA, Yang Y, Zhang L, Sun Z, Jia G, Parrish AR, Sowers JR. Insulin resistance, cardiovascular stiffening and cardiovascular disease. *Metabolism*. 2021 Jun;119:154766. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154766.

Hjort L, Jørgensen SW, Gillberg L, Hall E, Brøns C, Frystyk J, Vaag AA, Ling C. 36 h fasting of young men influences adipose tissue DNA methylation of LEP and ADIPOQ in a birth weight-dependent manner. *Clin Epigenetics*. 2017 Apr 21;9:40. doi: 10.1186/s13148-017-0340-8.

Hjorth MF, Christensen L, Kjølbaek L, Larsen LH, Roager HM, Kiilerich P, Kristiansen, K, Astrup, A. Pretreatment Prevotella-to-Bacteroides ratio and markers of glucose metabolism as prognostic markers for dietary weight loss maintenance. *Eur J Clin Nutr (Internet)*. 2020;74(2):338–47. doi: 10.1038/s41430-019-0466-1

Hjorth MF, Roager HM, Larsen TM, Poulsen SK, Licht TR, Bahl MI, Zohar Y, Astrup A. Pre-treatment microbial Prevotella-to-Bacteroides ratio, determines body fat loss success during a 6-month randomized controlled diet intervention. *Int J Obes (Lond)*. 2018 Mar;42(3):580-583. doi: 10.1038/ijo.2017.220.

Ho EV, Klenotich SJ, McMurray MS, Dulawa SC. Activity-based anorexia alters the expression of BDNF transcripts in the mesocorticolimbic reward circuit. *PLoS one*. 2016;11(11).

Hoffman HJ, Rawal S, Li CM, Duffy VB. New chemosensory component in the U.S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES): first-year results for measured olfactory dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016 Jun;17(2):221-40. doi: 10.1007/s11154-016-9364-1.

Holdcroft A. Integrating the dimensions of sex and gender into basic life sciences research: methodologic and ethical issues. *Gend Med*. 2007;4 Suppl B:S64-74. doi: 10.1016/s1550-8579(07)80048-9.

Holland WL, Knotts TA, Chavez JA, Wang LP, Hoehn KL, Summers SA. Lipid mediators of insulin resistance. *Nutr Rev*. 2007 Jun;65(6 Pt 2):S39-46. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00327.x.

Hollman G, Kristenson M. The prevalence of the metabolic syndrome and its risk factors in a middle-aged Swedish population--mainly a function of overweight? *Eur J Cardiovasc Nurs*. 2008 Mar;7(1):21-6. doi: 10.1016/j.ejcnurse.2007.05.003. Epub 2007 Jun 22. PMID: 17586094.

Holtmann M, Bölte S, Poustka F. Attention deficit hyperactivity disorder symptoms in pervasive developmental disorders: association with autistic behavior domains and coexisting psychopathology. *Psychopathology*. 2007;40:172-177. doi: 10.1159/000100007.

Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, Goodpaster B, Harris TB. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes*. 2004;53:1068-1073. doi: 10.2337/diabetes.53.4.1068.

Horsthemke B. A critical appraisal of clinical epigenetics. *Clin Epigenetics*. 2022 Jul 28;14(1):95. doi: 10.1186/s13148-022-01315-6.

Horstmann A, Kovacs P, Kabisch S, Boettcher Y, Schloegl H, Tönjes A, Stumvoll M, Pleger B, Villringer A. Common genetic variation near MC4R has a sex-specific impact on human brain structure and eating behavior. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e74362. doi: 10.1371/journal.pone.0074362.

Hosain GM, Berenson AB, Tennen H, Bauer LO, Wu ZH. Attention deficit hyperactivity symptoms and risky sexual behavior in young adult women. *J Womens Health (Larchmt)* 21, 463-468 (2012).

Hosseini Nasab N, Raza H, Shim RS, Hassan M, Kloczkowski A, Kim SJ. Potent Alkaline Phosphatase Inhibitors, Pyrazolo-Oxothiazolidines: Synthesis, Biological Evaluation, Molecular Docking, and Kinetic Studies. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 13262, doi:10.3390/ijms232113262.

Houde AA, Légaré C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, Tchernof A, Vohl MC, Hivert MF, Bouchard L. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med Genet*. 2015 May 1;16:29. doi: 10.1186/s12881-015-0174-1.

Hruby A, Ngwa JS, Renström F, Wojczynski MK, Ganna A, Hallmans G, Houston DK, Jacques PF, Kanoni S, Lehtimäki T, Lemaitre RN, Manichaikul A, North KE, Ntalla I, Sonestedt E, Tanaka T, van Rooij FJ, Bandinelli S, Djoussé L, Grigoriou E, Johansson I, Lohman KK, Pankow JS, Raitakari OT, Riserus U, Yannakoulia M, Zillikens MC, Hassanali N, Liu Y, Mozaffarian D, Papoutsakis C, Syvänen AC, Uitterlinden AG, Viikari J, Groves CJ, Hofman A, Lind L, McCarthy ML, Mikkilä V, Mukamal K, Franco OH, Borecki IB, Cupples LA, Dedoussis GV, Ferrucci L, Hu FB, Ingelsson E, Kähönen M, Kao WH, Kritchevsky SB, Orho-Melander M, Prokopenko I, Rotter JJ, Siscovick DS, Witteman JC, Franks PW, Meigs JB, McKeown NM, Nettleton JA. Higher magnesium intake is associated with lower fasting glucose and insulin, with no evidence of interaction with select genetic loci, in a meta-analysis of 15 CHARGE Consortium Studies. *J Nutr*. 2013 Mar;143(3):345-53. doi: 10.3945/jn.112.172049.

Hsueh WA, Wyne K. Renin-Angiotensin-aldosterone system in diabetes and hypertension. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* 2011;13:224-237. doi: 10.1111/j.1751-7176.2011.00449.x.

Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJ, Zuker CS. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):934-8. doi: 10.1038/nature05084.

Huang R. Gut Microbiota: A Key Regulator in the Effects of Environmental Hazards on Modulates Insulin Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jan 17;11:800432. doi: 10.3389/fcimb.2021.800432.

- Huang T, Hu FB. Gene-environment interactions and obesity: recent developments and future directions. *BMC Med Genomics*. 2015;8 Suppl 1(Suppl 1):S2. doi: 10.1186/1755-8794-8-S1-S2.
- Hueston CM, Cryan JF, Nolan YM. Stress and adolescent hippocampal neurogenesis: diet and exercise as cognitive modulators. *Transl Psychiatry*. 2017 Apr 4;7(4):e1081. doi: 10.1038/tp.2017.48.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992 Mar;55(3):181-4. doi: 10.1136/jnnp.55.3.181.
- Hulls PM, de Vocht F, Bao Y, Relton CL, Martin RM, Richmond RC. DNA methylation signature of passive smoke exposure is less pronounced than active smoking: The Understanding Society study. *Environ Res*. 2020 Nov;190:109971. doi: 10.1016/j.envres.2020.109971.
- Hunt L, Nielsen MW, Schiebinger L. A framework for sex, gender, and diversity analysis in research. *Science*. 2022 Sep 30;377(6614):1492-1495. doi: 10.1126/science.abp9775.
- Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet*. 2005 Apr;6(4):287-98. doi: 10.1038/nrg1578.
- Hurtado-Barroso S, Martínez-Huélamo M, Rinaldi de Alvarenga JF, Quifer-Rada P, Vallverdú-Queralt A, Pérez-Fernández S, Lamuela-Raventós RM. Acute Effect of a Single Dose of Tomato Sofrito on Plasmatic Inflammatory Biomarkers in Healthy Men. *Nutrients*. 2019 Apr 15;11(4):851. doi: 10.3390/nu11040851.
- Hussain MM, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)*. 2012 Feb 21;9:14. doi: 10.1186/1743-7075-9-14.
- Huvenne H, Dubern B, Clément K, Poitou C. Rare Genetic Forms of Obesity: Clinical Approach and Current Treatments in 2016. *Obes Facts*. 2016;9(3):158-73. doi: 10.1159/000445061.
- Huypens P, Sass S, Wu M, Dyckhoff D, Tschöp M, Theis F, Marschall S, Hrabě de Angelis M, Beckers J. Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nat Genet*. 2016 May;48(5):497-9. doi: 10.1038/ng.3527.
- Hwang LD, Gharahkhani P, Breslin PAS, Gordon SD, Zhu G, Martin NG, Reed DR, Wright MJ. Bivariate genome-wide association analysis strengthens the role of bitter receptor clusters on chromosomes 7 and 12 in human bitter taste. *BMC Genom*. 2018, 19, 678.
- Hwang LD, Lin C, Gharahkhani P, Cuellar-Partida G, Ong JS, An J, Gordon SD, Zhu G, MacGregor S, Lawlor DA, Breslin PAS, Wright MJ, Martin NG, Reed DR. New insight into human sweet taste: a genome-wide association study of the perception and intake of sweet substances. *Am J Clin Nutr*. 2019 Jun 1;109(6):1724-1737. doi: 10.1093/ajcn/nqz043.
- Iacono WG, Malone SM, McGue M. Behavioral disinhibition and the development of early-onset addiction: common and specific influences. *Annu Rev Clin Psychol*. 2008;4:325-48. doi: 10.1146/annurev.clinpsy.4.022007.141157.
- Ikenaga M, Higaki Y, Saku K, Uehara Y. High-Density Lipoprotein Mimetics: a Therapeutic Tool for Atherosclerotic Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(4):385-94. doi: 10.5551/jat.33720.
- Inagaki T, Sakai J, Kajimura S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Aug;17(8):480-95. doi: 10.1038/nrm.2016.62. Epub 2016 Jun 2. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Aug;18(8):527.

Ingelsson E, McCarthy MI. Human Genetics of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: Past, Present, and Future. *Circ Genom Precis Med*. 2018 Jun;11(6):e002090. doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002090.

Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la Causa de Muerte Año 201. Notas de Prensa. 2019. Consultado en 5 de abril de 2020 en: https://www.ine.es/prensa/edcm_2018.pdf

Iqbal J, Al Qarni A, Hawwari A, Alghanem AF, Ahmed G. Metabolic Syndrome, Dyslipidemia and Regulation of Lipoprotein Metabolism. *Curr Diabetes Rev*. 2018;14(5):427-433. doi: 10.2174/1573399813666170705161039.

Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15;103(33):12569-74. doi: 10.1073/pnas.0602702103.

Islam MR, Trenholm J, Rahman A, Pervin J, Ekström EC, Rahman SM. Sociocultural Influences on Dietary Practices and Physical Activity Behaviors of Rural Adolescents-A Qualitative Exploration. *Nutrients* 2019, 11, 2916.

Jacobs DR Jr, Kromhout D. Education, diet, and incident cardiovascular disease: ecological interactions and conclusions. *Lancet Glob Health*. 2019 Jun;7(6):e684-e685. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30187-1.

Jacobsen SC, Brøns C, Bork-Jensen J, Ribel-Madsen R, Yang B, Lara E, Hall E, Calvanese V, Nilsson E, Jørgensen SW. Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*. 2012;55:3341–3349.

Jacobsen SC, Gillberg L, Bork-Jensen J, Ribel-Madsen R, Lara E, Calvanese V, Ling C, Fernandez AF, Fraga MF, Poulsen P. Young men with low birthweight exhibit decreased plasticity of genome-wide muscle DNA methylation by high-fat overfeeding. *Diabetologia*. 2014;57:1154–1158.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003 Mar;33 Suppl:245-54. doi: 10.1038/ng1089.

Jahandideh F, Wu J. Perspectives on the Potential Benefits of Antihypertensive Peptides towards Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):2192. Published 2020 Mar 22. doi:10.3390/ijms21062192

Jang JH, Kwon O, Moon SJ, Jeong YT. Recent Advances in Understanding Peripheral Taste Decoding I: 2010 to 2020. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2021 Jun;36(3):469-477. doi: 10.3803/EnM.2021.302.

Janikiewicz J, Szymański J, Malinska D, Patalas-Krawczyk P, Michalska B, Duszyński J, Giorgi C, Bonora M, Dobrzyn A, Wieckowski MR. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 28;9(3):332. doi: 10.1038/s41419-017-0105-5.

Jantaratnotai N, Mosikanon K, Lee Y, McIntyre RS. The interface of depression and obesity. *Obes Res Clin Pract*. 2017 Jan-Feb;11(1):1-10. doi: 10.1016/j.orcp.2016.07.003. Epub 2016 Aug 4.

Javadi S, Farooq T, Rehman Z, Afzal A, Ashraf W, Rasool MF, Alqahtani F, Alsanea S, Alasmari F, Alanazi MM, Alharbi M, Imran I. Dynamics of Choline-Containing Phospholipids in Traumatic Brain Injury and Associated Comorbidities. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 20;22(21):11313. doi: 10.3390/ijms222111313.

Jayasinghe SN, Kruger R, Walsh DCI, Cao G, Rivers S, Richter M, Breier BH. Is Sweet Taste Perception Associated with Sweet Food Liking and Intake? *Nutrients*. 2017 Jul 14;9(7):750. doi: 10.3390/nu9070750.

Jelenkovic A, Bogl LH, Rose RJ, Kangas AJ, Soininen P, Ala-Korpela M, Kaprio J, Silventoinen K. Association between serum fatty acids and lipoprotein subclass profile in healthy young adults: exploring common genetic and environmental factors. *Atherosclerosis*. 2014 Apr;233(2):394-402. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.053.

Jenkins D, Sievenpiper J, Jones P. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med*. 2018 Oct 4;379(14):1387-8. doi: 10.1056/NEJMc1809971.

Jentsch JD, Pennington ZT. Reward, interrupted: Inhibitory control and its relevance to addictions. *Neuropharmacology*. 2014 Jan;76 Pt B(0 0):479-86. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.022.

Jian C, Silvestre MP, Middleton D, Korpela K, Jalo E, Broderick D, de Vos WM, Fogelholm M, Taylor MW, Raben A, Poppitt S, Salonen A. Gut microbiota predicts body fat change following a low-energy diet: a PREVIEW intervention study. *Genome Med*. 2022 May 23;14(1):54. doi: 10.1186/s13073-022-01053-7.

Jiménez Boraita R, Arriscado Alsina D, Gargallo Ibort E, Dalmau Torres JM. Factors associated with adherence to a Mediterranean diet in adolescents from the northern region of Spain. *Br J Nutr*. 2020 Sep 28;119. doi: 10.1017/S0007114520003803.

Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis*. 2018 Jan 31;5(1):1-8. doi: 10.1016/j.gendis.2018.01.002.

Joehanes R, Just AC, Marioni RE, Pilling LC, Reynolds LM, Mandaviya PR, Guan W, Xu T, Elks CE, Aslibekyan S, Moreno-Macias H, Smith JA, Brody JA, Dhingra R, Yousefi P, Pankow JS, Kunze S, Shah SH, McRae AF, Lohman K, Sha J, Absher DM, Ferrucci L, Zhao W, Demerath EW, Bressler J, Grove ML, Huan T, Liu C, Mendelson MM, Yao C, Kiel DP, Peters A, Wang-Sattler R, Visscher PM, Wray NR, Starr JM, Ding J, Rodriguez CJ, Wareham NJ, Irvin MR, Zhi D, Barrdahl M, Vineis P, Ambatipudi S, Uitterlinden AG, Hofman A, Schwartz J, Colicino E, Hou L, Vokonas PS, Hernandez DG, Singleton AB, Bandinelli S, Turner ST, Ware EB, Smith AK, Klengel T, Binder EB, Psaty BM, Taylor KD, Gharib SA, Swenson BR, Liang L, DeMeo DL, O'Connor GT, Herceg Z, Ressler KJ, Conneely KN, Sotoodehnia N, Kardina SL, Melzer D, Baccarelli AA, van Meurs JB, Romieu I, Arnett DK, Ong KK, Liu Y, Waldenberger M, Deary IJ, Fornage M, Levy D, London SJ. Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016 Oct;9(5):436-447. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001506.

Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, Kennedy BA, Hassell RG, Visser ME, Schwartz SM, Voight BF, Elosua R, Salomaa V, O'Donnell CJ, Dallong-Thie GM, Anand SS, Yusuf S, Huff MW, Kathiresan S, Cao H, Hegele RA. An increased burden of common and rare lipid-associated risk alleles contributes to the phenotypic spectrum of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Aug;31(8):1916-26. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.226365.

Johansson LE, Danielsson AP, Parikh H, Klintenberg M, Norström F, Groop L, Ridderstråle M. Differential gene expression in adipose tissue from obese human subjects during weight loss and weight maintenance. *Am J Clin Nutr*. 2012 Jul;96(1):196-207. doi: 10.3945/ajcn.111.020578.

John GK, Mullin GE. The Gut Microbiome and Obesity. *Curr Oncol Rep (Internet)*. 2016;18(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11912-016-0528-7>

Johnston BC, Kanters S, Bandayrel K, Wu P, Naji F, Siemieniuk RA, Ball GD, Busse JW, Thorlund K, Guyatt G, Jansen JP, Mills EJ. Comparison of weight loss among named diet programs in overweight and obese adults: a meta-analysis. *JAMA*. 2014 Sep 3;312(9):923-33. doi: 10.1001/jama.2014.10397.

Joseph PV, Reed DR, Mennella JA. Individual Differences Among Children in Sucrose Detection Thresholds: Relationship With Age, Gender, and Bitter Taste Genotype. *Nurs Res*. 2016 Jan-Feb;65(1):3-12. doi: 10.1097/NNR.0000000000000138.

Juanola-Falgarona M, Salas-Salvadó J, Estruch R, Portillo MP, Casas R, Miranda J, Martínez-González MA, Bulló M. Association between dietary phyloquinone intake and peripheral metabolic risk markers related to insulin resistance and diabetes in elderly subjects at high cardiovascular risk. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Jan 8;12:7. doi: 10.1186/1475-2840-12-7.

Kalenik A, Kardaś K, Rahnama A, Sirojć K, Wolańczyk T. Gut microbiota and probiotic therapy in ADHD: A review of current knowledge. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021 Aug 30;110:110277. doi: 10.1016/j.pnpbp.2021.110277.

Kamphuis, C.B.M.; de Bekker-Grob, E.W.; van Lenthe, F.J. Factors affecting food choices of older adults from high and low socioeconomic groups: A discrete choice experiment. *Am. J. Clin. Nutr*. 2015, *101*, 768–774.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006 Jun;116(6):1494-505. doi: 10.1172/JCI26498.

Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D353-D361. doi: 10.1093/nar/gkw1092.

Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1;28(1):27-30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.

Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a Reference Resource for Gene and Protein Annotation. *Nucleic Acids Res* 2016, *44*, D457-462, doi:10.1093/nar/gkv1070.

Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One*. 2013 Jul 3;8(7):e68322. doi: 10.1371/journal.pone.0068322.

Kaprio J. Twins and the mystery of missing heritability: the contribution of gene-environment interactions. *J Intern Med*. 2012 Nov;272(5):440-8. doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02587.x.

Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013 Jun 6;498(7452):99-103. doi: 10.1038/nature12198.

Karusheva Y, Koessler T, Strassburger K, Markgraf D, Mastrototaro L, Jelenik T, Simon MC, Pesta D, Zaharia OP, Bódis K, Bärenz F, Schmoll D, Wolkersdorfer M, Tura A, Pacini G, Burkart V, Müssig K, Szendroedi J, Roden M. Short-term dietary reduction of branched-chain amino acids reduces meal-induced insulin secretion and modifies microbiome composition in type 2 diabetes: a randomized controlled crossover trial. *Am J Clin Nutr*. 2019 Nov 1;110(5):1098-1107. doi: 10.1093/ajcn/nqz191.

Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Mar 15;57(11):1299-313. doi: 10.1016/j.jacc.2010.09.073.

Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162. doi: 10.1155/2014/943162. Epub 2014 Mar 11. Retraction in: *Cardiol Res Pract*. 2019 Jan 31;2019:4301528.

Kaur S, Banerjee N, Miranda M, Slugh M, Sun-Suslow N, McInerney KF, Sun X, Ramos AR, Rundek T, Sacco RL, Levin BE. Sleep quality mediates the relationship between frailty and cognitive dysfunction in non-demented middle aged to older adults. *Int Psychogeriatr*. 2019 Jun;31(6):779-788. doi: 10.1017/S1041610219000292.

- Kaur Y, de Souza RJ, Gibson WT, Meyre D. A systematic review of genetic syndromes with obesity. *Obes Rev.* 2017 Jun;18(6):603-634. doi: 10.1111/obr.12531.
- Kaushal A, Zhang H, Karmaus WJJ, Ray M, Torres MA, Smith AK, Wang SL. Comparison of Different Cell Type Correction Methods for Genome-Scale Epigenetics Studies. *BMC Bioinformatics* 2017, 18, 216, doi:10.1186/s12859-017-1611-2.
- Kavaliauskienė I, Domarkienė I, Ambrozaitytė L, Barauskienė L, Meškienė R, Arasimavičius J, Irnius A, Kučinskas V. Association Study of Taste Preference: Analysis in the Lithuanian Population. *Food Sci. Nutr.* 2021, 9, 4310–4321. doi: 10.1002/fsn3.2401.
- Kawafune K, Hachiya T, Nogawa S, Takahashi S, Jia H, Saito K, Kato H. Strong association between the 12q24 locus and sweet taste preference in the Japanese population revealed by genome-wide meta-analysis. *J Hum Genet* 2020, 65, 939–947. doi: 10.1038/s10038-020-0787-x.
- Kazmi N, Elliott HR, Burrows K, Tillin T, Hughes AD, Chaturvedi N, Gaunt TR, Relton CL. Associations between high blood pressure and DNA methylation. *PLoS One.* 2020 Jan 30;15(1):e0227728. doi: 10.1371/journal.pone.0227728.
- Keating ST, Plutzky J, El-Osta A. Epigenetic Changes in Diabetes and Cardiovascular Risk. *Circ Res.* 2016 May 27;118(11):1706-22. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306819.
- Keller M, Klös M, Rohde K, Krüger J, Kurze T, Dietrich A, Schön MR, Gärtner D, Lohmann T, Dreßler M, Stumvoll M, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. DNA methylation of SSPN is linked to adipose tissue distribution and glucose metabolism. *FASEB J.* 2018 Jun 22:fj201800528R. doi: 10.1096/fj.201800528R.
- Kelly S, Frost G, Whittaker V, Summerbell C. Low glycaemic index diets for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004 Oct 18;(4):CD004467. doi: 10.1002/14651858.CD004467.pub2.
- Kelly SA, Hartley L, Loveman E, Colquitt JL, Jones HM, Al-Khudairy L, Clar C, Germanò R, Lunn HR, Frost G, Rees K. Whole grain cereals for the primary or secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Aug 24;8(8):CD005051. doi: 10.1002/14651858.CD005051.pub3.
- Kershaw KN, Klikuszowian E, Schrader L, Siddique J, Van Horn L, Womack VY, Zenk SN. Assessment of the influence of food attributes on meal choice selection by socioeconomic status and race/ethnicity among women living in Chicago, USA: A discrete choice experiment. *Appetite* 2019, 139, 19–25. doi: 10.1016/j.appet.2019.04.003.
- Keskitalo K, Tuorila H, Spector TD, Cherkas LF, Knaapila A, Silventoinen K, Perola M. Same genetic components underlie different measures of sweet taste preference. *Am J Clin Nutr.* 2007 Dec;86(6):1663-9. doi: 10.1093/ajcn/86.5.1663.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedeljkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol.* 1986 Dec;124(6):903-15. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114480.
- Keys A. Atherosclerosis: a problem in newer Public Health. *J Mt Sinai Hosp.* 1953;20:118-39
- Khachatryan SG. Insomnia Burden and Future Perspectives. *Sleep Med Clin.* 2021 Sep;16(3):513-521. doi: 10.1016/j.jsmc.2021.05.006.
- Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh MK, Neogi T, Pillinger MH, Merrill J, Lee S, Prakash S, Kaldas M, Gogia M, Perez-Ruiz F, Taylor W, Lioté F, Choi H, Singh JA, Dalbeth N, Kaplan S, Niyyar V,

Jones D, Yarows SA, Roessler B, Kerr G, King C, Levy G, Furst DE, Edwards NL, Mandell B, Schumacher HR, Robbins M, Wenger N, Terkeltaub R; American College of Rheumatology. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012 Oct;64(10):1431-46. doi: 10.1002/acr.21772.

Khoury MJ, Bowen MS, Clyne M, Dotson WD, Gwinn ML, Green RF, Kolor K, Rodriguez JL, Wulf A, Yu W. From public health genomics to precision public health: a 20-year journey. *Genet Med*. 2018 Jun;20(6):574-582. doi: 10.1038/gim.2017.211.

Kiani AK, Bonetti G, Donato K, Kaftalli J, Herbst KL, Stuppia L, Fioretti F, Nodari S, Perrone M, Chiurazzi P, Bellinato F, Gisondi P, Bertelli M. Polymorphisms, diet and nutrigenomics. *J Prev Med Hyg*. 2022 Oct 17;63(2 Suppl 3):E125-E141. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2754.

Kilpeläinen TO, Zillikens MC, Stančáková A, Finucane FM, Ried JS, Langenberg C, Zhang W, Beckmann JS, Luan J, Vandenput L, Styrkarsdóttir U, Zhou Y, Smith AV, Zhao JH, Amin N, Vedantam S, Shin SY, Haritunians T, Fu M, Feitosa MF, Kumari M, Halldorsson BV, Tikkanen E, Mangino M, Hayward C, Song C, Arnold AM, Aulchenko YS, Oostra BA, Campbell H, Cupples LA, Davis KE, Döring A, Eiriksdóttir G, Estrada K, Fernández-Real JM, García M, Gieger C, Glazer NL, Guiducci C, Hofman A, Humphries SE, Isomaa B, Jacobs LC, Jula A, Karasik D, Karlsson MK, Khaw KT, Kim LJ, Kivimäki M, Klopp N, Kühnel B, Kuusisto J, Liu Y, Ljunggren O, Lorentzon M, Luben RN, McKnight B, Mellström D, Mitchell BD, Mooser V, Moreno JM, Männistö S, O'Connell JR, Pascoe L, Peltonen L, Peral B, Perola M, Psaty BM, Salomaa V, Savage DB, Semple RK, Skaric-Juric T, Sigurdsson G, Song KS, Spector TD, Syvänen AC, Talmud PJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Vidal-Puig A, Wild SH, Wright AF, Clegg DJ, Schadt E, Wilson JF, Rudan I, Ripatti S, Borecki IB, Shuldiner AR, Ingelsson E, Jansson JO, Kaplan RC, Gudnason V, Harris TB, Groop L, Kiel DP, Rivadeneira F, Walker M, Barroso I, Vollenweider P, Waeber G, Chambers JC, Kooner JS, Soranzo N, Hirschhorn JN, Stefansson K, Wichmann HE, Ohlsson C, O'Rahilly S, Wareham NJ, Speliotes EK, Fox CS, Laakso M, Loos RJ. Genetic variation near *IRS1* associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile. *Nat Genet*. 2011 Jun 26;43(8):753-60. doi: 10.1038/ng.866.

Kim UK, Breslin PA, Reed D, Drayna D. Genetics of human taste perception. *J Dent Res*. 2004 Jun;83(6):448-53. doi: 10.1177/154405910408300603.

Kim Y, Radoias V. Subjective socioeconomic status, health, and early-life conditions. *J Health Psychol*. 2021 Mar;26(4):595-604. doi: 10.1177/1359105319828137.

Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto G. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):8030-5. doi: 10.1073/pnas.1016088108.

Kirchner H, Sinha I, Gao H, Ruby MA, Schöнке M, Lindvall JM, Barrès R, Krook A, Näslund E, Dahlman-Wright K, Zierath JR. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Mol Metab*. 2016 Jan 2;5(3):171-183. doi: 10.1016/j.molmet.2015.12.004.

Kjellberg E, Roswall J, Bergman S, Almqvist-Tangen G, Alm B, Dahlgren J. Longitudinal birth cohort study found that a significant proportion of children had abnormal metabolic profiles and insulin resistance at 6 years of age. *Acta Paediatr*. 2019 Mar;108(3):486-492. doi: 10.1111/apa.14599.

Klancic T, Woodward L, Hofmann SM, Fisher EA. High density lipoprotein and metabolic disease: Potential benefits of restoring its functional properties. *Mol Metab*. 2016 Mar 18;5(5):321-327. doi: 10.1016/j.molmet.2016.03.001.

Klein-Platat C, Draï J, Oujaa M, Schlienger JL, Simon C. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr*. 2005 Dec;82(6):1178-84. doi: 10.1093/ajcn/82.6.1178.

Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*. 2004 Sep 22;292(12):1433-9. doi: 10.1001/jama.292.12.1433.

Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, Brenneman AT, Brown-Friday JO, Goldberg R, Venditti E, Nathan DM. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2009 Nov 14;374(9702):1677-86. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61457-4.

Knuesel T, Mohajeri MH. The Role of the Gut Microbiota in the Development and Progression of Major Depressive and Bipolar Disorder. *Nutrients*. 2021 Dec 23;14(1):37. doi: 10.3390/nu14010037.

Konieczna J, Abete I, Galmés AM, Babio N, Colom A, Zulet MA, Estruch R, Vidal J, Toledo E, Díaz-López A, Fiol M, Casas R, Vera J, Buil-Cosiales P, Martín V, Goday A, Salas-Salvadó J, Martínez JA, Romaguera D; PREDIMED-Plus Investigators. Body adiposity indicators and cardiometabolic risk: Cross-sectional analysis in participants from the PREDIMED-Plus trial. *Clin Nutr*. 2019 Aug;38(4):1883-1891. doi: 10.1016/j.clnu.2018.07.005.

Konikowska K, Regulska-Ilow B, Róžańska D. The influence of components of diet on the symptoms of ADHD in children. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2012;63(2):127-34.

Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):342-74. doi: 10.1124/pr.58.3.1.

Kouvari M, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, Georgousopoulou EN, Tousoulis D, Pitsavos AC. Sex-Related Differences of the Effect of Lipoproteins and Apolipoproteins on 10-Year Cardiovascular Disease Risk; Insights from the ATTICA Study (2002-2012). *Molecules*. 2020 Mar 26;25(7):1506. doi: 10.3390/molecules25071506.

Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, Hallen A, Martens E, Björck I, Bäckhed F. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):971-82. doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.001.

Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, Goodarzi MO, Assimes TL, Kullo IJ, Sovio U, Mathias RA, Sun YV, Franceschini N, Absher D, Li G, Zhang Q, Feitosa MF, Glazer NL, Haritunians T, Hartikainen AL, Knowles JW, North KE, Iribarren C, Kral B, Yanek L, O'Reilly PF, McCarthy MI, Jaquish C, Couper DJ, Chakravarti A, Psaty BM, Becker LC, Province MA, Boerwinkle E, Quertermous T, Palotie L, Jarvelin MR, Becker DM, Kardia SL, Rotter JI, Chen YD, Borecki IB. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1329-39. doi: 10.2337/db10-1011.

Kriebel J, Herder C, Rathmann W, Wahl S, Kunze S, Molnos S, Volkova N, Schramm K, Carstensen-Kirberg M, Waldenberger M, Gieger C, Peters A, Illig T, Prokisch H, Roden M, Grallert H. Association between DNA Methylation in Whole Blood and Measures of Glucose Metabolism: KORA F4 Study. *PLoS One*. 2016 Mar 28;11(3):e0152314. doi: 10.1371/journal.pone.0152314.

Kristiansson K, Perola M, Tikkanen E, Kettunen J, Surakka I, Havulinna AS, Stancáková A, Barnes C, Widen E, Kajantie E, Eriksson JG, Viikari J, Kähönen M, Lehtimäki T, Raitakari OT, Hartikainen AL, Ruokonen A, Pouta A, Jula A, Kangas AJ, Soininen P, Ala-Korpela M, Männistö S, Jousilahti P, Bonnycastle LL, Jarvelin MR, Kuusisto J, Collins FS, Laakso M, Hurles ME, Palotie A, Peltonen L, Ripatti S, Salomaa V. Genome-wide screen for metabolic syndrome susceptibility Loci reveals strong lipid gene contribution but no evidence

for common genetic basis for clustering of metabolic syndrome traits. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Apr 1;5(2):242-9. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.961482.

Kronfol MM, Dozmorov MG, Huang R, Slatum PW, McClay JL. The Role of Epigenomics in Personalized Medicine. *Expert Rev Precis Med Drug Dev* 2017, 2, 33–45, doi:10.1080/23808993.2017.1284557.

Kubacka J, Cembrowska P, Sypniewska G, Stefanska A. The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status. *Nutrients*. 2021 Sep 22;13(10):3307. doi: 10.3390/nu13103307.

Kühnen P, Handke D, Waterland RA, Hennig BJ, Silver M, Fulford AJ, Dominguez-Salas P, Moore SE, Prentice AM, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner FL, Walzer L, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A, Krude H. Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. *Cell Metab*. 2016 Sep 13;24(3):502-509. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.001.

Kuivenhoven JA, Hegele RA. Mining the genome for lipid genes. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Oct;1842(10):1993-2009. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.04.028.

Kurilshikov A, Medina-Gomez C, Bacigalupe R, Radjabzadeh D, Wang J, Demirkan A, Le Roy CI, Raygoza Garay JA, Finnicum CT, Liu X, Zhenakova DV, Bonder MJ, Hansen TH, Frost F, Rühlemann MC, Turpin W, Moon JY, Kim HN, Lüll K, Barkan E, Shah SA, Fornage M, Szopinska-Tokov J, Wallen ZD, Borisovich D, Agreus L, Andreasson A, Bang C, Bedrani L, Bell JT, Bisgaard H, Boehnke M, Boomsma DI, Burk RD, Claringbould A, Croitoru K, Davies GE, van Duijn CM, Duijts L, Falony G, Fu J, van der Graaf A, Hansen T, Homuth G, Hughes DA, Ijzerman RG, Jackson MA, Jaddoe VWV, Joossens M, Jørgensen T, Keszthelyi D, Knight R, Laakso M, Laudes M, Launer LJ, Lieb W, Lusi AJ, Masclee AAM, Moll HA, Mujagic Z, Qibin Q, Rothschild D, Shin H, Sørensen SJ, Steves CJ, Thorsen J, Timpson NJ, Tito RY, Vieira-Silva S, Völker U, Völzke H, Vösa U, Wade KH, Walter S, Watanabe K, Weiss S, Weiss FU, Weissbrod O, Westra HJ, Willemsen G, Payami H, Jonkers DMAE, Arias Vasquez A, de Geus EJC, Meyer KA, Stokholm J, Segal E, Org E, Wijmenga C, Kim HL, Kaplan RC, Spector TD, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Franke A, Lerch MM, Franke L, Sanna S, D'Amato M, Pedersen O, Paterson AD, Kraaij R, Raes J, Zhenakova A. Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. *Nat Genet*. 2021 Feb;53(2):156-165. doi: 10.1038/s41588-020-00763-1.

Kusmann M., Stover P.J. *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease: Towards a Systems-Level Understanding of Gene-Diet Interactions*. 2nd ed. John Wiley & Sons; Hoboken, NJ, USA: 2017. p. 1119098831. ISBN: 9781119098836

Kwak SH, Park KS. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes. *Exp Mol Med*. 2016;48:e220. doi: 10.1038/emmm.2016.7.

Lai CQ, Smith CE, Parnell LD, Lee YC, Corella D, Hopkins P, Hidalgo BA, Aslibekyan S, Province MA, Absher D, Arnett DK, Tucker KL, Ordovas JM. Epigenomics and metabolomics reveal the mechanism of the APOA2-saturated fat intake interaction affecting obesity. *Am J Clin Nutr*. 2018 Jul 1;108(1):188-200. doi: 10.1093/ajcn/nqy081.

Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jul;94(7):2537-43. doi: 10.1210/jc.2009-0141.

Lally S, Tan CY, Owens D, Tomkin GH. Messenger RNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann-Pick C1-like 1, ATP-binding cassette, transporters G5 and G8, and of microsomal triglyceride transfer protein. *Diabetologia*. 2006 May;49(5):1008-16. doi: 10.1007/s00125-006-0177-8.

Lampignano L, Zupo R, Donghia R, Guerra V, Castellana F, Murro I, Di Noia C, Sardone R, Giannelli G, Triggiani V, De Pergola G. Relationship Among Adherence to The Mediterranean Diet and Anthropometric and Metabolic Parameters in Subjects with Obesity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020 Nov 11. doi: 10.2174/187153032099920111161220.

Langdon RJ, Yousefi P, Relton CL, Suderman MJ. Epigenetic modelling of former, current and never smokers. *Clin Epigenetics*. 2021 Nov 17;13(1):206. doi: 10.1186/s13148-021-01191-6.

Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell* 2019, 177, 70–84, doi:10.1016/j.cell.2019.02.032.

Lau DC, Teoh H. Benefits of modest weight loss on the management of type 2 diabetes mellitus. *Can J Diabetes*. 2013 Apr;37(2):128-34. doi: 10.1016/j.jcjd.2013.03.023.

Le Bras M, Roquilly A, Deckert V, Langhi C, Feuillet F, Sébille V, Mahé PJ, Bach K, Masson D, Lagrost L, Costet P, Asehnoune K, Cariou B. Plasma PCSK9 is a late biomarker of severity in patients with severe trauma injury. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):E732-6. doi: 10.1210/jc.2012-4236.

Le Couteur DG, Solon-Biet SM, Cogger VC, Ribeiro R, de Cabo R, Raubenheimer D, Cooney GJ, Simpson SJ. Branched chain amino acids, aging and age-related health. *Ageing Res Rev*. 2020 Dec;64:101198. doi: 10.1016/j.arr.2020.101198.

Ledda M, Kutalik Z, Souza Destito MC, Souza MM, Cirillo CA, Zamboni A, Martin N, Morya E, Sameshima K, Beckmann JS, le Coutre J, Bergmann S, Genick UK. GWAS of human bitter taste perception identifies new loci and reveals additional complexity of bitter taste genetics. *Hum Mol Genet*. 2014 Jan 1;23(1):259-67. doi: 10.1093/hmg/ddt404.

Lee C, Antonarakis SE, Hamosh A, Burn J. Three Decades of the Human Genome Organization. *Am J Med Genet A* 2021, 185, 3314–3321, doi:10.1002/ajmg.a.62512.

Lee DH, Oh JH, Chung JH. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *J Dermatol Sci*. 2016 Sep;83(3):174-81. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.016.

Lee EJ, Rath P, Liu J, Ryu D, Pei L, Noonepalle SK, Shull AY, Feng Q, Litofsky NS, Miller DC, Anthony DC, Kirk MD, Lattera J, Deng L, Xin HB, Wang X, Choi JH, Shi H. Identification of Global DNA Methylation Signatures in Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells. *J Genet Genomics*. 2015 Jul 20;42(7):355-71. doi: 10.1016/j.jgg.2015.06.003.

Lee IM, Skerrett PJ. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Jun;33(6 Suppl):S459-71; discussion S493-4. doi: 10.1097/00005768-200106001-00016. PMID: 11427772.

Lee JE, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell Biosci*. 2014 May 29;4:29. doi: 10.1186/2045-3701-4-29.

Lee JE, Schmidt H, Lai B, Ge K. Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 2019 May 14;39(11). pii: e00601-18. doi: 10.1128/MCB.00601-18.

Lee KE. Students' dietary habits, food service satisfaction, and attitude toward school meals enhance meal consumption in school food service. *Nutr. Res. Pract*. 2019, 13, 555–563.

Lee KH, Mo J. The Factors Influencing Meal Satisfaction in Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *Asian Nurs. Res. Korean Soc. Nurs. Sci*. 2019, 13, 169–176.

Lee PG, Jackson EA, Richardson CR. Exercise Prescriptions in Older Adults. *Am Fam Physician*. 2017 Apr 1;95(7):425-432.

Lee S. The association of genetically controlled CpG methylation (cg158269415) of protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 (PTPRN2) with childhood obesity. *Sci Rep* 2019, 9, 4855. 10.1038/s41598-019-40486-w.

Lee SS, Humphreys KL, Flory K, Liu R, Glass K. Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. *Clin Psychol Rev*. 2011 Apr;31(3):328-41. doi: 10.1016/j.cpr.2011.01.006.

Lehtovirta M, Kaprio J, Groop L, Trombetta M, Bonadonna RC. Heritability of model-derived parameters of beta cell secretion during intravenous and oral glucose tolerance tests: a study of twins. *Diabetologia*. 2005 Aug;48(8):1604-13. doi: 10.1007/s00125-005-1815-2.

Leitch MA, Morgan MJ, Yeomans MR. Different subtypes of impulsivity differentiate uncontrolled eating and dietary restraint. *Appetite*. 2013 Oct;69:54-63. doi: 10.1016/j.appet.2013.05.007.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Bimbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):285-91. doi: 10.1038/nature19057.

Lesseur C, Armstrong DA, Paquette AG, Koestler DC, Padbury JF, Marsit CJ. Tissue-specific Leptin promoter DNA methylation is associated with maternal and infant perinatal factors. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Dec 5;381(1-2):160-7. doi: 10.1016/j.mce.2013.07.024.

Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment. *Cell Death Dis*. 2013;4(10):e861. Published 2013 Oct 17. doi:10.1038/cddis.2013.404

Leung A, Parks BW, Du J, Trac C, Setten R, Chen Y, Brown K, Lusi AJ, Natarajan R, Schones DE. Open chromatin profiling in mice livers reveals unique chromatin variations induced by high fat diet. *J Biol Chem*. 2014 Aug 22;289(34):23557-67. doi: 10.1074/jbc.M114.581439.

Leung A, Trac C, Du J, Natarajan R, Schones DE. Persistent Chromatin Modifications Induced by High Fat Diet. *J Biol Chem*. 2016 May 13;291(20):10446-55. doi: 10.1074/jbc.M115.711028.

Leung AWY, Chan RSM, Sea MMM, Woo J. An Overview of Factors Associated with Adherence to Lifestyle Modification Programs for Weight Management in Adults. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Aug 16;14(8):922. doi: 10.3390/ijerph14080922.

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11070-5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444:1022-1023. doi: 10.1038/4441022a.

Ley SH, Hamdy O, Mohan V, Hu FB. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. *Lancet*. 2014 Jun 7;383(9933):1999-2007. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60613-9.

Li C, Kim YK, Dorajoo R, Li H, Lee IT, Cheng CY, He M, Sheu WH, Guo X, Ganesh SK, He J, Lee J, Liu J, Hu Y, Rao DC, Tsai FJ, Koh JY, Hu H, Liang KW, Palmas W, Hixson JE, Han S, Teo YY, Wang Y, Chen J, Lu CH, Zheng Y, Gui L, Lee WJ, Yao J, Gu D, Han BG, Sim X, Sun L, Zhao J, Chen CH, Kumari N, He Y, Taylor KD, Raffel LJ, Moon S, Rotter JJ, Ida Chen YD, Wu T, Wong TY, Wu JY, Lin X, Tai ES, Kim BJ, Kelly TN. Genome-Wide Association Study Meta-Analysis of Long-Term Average Blood Pressure in East Asians. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017 Apr;10(2):e001527. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001527.

Li F, Jiang C, Krausz KW, Li Y, Albert I, Hao H, Fabre KM, Mitchell JB, Patterson AD, Gonzalez FJ. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun*. 2013;4:2384. doi: 10.1038/ncomms3384.

Li J, Bu S, Zhou H, Bi S, Xu Y. Identifying potential therapeutic targets of Tang-Yi-Ping for the treatment of impaired glucose tolerance: a tandem mass tag-labeled quantitative proteomic analysis. *Ann Transl Med*. 2021 Oct;9(20):1532. doi: 10.21037/atm-21-4257.

Li J, Guasch-Ferré M, Chung W, Ruiz-Canela M, Toledo E, Corella D, Bhupathiraju SN, Tobias DK, Tabung FK, Hu J, Zhao T, Turman C, Feng YA, Clish CB, Mucci L, Eliassen AH, Costenbader KH, Karlson EW, Wolpin BM, Ascherio A, Rimm EB, Manson JE, Qi L, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Hu FB, Liang L. The Mediterranean diet, plasma metabolome, and cardiovascular disease risk. *Eur Heart J*. 2020 Jul 21;41(28):2645-2656. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa209.

Li S, Guo YL, Xu RX, Zhang Y, Zhu CG, Sun J, Qing P, Wu NQ, Jiang LX, Li JJ. Association of plasma PCSK9 levels with white blood cell count and its subsets in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014 Jun;234(2):441-5. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.001.

Li S, Guo YL, Xu RX, Zhang Y, Zhu CG, Sun J, Qing P, Wu NQ, Li JJ. Plasma PCSK9 levels are associated with the severity of coronary stenosis in patients with atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2014 Jul 1;174(3):863-4. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.224.

Li S, Wong EM, Bui M, Nguyen TL, Joo JE, Stone J, Dite GS, Giles GG, Saffery R, Southey MC, Hopper JL. Causal effect of smoking on DNA methylation in peripheral blood: a twin and family study. *Clin Epigenetics*. 2018 Feb 9;10:18. doi: 10.1186/s13148-018-0452-9.

Li S, Zhao JH, Luan J, Ekelund U, Luben RN, Khaw KT, Wareham NJ, Loos RJ. Physical activity attenuates the genetic predisposition to obesity in 20,000 men and women from EPIC-Norfolk prospective population study. *PLoS Med*. 2010 Aug 31;7(8):e1000332. doi: 10.1371/journal.pmed.1000332.

Li W, Dowd SE, Scurlock B, Acosta-Martinez V, Lyte M. Memory and learning behavior in mice is temporally associated with diet-induced alterations in gut bacteria. *Physiol Behav*. 2009 Mar 23;96(4-5):557-67. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.12.004.

Li W, Wang WX. In vivo oral bioavailability of fish mercury and comparison with in vitro bioaccessibility. *Sci Total Environ*. 2019 Sep 15;683:648-658. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.290.

Li X, Qi L. Epigenetics in Precision Nutrition. *J Pers Med*. 2022 Mar 28;12(4):533. doi: 10.3390/jpm12040533.

Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab*. 2011 Apr 6;13(4):376-388. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.009.

Liang F, Lv K, Wang Y, Yuan Y, Lu L, Feng Q, Jing X, Wang H, Liu C, Rayner S, Ling S, Chen H, Wan Y, Zhou W, He L, Wu B, Qu L, Chen S, Xiong J, Li Y. Personalized Epigenome Remodeling Under Biochemical and Psychological Changes During Long-Term Isolation Environment. *Front Physiol.* 2019 Jul 31;10:932. doi: 10.3389/fphys.2019.00932.

Lichtenstein P, Carlström E, Råstam M, Gillberg C, Anckarsäter H. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *Am J Psychiatry.* 2010 Nov;167(11):1357-63. doi: 10.1176/appi.ajp.2010.10020223..

Liem DG, Russell CG. The Influence of Taste Liking on the Consumption of Nutrient Rich and Nutrient Poor Foods. *Front Nutr.* 2019 Nov 15;6:174. doi: 10.3389/fnut.2019.00174.

Lima RPA, do Nascimento RAF, Luna RCP, Persuhn DC, da Silva AS, da Conceição Rodrigues Gonçalves M, de Almeida ATC, de Moraes RM, Junior EV, Fouilloux-Meugnier E, Vidal H, Pirola L, Magnani M, de Oliveira NFP, Prada PO, de Carvalho Costa MJ. Effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation level of the ADRB3 gene, lipid profile and oxidative stress in overweight or obese women. *Clin Epigenetics.* 2017 Oct 13;9:110. doi: 10.1186/s13148-017-0407-6.

Lin HF, Boden-Albala B, Juo SH, Park N, Rundek T, Sacco RL. Heritabilities of the metabolic syndrome and its components in the Northern Manhattan Family Study. *Diabetologia.* 2005 Oct;48(10):2006-12. doi: 10.1007/s00125-005-1892-2.

Lin JY, Arthurs J, Reilly S. Reduced palatability in pain-induced conditioned taste aversions. *Physiol Behav.* 2013 Jul 2;119:79-85. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.06.012.

Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, Lin MF, Parker BJ, Washietl S, Kheradpour P, Ernst J, Jordan G, Mauceli E, Ward LD, Lowe CB, Holloway AK, Clamp M, Gnerre S, Alföldi J, Beal K, Chang J, Clawson H, Cuff J, Di Palma F, Fitzgerald S, Flicek P, Guttman M, Hubisz MJ, Jaffe DB, Jungreis I, Kent WJ, Kostka D, Lara M, Martins AL, Masingham T, Moltke I, Raney BJ, Rasmussen MD, Robinson J, Stark A, Vilella AJ, Wen J, Xie X, Zody MC; Broad Institute Sequencing Platform and Whole Genome Assembly Team; Baldwin J, Bloom T, Chin CW, Heiman D, Nicol R, Nusbaum C, Young S, Wilkinson J, Worley KC, Kovar CL, Muzny DM, Gibbs RA; Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center Sequencing Team; Cree A, Dihn HH, Fowler G, Jhangiani S, Joshi V, Lee S, Lewis LR, Nazareth LV, Okwuonu G, Santibanez J, Warren WC, Mardis ER, Weinstock GM, Wilson RK; Genome Institute at Washington University; Delehaunty K, Dooling D, Fronik C, Fulton L, Fulton B, Graves T, Minx P, Sodergren E, Birney E, Margulies EH, Herrero J, Green ED, Haussler D, Siepel A, Goldman N, Pollard KS, Pedersen JS, Lander ES, Kellis M. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature.* 2011 Oct 12;478(7370):476-82. doi: 10.1038/nature10530. P

Lindemann B. Receptors and transduction in taste. *Nature.* 2001 Sep 13;413(6852):219-25. doi: 10.1038/35093032.

Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Rönn T, Granhall C, Luthman H, Masiello P, Marchetti P, Groop L, Del Prato S. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia.* 2008 Apr;51(4):615-22. doi: 10.1007/s00125-007-0916-5.

Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 2019 May 7;29(5):1028-1044. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.009.

Linthorst J, Meert W, Hestand MS, Korlach J, Vermeesch JR, Reinders MJT, Holstege H. Extreme enrichment of VNTR-associated polymorphic in human subtelomeres: genes with most VNTRs are predominantly expressed in the brain. *Transl Psychiatry.* 2020 Nov 2;10(1):369. doi: 10.1038/s41398-020-01060-5.

Liu AG, Ford NA, Hu FB, Zelman KM, Mozaffarian D, Kris-Etherton PM. A healthy approach to dietary fats: understanding the science and taking action to reduce consumer confusion. *Nutr J*. 2017 Aug 30;16(1):53. doi: 10.1186/s12937-017-0271-4.

Liu CF, Tang WHW. Gut microbiota in sarcopenia and heart failure. *J Cardiovasc Aging*. 2022 Jul;2(3):35. doi: 10.20517/jca.2022.07.

Liu CJ, Latham NK. Progressive resistance strength training for improving physical function in older adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jul 8;2009(3):CD002759. doi: 10.1002/14651858.CD002759.pub2.

Liu G, Zong G, Doty RL, Sun Q. Prevalence and risk factors of taste and smell impairment in a nationwide representative sample of the US population: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2016 Nov 9;6(11):e013246. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013246.

Liu R, Hong J, Xu X, Feng Q, Zhang D, Gu Y, Shi J, Zhao S, Liu W, Wang X, Xia H, Liu Z, Cui B, Liang P, Xi L, Jin J, Ying X, Wang X, Zhao X, Li W, Jia H, Lan Z, Li F, Wang R, Sun Y, Yang M, Shen Y, Jie Z, Li J, Chen X, Zhong H, Xie H, Zhang Y, Gu W, Deng X, Shen B, Xu X, Yang H, Xu G, Bi Y, Lai S, Wang J, Qi L, Madsen L, Wang J, Ning G, Kristiansen K, Wang W. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017 Jul;23(7):859-868. doi: 10.1038/nm.4358.

Liu YK, Ling S, Lui LMW, Ceban F, Vinberg M, Kessing LV, Ho RC, Rhee TG, Gill H, Cao B, Mansur RB, Lee Y, Rosenblat J, Teopiz KM, McIntyre RS. Prevalence of type 2 diabetes mellitus, impaired fasting glucose, general obesity, and abdominal obesity in patients with bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2022 Mar 1;300:449-461. doi: 10.1016/j.jad.2021.12.110.

Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, Powell C, Vedantam S, Buchkovich ML, Yang J, Croteau-Chonka DC, Esko T, Fall T, Ferreira T, Gustafsson S, Kutalik Z, Luan J, Mägi R, Randall JC, Winkler TW, Wood AR, Workalemahu T, Faul JD, Smith JA, Zhao JH, Zhao W, Chen J, Fehrmann R, Hedman ÅK, Karjalainen J, Schmidt EM, Absher D, Amin N, Anderson D, Beekman M, Bolton JL, Bragg-Gresham JL, Buyske S, Demirkan A, Deng G, Ehret GB, Feenstra B, Feitosa MF, Fischer K, Goel A, Gong J, Jackson AU, Kanoni S, Kleber ME, Kristiansson K, Lim U, Lotay V, Mangino M, Leach IM, Medina-Gomez C, Medland SE, Nalls MA, Palmer CD, Pasko D, Pechlivanis S, Peters MJ, Prokopenko I, Shungin D, Stančáková A, Strawbridge RJ, Sung YJ, Tanaka T, Teumer A, Trompet S, van der Laan SW, van Setten J, Van Vliet-Ostapchouk JV, Wang Z, Yengo L, Zhang W, Isaacs A, Albrecht E, Ärnlöv J, Arscott GM, Attwood AP, Bandinelli S, Barrett A, Bas IN, Bellis C, Bennett AJ, Berne C, Blagieva R, Blüher M, Böhringer S, Bonnycastle LL, Böttcher Y, Boyd HA, Bruinenberg M, Caspersen IH, Chen YI, Clarke R, Daw EW, de Craen AJM, Delgado G, Dimitriou M, Doney ASF, Eklund N, Estrada K, Eury E, Folkersen L, Fraser RM, Garcia ME, Geller F, Giedraitis V, Gigante B, Go AS, Golay A, Goodall AH, Gordon SD, Gorski M, Grabe HJ, Grallert H, Grammer TB, Gräßler J, Grönberg H, Groves CJ, Gusto G, Haessler J, Hall P, Haller T, Hallmans G, Hartman CA, Hassinen M, Hayward C, Heard-Costa NL, Helmer Q, Hengstenberg C, Holmen O, Hottenga JJ, James AL, Jeff JM, Johansson Å, Jolley J, Juliusdottir T, Kinnunen L, Koenig W, Koskenvuo M, Kratzer W, Laitinen J, Lamina C, Leander K, Lee NR, Lichtner P, Lind L, Lindström J, Lo KS, Lobbens S, Lorbeer R, Lu Y, Mach F, Magnusson PKE, Mahajan A, McArdle WL, McLachlan S, Menni C, Merger S, Mihailov E, Milani L, Moayyeri A, Monda KL, Morken MA, Mulas A, Müller G, Müller-Nurasyid M, Musk AW, Nagaraja R, Nöthen MM, Nolte IM, Pilz S, Rayner NW, Renstrom F, Rettig R, Ried JS, Ripke S, Robertson NR, Rose LM, Sanna S, Scharnagl H, Scholtens S, Schumacher FR, Scott WR, Seufferlein T, Shi J, Smith AV, Smolonska J, Stanton AV, Steinthorsdottir V, Stirrups K, Stringham HM, Sundström J, Swertz MA, Swift AJ, Syvänen AC, Tan ST, Tayo BO, Thorand B, Thorleifsson G, Tyrer JP, Uh HW, Vandenput L, Verhulst FC, Vermeulen SH, Verweij N, Vonk JM, Waite LL, Warren HR, Waterworth D, Weedon MN, Wilkens LR, Willenborg C, Wilsgaard T, Wojczynski MK, Wong A, Wright AF, Zhang Q; LifeLines Cohort Study, Brennan EP, Choi M, Dastani Z, Drong AW, Eriksson P, Franco-Cereceda A, Gådin JR, Gharavi AG, Goddard ME, Handsaker RE, Huang J, Karpe F, Kathiresan S, Keildson S, Kiryluk K, Kubo M, Lee JY, Liang L, Lifton RP, Ma B, McCarroll SA, McKnight AJ, Min JL, Moffatt MF, Montgomery GW, Murabito JM, Nicholson G, Nyholt DR, Okada Y, Perry JRB, Dorajoo R, Reinmaa E, Salem RM, Sandholm N, Scott RA, Stolk L, Takahashi A, Tanaka T, van't Hooft FM, Vinkhuyzen AAE, Westra HJ, Zheng W, Zondervan KT; ADIPOGen Consortium; AGEN-BMI Working Group; CARDIOGRAMplusC4D Consortium; CKDGen

Consortium; GLGC; ICBP; MAGIC Investigators; MuTHER Consortium; MiGen Consortium; PAGE Consortium; ReproGen Consortium; GENIE Consortium; International Endogene Consortium, Heath AC, Arveiler D, Bakker SJL, Beilby J, Bergman RN, Blangero J, Bovet P, Campbell H, Caulfield MJ, Cesana G, Chakravarti A, Chasman DI, Chines PS, Collins FS, Crawford DC, Cupples LA, Cusi D, Danesh J, de Faire U, den Ruijter HM, Dominiczak AF, Erbel R, Erdmann J, Eriksson JG, Farrall M, Felix SB, Ferrannini E, Ferrières J, Ford I, Forouhi NG, Forrester T, Franco OH, Gansevoort RT, Gejman PV, Gieger C, Gottesman O, Gudnason V, Gyllenstein U, Hall AS, Harris TB, Hattersley AT, Hicks AA, Hindorf LA, Hingorani AD, Hofman A, Homuth G, Hovingh GK, Humphries SE, Hunt SC, Hyppönen E, Illig T, Jacobs KB, Jarvelin MR, Jöckel KH, Johansen B, Jousilahti P, Jukema JW, Jula AM, Kaprio J, Kastelein JJP, Keinanen-Kiukkaanniemi SM, Kiemeny LA, Knekt P, Kooner JS, Kooperberg C, Kovacs P, Kraja AT, Kumari M, Kuusisto J, Lakka TA, Langenberg C, Marchand LL, Lehtimäki T, Lyssenko V, Männistö S, Marette A, Matise TC, McKenzie CA, McKnight B, Moll FL, Morris AD, Morris AP, Murray JC, Nelis M, Ohlsson C, Oldehinkel AJ, Ong KK, Madden PAF, Pasterkamp G, Peden JF, Peters A, Postma DS, Pramstaller PP, Price JF, Qi L, Raitakari OT, Rankinen T, Rao DC, Rice TK, Ridker PM, Rioux JD, Ritchie MD, Rudan I, Salomaa V, Samani NJ, Saramies J, Sarzynski MA, Schunkert H, Schwarz PEH, Sever P, Shuldiner AR, Sinisalo J, Stolk RP, Strauch K, Tönjes A, Trégouët DA, Tremblay A, Tremoli E, Virtamo J, Vohl MC, Völker U, Waeber G, Willemssen G, Witteman JC, Zillikens MC, Adair LS, Amouyel P, Asselbergs FW, Assimes TL, Bochud M, Boehm BO, Boerwinkle E, Bornstein SR, Bottinger EP, Bouchard C, Cauchi S, Chambers JC, Chanock SJ, Cooper RS, de Bakker PIW, Dedoussis G, Ferrucci L, Franks PW, Froguel P, Groop LC, Haiman CA, Hamsten A, Hui J, Hunter DJ, Hveem K, Kaplan RC, Kivimäki M, Kuh D, Laakso M, Liu Y, Martin NG, März W, Melbye M, Metspalu A, Moebus S, Munroe PB, Njølstad I, Oostra BA, Palmer CNA, Pedersen NL, Perola M, Pérusse L, Peters U, Power C, Quertermous T, Rauramaa R, Rivadeneira F, Saaristo TE, Saleheen D, Sattar N, Schadt EE, Schlessinger D, Slagboom PE, Snieder H, Spector TD, Thorsteinsdottir U, Stumvoll M, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Uusitupa M, van der Harst P, Walker M, Wallaschofski H, Wareham NJ, Watkins H, Weir DR, Wichmann HE, Wilson JF, Zanen P, Borecki IB, Deloukas P, Fox CS, Heid IM, O'Connell JR, Strachan DP, Stefansson K, van Duijn CM, Abecasis GR, Franke L, Frayling TM, McCarthy MI, Visscher PM, Scherag A, Willer CJ, Boehnke M, Mohlke KL, Lindgren CM, Beckmann JS, Barroso I, North KE, Ingelsson E, Hirschhorn JN, Loos RJJ, Speliotes EK. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015 Feb 12;518(7538):197-206. doi: 10.1038/nature14177.

Loos RJ. The genetics of adiposity. *Curr Opin Genet Dev*. 2018 Jun;50:86-95. doi: 10.1016/j.gde.2018.02.009.

Loper HB, La Sala M, Dotson C, Steinle N. Taste perception, associated hormonal modulation, and nutrient intake. *Nutr Rev*. 2015 Feb;73(2):83-91. doi: 10.1093/nutrit/nuu009.

López P, Pinto RS, Radaelli R, Rech A, Grazioli R, Izquierdo M, Cadore EL. Benefits of resistance training in physically frail elderly: a systematic review. *Aging Clin Exp Res*. 2018 Aug;30(8):889-899. doi: 10.1007/s40520-017-0863-z.

López-Jimenez ND, Cavenagh MM, Sainz E, Cruz-Ithier MA, Battey JF, Sullivan SL. Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd1l3 and Pkd2l1, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J Neurochem*. 2006 Jul;98(1):68-77. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03842.x.

Lopomo A, Burgio E, Migliore L. Epigenetics of Obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;140:151-84. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.02.002.

Lotan A, Fenckova M, Bralten J, Alttoa A, Dixon L, Williams RW, van der Voet M. Neuroinformatic analyses of common and distinct genetic components associated with major neuropsychiatric disorders. *Front Neurosci*. 2014 Nov 6;8:331. doi: 10.3389/fnins.2014.00331.

Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2017 Jan;19(1):29-41. doi: 10.1111/1462-2920.13589.

Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Micro*. 2014;12:661-672. doi: 10.1038/nrmicro3344.

- Low JYQ, Lacy KE, McBride R, Keast RSJ. The Association between Sweet Taste Function, Anthropometry, and Dietary Intake in Adults. *Nutrients* 2016, 8, 241.
- Loxton NJ. The role of reward sensitivity and impulsivity in overeating and food addiction. *Curr Addict Reports*. 2018;5(2):212–22. doi: 10.1007/s40429-018-0206-y
- Lozano M, Manyes L, Peiró J, Montes F. Geographic conditioning in dietary, social, and health patterns in elderly population with disabilities. *Nutrition*. 2019 Jan;57:17–23. doi: 10.1016/j.nut.2018.05.015.
- Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* 2010;14:840–860. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
- Lumley J, Stevenson RJ, Oaten MJ, Mahmut M, Yeomans MR. Individual differences in impulsivity and their relationship to a Western-style diet. *Pers Individ Dif.* 2016;97:178–85. doi: 10.1016/j.paid.2016.03.055.
- Lunde LK, Skare Ø, Mamen A, Sirnes PA, Aass HCD, Øvstebø R, Goffeng E, Matre D, Nielsen P, Heglum HSA, Hammer SE, Skogstad M. Cardiovascular Health Effects of Shift Work with Long Working Hours and Night Shifts: Study Protocol for a Three-Year Prospective Follow-Up Study on Industrial Workers. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 16;17(2):589. doi: 10.3390/ijerph17020589.
- Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science*. 2018 Sep 28;361(6409):1336–1340. doi: 10.1126/science.aat6806.
- Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BW, Zitman FG. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2010 Mar;67(3):220–9. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.2.
- Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr*. 2004 Feb;134(2):479–82. doi: 10.1093/jn/134.2.479.
- Lutz M. Healthy sustainable food patterns and systems: a planetary urgency. *Medwave*. 2021 Aug 6;21(7):e8436. Spanish, English. doi: 10.5867/medwave.2021.07.8436.
- Lv WQ, Zhang X, Zhang Q, He JY, Liu HM, Xia X, Fan K, Zhao Q, Shi XZ, Zhang WD, Sun CQ, Deng HW. Novel common variants associated with body mass index and coronary artery disease detected using a pleiotropic cFDR method. *J Mol Cell Cardiol*. 2017 Nov;112:1–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.08.011.
- Ly V, Bottelier M, Hockstra PJ, Arias Vasquez A, Buitelaar JK, Rommelse NN. Elimination diets' efficacy and mechanisms in attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2017 Sep;26(9):1067–1079. doi: 10.1007/s00787-017-0959-1.
- Lynam DR, Miller JD, Miller DJ, Bornovalova MA, Lejuez CW. Testing the relations between impulsivity-related traits, suicidality, and nonsuicidal self-injury: a test of the incremental validity of the UPPS model. *Personal Disord*. 2011 Apr;2(2):151–160. doi: 10.1037/a0019978.
- Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Dec;10(12):723–36. doi: 10.1038/nrendo.2014.171..
- Ma F, Zhou X, Li Q, Zhao J, Song A, An P, Du Y, Xu W, Huang G. Effects of Folic Acid and Vitamin B12, Alone and in Combination on Cognitive Function and Inflammatory Factors in the Elderly with Mild Cognitive Impairment: A Single-blind Experimental Design. *Curr Alzheimer Res*. 2019;16(7):622–632. doi: 10.2174/1567205016666190725144629.

MacFabe DF (2015) Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Health Dis* 26. doi:10.3402/mehd.v26.28177. doi:10.3402/mehd.v26.28177

Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999 May;69(5):1035S-1045S. doi: 10.1093/ajcn/69.5.1035s.

Magder S. The meaning of blood pressure. *Crit Care*. 2018 Oct 11;22(1):257. doi: 10.1186/s13054-018-2171-1.

Magge SN, Goodman E, Armstrong SC; COMMITTEE ON NUTRITION; SECTION ON ENDOCRINOLOGY; SECTION ON OBESITY. The Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: Shifting the Focus to Cardiometabolic Risk Factor Clustering. *Pediatrics*. 2017 Aug;140(2). pii: e20171603. doi: 10.1542/peds.2017-1603.

Mahajan A, Wessel J, Willems SM, Zhao W, Robertson NR, Chu AY, Gan W, Kitajima H, Taliun D, Rayner NW, Guo X, Lu Y, Li M, Jensen RA, Hu Y, Huo S, Lohman KK, Zhang W, Cook JP, Prins BP, Flannick J, Grarup N, Trubetskoy VV, Kravic J, Kim YJ, Rybin DV, Yaghootkar H, Müller-Nurasyid M, Meidtner K, Li-Gao R, Varga TV, Marten J, Li J, Smith AV, An P, Ligthart S, Gustafsson S, Malerba G, Demirkan A, Tajdes JF, Steinthorsdottir V, Wuttke M, Lecoeur C, Preuss M, Bielak LF, Graff M, Highland HM, Justice AE, Liu DJ, Marouli E, Peloso GM, Warren HR; ExomeBP Consortium; MAGIC Consortium; GIANT Consortium; Afaq S, Afzal S, Ahlqvist E, Almgren P, Amin N, Bang LB, Bertoni AG, Bombieri C, Bork-Jensen J, Brandslund I, Brody JA, Burtt NP, Canouil M, Chen YI, Cho YS, Christensen C, Eastwood SV, Eckardt KU, Fischer K, Gambaro G, Giedraitis V, Grove ML, de Haan HG, Hackinger S, Hai Y, Han S, Tybjaerg-Hansen A, Hivert MF, Isomaa B, Jäger S, Jørgensen ME, Jørgensen T, Käräjämäki A, Kim BJ, Kim SS, Koistinen HA, Kovacs P, Kriebel J, Kronenberg F, Läll K, Lange LA, Lee JJ, Lehne B, Li H, Lin KH, Linneberg A, Liu CT, Liu J, Loh M, Mägi R, Mamakou V, McKean-Cowdin R, Nadkarni G, Neville M, Nielsen SF, Ntalla I, Peyser PA, Rathmann W, Rice K, Rich SS, Rode L, Rolandsson O, Schönherr S, Selvin E, Small KS, Stančáková A, Surendran P, Taylor KD, Teslovich TM, Thorand B, Thorleifsson G, Tin A, Tönjes A, Varbo A, Witte DR, Wood AR, Yajnik P, Yao J, Yengo L, Young R, Amouyel P, Boeing H, Boerwinkle E, Bottinger EP, Chowdhury R, Collins FS, Dedoussis G, Dehghan A, Deloukas P, Ferrario MM, Ferrières J, Florez JC, Frossard P, Gudnason V, Harris TB, Heckbert SR, Howson JMM, Ingelsson M, Kathiresan S, Kee F, Kuusisto J, Langenberg C, Launer LJ, Lindgren CM, Männistö S, Meitinger T, Melander O, Mohlke KL, Moitry M, Morris AD, Murray AD, de Mutsert R, Orho-Melander M, Owen KR, Perola M, Peters A, Province MA, Rasheed A, Ridker PM, Rivadineira F, Rosendaal FR, Rosengren AH, Salomaa V, Sheu WH, Sladek R, Smith BH, Strauch K, Uitterlinden AG, Varma R, Willer CJ, Blüher M, Butterworth AS, Chambers JC, Chasman DI, Danesh J, van Duijn C, Dupuis J, Franco OH, Franks PW, Froguel P, Grallert H, Groop L, Han BG, Hansen T, Hattersley AT, Hayward C, Ingelsson E, Kardia SLR, Karpe F, Kooner JS, Köttgen A, Kuulasmaa K, Laakso M, Lin X, Lind L, Liu Y, Loos RJF, Marchini J, Metspalu A, Mook-Kanamori D, Nordestgaard BG, Palmer CNA, Pankow JS, Pedersen O, Psaty BM, Rauramaa R, Sattar N, Schulze MB, Soranzo N, Spector TD, Stefansson K, Stumvoll M, Thorsteinsdottir U, Tuomi T, Tuomilehto J, Wareham NJ, Wilson JG, Zeggini E, Scott RA, Barroso I, Frayling TM, Goodarzi MO, Meigs JB, Boehnke M, Saleheen D, Morris AP, Rotter JI, McCarthy MI. Refining the accuracy of validated target identification through coding variant fine-mapping in type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2018 Apr;50(4):559-571. doi: 10.1038/s41588-018-0084-1.

Mahmoud AM. An Overview of Epigenetics in Obesity: The Role of Lifestyle and Therapeutic Interventions. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 1341, doi:10.3390/ijms23031341.

Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Edwards PA. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31900-8. doi: 10.1074/jbc.M202993200.

Maksimovic J, Oshlack A, Phipson B. Gene Set Enrichment Analysis for Genome-Wide DNA Methylation Data. *Genome Biol* 2021, 22, 173, doi:10.1186/s13059-021-02388-x.

Malhotra J, Borron C, Freedman ND, Abnet CC, van den Brandt PA, White E, Milne RL, Giles GG, Boffetta P. Association between Cigar or Pipe Smoking and Cancer Risk in Men: A Pooled Analysis of Five Cohort Studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2017, 10, 704–709, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-17-0084.

Mallorquí-Bagué N, Lozano-Madrid M, Vintró-Alcaraz C, Forcano L, Díaz-López A, Galera A, Fernández-Carrión R, Granero R, Jiménez-Murcia S, Corella D, Pintó X, Cuenca-Royo A, Bulló M, Salas-Salvadó J, de la Torre R, Fernández-Aranda F. Effects of a psychosocial intervention at one-year follow-up in a PREDIMED-plus sample with obesity and metabolic syndrome. *Sci Rep.* 2021 Apr 28;11(1):9144. doi: 10.1038/s41598-021-88298-1.

Mandy W, Lai MC. Annual Research Review: the role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *J Child Psychol Psychiatry.* 2016;57:271–292. doi: 10.1111/jcpp.12501.

Manolio TA. Implementing Genomics and Pharmacogenomics in the Clinic: The National Human Genome Research Institute's Genomic Medicine Portfolio. *Atherosclerosis* 2016, 253, 225–236, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.034.

Mansell G, Gorrie-Stone TJ, Bao Y, Kumari M, Schalkwyk LS, Mill J, Hannon E. Guidance for DNA methylation studies: statistical insights from the Illumina EPIC array. *BMC Genomics.* 2019 May 14;20(1):366. doi: 10.1186/s12864-019-5761-7.

Mansoor N, Vinknes KJ, Veierød MB, Retterstøl K. Effects of low-carbohydrate diets v. low-fat diets on body weight and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr.* 2016 Feb 14;115(3):466–79. doi: 10.1017/S0007114515004699.

Marchesi JAP, Ono RK, Cantão ME, Ibelli AMG, Peixoto JO, Moreira GCM, Godoy TF, Coutinho LL, Munari DP, Ledur MC. Exploring the genetic architecture of feed efficiency traits in chickens. *Sci Rep.* 2021 Feb 25;11(1):4622. doi: 10.1038/s41598-021-84125-9.

Marcus Y, Shefer G, Stern N. Adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;378:1–14. doi: 10.1016/j.mce.2012.06.021.

Maroun-Eid C, Ortega-Hernández A, Modrego J, Abad-Cardiel M, García-Donaire JA, Reinares L, Martell-Claros N, Gómez-Garre D. Effect of intensive multifactorial treatment on vascular progenitor cells in hypertensive patients. *PLoS One.* 2018 Jan 5;13(1):e0190494. doi: 10.1371/journal.pone.0190494.

Marsh LE, Norvilitis JM, Ingersoll TS, Li B. ADHD symptomatology, fear of intimacy, and sexual anxiety and behavior among college students in China and the United States. *J Atten Disord.* 2015 Mar;19(3):211–21. doi: 10.1177/1087054712453483.

Martin EM, Fry RC. Environmental Influences on the Epigenome: Exposure-Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annu Rev Public Health* 2018, 39, 309–333, doi:10.1146/annurev-publhealth-040617-014629

Martin J, Hamshere ML, Stergiakouli E, O'Donovan MC, Thapar A. Genetic risk for attention-deficit/hyperactivity disorder contributes to neurodevelopmental traits in the general population. *Biol Psychiatry.* 2014 Oct 15;76(8):664–71. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.02.013.

Martin J, Walters RK, Demontis D, Mattheisen M, Lee SH, Robinson E, Brikell I, Ghirardi L, Larsson H, Lichtenstein P, Eriksson N; 23andMe Research Team; Psychiatric Genomics Consortium: ADHD Subgroup; iPSYCH–Broad ADHD Workgroup; Werge T, Mortensen PB, Pedersen MG, Mors O, Nordentoft M, Hougaard DM, Bybjerg-Grauholm J, Wray NR, Franke B, Faraone SV, O'Donovan MC, Thapar A, Børglum

AD, Neale BM. A Genetic Investigation of Sex Bias in the Prevalence of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry*. 2018 Jun 15;83(12):1044-1053. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.11.026.

Martínez-González MA, Buil-Cosiales P, Corella D, Bulló M, Fitó M, Vioque J, Romaguera D, Martínez JA, Wärnberg J, López-Miranda J, Estruch R, Bueno-Cavanillas A, Arós F, Tur JA, Tinahones F, Serra-Majem L, Martín V, Lapetra J, Vázquez C, Pintó X, Vidal J, Daimiel L, Delgado-Rodríguez M, Matía P, Ros E, Fernández-Aranda F, Botella C, Portillo MP, Lamuela-Raventós RM, Marcos A, Sáez G, Gómez-Gracia E, Ruiz-Canela M, Toledo E, Alvarez-Alvarez I, Díez-Espino J, Sorlí JV, Basora J, Castañer O, Schröder H, Navarrete-Muñoz EM, Zulet MA, García-Ríos A, Salas-Salvadó J; PREDIMED-Plus Study Investigators. Cohort Profile: Design and methods of the PREDIMED-Plus randomized trial. *Int J Epidemiol*. 2019 Apr 1;48(2):387-388o. doi: 10.1093/ije/dyy225.

Martínez-González MA, de la Fuente-Arrillaga C, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Vazquez Z, Benito S, Tortosa A, Bes-Rastrollo M. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *BMJ*. 2008 Jun 14;336(7657):1348-51. doi: 10.1136/bmj.39561.501007.BE.

Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Martí A, Martínez JA, Martín-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr*. 2002 Aug;41(4):153-60. doi: 10.1007/s00394-002-0370-6.

Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E; PREDIMED INVESTIGATORS. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015 Jul-Aug;58(1):50-60. doi: 10.1016/j.pcad.2015.04.003.

Martínez-González MA. Benefits of the Mediterranean diet beyond the Mediterranean Sea and beyond food patterns. *BMC Med*. 2016 Oct 14;14(1):157. doi: 10.1186/s12916-016-0714-3.

Martínez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, Estruch R, Salas-Salvadó J, San Julián B, Sanchez-Tainta A, Ros E, Valls-Pedret C, Martínez-González MÁ. Mediterranean diet improves cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomised trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Dec;84(12):1318-25. doi: 10.1136/jnnp-2012-304792.

Massart R, Freyburger M, Suderman M, Paquet J, El Helou J, Belanger-Nelson E, Rachalski A, Koumar OC, Carrier J, Szyf M, Mongrain V. The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes. *Transl Psychiatry*. 2014 Jan 21;4(1):e347. doi: 10.1038/tp.2013.120.

Matsuda M., Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes. Res. Clin. Pract*. 2013;7:E330–E341. doi: 10.1016/j.orcp.2013.05.004.

Matsuoka R, Abe S, Tokoro F, Arai M, Noda T, Watanabe S, Horibe H, Fujimaki T, Oguri M, Kato K, Minatoguchi S, Yamada Y. Association of six genetic variants with myocardial infarction. *Int J Mol Med*. 2015 May;35(5):1451-9. doi: 10.3892/ijmm.2015.2115.

Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet*. 2022 Jul;38(7):676-707. doi: 10.1016/j.tig.2022.03.010.

Maugeri, A. The Effects of Dietary Interventions on DNA Methylation: Implications for Obesity Management. *Int J Mol Sci* 2020, 21, 8670, doi:10.3390/ijms21228670.

Mauvais-Jarvis F, Arnold AP, Reue K. A Guide for the Design of Pre-clinical Studies on Sex Differences in Metabolism. *Cell Metab*. 2017 Jun 6;25(6):1216-1230. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.033.

- Maxwell AL, Gardiner E, Loxton NJ. Investigating the relationship between reward sensitivity, impulsivity, and food addiction: A systematic review. *Eur Eat Disord Rev*. 2020 Jul;28(4):368-384. doi: 10.1002/erv.2732.
- Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:453-466. doi: 10.1038/nrn3071.
- Mazzocchi A, Leone L, Agostoni C, Pali-Schöll I. The Secrets of the Mediterranean Diet. Does [Only] Olive Oil Matter? *Nutrients*. 2019 Dec 3;11(12):2941. doi: 10.3390/nu11122941.
- McDermott MM, Newman AB. Remote Research and Clinical Trial Integrity During and After the Coronavirus Pandemic. *JAMA*. 2021 May 18;325(19):1935-1936. doi: 10.1001/jama.2021.4609.
- McGuinness AJ, Davis JA, Dawson SL, Loughman A, Collier F, O'Hely M, Simpson CA, Green J, Marx W, Hair C, Guest G, Mohebbi M, Berk M, Stupart D, Watters D, Jacka FN. A systematic review of gut microbiota composition in observational studies of major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2022 Apr;27(4):1920-1935. doi: 10.1038/s41380-022-01456-3.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011 May;7(3):263-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- McKinnon AC, Beath AP, Naismith SL. Relationships between sleep quality, depressive symptoms and MCI diagnosis: A path analysis. *J Affect Disord*. 2019 Sep 1;256:26-32. doi: 10.1016/j.jad.2019.05.045.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012 Jul;33(14):1787-847. doi: 10.1093/eurheartj/ehs104.
- McWhinney SR, Brosch K, Calhoun VD, Crespo-Facorro B, Crossley NA, Dannlowski U, Dickie E, Dietze LMF, Donohoe G, Du Plessis S, Ehrlich S, Emsley R, Furstova P, Glahn DC, Gonzalez-Valderrama A, Grotegerd D, Holleran L, Kircher TTJ, Knytl P, Kolenic M, Lencer R, Nenadić I, Opel N, Pfarr JK, Rodrigue AL, Roes-Murdy K, Ross AJ, Sim K, Škoch A, Spaniel F, Stein F, Švancer P, Tordesillas-Gutiérrez D, Undurraga J, Vázquez-Bourgon J, Voineskos A, Walton E, Weickert TW, Weickert CS, Thompson PM, van Erp TGM, Turner JA, Hajek T. Obesity and brain structure in schizophrenia - ENIGMA study in 3021 individuals. *Mol Psychiatry*. 2022 Sep;27(9):3731-3737. doi: 10.1038/s41380-022-01616-5.
- Meagher KM, McGowan ML, Settersten RA, Fishman JR, Juengst ET. Precisely Where Are We Going? Charting the New Terrain of Precision Prevention. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2017, 18, 369-387, doi:10.1146/annurev-genom-091416-035222.
- Mechanick JI, Farkouh ME, Newman JD, Garvey WT. Cardiometabolic-Based Chronic Disease, Adiposity and Dysglycemia Drivers: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(5):525-538. doi:10.1016/j.jacc.2019.11.044
- Mechanick JI, Garber AJ, Grunberger G, Handelsman Y, Garvey WT. Dysglycemia-Based Chronic Disease: An American Association of Clinical Endocrinologists Position Statement. *Endocr Pract*. 2018 Nov;24(11):995-1011. doi: 10.4158/PS-2018-0139.

Mechanick JI, Hurley DL, Garvey WT. Adiposity-Based Chronic Disease as a new Diagnostic Term: The American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Position Statement. *Endocr Pract.* 2017 Mar;23(3):372-378. doi: 10.4158/EP161688.PS. Epub 2016 Dec 14. PMID: 27967229.

Mehrmohamadi M, Sepehri MH, Nazer N, Norouzi MR. A Comparative Overview of Epigenomic Profiling Methods. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9, 714687, doi:10.3389/fcell.2021.714687.

Mehta NN, Dey AK, Maddineni R, Kraus WE, Huffman KM. GlycA measured by NMR spectroscopy is associated with disease activity and cardiovascular disease risk in chronic inflammatory diseases. *Am J Prev Cardiol.* 2020 Nov 7;4:100120. doi: 10.1016/j.ajpc.2020.100120.

Mena-Sánchez G, Babio N, Martínez-González MÁ, Corella D, Schröder H, Vioque J, Romaguera D, Martínez JA, Lopez-Miranda J, Estruch R, Wärnberg J, Bueno-Cavanillas A, Serra-Majem L, Tur JA, Arós F, Tinahones FJ, Sánchez VM, Lapetra J, Pintó X, Vidal J, Vázquez C, Ordovás JM, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martín P, Basora J, Buil-Cosiales P, Fernandez-Carrion R, Fitó M, Salas-Salvadó J; PREDIMED-PLUS investigators. Fermented dairy products, diet quality, and cardio-metabolic profile of a Mediterranean cohort at high cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018 Oct;28(10):1002-1011. doi: 10.1016/j.numecd.2018.05.006.

Mena-Sánchez G, Becerra-Tomás N, Babio N, Salas-Salvadó J. Dairy Product Consumption in the Prevention of Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Adv Nutr.* 2019 May 1;10(suppl_2):S144-S153. doi: 10.1093/advances/nmy083.

Mendizábal Y, Llorens S, Nava E. Hypertension in metabolic syndrome: vascular pathophysiology. *Int J Hypertens.* 2013;2013:230868. doi:10.1155/2013/230868

Mennella JA, Bobowski NK, Reed DR. The development of sweet taste: From biology to hedonics. *Rev Endocr Metab Disord.* 2016 Jun;17(2):171-8. doi: 10.1007/s11154-016-9360-5.

Mennella JA, Bobowski NK. The sweetness and bitterness of childhood: Insights from basic research on taste preferences. *Physiol Behav.* 2015 Dec 1;152(Pt B):502-7. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.05.015. Epub 2015 May 20.

Mennella JA, Pepino MY, Duke FF, Reed DR. Psychophysical dissection of genotype effects on human bitter perception. *Chem Senses.* 2011 Jan;36(2):161-7. doi: 10.1093/chemse/bjq106.

Mennella JA, Trabulsi JC. Complementary foods and flavor experiences: setting the foundation. *Ann Nutr Metab.* 2012;60 Suppl 2(Suppl 2):40-50. doi: 10.1159/000335337.

Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism.* 2013 Apr;62(4):457-78. doi: 10.1016/j.metabol.2012.08.012.

Mignogna C, Costanzo S, Ghulam A, Cerletti C, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L, Bonaccio M. Impact of Nationwide Lockdowns Resulting from The First Wave of the COVID-19 Pandemic on Food Intake, Eating Behaviours and Diet Quality: A Systematic Review. *Adv Nutr.* 2021 Dec 30;13(2):388-423. doi: 10.1093/advances/nmab130.

Milagro FI, Gómez-Abellán P, Campión J, Martínez JA, Ordovás JM, Garaulet M. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiol Int.* 2012 Nov;29(9):1180-94. doi: 10.3109/07420528.2012.719967.

Milaneschi Y, Simmons WK, van Rossum EFC, Penninx BW. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. *Mol Psychiatry*. 2019 Jan;24(1):18-33. doi: 10.1038/s41380-018-0017-5.

Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)*. 2007 Sep 1;4:18. doi: 10.1186/1743-7075-4-18.

Min JL, Hemani G, Davey Smith G, Relton C, Suderman M. Meffil: Efficient Normalization and Analysis of Very Large DNA Methylation Datasets. *Bioinformatics* 2018, 34, 3983–3989, doi:10.1093/bioinformatics/bty476.

Miola A, De Filippis E, Veldic M, Ho AM, Winham SJ, Mendoza M, Romo-Nava F, Nunez NA, Gardea Resendez M, Prieto ML, McElroy SL, Biernacka JM, Frye MA, Cuellar-Barboza AB. The genetics of bipolar disorder with obesity and type 2 diabetes. *J Affect Disord*. 2022 Sep 15;313:222-231. doi: 10.1016/j.jad.2022.06.084.

Mirabelli M, Chiefari E, Arcidiacono B, Corigliano DM, Brunetti FS, Maggisano V, Russo D, Foti DP, Brunetti A. Mediterranean Diet Nutrients to Turn the Tide against Insulin Resistance and Related Diseases. *Nutrients*. 2020 Apr 12;12(4):1066. doi: 10.3390/nu12041066.

Miranda JJ, Barrientos-Gutiérrez T, Corvalan C, Hyder AA, Lazo-Porras M, Oni T, Wells JCK. Understanding the rise of cardiometabolic diseases in low- and middle-income countries. *Nat Med*. 2019 Nov;25(11):1667-1679. doi: 10.1038/s41591-019-0644-7.

Mirhafez SR, Ebrahimi M, Saberi Karimian M, Avan A, Tayefi M, Heidari-Bakavoli A, Parizadeh MR, Moohebati M, Azarpazhooh MR, Esmaily H, Nematy M, Safarian M, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M. Serum high-sensitivity C-reactive protein as a biomarker in patients with metabolic syndrome: evidence-based study with 7284 subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2016 Nov;70(11):1298-1304. doi: 10.1038/ejcn.2016.111.

Mishra PP, Hänninen I, Raitoharju E, Marttila S, Mishra BH, Mononen N, Kähönen M, Hurme M, Raitakari O, Törönen P, Holm L, Lehtimäki T. Epigenome-450K-wide methylation signatures of active cigarette smoking: The Young Finns Study. *Biosci Rep*. 2020 Jul 31;40(7):BSR20200596. doi: 10.1042/BSR20200596.

Mitchell AJ, Vancampfort D, Sweers K, van Winkel R, Yu W, De Hert M. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic abnormalities in schizophrenia and related disorders--a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Bull*. 2013 Mar;39(2):306-18. doi: 10.1093/schbul/sbr148.

Mitrou PN, Kipnis V, Thiébaud AC, Reedy J, Subar AF, Wirfält E, Flood A, Mouw T, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Arch Intern Med*. 2007 Dec 10;167(22):2461-8. doi: 10.1001/archinte.167.22.2461.

Mocanu V, Bontea A, Anton-Păduraru DT. EATING BEHAVIOR IN RESPONSE TO ACUTE STRESS. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2016 Apr-Jun;120(2):223-7.

Moeller FG, Barratt ES, Dougherty DM, Schmitz JM, Swann AC. Psychiatric aspects of impulsivity. *Am J Psychiatry*. 2001 Nov;158(11):1783-93. doi: 10.1176/appi.ajp.158.11.1783.

Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, Eggersdorfer M. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur J Nutr*. 2018 May;57(Suppl 1):1-14. doi: 10.1007/s00394-018-1703-4.

Mohammed SG, Qoronfleh MW. Fruits. *Adv Neurobiol*. 2020;24:279-376. doi: 10.1007/978-3-030-30402-7_10.

Molina L, Sarmiento M, Peñafiel J, Donaire D, Garcia-Aymerich J, Gomez M, Ble M, Ruiz S, Frances A, Schröder H, Marrugat J, Elosua R. Validation of the Regicor Short Physical Activity Questionnaire for the Adult Population. *PLoS One*. 2017 Jan 13;12(1):e0168148. doi: 10.1371/journal.pone.0168148.

Molina-Serrano D, Kyriakou D, Kirmizis A. Histone Modifications as an Intersection Between Diet and Longevity. *Front Genet*. 2019 Mar 12;10:192. doi: 10.3389/fgene.2019.00192.

Mongraw-Chaffin M, Foster MC, Anderson CAM, Burke GL, Haq N, Kalyani RR, Ouyang P, Sibley CT, Tracy R, Woodward M, Vaidya D. Metabolically Healthy Obesity, Transition to Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol*. 2018 May 1;71(17):1857-1865. doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.055.

Montaño Z, Smith JD, Dishion TJ, Shaw DS, Wilson MN. Longitudinal relations between observed parenting behaviors and dietary quality of meals from ages 2 to 5. *Appetite*. 2015 Apr;87:324-9. doi: 10.1016/j.appet.2014.12.219.

Mora JC, Valencia WM. Exercise and Older Adults. *Clin Geriatr Med*. 2018 Feb;34(1):145-162. doi: 10.1016/j.cger.2017.08.007.

Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*. 2016 Mar;8(3):389-99. doi: 10.2217/epi.15.114.

Moreno Reyes P, Muñoz Gutiérrez C, Pizarro Mena R, Jiménez Torres S. Efectos del ejercicio físico sobre la calidad del sueño, insomnio y somnolencia diurna en personas mayores. Revisión de la literatura [Effects of physical exercise on sleep quality, insomnia, and daytime sleepiness in the elderly. A literature review]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2020 Jan-Feb;55(1):42-49. Spanish. doi: 10.1016/j.regg.2019.07.003.

Mörkl S, Butler MI, Holl A, Cryan JF, Dinan TG. Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Focus on Psychiatry. *Curr Nutr Rep*. 2020 Sep;9(3):171-182. doi: 10.1007/s13668-020-00313-5.

Mosca SJ, Langevin LM, Dewey D, Innes AM, Lionel AC, Marshall CC, Scherer SW, Parboosingh JS, Bernier FP. Copy-number variations are enriched for neurodevelopmental genes in children with developmental coordination disorder. *J Med Genet*. 2016 Dec;53(12):812-819. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103818.

Mosinger B, Redding KM, Parker MR, Yevshayeva V, Yee KK, Dyomina K, Li Y, Margolske RF. Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 23;110(30):12319-24. doi: 10.1073/pnas.1302827110.

Mostaza JM, Lahoz C. Nuevas pautas en el tratamiento de las dislipidemias [New approaches for the treatment of dyslipidemia]. *Med Clin (Barc)*. 2014;142(7):306-309. doi:10.1016/j.medcli.2013.04.026

Mullings EL, Donaldson LF, Melichar JK, Munafò MR. Effects of acute abstinence and nicotine administration on taste perception in cigarette smokers. *J Psychopharmacol*. 2010 Nov;24(11):1709-15. doi: 10.1177/0269881109105395.

Mulyadi M, Tonapa SI, Luneto S, Lin WT, Lee BO. Prevalence of mental health problems and sleep disturbances in nursing students during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. *Nurse Educ Pract*. 2021 Nov;57:103228. doi: 10.1016/j.nepr.2021.103228.

Muntner P, Shimbo D, Carey RM, Charleston JB, Gaillard T, Misra S, Myers MG, Ogedegbe G, Schwartz JE, Townsend RR, Urbina EM, Viera AJ, White WB, Wright JT Jr. Measurement of Blood Pressure in Humans: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2019 May;73(5):e35-e66. doi: 10.1161/HYP.0000000000000087.

Muntner P, Shimbo D, Carey RM, Charleston JB, Gaillard T, Misra S, Myers MG, Ogedegbe G, Schwartz JE, Townsend RR, Urbina EM, Viera AJ, White WB, Wright JT, NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017 Dec 16;390(10113):2627-2642. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32129-3.

Muñiz-Pedrogo DA, Jensen MD, Van Dyke CT, Murray JA, Woods JA, Chen J, Kashyap PC, Nehra V. Gut Microbial Carbohydrate Metabolism Hinders Weight Loss in Overweight Adults Undergoing Lifestyle Intervention With a Volumetric Diet. *Mayo Clin Proc*. 2018 Aug;93(8):1104-1110. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.02.019.

Muñoz-Garach A, García-Fontana B, Muñoz-Torres M. Nutrients and Dietary Patterns Related to Osteoporosis. *Nutrients*. 2020 Jul 3;12(7):1986. doi: 10.3390/nu12071986.

Muralidharan J, Moreno-Indias I, Bulló M, Lopez JV, Corella D, Castañer O, Vidal J, Atzeni A, Fernandez-García JC, Torres-Collado L, Fernández-Carrión R, Fito M, Olbeyra R, Gomez-Perez AM, Galiè S, Bernal-López MR, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvadó J, Tinahones FJ. Effect on gut microbiota of a 1-y lifestyle intervention with Mediterranean diet compared with energy-reduced Mediterranean diet and physical activity promotion: PREDIMED-Plus Study. *Am J Clin Nutr*. 2021 Sep 1;114(3):1148-1158. doi: 10.1093/ajcn/nqab150.

Murat K, Grüning B, Poterlowicz PW, Westgate G, Tobin DJ, Poterlowicz K. Ewastools: Infinium Human Methylation BeadChip Pipeline for Population Epigenetics Integrated into Galaxy. *Gigascience* 2020, 9, giaa049, doi:10.1093/gigascience/giaa049.

Murphy KJ, Parletta N. Implementing a Mediterranean-Style Diet Outside the Mediterranean Region. *Curr Atheroscler Rep*. 2018 May 4;20(6):28. doi: 10.1007/s11883-018-0732-z.

Murray RD. Savoring Sweet: Sugars in Infant and Toddler Feeding. *Ann Nutr Metab*. 2017;70 Suppl 3:38-46. doi: 10.1159/000479246.

Nakabayashi K, Komaki G, Tajima A, Ando T, Ishikawa M, Nomoto J, Hata K, Oka A, Inoko H, Sasazuki T; Japanese Genetic Research Group for Eating Disorders (JGRED); Shirasawa S. Identification of novel candidate loci for anorexia nervosa at 1q41 and 11q22 in Japanese by a genome-wide association analysis with microsatellite markers. *J Hum Genet*. 2009 Sep;54(9):531-7. doi: 10.1038/jhg.2009.74.

Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc*. 2005 Apr;53(4):695-9. doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x.

Navarrete-Muñoz EM, Vioque J, Toledo E, Oncina-Canovas A, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Corella D, Fitó M, Romaguera D, Alonso-Gómez AM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, López-Miranda J, Bueno-Cavanillas A, Matía-Martín P, Daimiel L, Sánchez VM, Vidal J, de Cos Blanco AI, Ros E, Diez-Espino J, Babio N, Fernandez-Carrión R, Castañer O, Colom A, Compañ-Gabucio L, Lete IS, Crespo-Oliva E, Abete I, Tomaino L, Casas R, Fernandez-Garcia JC, Santos-Lozano JM, Sarasa I, Gámez JM, Garcia-Rios JMA, Martín-Pelaez S, Ruiz-Canela M, Díaz-López A, Martínez-Lacruz R, Zomeño MD, Rayó E, Sellés CG, Canudas S, Goday A, García-de-la-Hera M. Dietary folate intake and metabolic syndrome in participants of PREDIMED-Plus study: a cross-sectional study. *Eur J Nutr*. 2021 Mar;60(2):1125-1136. doi: 10.1007/s00394-020-02364-4.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017 Dec 16;390(10113):2627-2642. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32129-3.

Nederkoorn C, Braet C, Van Eijls Y, Tanghe A, Jansen A. Why obese children cannot resist food: the role of impulsivity. *Eat Behav.* 2006 Nov;7(4):315-22. doi: 10.1016/j.eatbeh.2005.11.005.

Neiers F, Canivenc-Lavier MC, Briand L. What Does Diabetes "Taste" Like? *Curr Diab Rep.* 2016 Jun;16(6):49. doi: 10.1007/s11892-016-0746-2.

Nelson ME, Hamm MW, Hu FB, Abrams SA, Griffin TS. Alignment of Healthy Dietary Patterns and Environmental Sustainability: A Systematic Review. *Adv Nutr.* 2016 Nov 15;7(6):1005-1025. doi: 10.3945/an.116.012567.

Nematy M, Ahmadpour F, Rassouli ZB, Ardabili HM, Azimi-Nezhad M (2014) A Review on Underlying Differences in the Prevalence of Metabolic Syndrome in the Middle East, Europe and North America. *J Mol Genet Med* S1:019. doi:10.4172/1747-0862.S1-019

Nerenberg KA, Zarnke KB, Leung AA, Dasgupta K., Butalia S., McBrien K., Harris KC, Nakhla M., Cloutier L., Gelfer M. y col. Hypertension Canada's 2018 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults and Children. *Poder. J. Cardiol.* 2018; 34: 506–525. doi: 10.1016/j.cjca.2018.02.022.

Neufeld KA, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Commun Integr Biol.* 2011 Jul;4(4):492-4. doi: 10.4161/cib.4.4.15702.

Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2011 Mar;23(3):255-64, e119. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x.

Neuhouser ML. The importance of healthy dietary patterns in chronic disease prevention. *Nutr Res.* 2019 Oct;70:3-6. doi: 10.1016/j.nutres.2018.06.002.

Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisonson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* 2009 Apr;9(4):311-26. doi: 10.1016/j.cmet.2009.02.002.

Nie DS, Liu Y, Juan H, Yang X. Overexpression of human SPATA17 protein induces germ cell apoptosis in transgenic male mice. *Mol Biol Rep.* 2013 Feb;40(2):1905-10. doi: 10.1007/s11033-012-2246-z.

Nigg CR, Burbank PM, Padula C, Dufresne R, Rossi JS, Velicer WF, Laforge RG, Prochaska JO. Stages of change across ten health risk behaviors for older adults. *Gerontologist.* 1999 Aug;39(4):473-82. doi: 10.1093/geront/39.4.473.

Nikolova VL, Smith MRB, Hall LJ, Cleare AJ, Stone JM, Young AH. Perturbations in Gut Microbiota Composition in Psychiatric Disorders: A Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry.* 2021 Dec 1;78(12):1343-1354. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2021.2573.

Nilsen TI, Vatten LJ. Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: exploring the hyperinsulinaemia hypothesis. *Br J Cancer.* 2001 Feb 2;84(3):417-22. doi: 10.1054/bjoc.2000.1582.

Nilsson E, Jansson PA, Perfilov A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, Poulsen P, Ribøl-Madsen R, Pedersen NL, Almgren P, Fadista J, Rönn T, Klarlund Pedersen B, Scheele C, Vaag A, Ling C. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2014 Sep;63(9):2962-76. doi: 10.2337/db13-1459.

Nilsson E, Matte A, Perfiljev A, de Mello VD, Käkälä P, Pihlajamäki J, Ling C. Epigenetic Alterations in Human Liver From Subjects With Type 2 Diabetes in Parallel With Reduced Folate Levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Nov;100(11):E1491-501. doi: 10.1210/jc.2015-3204.

Nishimura T, Kubosaki A, Ito Y, Notkins AL. Disturbances in the secretion of neurotransmitters in IA-2/IA-2beta null mice: changes in behavior, learning and lifespan. *Neuroscience*. 2009 Mar 17;159(2):427-37. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.022.

Nishiyama, A.; Nakanishi, M. Navigating the DNA Methylation Landscape of Cancer. *Trends Genet* 2021, 37, 1012–1027, doi:10.1016/j.tig.2021.05.002.

Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, Elgzyri T, Hall E, Nilsson E, Yang BT, Lang S, Parikh H, Wessman Y, Weishaupt H, Attema J, Abels M, Wierup N, Almgren P, Jansson PA, Rönn T, Hansson O, Eriksson KF, Groop L, Ling C. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012 Dec;61(12):3322-32. doi: 10.2337/db11-1653.

Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, Stefanini L, Violi F, Carnevale R. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(1):4-13. doi: 10.2174/1871530317666171114121533.

Noël X, Van der Linden M, Brevers D, Campanella S, Verbanck P, Hanak C, Kornreich C, Verbruggen F. Separating intentional inhibition of prepotent responses and resistance to proactive interference in alcohol-dependent individuals. *Drug Alcohol Depend*. 2013 Mar 1;128(3):200-5. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2012.08.021.

Nøhr MK, Pedersen MH, Gille A, Egerod KL, Engelstoft MS, Husted AS, Sichlau RM, Grunddal KV, Poulsen SS, Han S, Jones RM, Offermanns S, Schwartz TW. GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology*. 2013 Oct;154(10):3552-64. doi: 10.1210/en.2013-1142.

Nolden AA, Feeney EL. Genetic Differences in Taste Receptors: Implications for the Food Industry. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2020 Mar 25;11:183-204. doi: 10.1146/annurev-food-032519-051653.

Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(2):119-29. doi: 10.2147/vhrm.1.2.119.64083.

Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*. 2007 Jan;45 Suppl S:S5-67. doi: 10.1016/j.jvs.2006.12.037..

November J. Morehan Moore's Mores: Computers, Genomics, and the Embrace of Innovation. *J Hist Biol* 2018, 51, 807–840, doi:10.1007/s10739-018-9539-6.

Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko AR, Auton A, Indap A, King KS, Bergmann S, Nelson MR, Stephens M, Bustamante CD. Genes mirror geography within Europe. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):98-101. doi: 10.1038/nature07331.

Obermann-Borst SA, Eilers PH, Tobi EW, de Jong FH, Slagboom PE, Heijmans BT, Steegers-Theunissen RP. Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr Res*. 2013 Sep;74(3):344-9. doi: 10.1038/pr.2013.95.

Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) impulsados por las Naciones Unidas. Visitado en 4 de enero de 2021. Visto en (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>).

Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999 Jan 1;27(1):29-34. doi: 10.1093/nar/27.1.29.

Okubo H, Inagaki H, Gondo Y, Kamide K, Ikebe K, Masui Y, Arai Y, Ishizaki T, Sasaki S, Nakagawa T, Kabayama M, Sugimoto K, Rakugi H, Maeda Y; SONIC Study Group. Association between dietary patterns and cognitive function among 70-year-old Japanese elderly: a cross-sectional analysis of the SONIC study. *Nutr J.* 2017 Sep 11;16(1):56. doi: 10.1186/s12937-017-0273-2.

Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez JR. Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009;302:128–139. doi: 10.1016/j.mce.2008.12.011.

Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science.* 2012 Apr 27;336(6080):489-93. doi: 10.1126/science.1219328.

O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res.* 2015 Jan 15;277:32-48. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.027.

O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev.* 2015 Jan;16(1):1-12. doi: 10.1111/obr.12229.

Ooi SX, Lee PL, Law HY, Say YH. Bitter receptor gene (TAS2R38) P49A genotypes and their associations with aversion to vegetables and sweet/fat foods in Malaysian subjects. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2010;19(4):491-8.

Ordovas JM, Corella D, Kaput J. Nutrient-gene interactions in lipoprotein metabolism - an overview. *Forum Nutr.* 2007;60:102-109. doi: 10.1159/000107079.

Ordovás JM, Corella D. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:71-118. doi: 10.1146/annurev.genom.5.061903.180008.

Ordovas JM, Ferguson LR, Tai ES, Mathers JC. Personalised nutrition and health. *BMJ.* 2018 Jun 13;361:bmj.k2173. doi: 10.1136/bmj.k2173.

Ordovás JM, Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol.* 2004 Apr;15(2):101-8. doi: 10.1097/00041433-200404000-00002.

Ordovás JM, Robertson R, Cléirigh EN. Gene-gene and gene-environment interactions defining lipid-related traits. *Curr Opin Lipidol.* 2011 Apr;22(2):129-36. doi: 10.1097/MOL.0b013e32834477a9.

Org E, Blum Y, Kasela S, Mehrabian M, Kuusisto J, Kangas AJ, Soininen P, Wang Z, Ala-Korpela M, Hazen SL, Laakso M, Lusi AJ. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol.* 2017 Apr 13;18(1):70. doi: 10.1186/s13059-017-1194-2.

Orkin AM, Gill PJ, Ghersi D, Campbell L, Sugarman J, Emsley R, Steg PG, Weijer C, Simes J, Rombey T, Williams HC, Wittes J, Moher D, Richards DP, Kasamon Y, Getz K, Hopewell S, Dickersin K, Wu T, Ayala AP, Schulz KF, Calleja S, Boutron I, Ross JS, Golub RM, Khan KM, Mulrow C, Siegfried N, Heber J, Lee N, Kearney PR, Wanyenze RK, Hróbjartsson A, Williams R, Bhandari N, Jüni P, Chan AW; CONSERVE Group. Guidelines for Reporting Trial Protocols and Completed Trials Modified Due to the COVID-19 Pandemic and Other Extenuating Circumstances: The CONSERVE 2021 Statement. *JAMA.* 2021 Jul 20;326(3):257-265. doi: 10.1001/jama.2021.9941.

Orozco-Ruiz X, Anesi A, Mattivi F, Breteler MMB. Branched-Chain and Aromatic Amino Acids Related to Visceral Adipose Tissue Impact Metabolic Health Risk Markers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022 Jun 16;107(7):e2896-e2905. doi: 10.1210/clinem/dgac160.

Ortal S, van de Glind G, Johan F, Itai B, Nir Y, Iliyan I, van den Brink W. The Role of Different Aspects of Impulsivity as Independent Risk Factors for Substance Use Disorders in Patients with ADHD: A Review. *Curr Drug Abuse Rev*. 2015;8(2):119-33. doi: 10.2174/1874473708666150916112913.

Østergaard SD, Dalsgaard S, Faraone SV, Munk-Olsen T, Laursen TM. Teenage Parenthood and Birth Rates for Individuals With and Without Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Nationwide Cohort Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017 Jul;56(7):578-584.e3. doi: 10.1016/j.jaac.2017.05.003.

Osterrieth PA. Le test de copie d'une figure complexe: Contribution à l'étude de la perception et la mémoire. *Archives of Psychology*. 1944;30:286—356.

Ottosson F, Brunkwall L, Ericson U, Nilsson PM, Almgren P, Fernandez C, Melander O, Orho-Melander M. Connection Between BMI-Related Plasma Metabolite Profile and Gut Microbiota. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Apr 1;103(4):1491-1501. doi: 10.1210/jc.2017-02114.

Otvos JD, Shalaurova I, Wolak-Dinsmore J, Connelly MA, Mackey RH, Stein JH, Tracy RP. GlycA: A Composite Nuclear Magnetic Resonance Biomarker of Systemic Inflammation. *Clin Chem*. 2015 May;61(5):714-23. doi: 10.1373/clinchem.2014.232918.

Ouni M, Saussenthaler S, Eichelmann F, Jähnert M, Stadion M, Wittenbecher C, Rönn T, Zellner L, Gottmann P, Ling C, Schulze MB, Schürmann A. Epigenetic Changes in Islets of Langerhans Preceding the Onset of Diabetes. *Diabetes*. 2020 Nov;69(11):2503-2517. doi: 10.2337/db20-0204.

Ovbiagele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. Hypertension. 2018 Jun;71(6):e13-e115. doi: 10.1161/HYP.0000000000000065. Epub 2017 Nov 13. Erratum in: Hypertension. 2018 Jun;71(6):e140-e144.

Owens JA. A clinical overview of sleep and attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2009 May;18(2):92-102.

Padró T, Cubedo J, Camino S, Béjar MT, Ben-Aicha S, Mendieta G, Escolà-Gil JC, Escate R, Gutiérrez M, Casani L, Badimon L, Vilahur G. Detrimental Effect of Hypercholesterolemia on High-Density Lipoprotein Particle Remodeling in Pigs. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jul 11;70(2):165-178. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.018.

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e177. doi: 10.1371/journal.pbio.0050177.

Pan WH, Yeh WT, Weng LC. Epidemiology of metabolic syndrome in Asia. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008;17 Suppl 1:37-42.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Dec;16(8):559-68. doi: 10.1016/j.numecd.2005.08.006.

Panagiotou M, Michel S, Meijer JH, Deboer T. The aging brain: sleep, the circadian clock and exercise. *Biochem Pharmacol*. 2021 Sep;191:114563. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114563.

Papandreou C, Arija V, Aretouli E, Tsilidis KK, Bulló M. Comparing eating behaviours, and symptoms of depression and anxiety between Spain and Greece during the COVID-19 outbreak: Cross-sectional analysis of two different confinement strategies. *Eur Eat Disord Rev.* 2020 Nov;28(6):836-846. doi: 10.1002/erv.2772.

Parikh RM, Mohan V. Changing definitions of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012 Jan;16(1):7-12. doi: 10.4103/2230-8210.91175.

Park J, Kim NH, Yi HJ, Rhee SG, Woo HA. Mitochondrial Peroxiredoxin III Protects against Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Caused by a Methionine-Choline Deficient Diet. *Antioxidants (Basel).* 2022 Dec 21;12(1):9. doi: 10.3390/antiox12010009.

Park KS, Etnier JL. An innovative protocol for the artificial speech-directed, contactless administration of laboratory-based comprehensive cognitive assessments: PAAD-2 trial management during the COVID-19 pandemic. *Contemp Clin Trials.* 2021 Aug;107:106500. doi: 10.1016/j.cct.2021.106500.

Park S, Liu M, Song MY. Mental stress and physical activity interact with the genetic risk scores of the genetic variants related to sweetness preference in high sucrose-containing food and glucose tolerance. *Food Sci Nutr.* 2020 May 21;8(7):3492-3503. doi: 10.1002/fsn3.1632.

Parkes SL, Furlong TM, Black AD, Balleine BW. Intermittent feeding alters sensitivity to changes in reward value. *Appetite.* 2017 Jun 1;113:1-6. doi: 10.1016/j.appet.2017.02.009.

Parnetti L, Amenta F, Gallai V. Choline alphoscerate in cognitive decline and in acute cerebrovascular disease: an analysis of published clinical data. *Mech Ageing Dev.* 2001 Nov;122(16):2041-55. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00312-8.

Parracho HMRT, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol.* 2005;54:987-991. doi: 10.1099/jmm.0.46101-0.

Parséus A, Sommer N, Sommer F, Caesar R, Molinaro A, Ståhlman M, Greiner TU, Perkins R, Bäckhed F. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut.* 2017 Mar;66(3):429-437. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310283.

Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar 13;13(4):271-82. doi: 10.1038/nrg3162.

Patel H, Chandra S, Alexander S, Soble J, Williams KA Sr. Plant-Based Nutrition: An Essential Component of Cardiovascular Disease Prevention and Management. *Curr Cardiol Rep.* 2017 Sep 8;19(10):104. doi: 10.1007/s11886-017-0909-z.

Pathirana TI, Jackson CA. Socioeconomic status and multimorbidity: a systematic review and meta-analysis. *Aust N Z J Public Health.* 2018 Apr;42(2):186-194. doi: 10.1111/1753-6405.12762.

Patterson R, McNamara E, Tainio M, de Sá TH, Smith AD, Sharp SJ, Edwards P, Woodcock J, Brage S, Wijndaele K. Sedentary behaviour and risk of all-cause, cardiovascular and cancer mortality, and incident type 2 diabetes: a systematic review and dose response meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 2018 Sep;33(9):811-829. doi: 10.1007/s10654-018-0380-1.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev.* 2006;86:747-803. doi: 10.1152/physrev.00036.2005.

Paumgarten FJR, Gomes-Carneiro MR, Oliveira ACAX. The impact of tobacco additives on cigarette smoke toxicity: a critical appraisal of tobacco industry studies. *Cad Saude Publica*. 2017 Sep 21;33Suppl 3(Suppl 3):e00132415. Portuguese, English. doi: 10.1590/0102-311X00132415.

Paz-Graniel I, Babio N, Becerra-Tomás N, Toledo E, Camacho-Barcia L, Corella D, Castañer-Niño O, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Fernandez-Aranda F, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, García-Ríos A, Bueno-Cavanillas A, Gaforio JJ, Matía-Martín P, Daimiel L, Sánchez VM, Vidal J, Prieto-Sánchez L, Ros E, Razquin C, Mestres C, Sorlí JV, Cuenca-Royo AM, Ríos A, Torres-Collado L, Vaquero-Luna J, Pérez-Farinós N, Zulet MA, Sánchez-Villegas A, Casas R, Bernal-Lopez MR, Santos-Lozano JM, Corbella X, Mateos D, Buil-Cosiales P, Jiménez-Murcia S, Fernandez-Carrión R, Forcano-Gamazo L, López M, Sempere-Pascual MÁ, Moreno-Rodríguez A, Gea A, de la Torre-Fornell R, Salas-Salvadó J; PREDIMED-Plus Investigators. Association between coffee consumption and total dietary caffeine intake with cognitive functioning: cross-sectional assessment in an elderly Mediterranean population. *Eur J Nutr*. 2021 Aug;60(5):2381-2396. doi: 10.1007/s00394-020-02415-w.

Paz-Graniel I, Babio N, Serra-Majem L, Vioque J, Zomeño MD, Corella D, Díaz-López A, Pintó X, Bueno-Cavanillas A, Tur JA, Daimiel L, Martínez JA, Becerra-Tomás N, Navarrete-Muñoz EM, Schröder H, Fernández-Carrión R, Ortiz-Andrellucchi A, Corbella E, Riquelme-Gallego B, Gallardo-Alfaro L, Micó V, Zulet M, Barrubés L, Fitó M, Ruiz-Canela M, Salas-Salvadó J. Fluid and total water intake in a senior mediterranean population at high cardiovascular risk: demographic and lifestyle determinants in the PREDIMED-Plus study. *Eur J Nutr*. 2020 Jun;59(4):1595-1606. doi: 10.1007/s00394-019-02015-3.

Paz-Graniel I, Fitó M, Ros E, Buil-Cosiales P, Corella D, Babio N, Martínez JA, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Vioque J, Romaguera D, López-Miranda J, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Serra-Majem L, Bueno-Cavanillas A, Tur JA, Martín-Sánchez V, Pintó X, Gaforio JJ, Matía-Martín P, Vidal J, Vázquez C, Daimiel L, García-Gavilán JF, Toledo E, Nishi SK, Sorlí JV, Castañer O, García-Ríos A, García de la Hera M, Barón-López FJ, Ruiz-Canela M, Morey M, Casas R, Garrido-Garrido EM, Tojal-Sierra L, Fernández-García JC, Vázquez-Ruiz Z, Fernández-Carrión R, Goday A, Peña-Orihuela PJ, Compañ-Gabucio L, Schröder H, Martínez-Gonzalez MA, Salas-Salvadó J. Impact of COVID-19 pandemic on the PREDIMED-Plus randomized clinical trial: Effects on the interventions, participants follow-up, and adiposity. *Front Nutr*. 2023 Jan 12;9:1098269. doi: 10.3389/fnut.2022.1098269.

Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen BA, Forslund K, Hildebrand F, Prifti E, Falony G, Le Chatelier E, Levenez F, Doré J, Mattila I, Plichta DR, Pöhö P, Hellgren LI, Arumugam M, Sunagawa S, Vieira-Silva S, Jørgensen T, Holm JB, Tröst K; MetaHIT Consortium; Kristiansen K, Brix S, Raes J, Wang J, Hansen T, Bork P, Brunak S, Oresic M, Ehrlich SD, Pedersen O. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016 Jul 21;535(7612):376-81. doi: 10.1038/nature18646.

Pedram P, Wadden D, Amini P, Gulliver W, Randell E, Cahill F, Vasdev S, Goodridge A, Carter JC, Zhai G, Ji Y, Sun G. Food addiction: its prevalence and significant association with obesity in the general population. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e74832. doi: 10.1371/journal.pone.0074832.

Pelsser LM, Frankena K, Buitelaar JK, Rommelse NN. Effects of food on physical and sleep complaints in children with ADHD: a randomised controlled pilot study. *Eur J Pediatr*. 2010;169:1129-1138. doi: 10.1007/s00431-010-1196-5.

Pelsser LM, Frankena K, Toorman J, Rodrigues Pereira R. Diet and ADHD, Reviewing the Evidence: A Systematic Review of Meta-Analyses of Double-Blind Placebo-Controlled Trials Evaluating the Efficacy of Diet Interventions on the Behavior of Children with ADHD. *PLoS One*. 2017 Jan 25;12(1):e0169277. doi: 10.1371/journal.pone.0169277.

Pepino MY, Finkbeiner S, Beauchamp GK, Mennella JA. Obese women have lower monosodium glutamate taste sensitivity and prefer higher concentrations than do normal-weight women. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 May;18(5):959-65. doi: 10.1038/oby.2009.493.

Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Metabolic syndrome: evidences for a personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Jan;56(1):67-76. doi: 10.1002/mnfr.201100531.

Perfilyev A, Dahlman I, Gillberg L, Rosqvist F, Iggman D, Volkov P, Nilsson E, Risérus U, Ling C. Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2017 Apr;105(4):991-1000. doi: 10.3945/ajcn.116.143164. Epub 2017 Mar 8. Erratum in: *Am J Clin Nutr*. 2017 Jul;106(1):325.

Perros P, MacFarlane TW, Counsell C, Frier BM. Altered taste sensation in newly-diagnosed NIDDM. *Diabetes Care* 1996, 19, 768–770. doi:10.2337/diacare.19.7.768.

Petty S, Salame C, Mennella JA, Pepino MY. Relationship between Sucrose Taste Detection Thresholds and Preferences in Children, Adolescents, and Adults. *Nutrients*. 2020 Jun 29;12(7):1918. doi: 10.3390/nu12071918.

Pfeiffer L, Wahl S, Pilling LC, Reischl E, Sandling JK, Kunze S, Holdt LM, Kretschmer A, Schramm K, Adamski J, Klopp N, Illig T, Hedman ÅK, Roden M, Hernandez DG, Singleton AB, Thasler WE, Grallert H, Gieger C, Herder C, Teupser D, Meisinger C, Spector TD, Kronenberg F, Prokisch H, Melzer D, Peters A, Deloukas P, Ferrucci L, Waldenberger M. DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015 Apr;8(2):334-42. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000804.

Philibert RA, Beach SR, Lei MK, Brody GH. Changes in DNA methylation at the aryl hydrocarbon receptor repressor may be a new biomarker for smoking. *Clin Epigenetics*. 2013 Oct 11;5(1):19. doi: 10.1186/1868-7083-5-19.

Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, Van Djik S, Muhlhauser B, Stirzaker C, Clark SJ. Critical Evaluation of the Illumina Methylation EPIC BeadChip Microarray for Whole-Genome DNA Methylation Profiling. *Genome Biol* 2016, 17, 208, doi:10.1186/s13059-016-1066-1.

Pikhart H, Pikhartova J. The Relationship Between Psychosocial Risk Factors and Health Outcomes of Chronic Diseases: A Review of the Evidence for Cancer and Cardiovascular Diseases. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark (2015).

Pisu M, Omaid I, Hoenemeyer T, Halilova KI, Schoenberger YM, Rogers LQ, Kenzik KM, Oster RA, Ivankova NV, Pekmez D, Fontaine K, Demark-Wahnefried W, Martin MY. Developing a virtual assessment protocol for the AMPLIFI Randomized Controlled Trial due to COVID-19: From assessing participants' preference to preparing the team. *Contemp Clin Trials*. 2021 Dec;111:106604. doi: 10.1016/j.cct.2021.106604.

Pi-Sunyer X, Blackburn G, Brancati FL, Bray GA, Bright R, Clark JM, Curtis JM, Espeland MA, Foreyt JP, Graves K, Haffner SM, Harrison B, Hill JO, Horton ES, Jakicic J, Jeffery RW, Johnson KC, Kahn S, Kelley DE, Kitabchi AE, Knowler WC, Lewis CE, Maschak-Carey BJ, Montgomery B, Nathan DM, Patricio J, Peters A, Redmon JB, Reeves RS, Ryan DH, Safford M, Van Dorsten B, Wadden TA, Wagenknecht L, Wesche-Thobaben J, Wing RR, Yanovski SZ. Reduction in weight and cardiovascular disease risk factors in individuals with type 2 diabetes: one-year results of the look AHEAD trial. *Diabetes Care*. 2007 Jun;30(6):1374-83. doi: 10.2337/dc07-0048.

Pluznick JL. Renal and cardiovascular sensory receptors and blood pressure regulation. *American journal of physiology Renal physiology*. 2013;305(4):F439–44.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 2007;7:803–815. doi: 10.1038/nri2171.

Povel CM, Boer JM, Onland-Moret NC, Dollé ME, Feskens EJ, van der Schouw YT. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) involved in insulin resistance, weight regulation, lipid metabolism and inflammation in relation to metabolic syndrome: an epidemiological study. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:133. Published 2012 Oct 29. doi:10.1186/1475-2840-11-133

Prasad H, Ryan DA, Celzo MF, Stapleton D. Metabolic syndrome: Definition and therapeutic implications. *Postgrad. Med*. 2012;124:21–30. doi: 10.3810/pgm.2012.01.2514.

Pruim RJ, Welch RP, Sanna S, Teslovich TM, Chines PS, Gliedt TP, Boehnke M, Abecasis GR, Willer CJ. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics*. 2010 Sep 15;26(18):2336–7. doi: 10.1093/bioinformatics/btq419.

Prunicki M, Cauwenberghs N, Lee J, Zhou X, Movassagh H, Noth E, Lurmann F, Hammond SK, Balmes JR, Desai M, Wu JC, Nadeau KC. Air pollution exposure is linked with methylation of immunoregulatory genes, altered immune cell profiles, and increased blood pressure in children. *Sci Rep*. 2021 Feb 18;11(1):4067. doi: 10.1038/s41598-021-83577-3.

Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80: 1012–8. DOI: 10.1093/ajcn/80.4.1012

Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, Schellenbaum G, Pahor M, Alderman MH, Weiss NS. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *JAMA*. 2003 May 21;289(19):2534–44. doi: 10.1001/jama.289.19.2534.

Pucci G, Alcidi R, Tap L, Battista F, Mattace-Raso F, Schillaci G. Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. *Pharmacol Res*. 2017 Jun;120:34–42. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.008.

Pugnaloni S, Alia S, Mancini M, Santoro V, Di Paolo A, Rabini RA, Fiorini R, Sabbatinelli J, Fabri M, Mazzanti L, Vignini A. A Study on the Relationship between Type 2 Diabetes and Taste Function in Patients with Good Glycemic Control. *Nutrients*. 2020 Apr 16;12(4):1112. doi: 10.3390/nu12041112.

Puig-Jové C, Julve J, Castelblanco E, Julián MT, Amigó N, Andersen HU, Ahluwalia TS, Rossing P, Mauricio D, Jensen MT, Alonso N. The novel inflammatory biomarker GlycA and triglyceride-rich lipoproteins are associated with the presence of subclinical myocardial dysfunction in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2022 Nov 24;21(1):257. doi: 10.1186/s12933-022-01652-z.

Puntoni M, Sbrana F, Bigazzi F, Minichilli F, Ferdeghini E, Sampietro T. Myeloperoxidase modulation by LDL apheresis in familial hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis*. 2011 Oct 20;10:185. doi: 10.1186/1476-511X-10-185.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007 Sep;81(3):559–75. doi: 10.1086/519795.

Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1827–38. doi: 10.1002/hep.23229.

Qi Q, Chu AY, Kang JH, Jensen MK, Curhan GC, Pasquale LR, Ridker PM, Hunter DJ, Willett WC, Rimm EB, Chasman DI, Hu FB, Qi L. Sugar-sweetened beverages and genetic risk of obesity. *N Engl J Med*. 2012 Oct 11;367(15):1387–96. doi: 10.1056/NEJMoal203039.

Rahat-Rozenbloom S, Fernandes J, Gloor GB, Wolever TM. Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans. *Int J Obes (Lond)*. 2014 Dec;38(12):1525-31. doi: 10.1038/ijo.2014.46.

Rahman MM, Islam F, -Or-Rashid MH, Mamun AA, Rahaman MS, Islam MM, Meem AFK, Sutradhar PR, Mitra S, Mimi AA, Emran TB, Fatimawali, Idroes R, Tallei TE, Ahmed M, Cavalu S. The Gut Microbiota (Microbiome) in Cardiovascular Disease and Its Therapeutic Regulation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jun 20;12:903570. doi: 10.3389/fcimb.2022.903570.

Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F Jr. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2021 May;14(5):601-621. doi: 10.1080/17512433.2021.1902303.

Rajamoorthi A, LeDuc CA, Thaker VV. The metabolic conditioning of obesity: A review of the pathogenesis of obesity and the epigenetic pathways that "program" obesity from conception. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Oct 18;13:1032491. doi: 10.3389/fendo.2022.1032491.

Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci*. 2013;9:1057–1069. doi: 10.7150/ijbs.7502.

Ramirez K, Fernández R, Collet S, Kiyar M, Delgado-Zayas E, Gómez-Gil E, Van Den Eynde T, T'Sjoen G, Guillaumon A, Mueller SC, Pásaro E. Epigenetics Is Implicated in the Basis of Gender Incongruence: An Epigenome-Wide Association Analysis. *Front Neurosci*. 2021 Aug 19;15:701017. doi: 10.3389/fnins.2021.701017.

Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr*. 1999 Dec;129(12):2177-83. doi: 10.1093/jn/129.12.2177.

Ramos Da Conceicao Neta ER, Johanningsmeier SD, McFeeters RF. The chemistry and physiology of sour taste--a review. *J Food Sci*. 2007 Mar;72(2):R33-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00282.x.

Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem*. 2003 Sep;36(6):421-9. doi: 10.1016/s0009-9120(03)00078-x.

Rauluseviciute I, Drablos F, Rye MB. DNA Methylation Data by Sequencing: Experimental Approaches and Recommendations for Tools and Pipelines for Data Analysis. *Clin Epigenetics* 2019, 11, 193, doi:10.1186/s13148-019-0795-x.

Raveendran AV, Misra A. Post COVID-19 Syndrome ("Long COVID") and Diabetes: Challenges in Diagnosis and Management. *Diabetes Metab Syndr*. 2021 Sep-Oct;15(5):102235. doi: 10.1016/j.dsx.2021.102235.

Rawat PS, Seyed Hameed AS, Meng X, Liu W. Utilization of glycosaminoglycans by the human gut microbiota: participating bacteria and their enzymatic machineries. *Gut Microbes*. 2022 Jan-Dec;14(1):2068367. doi: 10.1080/19490976.2022.2068367.

Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, Ray TD, Sheedy FJ, Goedeke L, Liu X, Khatsenko OG, Kaimal V, Lees CJ, Fernandez-Hernando C, Fisher EA, Temel RE, Moore KJ. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*. 2011 Oct 19;478(7369):404-7. doi: 10.1038/nature10486.

Razquin C, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA, Mitjavila MT, Estruch R, Marti A. A 3 years follow-up of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight gain. *Eur J Clin Nutr.* 2009 Dec;63(12):1387-93. doi: 10.1038/ejcn.2009.106.

Reaven GM. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? [published correction appears in *Am J Clin Nutr.* 2006 Nov;84(5):1253]. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6):1237-1247. doi:10.1093/ajcn/83.6.1237

Redondo-Useros N, Nova E, González-Zancada N, Díaz LE, Gómez-Martínez S, Marcos A. Microbiota and Lifestyle: A Special Focus on Diet. *Nutrients.* 2020 Jun 15;12(6):1776. doi: 10.3390/nu12061776.

Reed DR, Knaapila A. Genetics of taste and smell: Poisons and pleasures. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2010, 94, 213–240.

Reed DR, Mainland JD, Arayata CJ. Sensory nutrition: The role of taste in the reviews of commercial food products. *Physiol. Behav.* 2019, 209, 112579.

Rees K, Takeda A, Martin N, Ellis L, Wijesekara D, Vepa A, Das A, Hartley L, Stranges S. Mediterranean-style diet for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 13;3(3):CD009825. doi: 10.1002/14651858.CD009825.pub3.

Reichard J, Zimmer-Bensch G. The Epigenome in Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci.* 2021 Nov 3;15:776809. doi: 10.3389/fnins.2021.776809.

Reisinger C, Nkeh-Chungag BN, Fredriksen PM, Goswami N. The prevalence of pediatric metabolic syndrome-a critical look on the discrepancies between definitions and its clinical importance. *Int J Obes (Lond).* 2021 Jan;45(1):12-24. doi: 10.1038/s41366-020-00713-1.

Remely M, Tesar I, Hippe B, Gnauer S, Rust P, Haslberger AG. Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss. *Benef Microbes.* 2015;6(4):431-9. doi: 10.3920/BM2014.0104.

Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18793-800. doi: 10.1074/jbc.M109927200.

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000 Nov 15;14(22):2819-30. doi: 10.1101/gad.844900.

Rewers M, Zaccaro D, D'Agostino R, Haffner S, Saad MF, Selby JV, Bergman R, Savage P; Insulin Resistance Atherosclerosis Study Investigators. Insulin sensitivity, insulinemia, and coronary artery disease: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care.* 2004 Mar;27(3):781-7. doi: 10.2337/diacare.27.3.781.

Rey A. L'examen psychologique dans les cas d'encéphalopathie traumatique. *Archives of Psychology.* 1941;28:286—340.

Rey A. L'examen clinique en psychologie. Paris: Presses Universitaires de France. 1964

Reynolds LM, Wan M, Ding J, Taylor JR, Lohman K, Su D, Bennett BD, Porter DK, Gimple R, Pittman GS, Wang X, Howard TD, Siscovick D, Psaty BM, Shea S, Burke GL, Jacobs DR Jr, Rich SS, Hixson JE, Stein JH, Stunnenberg H, Barr RG, Kaufman JD, Post WS, Hoeschele I, Herrington DM, Bell DA, Liu Y. DNA Methylation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Associations With Cigarette Smoking and

Subclinical Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015 Oct;8(5):707-16. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001097.

Reynolds LM, Wan M, Ding J, Taylor JR, Lohman K, Su D, Bennett BD, Porter DK, Gimple R, Pittman GS, Wang X, Howard TD, Siscovick D, Psaty BM, Shea S, Burke GL, Jacobs DR Jr, Rich SS, Hixson JE, Stein JH, Stunnenberg H, Barr RG, Kaufman JD, Post WS, Hoeschele I, Herrington DM, Bell DA, Liu Y. DNA Methylation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Associations With Cigarette Smoking and Subclinical Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015 Oct;8(5):707-16. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001097.

Rhee EJ, Kim HC, Kim JH, Lee EY, Kim BJ, Kim EM, Song Y, Lim JH, Kim HJ, Choi S, Moon MK, Na JO, Park KY, Oh MS, Han SY, Noh J, Yi KH, Lee SH, Hong SC, Jeong IK. 2018 Guidelines for the management of dyslipidemia. *Korean J Intern Med.* 2019 Jul;34(4):723-771. doi: 10.3904/kjim.2019.188. Epub 2019 Jul 1. Erratum in: *Korean J Intern Med.* 2019 Sep;34(5):1171.

Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, Fernandez AF, Friedrichsen M, Vind BF, Højlund K, Beck-Nielsen H, Esteller M, Vaag A, Poulsen P. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. *PLoS One.* 2012;7(12):e51302. doi: 10.1371/journal.pone.0051302.

Rincón Mancheño I. Prevalencia del síndrome metabólico en población española adulta que asiste a consulta dietética. Tesis doctoral. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. 2017. Consultado en 4 abril de 2020 en: <https://eprints.ucm.es/49256/1/T40224.pdf>

Ristori MV, Quagliarello A, Reddel S, Ianiro G, Vicari S, Gasbarrini A, Putignani L. Autism, Gastrointestinal Symptoms and Modulation of Gut Microbiota by Nutritional Interventions. *Nutrients.* 2019 Nov 18;11(11):2812. doi: 10.3390/nu11112812.

Roberts MC, Fohner AE, Landry L, Olstad DL, Smit AK, Turbitt E, Allen CG. Advancing precision public health using human genomics: examples from the field and future research opportunities. *Genome Med.* 2021 Jun 1;13(1):97. doi: 10.1186/s13073-021-00911-0.

Robino A, Bevilacqua L, Pirastu N, Situlin R, Di Lenarda R, Gasparini P, Navarra CO. Polymorphisms in sweet taste genes (TAS1R2 and GLUT2), sweet liking, and dental caries prevalence in an adult Italian population. *Genes Nutr.* 2015 Sep;10(5):485. doi: 10.1007/s12263-015-0485-z.

Rodgers AB, Bale TL. Germ Cell Origins of Posttraumatic Stress Disorder Risk: The Transgenerational Impact of Parental Stress Experience. *Biol Psychiatry.* 2015 Sep 1;78(5):307-14. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.03.018.

Rodgers GP, Collins FS. Precision Nutrition-the Answer to "What to Eat to Stay Healthy". *JAMA.* 2020 Aug 25;324(8):735-736. doi: 10.1001/jama.2020.13601.

Rodríguez Bernardino A, García Polavieja P, Reviriego Fernández J, Serrano Ríos M. Prevalencia del síndrome metabólico y grado de concordancia en su diagnóstico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en España [Prevalence of metabolic syndrome and consistency in its diagnosis in type 2 diabetic patients in Spain]. *Endocrinol Nutr.* 2010 Feb;57(2):60-70. Spanish. doi: 10.1016/j.endonu.2009.12.002.

Rodríguez-Rodríguez E, López-Plaza B, López-Sobaler AM, Ortega RM. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos españoles. *Nutrición Hospitalaria.* 2011;26(2):355-363

Roehr B. American Psychiatric Association explains DSM-5. *BMJ* 2013; 346: f3591 doi: 10.1136/bmj.f3591

Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry*. 2016 Jun;21(6):738-48. doi: 10.1038/mp.2016.50.

Rohde K, Keller M, Klös M, Schleinitz D, Dietrich A, Schön MR, Gärtner D, Lohmann T, Dreßler M, Stumvoll M, Kovacs P, Blüher M, Böttcher Y. Adipose tissue depot specific promoter methylation of TMEM18. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Aug;92(8):881-8. doi: 10.1007/s00109-014-1154-1.

Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*. 2019 Mar;92:37-50. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.007.

Rohde K, Klös M, Hopp L, Liu X, Keller M, Stumvoll M, Dietrich A, Schön MR, Gärtner D, Lohmann T, Dreßler M, Kovacs P, Binder H, Blüher M, Böttcher Y. IRS1 DNA promoter methylation and expression in human adipose tissue are related to fat distribution and metabolic traits. *Sci Rep*. 2017 Sep 28;7(1):12369. doi: 10.1038/s41598-017-12393-5.

Roig Espert B, Fernández Carrión R, Ortega Azorín C, De la Cámara Sahuquillo E, Asensio EM, Martínez-Lacruz R, Corella D, Sorlí JV. “Modulación de las pautas horarias durante el período de confinamiento según el cronotipo en población de edad avanzada”. *Rev Clin Esp* 2021;221 (Espec Congr):131. 41º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Congreso virtual, Noviembre 2020

Romaguera D, Norat T, Mouw T, May AM, Bamia C, Slimani N, Travier N, Besson H, Luan J, Wareham N, Rinaldi S, Couto E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Cottet V, Palli D, Agnoli C, Panico S, Tumino R, Vineis P, Agudo A, Rodríguez L, Sanchez MJ, Amiano P, Barricarte A, Huerta JM, Key TJ, Spencer EA, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Orfanos P, Naska A, Trichopoulou A, Rohrmann S, Kaaks R, Bergmann M, Boeing H, Johansson I, Hellstrom V, Manjer J, Wirfält E, Uhre Jacobsen M, Overvad K, Tjønneland A, Halkjaer J, Lund E, Braaten T, Engeset D, Odysseos A, Riboli E, Peeters PH. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower abdominal adiposity in European men and women. *J Nutr*. 2009 Sep;139(9):1728-37. doi: 10.3945/jn.109.108902.

Román GC, Jackson RE, Gadhia R, Román AN, Reis J. Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. *Rev Neurol (Paris)*. 2019 Dec;175(10):724-741. doi: 10.1016/j.neurol.2019.08.005.

Rommelse NN, Franke B, Geurts HM, Hartman CA, Buitelaar JK. Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Mar;19(3):281-95. doi: 10.1007/s00787-010-0092-x.

Rönn T, Volkov P, Gillberg L, Kokosar M, Perfilyev A, Jacobsen AL, Jørgensen SW, Brøns C, Jansson PA, Eriksson KF, Pedersen O, Hansen T, Groop L, Stener-Victorin E, Vaag A, Nilsson E, Ling C. Impact of age, BMI and HbA1c 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*. 2015 Jul 1;24(13):3792-813. doi: 10.1093/hmg/ddv124.

Ros E, Martínez-González MA, Estruch R, Salas-Salvadó J, Fitó M, Martínez JA, Corella D. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Adv Nutr*. 2014 May 14;5(3):330S-6S. doi: 10.3945/an.113.005389.

Rosa AR, Sánchez-Moreno J, Martínez-Aran A, Salamero M, Torrent C, Reinares M, Comes M, Colom F, Van Riel W, Ayuso-Mateos JL, Kapczynski F, Vieta E. Validity and reliability of the Functioning Assessment Short Test (FAST) in bipolar disorder. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2007 Jun 7;3:5. doi: 10.1186/1745-0179-3-5.

Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2), 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>

Rosen ED. Epigenomic and transcriptional control of insulin resistance. *J Intern Med*. 2016 Nov;280(5):443–456. doi: 10.1111/joim.12547.

Rosique-Esteban N, Papandreou C, Romaguera D, Warnberg J, Corella D, Martínez-González MÁ, Díaz-López A, Estruch R, Vioque J, Arós F, García-Ríos A, Bueno-Cavanillas A, Vidal J, Serra-Majem L, Sibai AA, Tinahones FJ, Martínez JA, Ordovás JM, Tur JA, Ellacuría MT, Sanllorente A, Pintó X, Buil-Cosiales P, Fernández-Carrion R, Castañer O, Bulló M, Ruiz-Canela M, García-de la Hera M, Pérez-Farinós N, Barón-López FJ, Colom A, Abete I, Ros E, Salas-Salvadó J. Cross-sectional associations of objectively-measured sleep characteristics with obesity and type 2 diabetes in the PREDIMED-Plus trial. *Sleep*. 2018 Dec 1;41(12). doi: 10.1093/sleep/zsy190.

Ross JP, van Dijk S, Phang M, Skilton MR, Molloy PL, Oytam Y. Batch-Effect Detection, Correction and Characterization in Illumina Human Methylation 450 and Methylation EPIC BeadChip Array Data. *Clin Epigenetics* 2022, 14, 58, 969 doi:10.1186/s13148-022-01277-9.

Rouskas K, Kouvatsi A, Paletas K, Papazoglou D, Tsapas A, Lobbens S, Vatin V, Durand E, Labruno Y, Delplanque J, Meyre D, Froguel P. Common variants in FTO, MC4R, TMEM18, PRL, AIF1, and PCSK1 show evidence of association with adult obesity in the Greek population. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Feb;20(2):389–95. doi: 10.1038/oby.2011.177.

Rubino R, Iuliucci MR, Gatani S, Piscosquito A, D'Ambrosio B, Ingenito C, Scafuri L, Buonerba C, Di Lorenzo G. Mediterranean Diet as a Supportive Intervention in Cancer Patients: Current Evidence and Future Directions. *Curr Oncol*. 2022 Oct 11;29(10):7579–7582. doi: 10.3390/curroncol29100597.

Ruggiero E, Mignogna C, Costanzo S, Persichillo M, Di Castelnuovo A, Esposito S, Cerletti C, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L, Bonaccio M; Moli-LOCK Study Investigators. Changes in the consumption of foods characterising the Mediterranean dietary pattern and major correlates during the COVID-19 confinement in Italy: results from two cohort studies. *Int J Food Sci Nutr*. 2021 Dec;72(8):1105–1117. doi: 10.1080/09637486.2021.1895726.

Ruiz F, Keeley A, Léglise P, Tuleu C, Lachuer C, Rwabihama JP, Bachalat N, Boulaich I, Abdallah F, Rabus M, Ribemont AC, Michelon H, Wojcicki AD, Orlu M, Vallet T, Boudy V. Sex Differences in Medicine Acceptability: A New Factor to Be Considered in Medicine Formulation. *Pharmaceutics*. 2019 Aug 1;11(8):368. doi: 10.3390/pharmaceutics11080368.

Ruiz-Canela M, Guasch-Ferré M, Toledo E, Clish CB, Razquin C, Liang L, Wang DD, Corella D, Estruch R, Hernáez Á, Yu E, Gómez-Gracia E, Zheng Y, Arós F, Romaguera D, Dennis C, Ros E, Lapetra J, Serra-Majem L, Papandreou C, Portoles O, Fitó M, Salas-Salvadó J, Hu FB, Martínez-González MA. Plasma branched chain/aromatic amino acids, enriched Mediterranean diet and risk of type 2 diabetes: case-cohort study within the PREDIMED Trial. *Diabetologia*. 2018 Jul;61(7):1560–1571. doi: 10.1007/s00125-018-4611-5.

Rumawas ME, Meigs JB, Dwyer JT, McKeown NM, Jacques PF. Mediterranean-style dietary pattern, reduced risk of metabolic syndrome traits, and incidence in the Framingham Offspring Cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009; 90: 1608–14. doi: 10.3945/ajcn.2009.27908

Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell*. 2007;25:15–30. doi: 10.1016/j.molcel.2006.12.014.

Ryan DH, Yockey SR. Weight Loss and Improvement in Comorbidity: Differences at 5%, 10%, 15%, and Over. *Curr Obes Rep*. 2017 Jun;6(2):187–194. doi: 10.1007/s13679-017-0262-y.

Sacks FM, Katan M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am J Med.* 2002 Dec 30;113 Suppl 9B:13S-24S. doi: 10.1016/s0002-9343(01)00987-1.

Saeed S, Arslan M, Froguel P. Genetics of Obesity in Consanguineous Populations: Toward Precision Medicine and the Discovery of Novel Obesity Genes. *Obesity (Silver Spring).* 2018 Mar;26(3):474-484. doi: 10.1002/oby.22064.

Saint-Maurice PF, Troiano RP, Bassett DR Jr, Graubard BI, Carlson SA, Shiroma EJ, Fulton JE, Matthews CE. Association of Daily Step Count and Step Intensity with Mortality Among US Adults. *JAMA.* 2020 Mar 24;323(12):1151-1160. doi: 10.1001/jama.2020.1382.

Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018 Feb 26;20(2):12. doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.

Sakthianandeswaren A, Parsons MJ, Mouradov D, MacKinnon RN, Catimel B, Liu S, Palmieri M, Love C, Jorissen RN, Li S, Whitehead L, Putoczki TL, Preaudet A, Tsui C, Nowell CJ, Ward RL, Hawkins NJ, Desai J, Gibbs P, Ernst M, Street I, Buchert M, Sieber OM. *MACROD2* Haploinsufficiency Impairs Catalytic Activity of PARP1 and Promotes Chromosome Instability and Growth of Intestinal Tumors. *Cancer Discov.* 2018 Aug;8(8):988-1005. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0909.

Salas LA, Peres LC, Thayer ZM, Smith RW, Guo Y, Chung W, Si J, Liang L. A transdisciplinary approach to understand the epigenetic basis of race/ethnicity health disparities. *Epigenomics.* 2021 Nov;13(21):1761-1770. doi: 10.2217/epi-2020-0080..

Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, Estruch R, Covas MI, Corella D, Arós F, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E; PREDIMED Study Investigators. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care.* 2011 Jan;34(1):14-9. doi: 10.2337/dc10-1288.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, Ros E, Covas MI, Ibarrola-Jurado N, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Romaguera D, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez-González MA. Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2014 Jan 7;160(1):1-10. doi: 10.7326/M13-1725.

Salas-Salvadó J, Díaz-López A, Ruiz-Canela M, Basora J, Fitó M, Corella D, Serra-Majem L, Wärnberg J, Romaguera D, Estruch R, Vidal J, Martínez JA, Arós F, Vázquez C, Ros E, Vioque J, López-Miranda J, Bueno-Cavanillas A, Tur JA, Tinahones FJ, Martín V, Lapetra J, Pintó X, Daimiel L, Delgado-Rodríguez M, Matía P, Gómez-Gracia E, Díez-Espino J, Babio N, Castañer O, Sorlí JV, Fiol M, Zulet MÁ, Bulló M, Goday A, Martínez-González MÁ; PREDIMED-Plus investigators. Effect of a Lifestyle Intervention Program With Energy-Restricted Mediterranean Diet and Exercise on Weight Loss and Cardiovascular Risk Factors: One-Year Results of the PREDIMED-Plus Trial. *Diabetes Care.* 2019 May;42(5):777-788. doi: 10.2337/dc18-0836.

Salas-Salvadó J, Fernández-Ballart J, Ros E, Martínez-González MA, Fitó M, Estruch R, Corella D, Fiol M, Gómez-Gracia E, Arós F, Flores G, Lapetra J, Lamuela-Raventós R, Ruiz-Gutiérrez V, Bulló M, Basora J, Covas MI; PREDIMED Study Investigators. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med.* 2008 Dec 8;168(22):2449-2458. doi: 10.1001/archinte.168.22.2449

Sala-Vila A, Guasch-Ferré M, Hu FB, Sánchez-Tainta A, Bulló M, Serra-Mir M, López-Sabater C, Sorlí JV, Arós F, Fiol M, Muñoz MA, Serra-Majem L, Martínez JA, Corella D, Fitó M, Salas-Salvadó J, Martínez-González MA, Estruch R, Ros E; PREDIMED Investigators. B. Dietary α -Linolenic Acid, Marine ω -3 Fatty Acids, and Mortality in a Population With High Fish Consumption: Findings From the PREvención con Dieta

MEDiterránea (PREDIMED) Study. *J Am Heart Assoc.* 2016 Jan 26;5(1):e002543. doi: 10.1161/JAHA.115.002543.

Sales VM, Ferguson-Smith AC, Patti ME. Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell Metab.* 2017 Mar 7;25(3):559-571. doi: 10.1016/j.cmet.2017.02.016.

Samochowiec J, Misiak B. Gut microbiota and microbiome in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry.* 2021 Sep 1;34(5):503-507. doi: 10.1097/YCO.0000000000000733.

Sampath H, Ntambi JM. Role of stearoyl-CoA desaturase-1 in skin integrity and whole body energy balance. *J Biol Chem.* 2014 Jan 31;289(5):2482-8. doi: 10.1074/jbc.R113.516716.

Samson SL, Garber AJ. Metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014 Mar;43(1):1-23. doi: 10.1016/j.ecl.2013.09.009.

Samuelsson AM, Bollano E, Mobini R, Larsson BM, Omerovic E, Fu M, Waagstein F, Holmang A. Hyperinsulinemia: Effect on cardiac mass/function, angiotensin II receptor expression, and insulin signaling pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006;291:H787-H796. doi: 10.1152/ajpheart.00974.2005.

Sanchez-Mut JV, Heyn H, Vidal E, Moran S, Sayols S, Delgado-Morales R, Schultz MD, Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Pons-Espinal M, de Lagran MM, Dopazo J, Rabano A, Avila J, Dierssen M, Lott I, Ferrer I, Ecker JR, Esteller M. Human DNA methylomes of neurodegenerative diseases show common epigenomic patterns. *Transl Psychiatry.* 2016 Jan 19;6(1):e718. doi: 10.1038/tp.2015.214.

Sánchez-Taínta A, Estruch R, Bulló M, Corella D, Gómez-Gracia E, Fiol M, Algorta J, Covas MI, Lapetra J, Zazpe I, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E, Martínez-González MA; PREDIMED group. Adherence to a Mediterranean-type diet and reduced prevalence of clustered cardiovascular risk factors in a cohort of 3,204 high-risk patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008 Oct;15(5):589-93. doi: 10.1097/HJR.0b013e328308ba61.

Sánchez-Villegas A, Álvarez-Pérez J, Toledo E, Salas-Salvadó J, Ortega-Azorín C, Zomeño MD, Vioque J, Martínez JA, Romaguera D, Pérez-López J, López-Miranda J, Estruch R, Bueno-Cavanillas A, Arós F, Tur JA, Tinahones FJ, Lecea O, Martín V, Ortega-Calvo M, Vázquez C, Pintó X, Vidal J, Daimiel L, Delgado-Rodríguez M, Matía P, Corella D, Díaz-López A, Babio N, Muñoz MÁ, Fitó M, García de la Hera M, Abete I, García-Rios A, Ros E, Ruiz-Canela M, Martínez-González MÁ, Izquierdo M, Serra-Majem L. Seafood Consumption, Omega-3 Fatty Acids Intake, and Life-Time Prevalence of Depression in the PREDIMED-Plus Trial. *Nutrients.* 2018 Dec 18;10(12):2000. doi: 10.3390/nu10122000.

Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *JAMA.* 2014 May 7;311(17):1770-7. doi: 10.1001/jama.2014.4144.

Sanllorente A, Soria-Florido MT, Castañer O, Lassale C, Salas-Salvadó J, Martínez-González MÁ, Subirana I, Ros E, Corella D, Estruch R, Tinahones FJ, Hernáez Á, Fitó M. A lifestyle intervention with an energy-restricted Mediterranean diet and physical activity enhances HDL function: a substudy of the PREDIMED-Plus randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2021 Nov 8;114(5):1666-1674. doi: 10.1093/ajcn/nqab246. PMID: 34582548.

Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Vösa U, Mujagic Z, Masclee AAM, Jonkers DMAE, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Franke L, Zhernakova A, Fu J, Wijmenga C, McCarthy MI. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet.* 2019 Apr;51(4):600-605. doi: 10.1038/s41588-019-0350-x.

Santos RO, Gorgulho BM, Castro MA, Fisberg RM, Marchioni DM, Baltar VT. Principal Component Analysis and Factor Analysis: differences and similarities in Nutritional Epidemiology application. *Rev Bras Epidemiol*. 2019 Jul 29;22:e190041. doi: 10.1590/1980-549720190041.

Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4):450-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.637793.

Sayols-Baixeras S, Lluís-Ganella C, Subirana I, Salas LA, Vilahur N, Corella D, Muñoz D, Segura A, Jimenez-Conde J, Moran S, Soriano-Tárraga C, Roquer J, Lopez-Farré A, Marrugat J, Fitó M, Elosua R. Identification of a new locus and validation of previously reported loci showing differential methylation associated with smoking. The REGICOR study. *Epigenetics*. 2015;10(12):1156-65. doi: 10.1080/15592294.2015.1115175.

Sayón-Orea C, Razquin C, Bulló M, Corella D, Fitó M, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, López-Miranda J, Bueno-Cavanillas A, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martín P, Daimiel L, Sánchez VM, Vidal J, Vázquez C, Ros E, Ruiz-Canela M, Sorlí JV, Castañer O, Fiol M, Navarrete-Muñoz EM, Arós F, Gómez-Gracia E, Zulet MA, Sánchez-Villegas A, Casas R, Bernal-López R, Santos-Lozano JM, Corbella E, Bouzas C, García-Arellano A, Basora J, Asensio EM, Schröder H, Moñino M, García de la Hera M, Tojal-Sierra L, Toledo E, Díaz-López A, Goday A, Salas-Salvado J, Martínez-González MA. Effect of a Nutritional and Behavioral Intervention on Energy-Reduced Mediterranean Diet Adherence Among Patients With Metabolic Syndrome: Interim Analysis of the PREDIMED-Plus Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019 Oct 15;322(15):1486-1499. doi: 10.1001/jama.2019.14630.

Scaglioni S, De Cosmi V, Ciappolino V, Parazzini F, Brambilla P, Agostoni C. Factors Influencing Children's Eating Behaviours. *Nutrients*. 2018 May 31;10(6):706. doi: 10.3390/nu10060706.

Schaffhausen J. What Precisely Is Precision Medicine? *Trends Pharmacol Sci* 2017, 38, 1–2, doi:10.1016/j.tips.2016.11.004.

Scheithauer TPM, Rampanelli E, Nieuwdorp M, Vallance BA, Verchere CB, van Raalte DH, Herrema H. Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front Immunol*. 2020 Oct 16;11:571731. doi: 10.3389/fimmu.2020.571731.

Scherthaner GH, Kopp HP, Kriwanek S, Krzyzanowska K, Satler M, Koppensteiner R, Scherthaner G. Effect of massive weight loss induced by bariatric surgery on serum levels of interleukin-18 and monocyte-chemoattractant-protein-1 in morbid obesity. *Obes Surg*. 2006 Jun;16(6):709-15. doi: 10.1381/096089206777346763.

Schiebinger L, Stefanick ML. Gender Matters in Biological Research and Medical Practice. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Jan 19;67(2):136-138. doi: 10.1016/j.jacc.2015.11.029.

Schiffman SS. Taste and smell losses in normal aging and disease. *JAMA*. 1997 Oct 22-29;278(16):1357-62.

Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421–427 (2014).

Schröder H, Cárdenas-Fuentes G, Martínez-González MA, Corella D, Vioque J, Romaguera D, Alfredo Martínez J, Tinahones FJ, Miranda JL, Estruch R, Bueno-Cavanillas A, Arós F, Marcos A, Tur JA, Wärnberg J, Serra-Majem L, Martín V, Vázquez C, Lapetra J, Pintó X, Vidal J, Daimiel L, Gaforio JJ, Matía-Martín P, Ros E, Castañer O, Lassale C, Ruiz-Canela M, Asensio EM, Basora J, Torres-Collado L, García-Rios A, Abete I, Toledo E, Buil-Cosiales P, Bullo M, Goday A, Fitó M, Salas-Salvado J; PREDIMED-Plus investigators. Effectiveness of the physical activity intervention program in the PREDIMED-Plus study: a

randomized controlled trial. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2018 Nov 13;15(1):110. doi: 10.1186/s12966-018-0741-x.

Schröder H, Fitó M, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Lamuela-Raventós R, Ros E, Salaverria I, Fiol M, Lapetra J, Vinyoles E, Gómez-Gracia E, Lahoz C, Serra-Majem L, Pintó X, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI. A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *J Nutr.* 2011 Jun;141(6):1140-5. doi: 10.3945/jn.110.135566.

Schröder H, Zomeño MD, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Corella D, Vioque J, Romaguera D, Martínez JA, Tinahones FJ, Miranda JL, Estruch R, Bueno-Cavanillas A, Alonso Gómez AM, Tur JA, Warnberg J, Serra-Majem L, Martín V, Vázquez C, Lapetra J, Pintó X, Vidal J, Daimiel L, Gaforio JJ, Matia-Martin P, Ros E, Lassale C, Ruiz-Canela M, Babio N, Sorlí JV, Garcia-Arellano A, Díaz-López A, Fitó M, Castañer O; PREDIMED-Plus investigators. Validity of the energy-restricted Mediterranean Diet Adherence Screener. *Clin Nutr.* 2021 Aug;40(8):4971-4979. doi: 10.1016/j.clnu.2021.06.030.

Schrott R, Song A, Ladd-Acosta C. Epigenetics as a Biomarker for Early-Life Environmental Exposure. *Curr Environ Health Rep* 2022, 9, 604–624, doi:10.1007/s40572-022-00373-5.

Schulte EM, Grilo CM, Gearhardt AN. Shared and unique mechanisms underlying binge eating disorder and addictive disorders. *Clin Psychol Rev.* 2016 Mar;44:125-139. doi: 10.1016/j.cpr.2016.02.001.

Schweitzer JB, Cummins TK, Kant CA. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Med Clin North Am.* 2001 May;85(3):757-77. doi: 10.1016/s0025-7125(05)70339-4. PMID: 11349483.

Schweren LJS, Larsson H, Vinke PC, Li L, Kvalvik LG, Arias-Vasquez A, Haavik J, Hartman CA. Diet quality, stress and common mental health problems: A cohort study of 121,008 adults. *Clin Nutr.* 2021 Mar;40(3):901-906. doi: 10.1016/j.clnu.2020.06.016.

Schwingshackl L, Chaimani A, Schwedhelm C, Toledo E, Püsch M, Hoffmann G, Boeing H. Comparative effects of different dietary approaches on blood pressure in hypertensive and pre-hypertensive patients: A systematic review and network meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(16):2674-2687. doi: 10.1080/10408398.2018.1463967.

Schwingshackl L, Hoffmann G. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2014; 24(9): 929–39. doi: 10.1016/j.numecd.2014.03.003

Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ, Kaakinen M, Pervjakova N, Pers TH, Johnson AD, Eicher JD, Jackson AU, Ferreira T, Lee Y, Ma C, Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Qi L, Van Zuydam NR, Mahajan A, Chen H, Almgren P, Voight BF, Grallert H, Müller-Nurasyid M, Ried JS, Rayner NW, Robertson N, Karssen LC, van Leeuwen EM, Willems SM, Fuchsberger C, Kwan P, Teslovich TM, Chanda P, Li M, Lu Y, Dina C, Thuillier D, Yengo L, Jiang L, Sparso T, Kestler HA, Chheda H, Eisele L, Gustafsson S, Fränberg M, Strawbridge RJ, Benediktsson R, Hreidarsson AB, Kong A, Sigurðsson G, Kerrison ND, Luan J, Liang L, Meitinger T, Roden M, Thorand B, Esko T, Mihailov E, Fox C, Liu CT, Rybin D, Isomaa B, Lyssenko V, Tuomi T, Couper DJ, Pankow JS, Grarup N, Have CT, Jørgensen ME, Jørgensen T, Linneberg A, Cornelis MC, van Dam RM, Hunter DJ, Kraft P, Sun Q, Edkins S, Owen KR, Perry JRB, Wood AR, Zeggini E, Tajer-Fernandes J, Abecasis GR, Bonnycastle LL, Chines PS, Stringham HM, Koistinen HA, Kinnunen L, Sennblad B, Mühleisen TW, Nöthen MM, Pechlivanis S, Baldassarre D, Gertow K, Humphries SE, Tremoli E, Klopp N, Meyer J, Steinbach G, Wennauer R, Eriksson JG, Männistö S, Peltonen L, Tikkanen E, Charpentier G, Eury E, Lobbens S, Gigante B, Leander K, McLeod O, Bottinger EP, Gottesman O, Ruderfer D, Blüher M, Kovacs P, Tonjes A, Maruthur NM, Scapoli C, Erbel R, Jöckel KH, Moebus S, de Faire U, Hamsten A, Stumvoll M, Deloukas P, Donnelly PJ, Frayling TM, Hattersley AT, Ripatti S, Salomaa V, Pedersen NL, Boehm BO, Bergman RN, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Hansen T, Pedersen O, Barroso I, Lannfelt L, Ingelsson E, Lind L, Lindgren CM, Cauchi S, Froguel P, Loos RJF, Balkau B, Boeing H, Franks PW, Barricarte Gurra A, Palli D, van der Schouw YT, Altshuler D, Groop LC, Langenberg C, Wareham NJ,

Sijbrands E, van Duijn CM, Florez JC, Meigs JB, Boerwinkle E, Gieger C, Strauch K, Metspalu A, Morris AD, Palmer CNA, Hu FB, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Dupuis J, Morris AP, Boehnke M, McCarthy MI, Prokopenko I; DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes*. 2017 Nov;66(11):2888-2902. doi: 10.2337/db16-1253.

Segura J, Ruilope LM. Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system. *Public Health Nutr*. 2007;10:1151–1155. doi: 10.1017/S136898000700064X.

Sellbom KS, Gunstad J. Cognitive function and decline in obesity. *J Alzheimers Dis*. 2012;30 Suppl 2:S89-95. doi: 10.3233/JAD-2011-111073.

Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Peña Quintana L. Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000) [Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the enKid study (1998-2000)]. *Med Clin (Barc)*. 2003 Nov 29;121(19):725-32. Spanish. doi: 10.1016/s0025-7753(03)74077-9.

Serra-Majem L, Roman B, Estruch R. Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutrition Review*. 2006; 64: S27–47. doi: 10.1111/j.1753-4887.2006.tb00232.x

Severance EG, Gressitt KL, Stallings CR, Origoni AE, Khushalani S, Leweke FM, Dickerson FB, Yolken RH. Discordant patterns of bacterial translocation markers and implications for innate immune imbalances in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2013 Aug;148(1-3):130-7. doi: 10.1016/j.schres.2013.05.018.

Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blüher M, Stumvoll M, Stampfer MJ; Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008 Jul 17;359(3):229-41. doi: 10.1056/NEJMoa0708681.

Shaikh AR, Yaroch AL, Nebeling L, Yeh MC, Resnicow K. Psychosocial predictors of fruit and vegetable consumption in adults: a review of the literature. *Am J Prev Med*. 2008 Jun;34(6):535-543. doi: 10.1016/j.amepre.2007.12.028.

Sharma AM, Engeli S. The role of renin-angiotensin system blockade in the management of hypertension associated with the cardiometabolic syndrome. *J. Cardiometab. Syndr*. 2006;1:29–35. doi: 10.1111/j.0197-3118.2006.05422.x.

Sharma S, Fernandes MF, Fulton S. Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal. *Int J Obes (Lond)*. 2013 Sep;37(9):1183-91. doi: 10.1038/ijo.2012.197. Epub 2012 Dec 11. Sheelakumari R, Sarma SP, Kesavadas C, Thomas B, Sasi D, Sarath LV, Justus S, Mathew M, Menon RN. Multimodality Neuroimaging in Mild Cognitive Impairment: A Cross-sectional Comparison Study. *Ann Indian Acad Neurol*. 2018 Apr-Jun;21(2):133-139. doi: 10.4103/aian.AIAN_379_17.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):27-36. doi: 10.1093/carcin/bgp220.

Sharrett AR, Heiss G, Chambless LE, Boerwinkle E, Coady SA, Folsom AR, Patsch W. Metabolic and lifestyle determinants of postprandial lipemia differ from those of fasting triglycerides: The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Feb;21(2):275-81. doi: 10.1161/01.atv.21.2.275.

Shen J, Wilmot KA, Ghasemzadeh N, Molloy DL, Burkman G, Mekonnen G, Gongora MC, Quyyumi AA, Sperling LS. Mediterranean Dietary Patterns and Cardiovascular Health. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:425-49. doi: 10.1146/annurev-nutr-011215-025104.

Shendure J, Findlay GM, Snyder MW. Genomic Medicine-Progress, Pitfalls, and Promise. *Cell.* 2019 Mar 21;177(1):45-57. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.003.

Shenker NS, Polidoro S, van Veldhoven K, Sacerdote C, Ricceri F, Birrell MA, Belvisi MG, Brown R, Vineis P, Flanagan JM. Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. *Hum Mol Genet.* 2013 Mar 1;22(5):843-51. doi: 10.1093/hmg/ddt488.

Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2017, 22, 365–367, doi:10.1177/1074248416686187.

Sherrington C, Tiedemann A, Fairhall N, Close JC, Lord SR. Exercise to prevent falls in older adults: an updated meta-analysis and best practice recommendations. *N S W Public Health Bull.* 2011 Jun;22(3-4):78-83. doi: 10.1071/NB10056.

Shi X, Ma T, Sakandar HA, Menghe B, Sun Z. Gut microbiome and aging nexus and underlying mechanism. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022 Sep;106(17):5349-5358. doi: 10.1007/s00253-022-12089-5.

Shimobayashi M, Albert V, Woelnerhanssen B, Frei IC, Weissenberger D, Meyer-Gerspach AC, Clement N, Moes S, Colombi M, Meier JA, Swierczynska MM, Jenö P, Beglinger C, Peterli R, Hall MN. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2018 Apr 2;128(4):1538-1550. doi: 10.1172/JCI96139.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1793-801. doi: 10.1172/JCI29069. Erratum in: *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2308.

Shorey-Kendrick LE, McEvoy CT, Ferguson B, Burchard J, Park BS, Gao L, Vuylsteke BH, Milner KF, Morris CD, Spindel ER. Vitamin C Prevents Offspring DNA Methylation Changes Associated with Maternal Smoking in Pregnancy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Sep 15;196(6):745-755. doi: 10.1164/rccm.201610-2141OC.

Shungin D, Winkler TW, Croteau-Chonka DC, Ferreira T, Locke AE, Mägi R, Strawbridge RJ, Pers TH, Fischer K, Justice AE, Workalemahu T, Wu JMW, Buchkovich ML, Heard-Costa NL, Roman TS, Drong AW, Song C, Gustafsson S, Day FR, Esko T, Fall T, Kutalik Z, Luan J, Randall JC, Scherag A, Vedantam S, Wood AR, Chen J, Fehrmann R, Karjalainen J, Kahali B, Liu CT, Schmidt EM, Absher D, Amin N, Anderson D, Beekman M, Bragg-Gresham JL, Buyske S, Demirkan A, Ehret GB, Feitosa MF, Goel A, Jackson AU, Johnson T, Kleber ME, Kristiansson K, Mangino M, Leach IM, Medina-Gomez C, Palmer CD, Pasko D, Pechlivanis S, Peters MJ, Prokopenko I, Stančáková A, Sung YJ, Tanaka T, Teumer A, Van Vliet-Ostaptchouk JV, Yengo L, Zhang W, Albrecht E, Årnlöv J, Arscott GM, Bandinelli S, Barrett A, Bellis C, Bennett AJ, Berne C, Blüher M, Böhringer S, Bonnet F, Böttcher Y, Bruinenberg M, Carba DB, Caspersen IH, Clarke R, Daw EW, Deelen J, Deelman E, Delgado G, Doney AS, Eklund N, Erdos MR, Estrada K, Eury E, Friedrich N, Garcia ME, Giedraitis V, Gigante B, Go AS, Golay A, Grallert H, Grammer TB, Gräßler J, Grewal J, Groves CJ, Haller T, Hallmans G, Hartman CA, Hassinen M, Hayward C, Heikkilä K, Herzig KH, Helmer Q, Hillege HL, Holmen O, Hunt SC, Isaacs A, Ittermann T, James AL, Johansson I, Juliusdottir T, Kalafati IP, Kinnunen L, Koenig W, Kooner IK, Kratzer W, Lamina C, Leander K, Lee NR, Lichtner P, Lind L, Lindström J, Lobbens S, Lorentzon M, Mach F, Magnusson PK, Mahajan A, McArdle WL, Menni C, Merger S, Mihailov E, Milani L, Mills R, Moayyeri A, Monda KL, Mooijaart SP, Mühleisen TW, Mulas A, Müller G, Müller-Nurasyid M, Nagaraja R, Nalls MA, Narisu N, Glorioso N, Nolte IM, Olden M, Rayner NW, Renstrom F, Ried JS, Robertson NR, Rose LM, Sanna S, Scharnagl H, Scholtens S, Sennblad B, Seufferlein T, Sitlani CM, Smith AV, Stirrups K, Stringham HM, Sundström J, Swertz MA, Swift AJ,

Syvänen AC, Tayo BO, Thorand B, Thorleifsson G, Tomaschitz A, Troffa C, van Oort FV, Verweij N, Vonk JM, Waite LL, Wennauer R, Wilsgaard T, Wojczynski MK, Wong A, Zhang Q, Zhao JH, Brennan EP, Choi M, Eriksson P, Folkersen L, Franco-Cereceda A, Gharavi AG, Hedman ÅK, Hivert MF, Huang J, Kanoni S, Karpe F, Keildson S, Kiryluk K, Liang L, Lifton RP, Ma B, McKnight AJ, McPherson R, Metspalu A, Min JL, Moffatt MF, Montgomery GW, Murabito JM, Nicholson G, Nyholt DR, Olsson C, Perry JR, Reinmaa E, Salem RM, Sandholm N, Schadt EE, Scott RA, Stolk L, Vallejo EE, Westra HJ, Zondervan KT; ADIPOGen Consortium; CARDIOGRAMplusC4D Consortium; CKDGen Consortium; GEFOS Consortium; GENIE Consortium; GLGC; ICBP; International Endogene Consortium; LifeLines Cohort Study; MAGIC Investigators; MuTHER Consortium; PAGE Consortium; ReproGen Consortium, Amouyel P, Arveiler D, Bakker SJ, Beilby J, Bergman RN, Blangero J, Brown MJ, Burnier M, Campbell H, Chakravarti A, Chines PS, Claudi-Boehm S, Collins FS, Crawford DC, Danesh J, de Faire U, de Geus EJ, Dörr M, Erbel R, Eriksson JG, Farrall M, Ferrannini E, Ferrières J, Forouhi NG, Forrester T, Franco OH, Gansevoort RT, Gieger C, Gudnason V, Haiman CA, Harris TB, Hattersley AT, Heliövaara M, Hicks AA, Hingorani AD, Hoffmann W, Hofman A, Homuth G, Humphries SE, Hyppönen E, Illig T, Jarvelin MR, Johansen B, Jousilahti P, Jula AM, Kaprio J, Kee F, Keinänen-Kiukaanniemi SM, Kooner JS, Kooperberg C, Kovacs P, Kraja AT, Kumari M, Kuulasmaa K, Kuusisto J, Lakka TA, Langenberg C, Le Marchand L, Lehtimäki T, Lyssenko V, Männistö S, Marmot A, Matise TC, McKenzie CA, McKnight B, Musk AW, Möhlenkamp S, Morris AD, Nelis M, Ohlsson C, Oldenhinkel AJ, Ong KK, Palmer LJ, Penninx BW, Peters A, Pramstaller PP, Raitakari OT, Rankinen T, Rao DC, Rice TK, Ridker PM, Ritchie MD, Rudan I, Salomaa V, Samani NJ, Saramies J, Sarzynski MA, Schwarz PE, Shuldiner AR, Staessen JA, Steinthorsdottir V, Stolk RP, Strauch K, Tönjes A, Tremblay A, Tremoli E, Vohl MC, Völker U, Vollenweider P, Wilson JF, Witteman JC, Adair LS, Bochud M, Boehm BO, Bornstein SR, Bouchard C, Cauchi S, Caulfield MJ, Chambers JC, Chasman DI, Cooper RS, Dedoussis G, Ferrucci L, Froguel P, Grabe HJ, Hamsten A, Hui J, Hveem K, Jöckel KH, Kivimäki M, Kuh D, Laakso M, Liu Y, März W, Munroe PB, Njølstad I, Oostra BA, Palmer CN, Pedersen NL, Perola M, Pérusse L, Peters U, Power C, Quertermous T, Rauramaa R, Rivadeneira F, Saaristo TE, Saleheen D, Sinisalo J, Slagboom PE, Snieder H, Spector TD, Stefansson K, Stumvoll M, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Uusitupa M, van der Harst P, Veronesi G, Walker M, Wareham NJ, Watkins H, Wichmann HE, Abecasis GR, Assimes TL, Berndt SI, Boehnke M, Borecki IB, Deloukas P, Franke L, Frayling TM, Groop LC, Hunter DJ, Kaplan RC, O'Connell JR, Qi L, Schlessinger D, Strachan DP, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Willer CJ, Visscher PM, Yang J, Hirschhorn JN, Zillikens MC, McCarthy MI, Speliotes EK, North KE, Fox CS, Barroso I, Franks PW, Ingelsson E, Heid IM, Loos RJ, Cupples LA, Morris AP, Lindgren CM, Mohlke KL. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. *Nature*. 2015 Feb 12;518(7538):187-196. doi: 10.1038/nature14132.

Siervo M, Arnold R, Wells JC, Tagliafue A, Colantuoni A, Albanese E, Brayne C, Stephan BC. Intentional weight loss in overweight and obese individuals and cognitive function: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2011 Nov;12(11):968-83. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00903.x.

Siervo M, Shannon OM, Llewellyn DJ, Stephan BC, Fontana L. Mediterranean diet and cognitive function: From methodology to mechanisms of action. *Free Radic Biol Med*. 2021 Nov 20;176:105-117. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.018.

Sigit FS, Tahapary DL, Trompet S, Sartono E, Willems van Dijk K, Rosendaal FR, de Mutsert R. The Prevalence of Metabolic Syndrome and Its Association with Body Fat Distribution in Middle-Aged Individuals from Indonesia and the Netherlands: A Cross-Sectional Analysis of Two Population-Based Studies. *Diabetol Metab Syndr* 2020, 12, 2, doi:10.1186/s13098-019-0503-1.

Silveira Rossi JL, Barbalho SM, Reverete de Araujo R, Bechara MD, Sloan KP, Sloan LA. Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors. *Diabetes Metab Res Rev*. 2022 Mar;38(3):e3502. doi: 10.1002/dmrr.3502.

Silventoinen K, Rokholm B, Kaprio J, Sørensen TI. The genetic and environmental influences on childhood obesity: a systematic review of twin and adoption studies. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Jan;34(1):29-40. doi: 10.1038/ijo.2009.177.

Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008 Aug;47(8):921-9. doi: 10.1097/CHI.0b013e318179964f.

Singh JA, Bandewar SV, Bukusi EA. The impact of the COVID-19 pandemic response on other health research. *Bull World Health Organ*. 2020 Sep 1;98(9):625-631. doi: 10.2471/BLT.20.257485. Epub 2020 Jul 6.

Singh RB, Fedacko J, Fatima G, Magomedova A, Watanabe S, Elkilany G. Why and How the Indo-Mediterranean Diet May Be Superior to Other Diets: The Role of Antioxidants in the Diet. *Nutrients*. 2022 Feb 21;14(4):898. doi: 10.3390/nu14040898.

Smail HO. The roles of genes in the bitter taste. *AIMS Genet*. 2019 Dec 24;6(4):88-97. doi: 10.3934/genet.2019.4.88.

Smith A. 1973. Symbol Digit Modalities Test. Los Angeles, CA: Western Psychological Services.

Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, Califano JA. DNA Global Hypomethylation in Squamous Cell Head and Neck Cancer Associated with Smoking, Alcohol Consumption and Stage. *Int J Cancer* 2007, 121, 1724–1728, doi:10.1002/ijc.22889.

Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013 Aug 2;341(6145):569-73. doi: 10.1126/science.1241165.

Smolarek I, Wyszko E, Barciszewska AM, Nowak S, Gawronska I, Jablecka A, Barciszewska MZ. Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension. *Med Sci Monit*. 2010 Mar;16(3):CR149-155.

Sniderman AD, Bhopal R, Prabhakaran D, Sarrafzadegan N, Tchernof A. Why might South Asians be so susceptible to central obesity and its atherogenic consequences? The adipose tissue overflow hypothesis. *Int J Epidemiol*. 2007 Feb;36(1):220-5. doi: 10.1093/ije/dyl245.

Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*. 2008 Sep 11;337:a1344. doi: 10.1136/bmj.a1344.

Sofi F. The Mediterranean diet revisited: evidence of its effectiveness grows. *Curr Opin Cardiol*. 2009 Sep;24(5):442-6. doi: 10.1097/HCO.0b013e32832f056e.

Soh J, Iqbal J, Queiroz J, Fernandez-Hernando C, Hussain MM. MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion. *Nat Med*. 2013 Jul;19(7):892-900. doi: 10.1038/nm.3200.

Soldevila-Domenech N, Cuenca-Royo A, Babio N, Forcano L, Nishi S, Vintró-Alcaraz C, Gómez-Martínez C, Jiménez-Murcia S, Fernández-Carrión R, Gomis-González M, Alvarez-Sala A, Carlos S, Pintó X, Corella D, Díez-Espino J, Castañer O, Fernández-Aranda F, Salas-Salvadó J, de la Torre R. Metformin Use and Cognitive Function in Older Adults With Type 2 Diabetes Following a Mediterranean Diet Intervention. *Front Nutr*. 2021 Oct 5;8:742586. doi: 10.3389/fnut.2021.742586.

Soldevila-Domenech N, Forcano L, Vintró-Alcaraz C, Cuenca-Royo A, Pintó X, Jiménez-Murcia S, García-Gavilán JF, Nishi SK, Babio N, Gomis-González M, Corella D, Sorlí JV, Fernandez-Carrión R, Martínez-González MÁ, Martí A, Salas-Salvadó J, Castañer O, Fernández-Aranda F, Torre R. Interplay between cognition and weight reduction in individuals following a Mediterranean Diet: Three-year follow-up of the

PREDIMED-Plus trial. *Clin Nutr.* 2021 Sep;40(9):5221-5237. doi: 10.1016/j.clnu.2021.07.020. Epub 2021 Aug 5.

Song D, Zhou J, Ma J, Chang J, Qiu Y, Zhuang Z, Xiao H, Zeng L. Sleep disturbance mediates the relationship between depressive symptoms and cognitive function in older adults with mild cognitive impairment. *Geriatr Nurs.* 2021 Sep-Oct;42(5):1019-1023. doi: 10.1016/j.gerinurse.2021.06.004.

Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Nov;70(11):6459-65. doi: 10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004.

Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JL. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science.* 2005 Mar 25;307(5717):1955-9. doi: 10.1126/science.1109051.

Sonuga-Barke EJ, Brandeis D, Cortese S, Daley D, Ferrin M, Holtmann M, Stevenson J, Danckaerts M, van der Oord S, Döpfner M, Dittmann RW, Simonoff E, Zuddas A, Banaschewski T, Buitelaar J, Coghill D, Hollis C, Konofal E, Lecendreux M, Wong IC, Sergeant J; European ADHD Guidelines Group. Nonpharmacological interventions for ADHD: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of dietary and psychological treatments. *Am J Psychiatry.* 2013 Mar;170(3):275-89. doi: 10.1176/appi.ajp.2012.12070991.

Sørensen LB, Møller P, Flint A, Martens M, Raben A. Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Oct;27(10):1152-66. doi: 10.1038/sj.ijo.0802391.

Soriano del Castillo, JM. Nutrición básica humana. Universitat de València, 2006. ed. Colección: Educació. Sèrie Materials, 91. ISBN: 978-84-370-6546-5.

Sosnowska B, Penson P, Banach M. The role of nutraceuticals in the prevention of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2017 Apr;7(Suppl 1):S21-S31. doi: 10.21037/cdt.2017.03.20.

Sotos Prieto M, Guillen M, Sorlí JV, Asensio EM, Guillem Sáiz P, González JJ, Corella D. Consumo de carne y pescado en población mediterránea española de edad avanzada y alto riesgo cardiovascular [Meat and fish consumption in a high cardiovascular risk Spanish Mediterranean population]. *Nutr Hosp.* 2011 Sep-Oct;26(5):1033-40. Spanish. doi: 10.1590/S0212-16112011000500017.

Speiser PW, Rudolf MC, Anhalt H, Camacho-Hubner C, Chiarelli F, Eliakim A, Freemark M, Gruters A, HersHKovitz E, Iughetti L, Krude H, Latzer Y, Lustig RH, Pescovitz OH, Pinhas-Hamiel O, Rogol AD, Shalitin S, Sultan C, Stein D, Vardi P, Werther GA, Zadik Z, Zuckerman-Levin N, Hochberg Z; Obesity Consensus Working Group. Childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1871-87. doi: 10.1210/jc.2004-1389.

Spieker LE, Sudano I, Hürliemann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Lüscher TF, Noll G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation.* 2002 Mar 26;105(12):1399-402. doi: 10.1161/01.cir.0000013424.28206.8f.

Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharm.* 2009;78:539-552. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.029

Stancáková A, Civelek M, Saleem NK, Soininen P, Kangas AJ, Cederberg H, Paananen J, Pihlajamäki J, Bonnycastle LL, Morken MA, Boehnke M, Pajukanta P, Lusi AJ, Collins FS, Kuusisto J, Ala-Korpela M, Laakso M. Hyperglycemia and a common variant of GCKR are associated with the levels of eight amino acids in 9,369 Finnish men. *Diabetes.* 2012 Jul;61(7):1895-902. doi: 10.2337/db11-1378.

Stanford KI, Middelbeek RJ, Goodyear LJ. Erratum. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes*. 2015;64:2361-2368. *Diabetes*. 2015 Sep;64(9):3334. doi: 10.2337/db15-er09. Erratum for: *Diabetes*. 2015 Jul;64(7):2361-8.

Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, Lee MY, Takahashi H, So K, Hitchcox KM, Markan KR, Hellbach K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes*. 2015 Jun;64(6):2002-14. doi: 10.2337/db14-0704.

Stefan N, Birkenfeld AL, Schulze MB. Global pandemics interconnected - obesity, impaired metabolic health and COVID-19. *Nat Rev Endocrinol*. 2021 Mar;17(3):135-149. doi: 10.1038/s41574-020-00462-1.

Stefano GB, Challenger S, Kream R. Hyperglycemia-associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders. *Eur. J. Nutr.* 2016;55:2339-2345. doi: 10.1007/s00394-016-1212-2.

Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab*. 2016 May 10;23(5):770-84. doi: 10.1016/j.cmet.2016.04.011.

Stevenson J, Buitelaar J, Cortese S, Ferrin M, Konofal E, Lecendreux M, Simonoff E, Wong IC, Sonuga-Barke E. Research review: the role of diet in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder--an appraisal of the evidence on efficacy and recommendations on the design of future studies. *J Child Psychol Psychiatry*. 2014 May;55(5):416-27. doi: 10.1111/jcpp.12215.

Stewart BW, Wild CP. *World cancer report 2014*. International Agency for Research on Cancer, WHO. Disponible 30 de enero de 2023 en: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>

Stubenitsky K, Mela DJ. UK consumer perceptions of starchy foods. *Br J Nutr*. 2000 Mar;83(3):277-85. doi: 10.1017/s0007114500000350.

Stutz J, Eiholzer R, Spengler CM. Effects of Evening Exercise on Sleep in Healthy Participants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med*. 2019 Feb;49(2):269-287. doi: 10.1007/s40279-018-1015-0.

Su LN, Wang YB, Wnag CG, Wei HP. Network analysis identifies common genes associated with obesity in six obesity-related diseases. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017 Aug.;18(8):727-732. doi: 10.1631/jzus.B1600454.

Su S, Zhu H, Xu X, Wang X, Dong Y, Kapuku G, Treiber F, Gutin B, Harshfield G, Snieder H, Wang X. DNA methylation of the LY86 gene is associated with obesity, insulin resistance, and inflammation. *Twin Res Hum Genet*. 2014 Jun;17(3):183-91. doi: 10.1017/thg.2014.22.

Suckale J, Solimena M. The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Oct;21(10):599-609. doi: 10.1016/j.tem.2010.06.003.

Sun F, Lian Y, Wang J, Hu L, Luo J, Yu J. KIF26B in the Prognosis and Immune Biomarking of Various Cancers: A Pan-Cancer Study. *J Oncol*. 2022 Mar 22;2022:4829697. doi: 10.1155/2022/4829697.

Sun Y, Deng M, Ke X, Lei X, Ju H, Liu Z, Bai X. Epidermal Growth Factor Protects Against High Glucose-Induced Podocyte Injury Possibly via Modulation of Autophagy and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Through DNA Methylation. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021 May 19;14:2255-2268. doi: 10.2147/DMSO.S299562.

Sun YQ, Richmond RC, Suderman M, Min JL, Battram T, Flatberg A, Beisvag V, Nøst TH, Guida F, Jiang L, Wahl SGF, Langhammer A, Skorpen F, Walker RM, Bretherick AD, Zeng Y, Chen Y, Johansson M, Sandanger TM, Relton CL, Mai XM. Assessing the role of genome-wide DNA methylation between smoking and risk of lung cancer using repeated measurements: the HUNT study. *Int J Epidemiol*. 2021 Nov 10;50(5):1482-1497. doi: 10.1093/ije/dyab044.

Suzuki T, Nakamura Y, Doi Y, Narita A, Shimizu A, Imaeda N, Goto C, Matsui K, Kadota A, Miura K, Nakatochi M, Tanaka K, Hara M, Ikezaki H, Murata M, Takezaki T, Nishimoto D, Matsuo K, Oze I, Kuriyama N, Ozaki E, Mikami H, Nakamura Y, Watanabe M, Suzuki S, Katsuura-Kamano S, Arisawa K, Kuriki K, Momozawa Y, Kubo M, Takeuchi K, Kita Y, Wakai K; J-MICC Research Group. A genome-wide association study on confection consumption in a Japanese population: the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study. *Br J Nutr*. 2021 Dec 28;126(12):1843-1851. doi: 10.1017/S0007114521000684.

Swift DL, McGee JE, Earnest CP, Carlisle E, Nygard M, Johannsen NM. The Effects of Exercise and Physical Activity on Weight Loss and Maintenance. *Prog Cardiovasc Dis*. 2018 Jul-Aug;61(2):206-213. doi: 10.1016/j.pcad.2018.07.014.

Swinburn BA, Kraak VI, Allender S, Atkins VJ, Baker PI, Bogard JR, Brinsden H, Calvillo A, De Schutter O, Devarajan R, Ezzati M, Friel S, Goenka S, Hammond RA, Hastings G, Hawkes C, Herrero M, Hovmand PS, Howden M, Jaacks LM, Kapetanaki AB, Kasman M, Kuhnlein HV, Kumanyika SK, Larijani B, Lobstein T, Long MW, Matsudo VKR, Mills SDH, Morgan G, Morshed A, Nece PM, Pan A, Patterson DW, Sacks G, Shekar M, Simmons GL, Smit W, Tootee A, Vandevijvere S, Waterlander WE, Wolfenden L, Dietz WH. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet*. 2019 Feb 23;393(10173):791-846. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32822-8.

Szkiba D, Kapun M, von Haeseler A, Gallach M. SNP2GO: functional analysis of genome-wide association studies. *Genetics*. 2014 May;197(1):285-9. doi: 10.1534/genetics.113.160341..

Tan SY, Tucker RM. Sweet Taste as a Predictor of Dietary Intake: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019 Jan 5;11(1):94. doi: 10.3390/nut11010094.

Tanca A, Abbondio M, Palomba A, Fraumene C, Marongiu F, Serra M, Pagnozzi D, Laconi E, Uzzau S. Caloric restriction promotes functional changes involving short-chain fatty acid biosynthesis in the rat gut microbiota. *Sci Rep*. 2018 Oct 3;8(1):14778. doi: 10.1038/s41598-018-33100-y.

Tanjo T, Kawai Y, Tokunaga K, Ogasawara O, Nagasaki M. Practical Guide for Managing Large-Scale Human Genome Data in Research. *J Hum Genet* 2021, 66, 39–52, doi:10.1038/s10038-020-00862-1.

Tari AR, Norevik CS, Scrimgeour NR, Kobro-Flatmoen A, Storm-Mathisen J, Bergersen LH, Wrann CD, Selbæk G, Kivipelto M, Moreira JBN, Wisløff U. Are the neuroprotective effects of exercise training systemically mediated? *Prog Cardiovasc Dis*. 2019 Mar-Apr;62(2):94-101. doi: 10.1016/j.pcad.2019.02.003.

Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. 2003 Jun;46(6):733-49. doi: 10.1007/s00125-003-1111-y.

Te Morenga L, Mallard S, Mann J. Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *BMJ*. 2012 Jan 15;346:e7492. doi: 10.1136/bmj.e7492.

Teixeira TF, Grześkowiak Ł, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL, Peluzio MC. Higher level of faecal SCFA in women correlates with metabolic syndrome risk factors. *Br J Nutr*. 2013 Mar 14;109(5):914-9. doi: 10.1017/S0007114512002723.

Telle-Hansen VH, Christensen JJ, Formo GA, Holven KB, Ulven SM. A comprehensive metabolic profiling of the metabolically healthy obesity phenotype. *Lipids Health Dis.* 2020 May 9;19(1):90. doi: 10.1186/s12944-020-01273-z.

Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, Baumgartner I, Clément D, Collet JP, Cremonesi A, De Carlo M, Erbel R, Fowkes FG, Heras M, Kownator S, Minar E, Ostergren J, Poldermans D, Riambau V, Roffi M, Röther J, Sievert H, van Sambeek M, Zeller T; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: The Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2011 Nov;32(22):2851-906. doi: 10.1093/eurheartj/ehr211.

Tenenbaum A, Fisman EZ, Boyko V, Benderly M, Tanne D, Haim M, Matas Z, Motro M, Behar S. Attenuation of progression of insulin resistance in patients with coronary artery disease by bezafibrate. *Arch Intern Med.* 2006 Apr 10;166(7):737-41. doi: 10.1001/archinte.166.7.737.

Teshima A, Lavery AA, Filippidis FT. Burden of Current and Past Smoking across 28 European Countries in 2017: A Cross-Sectional Analysis. *Tob Induc Dis* 2022, 20, 56, doi:10.18332/tid/149477.

Testa G, Camacho-Barcia L, Gómez-Martínez C, Mora-Maltas B, de la Torre R, Pintó X, Corella D, Granero R, Cuenca-Royo A, Jiménez-Murcia S, Babio N, Fernández-Carrión R, Esteve-Luque V, Forcano L, Ni J, Malcampo M, De Las Heras-Delgado S, Fitó M, Salas-Salvado J, Fernández-Aranda F. Impulsive Personality Traits Predicted Weight Loss in Individuals with Type 2 Diabetes after 3 Years of Lifestyle Interventions. *J Clin Med.* 2022 Jun 16;11(12):3476. doi: 10.3390/jcm11123476.

Thaker VV. Genetic and epigenetic causes of obesity. *Adolesc Med State Art Rev.* 2017 Fall;28(2):379-405.

Thapar A, Cooper M. Attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 2016 Mar 19;387(10024):1240-50. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00238-X.

The Brainstorm Consortium. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science* 360, eaap8757 (2018).

Thosar SS, Butler MP, Shea SA. Role of the circadian system in cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2018 Jun 1;128(6):2157-2167. doi: 10.1172/JCI80590.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Writing Group on the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction; Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012 Oct;33(20):2551-67. doi: 10.1093/eurheartj/ehs184.

Tian T, Yang KQ, Cui JG, Zhou LL, Zhou XL. Folic Acid Supplementation for Stroke Prevention in Patients With Cardiovascular Disease. *Am J Med Sci.* 2017 Oct;354(4):379-387. doi: 10.1016/j.amjms.2017.05.020.

Tiret L. Gene-environment interaction: a central concept in multifactorial diseases. *Proc Nutr Soc.* 2002 Nov;61(4):457-63. doi: 10.1079/pns2002178.

Tobias DK, Lawler PR, Harada PH, Demler OV, Ridker PM, Manson JE, Cheng S, Mora S. Circulating Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in a Prospective Cohort of US Women. *Circ Genom Precis Med*. 2018 Apr;11(4):e002157. doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002157.

Tokarek J, Gadzinowska J, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. What Is the Role of Gut Microbiota in Obesity Prevalence? A Few Words about Gut Microbiota and Its Association with Obesity and Related Diseases. *Microorganisms*. 2021 Dec 27;10(1):52. doi: 10.3390/microorganisms10010052.

Toledo E, Salas-Salvadó J, Donat-Vargas C, Buil-Cosiales P, Estruch R, Ros E, Corella D, Fitó M, Hu FB, Arós F, Gómez-Gracia E, Romaguera D, Ortega-Calvo M, Serra-Majem L, Pintó X, Schröder H, Basora J, Sorlí JV, Bulló M, Serra-Mir M, Martínez-González MA. Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2015 Nov;175(11):1752-1760. doi: 10.1001/jamainternmed.2015.4838.

Tomczak A, Mortensen JM, Winnenburg R, Liu C, Alessi DT, Swamy V, Vallania F, Lofgren S, Haynes W, Shah NH, Musen MA, Khatri P. Interpretation of biological experiments changes with evolution of the Gene Ontology and its annotations. *Sci Rep*. 2018 Mar 23;8(1):5115. doi: 10.1038/s41598-018-23395-2.

Tong L, Wu H, Wang MD, Wang G. Introduction of Medical Genomics and Clinical Informatics Integration for P-Health Care. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2022, 190, 1–37, doi:10.1016/bs.pmbts.2022.05.002.

Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, Wainstein J, Friedlander Y, Levy-Lahad E, Glaser B, Hellman A. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet*. 2012 Jan 15;21(2):371-83. doi: 10.1093/hmg/ddr472. Epub 2011 Oct 12.

Traini E, Bramanti V, Amenta F. Choline alphoscerate (alpha-glyceryl-phosphoryl-choline) an old choline-containing phospholipid with a still interesting profile as cognition enhancing agent. *Curr Alzheimer Res*. 2013 Dec;10(10):1070-9. doi: 10.2174/15672050113106660173.

Tresserra-Rimbau A, Castro-Barquero S, Vitelli-Storelli F, Becerra-Tomas N, Vázquez-Ruiz Z, Díaz-López A, Corella D, Castañer O, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, López-Miranda J, García-Molina L, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martín P, Daimiel L, Rubín-García M, Vidal J, Galdon A, Ros E, Basterra-Gortari FJ, Babio N, Sorlí JV, Hernández Á, Konieczna J, Notario-Barandiaran L, Tojal-Sierra L, Pérez-López J, Abete I, Álvarez-Pérez J, Fernández-García JC, Santos-Lozano JM, Galera-Cusí A, Julibert A, Ruiz-Canela M, Martínez-Lacruz R, Pérez-Vega KA, Galmes-Panades AM, Pastor-Polo C, Moreno-Rodríguez A, Gea A, Fitó M, Lamuela-Raventós RM, Salas-Salvadó J. Associations between Dietary Polyphenols and Type 2 Diabetes in a Cross-Sectional Analysis of the PREDIMED-Plus Trial: Role of Body Mass Index and Sex. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Nov 8;8(11):537. doi: 10.3390/antiox8110537.

Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutrition Review*. 1997; 55: 383–9. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1997.tb01578.x

Trichopoulou A, Martínez-González MA, Tong TY, Forouhi NG, Khandelwal S, Prabhakaran D, Mozaffarian D, de Lorgeril M. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC Med*. 2014 Jul 24;12:112. doi: 10.1186/1741-7015-12-112.

Trivedi MS, Holger D, Bui AT, Craddock TJA, Tartar JL. Short-term sleep deprivation leads to decreased systemic redox metabolites and altered epigenetic status. *PLoS One*. 2017 Jul 24;12(7):e0181978. doi: 10.1371/journal.pone.0181978.

Truby H, Haines TP. Comparative weight loss with popular diets. *BMJ*. 2020 Apr 1;369:m1269. doi: 10.1136/bmj.m1269.

Truong V, Huang S, Dennis J, Lemire M, Zwingerman N, Aïssi D, Kassam I, Perret C, Wells P, Morange PE, Wilson M, Trégouët DA, Gagnon F. Blood triglyceride levels are associated with DNA methylation at the serine metabolism gene PHGDH. *Sci Rep*. 2017 Sep 11;7(1):11207. doi: 10.1038/s41598-017-09552-z.

Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, Chen HC, Lee CH, Tsai TF, Hsu MT, Wu JC, Huang HD, Shiao MS, Hsiao M, Tsou AP. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2884-97. doi: 10.1172/JCI63455.

Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, Dick KJ, Kanoni S, Nisbet J, Viñuela A, Grundberg E, Nelson CP, Meduri E, Buil A, Cambien F, Hengstenberg C, Erdmann J, Schunkert H, Goodall AH, Ouwehand WH, Dermitzakis E, Spector TD, Samani NJ, Deloukas P. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics*. 2014 Oct;9(10):1382-96. doi: 10.4161/15592294.2014.969637.

Tsui Y, Yamada H, Munetsuna E, Fujii R, Yamazaki M, Ando Y, Mizuno G, Hattori Y, Ishikawa H, Ohashi K, Hashimoto S, Hamajima N, Suzuki K. Intake of vegetables and fruits rich in provitamin A is positively associated with aryl hydrocarbon receptor repressor DNA methylation in a Japanese population. *Nutr Res*. 2022 Nov;107:206-217. doi: 10.1016/j.nutres.2022.10.006.

Tsui Y, Yamada H, Munetsuna E, Fujii R, Yamazaki M, Ando Y, Mizuno G, Hattori Y, Ishikawa H, Ohashi K, Hashimoto S, Hamajima N, Suzuki K. Increased risk of cancer mortality by smoking-induced aryl hydrocarbon receptor repressor DNA hypomethylation in Japanese population: A long-term cohort study. *Cancer Epidemiol*. 2022 Jun;78:102162. doi: 10.1016/j.canep.2022.102162.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999 May 8;353(9164):1547-57. doi: 10.1016/s0140-6736(99)04021-0.

Turati F, Carioli G, Bravi F, Ferraroni M, Serraino D, Montella M, Giacosa A, Toffolutti F, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Mediterranean Diet and Breast Cancer Risk. *Nutrients*. 2018 Mar 8;10(3):326. doi: 10.3390/nu10030326.

Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008 Apr 17;3(4):213-23. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.015.

Turner JE, Lira VA, Brum PC. New Insights into the Benefits of Physical Activity and Exercise for Aging and Chronic Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:2503767. doi: 10.1155/2017/2503767.

Turner L, Rogers PJ. Varied Effects of COVID-19 Chemosensory Loss and Distortion on Appetite: Implications for Understanding Motives for Eating and Drinking. *Foods* 2022, 11, 607. doi: 10.3390/foods11040607.

Turner SD. Qqman: An R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *Journal of Open Source Software*. 2018 Mar, 25;731. doi: 10.21105/joss.00731

Uebanso T, Shimohata T, Mawatari K, Takahashi A. Functional Roles of B-Vitamins in the Gut and Gut Microbiome. *Mol Nutr Food Res*. 2020 Sep;64(18):e2000426. doi: 10.1002/mnfr.202000426.

Ungaro P, Nettore IC, Franchini F, Palatucci G, Muscogiuri G, Colao A, Macchia PE. Epigenome Modulation Induced by Ketogenic Diets. *Nutrients*. 2022 Aug 8;14(15):3245. doi: 10.3390/nu14153245.

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc.* 2010 Jun;110(6):911-16.e12. doi: 10.1016/j.jada.2010.03.018.

Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M, Corella D, de la Torre R, Martínez-González MÁ, Martínez-Lapiscina EH, Fitó M, Pérez-Heras A, Salas-Salvadó J, Estruch R, Ros E. Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2015 Jul;175(7):1094-1103. doi: 10.1001/jamainternmed.2015.1668.

Van den Berg EH, Flores-Guerrero JL, Gruppen EG, de Borst MH, Wolak-Dinsmore J, Connelly MA, Bakker SJL, Dullaart RPF. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Incident Type 2 Diabetes: Role of Circulating Branched-Chain Amino Acids. *Nutrients.* 2019 Mar 26;11(3):705. doi: 10.3390/nu11030705.

Van Iterson, M.; van Zwet, E.W.; BIOS Consortium; Heijmans, B.T. Controlling Bias and Inflation in Epigenome- and Transcriptome-Wide Association Studies Using the Empirical Null Distribution. *Genome Biol* 2017, 18, 19, doi:10.1186/s13059-016-1131-9.

Van Langeveld, A.W.B.; Teo, P.S.; de Vries, J.H.M.; Feskens, E.J.M.; de Graaf, C.; Mars, M. Dietary taste patterns by sex and weight status in the Netherlands. *Br. J. Nutr.* 2018, 119, 1195–1206.

van Vliet-Ostaptchouk JV, Nuotio ML, Slagter SN, Doiron D, Fischer K, Foco L, Gaye A, Gögele M, Heier M, Hiekkalinna T, Joensuu A, Newby C, Pang C, Partinen E, Reischl E, Schwienbacher C, Tammesoo ML, Swertz MA, Burton P, Ferretti V, Fortier I, Giepmans L, Harris JR, Hillege HL, Holmen J, Julia A, Kootstra-Ros JE, Kvaløy K, Holmen TL, Männistö S, Metspalu A, Midthjell K, Murtagh MJ, Peters A, Pramstaller PP, Saaristo T, Salomaa V, Stolk RP, Uusitupa M, van der Harst P, van der Klauw MM, Waldenberger M, Perola M, Wölfenbittel BH. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr Disord.* 2014 Feb 1;14:9. doi: 10.1186/1472-6823-14-9.

Vanderbruggen N, Matthys F, Van Laere S, Zeeuws D, Santermans L, Van den Ameel S, Crunelle CL. Self-Reported Alcohol, Tobacco, and Cannabis Use during COVID-19 Lockdown Measures: Results from a Web-Based Survey. *Eur Addict Res.* 2020;26(6):309-315. doi: 10.1159/000510822.

Vanweert F, Schrauwen P, Phielix E. Role of branched-chain amino acid metabolism in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes-related metabolic disturbances BCAA metabolism in type 2 diabetes. *Nutr Diabetes.* 2022 Aug 5;12(1):35. doi: 10.1038/s41387-022-00213-3.

Varkevisser RDM, van Stralen MM, Kroeze W, Ket JCF, Steenhuis IHM. Determinants of weight loss maintenance: a systematic review. *Obes Rev.* 2019 Feb;20(2):171-211. doi: 10.1111/obr.12772.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001 Jul 6;89(1):E1-7. doi: 10.1161/hh1301.093953.

Veček NN, Mucalo L, Dragun R, Miličević T, Pribisalić A, Patarčić I, Hayward C, Polašek O, Koljić I. The Association between Salt Taste Perception, Mediterranean Diet and Metabolic Syndrome: A Cross-Sectional Study. *Nutrients.* 2020 Apr 22;12(4):1164. doi: 10.3390/nu12041164.

Veilleux A, Grenier E, Marceau P, Carpentier AC, Richard D, Levy E. Intestinal lipid handling: evidence and implication of insulin signaling abnormalities in human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Mar;34(3):644-53. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302993.

Venditti C, Musa-Veloso K, Lee HY, Poon T, Mak A, Darch M, Juana J, Fronda D, Noori D, Pateman E, Jack M. Determinants of Sweetness Preference: A Scoping Review of Human Studies. *Nutrients*. 2020 Mar 8;12(3):718. doi: 10.3390/nu12030718.

Ventura AK, Mennella JA. Innate and learned preferences for sweet taste during childhood. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jul;14(4):379-84. doi: 10.1097/MCO.0b013e328346df65.

Verdejo-García A, Lawrence AJ, Clark L. Impulsivity as a vulnerability marker for substance-use disorders: review of findings from high-risk research, problem gamblers and genetic association studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(4):777-810. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.11.003.

Vergès B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2005 Nov;31(5):429-39. doi: 10.1016/s1262-3636(07)70213-6.

Verhaar BJH, Hendriksen HMA, de Leeuw FA, Doorduyn AS, van Leeuwenstijn M, Teunissen CE, Barkhof F, Scheltens P, Kraaij R, van Duijn CM, Nieuwdorp M, Muller M, van der Flier WM. Gut Microbiota Composition Is Related to AD Pathology. *Front Immunol*. 2022 Jan 31;12:794519. doi: 10.3389/fimmu.2021.794519.

Verlaet AA, Noriega DB, Hermans N, Savelkoul HF. Nutrition, immunological mechanisms and dietary immunomodulation in ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2014 Jul;23(7):519-29. doi: 10.1007/s00787-014-0522-2.

Vernier M, Giguère V. Aging, senescence and mitochondria: the PGC-1/ERR axis. *J Mol Endocrinol*. 2021 Jan;66(1):R1-R14. doi: 10.1530/JME-20-0196.

Veronese N, Facchini S, Stubbs B, Luchini C, Solmi M, Manzato E, Sergi G, Maggi S, Cosco T, Fontana L. Weight loss is associated with improvements in cognitive function among overweight and obese people: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Jan;72:87-94. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.11.017.

Vesnina A, Prosekov A, Kozlova O, Atuchin V. Genes and Eating Preferences, Their Roles in Personalized Nutrition. *Genes (Basel)*. 2020 Mar 27;11(4):357. doi: 10.3390/genes11040357.

Viana JN, Edney S, Gondalia S, Mauch C, Sellak H, O'Callaghan N, Ryan JC. Trends and Gaps in Precision Health Research: A Scoping Review. *BMJ Open* 2021, 11, e056938, doi:10.1136/bmjopen-2021-056938.

Vineis P, Robinson O, Chadeau-Hyam M, Dehghan A, Mudway I, Dagnino S. What Is New in the Exposome? *Environ Int* 2020, 143, 105887, doi:10.1016/j.envint.2020.105887.

Vink JM, van Hooijdonk KJM, Willemsen G, Feskens EJM, Boomsma DI. Causes of Variation in Food Preference in the Netherlands. *Twin Res Hum Genet*. 2020 Aug;23(4):195-203. doi: 10.1017/thg.2020.66.

Vogelezang S, Bradfield JP, Ahluwalia TS, Curtin JA, Lakka TA, Grarup N, Scholz M, van der Most PJ, Monnereau C, Stergiakouli E, Heiskala A, Horikoshi M, Fedko IO, Vilor-Tejedor N, Cousminer DL, Standl M, Wang CA, Viikari J, Geller F, Íñiguez C, Pitkänen N, Chesi A, Bacelis J, Yengo L, Torrent M, Ntalla I, Helgeland Ø, Selzam S, Vonk JM, Zafarmand MH, Heude B, Farooqi IS, Alyass A, Beaumont RN, Have CT, Rzehak P, Bilbao JR, Schnurr TM, Barroso I, Bonnelykke K, Beilun LJ, Carstensen L, Charles MA, Chawes B, Clément K, Closa-Monasterolo R, Custovic A, Eriksson JG, Escibano J, Groen-Blokhuis M, Grote V, Gruszfeld D, Hakonarson H, Hansen T, Hattersley AT, Hollensted M, Hottenga JJ, Hyppönen E, Johansson S, Joro R, Kähönen M, Karhunen V, Kiess W, Knight BA, Koletzko B, Kühnapfel A, Landgraf K, Langhendries JP, Lehtimäki T, Leinonen JT, Li A, Lindi V, Lowry E, Bustamante M, Medina-Gomez C, Melbye M, Michaelsen KF, Morgen CS, Mori TA, Nielsen TRH, Niinikoski H, Oldehinkel AJ, Pakkala K, Panoutsopoulou K, Pedersen O, Pennell CE, Power C, Reijneveld SA, Rivadeneira F, Simpson A, Sly PD,

Stokholm J, Teo KK, Thiering E, Timpson NJ, Uitterlinden AG, van Beijsterveldt CEM, van Schaik BDC, Vaudel M, Verduci E, Vinding RK, Vogel M, Zeggini E, Sebert S, Lind MV, Brown CD, Santa-Marina L, Reischl E, Frithioff-Bøjsøe C, Meyre D, Wheeler E, Ong K, Nohr EA, Vrijkotte TGM, Koppelman GH, Plomin R, Njølstad PR, Dedoussis GD, Froguel P, Sørensen TIA, Jacobsson B, Freathy RM, Zemel BS, Raitakari O, Vrijheid M, Feenstra B, Lyytikäinen LP, Snieder H, Kirsten H, Holt PG, Heinrich J, Widén E, Sunyer J, Boomsma DI, Järvelin MR, Körner A, Davey Smith G, Holm JC, Atalay M, Murray C, Bisgaard H, McCarthy MI; Early Growth Genetics Consortium; Jaddoe VWV, Grant SFA, Felix JF. Novel loci for childhood body mass index and shared heritability with adult cardiometabolic traits. *PLoS Genet.* 2020 Oct 12;16(10):e1008718. doi: 10.1371/journal.pgen.1008718.

Voight BF, Kang HM, Ding J, Palmer CD, Sidore C, Chines PS, Burtt NP, Fuchsberger C, Li Y, Erdmann J, Frayling TM, Heid IM, Jackson AU, Johnson T, Kilpeläinen TO, Lindgren CM, Morris AP, Prokopenko I, Randall JC, Saxena R, Soranzo N, Speliotes EK, Teslovich TM, Wheeler E, Maguire J, Parkin M, Potter S, Rayner NW, Robertson N, Stirrups K, Winckler W, Sanna S, Mulas A, Nagaraja R, Cucca F, Barroso I, Deloukas P, Loos RJ, Kathiresan S, Munroe PB, Newton-Cheh C, Pfeuffer A, Samani NJ, Schunkert H, Hirschhorn JN, Altshuler D, McCarthy MI, Abecasis GR, Boehnke M. The metabochip, a custom genotyping array for genetic studies of metabolic, cardiovascular, and anthropometric traits. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002793. doi: 10.1371/journal.pgen.1002793. Epub 2012 Aug 2. Erratum in: *PLoS Genet.* 2013 Apr;9(4). doi: 10.1371/annotation/0b4e9c8b-35c5-4dbd-b95b-0640250fbc87.

Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G, Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segrè AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B, Benediktsson R, Bennett AJ, Blagieva R, Boerwinkle E, Bonnycastle LL, Bengtsson Boström K, Bravenboer B, Bumpstead S, Burtt NP, Charpentier G, Chines PS, Cornelis M, Couper DJ, Crawford G, Doney AS, Elliott KS, Elliott AL, Erdos MR, Fox CS, Franklin CS, Ganser M, Gieger C, Grarup N, Green T, Griffin S, Groves CJ, Guiducci C, Hadjadj S, Hassanali N, Herder C, Isomaa B, Jackson AU, Johnson PR, Jørgensen T, Kao WH, Klopp N, Kong A, Kraft P, Kuusisto J, Lauritzen T, Li M, Lieve A, Lindgren CM, Lyssenko V, Marre M, Meitinger T, Midthjell K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proença C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shrader P, Sigurdsson G, Sparsø T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van Dam RM, van Haften TW, van Herpt T, van Vliet-Ostapchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllenstein U, Hansen T, Hide WA, Hitman GA, Hofman A, Hunter DJ, Hveem K, Laakso M, Mohlke KL, Morris AD, Palmer CN, Pramstaller PP, Rudan I, Sijbrands E, Stein LD, Tuomilehto J, Uitterlinden A, Walker M, Wareham NJ, Watanabe RM, Abecasis GR, Boehm BO, Campbell H, Daly MJ, Hattersley AT, Hu FB, Meigs JB, Pankow JS, Pedersen O, Wichmann HE, Barroso I, Florez JC, Frayling TM, Groop L, Sladek R, Thorsteinsdottir U, Wilson JF, Illig T, Froguel P, van Duijn CM, Stefansson K, Altshuler D, Boehnke M, McCarthy MI; MAGIC investigators; GIANT Consortium. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010 Jul;42(7):579-89. doi: 10.1038/ng.609. Erratum in: *Nat Genet.* 2011 Apr;43(4):388.

Voisin S, Almén MS, Zheleznyakova GY, Lundberg L, Zarei S, Castillo S, Eriksson FE, Nilsson EK, Blüher M, Böttcher Y, Kovacs P, Klovins J, Rask-Andersen M, Schiöth HB. Many obesity-associated SNPs strongly associate with DNA methylation changes at proximal promoters and enhancers. *Genome Med.* 2015 Oct 8;7:103. doi: 10.1186/s13073-015-0225-4.

Volkov P, Bacos K, Ofori JK, Esguerra JL, Eliasson L, Rönn T, Ling C. Whole-Genome Bisulfite Sequencing of Human Pancreatic Islets Reveals Novel Differentially Methylated Regions in Type 2 Diabetes Pathogenesis. *Diabetes.* 2017 Apr;66(4):1074-1085. doi: 10.2337/db16-0996.

Volkov P, Olsson AH, Gillberg L, Jørgensen SW, Brøns C, Eriksson KF, Groop L, Jansson PA, Nilsson E, Rönn T, Vaag A, Ling C. A Genome-Wide mQTL Analysis in Human Adipose Tissue Identifies Genetic Variants Associated with DNA Methylation, Gene Expression and Metabolic Traits. *PLoS One.* 2016 Jun 20;11(6):e0157776. doi: 10.1371/journal.pone.0157776.

Vollenweider P, von Eckardstein A, Widmann C. HDLs, diabetes, and metabolic syndrome. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:405-21. doi: 10.1007/978-3-319-09665-0_12.

von Molitor E, Riedel K, Krohn M, Hafner M, Rudolf R, Cesetti T. Sweet Taste Is Complex: Signaling Cascades and Circuits Involved in Sweet Sensation. *Front Hum Neurosci*. 2021 Jun 22;15:667709. doi: 10.3389/fnhum.2021.667709.

Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E, Pietraforte D. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2019 doi: 10.1155/2019/8267234.

Wahl A, Kasela S, Carnero-Montoro E, van Iterson M, Štambuk J, Sharma S, van den Akker E, Klaric L, Benedetti E, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Ugrina I, Beekman M, Deelen J, van Heemst D, Heijmans BT, B I O S Consortium, Wuhler M, Plomp R, Keser T, Šimurina M, Pavić T, Gudelj I, Krištić J, Grallert H, Kunze S, Peters A, Bell JT, Spector TD, Milani L, Slagboom PE, Lauc G, Gieger C. IgG glycosylation and DNA methylation are interconnected with smoking. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018 Mar;1862(3):637-648. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.10.012.

Wahl S, Drong A, Lehne B, Loh M, Scott WR, Kunze S, Tsai PC, Ried JS, Zhang W, Yang Y, Tan S, Fiorito G, Franke L, Guarrera S, Kasela S, Kriebel J, Richmond RC, Adamo M, Afzal U, Ala-Korpela M, Albeti B, Ammerpohl O, Apperley JF, Beekman M, Bertazzi PA, Black SL, Blancher C, Bonder MJ, Brosch M, Carstensen-Kirberg M, de Craen AJ, de Lusignan S, Dehghan A, Elkalaawy M, Fischer K, Franco OH, Gaunt TR, Hampe J, Hashemi M, Isaacs A, Jenkinson A, Jha S, Kato N, Krogh V, Laffan M, Meisinger C, Meitinger T, Mok ZY, Motta V, Ng HK, Nikolakopoulou Z, Nteliopoulos G, Panico S, Pervjakova N, Prokisch H, Rathmann W, Roden M, Rota F, Rozario MA, Sandling JK, Schafmayer C, Schramm K, Siebert R, Slagboom PE, Soininen P, Stolk L, Strauch K, Tai ES, Tarantini L, Thorand B, Tigchelaar EF, Tumino R, Uitterlinden AG, van Duijn C, van Meurs JB, Vineis P, Wickremasinghe AR, Wijmenga C, Yang TP, Yuan W, Zhernakova A, Batterham RL, Smith GD, Deloukas P, Heijmans BT, Herder C, Hofman A, Lindgren CM, Milani L, van der Harst P, Peters A, Illig T, Relton CL, Waldenberger M, Järvelin MR, Bollati V, Soong R, Spector TD, Scott J, McCarthy MI, Elliott P, Bell JT, Matullo G, Gieger C, Kooner JS, Grallert H, Chambers JC. Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):81-86. doi: 10.1038/nature20784.

Walaszczyk E, Luijten M, Spijkerman AMW, Bonder MJ, Lutgers HL, Snieder H, Wolffenbuttel BHR, van Vliet-Ostaptchouk JV. DNA methylation markers associated with type 2 diabetes, fasting glucose and HbA_{1c} levels: a systematic review and replication in a case-control sample of the Lifelines study. *Diabetologia*. 2018 Feb;61(2):354-368. doi: 10.1007/s00125-017-4497-7.

Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:221-48. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.160725.

Wang HH, Lee DK, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. Novel Insights into the Pathogenesis and Management of the Metabolic Syndrome. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2020 May;23(3):189-230. doi: 10.5223/pghn.2020.23.3.189.

Wang HX, Wang YP. Gut Microbiota-brain Axis. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Oct 5;129(19):2373-80. doi: 10.4103/0366-6999.190667.

Wang KC; Chang HY. Epigenomics: Technologies and Applications. *Circ Res* 2018, 122, 1191–1199, doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.310998.

Wang L, Fang R, Zhu M, Qin N, Wang Y, Fan J, Sun Q, Ji M, Fan X, Xie J, Ma H, Dai J. Integrated gene-based and pathway analyses using UK Biobank data identify novel genes for chronic respiratory diseases. *Gene*. 2021 Jan 30;767:145287. doi: 10.1016/j.gene.2020.145287.

Wang X, Xiao R, Li H, Li T, Guan L, Ding H, Li X, Zheng H, Yu K, Zhao A, Liang W, Xi Y. Correlation between Mild Cognitive Impairment and Sarcopenia: The Prospective Role of Lipids and Basal Metabolic Rate in the Link. *Nutrients*. 2022 Dec 15;14(24):5321. doi: 10.3390/nu14245321.

Wang Y, Fan K, Wang J, Ding ZT, Wang H, Bi CH, Zhang YW, Sun HW. Proteomic analysis of *Camellia sinensis* (L.) reveals a synergistic network in the response to drought stress and recovery. *J Plant Physiol*. 2017 Dec;219:91-99. doi: 10.1016/j.jplph.2017.10.001.

Wang Y, Jia S. Degrees make all the difference: the multifunctionality of histone H4 lysine 20 methylation. *Epigenetics*. 2009;4:273-6. doi: 10.4161/epi.4.5.9212

Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Nov;16(11):678-89. doi: 10.1038/nrm4074.

Warburton DER, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. *Curr Opin Cardiol*. 2017 Sep;32(5):541-556. doi: 10.1097/HCO.0000000000000437.

Wardle J, Steptoe A, Oliver G, Lipsey Z. Stress, dietary restraint and food intake. *J Psychosom Res*. 2000 Feb;48(2):195-202. doi: 10.1016/s0022-3999(00)00076-3.

Ware JE Jr, Gandek B, Kosinski M, Aaronson NK, Apolone G, Brazier J, Bullinger M, Kaasa S, Leplège A, Prieto L, Sullivan M, Thunedborg K. The equivalence of SF-36 summary health scores estimated using standard and country-specific algorithms in 10 countries: results from the IQOLA Project. *International Quality of Life Assessment*. *J Clin Epidemiol*. 1998 Nov;51(11):1167-70. doi: 10.1016/s0895-4356(98)00108-5.

Wasalathanthri S, Hettiarachchi P, Prathapan S. Sweet taste sensitivity in pre-diabetics, diabetics and normoglycemic controls: a comparative cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*. 2014 Aug 13;14:67. doi: 10.1186/1472-6823-14-67.

Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun*. 2017 Nov 28;8(1):1826. doi: 10.1038/s41467-017-01261-5. PMID: 29184056; PMCID: PMC5705698.

Watanabe K, Umičević Mirkov M, de Leeuw CA, van den Heuvel MP, Posthuma D. Genetic mapping of cell type specificity for complex traits. *Nat Commun*. 2019 Jul 19;10(1):3222. doi: 10.1038/s41467-019-11181-1. Erratum in: *Nat Commun*. 2020 Apr 1;11(1):1718.

Waugh NR, Shyangdan D, Taylor-Phillips S, Suri G, Hall B. Screening for type 2 diabetes: a short report for the National Screening Committee. *Health Technol Assess*. 2013;17(35):1-90. doi:10.3310/hta17350

Wechsler D. 2002. WAIS – III. Escala de inteligencia para adultos de Wechsler- Tercera edición. Buenos Aires: Paidós.

Wei R, Duan X, Guo L. Effects of sleep deprivation on coronary heart disease. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2022 Sep 1;26(5):297-305. doi: 10.4196/kjpp.2022.26.5.297.

Wen D, Shi J, Liu Y, He W, Qu W, Wang C, Xing H, Cao Y, Li J, Zha L. DNA methylation analysis for smoking status prediction in the Chinese population based on the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method. *Forensic Sci Int*. 2022 Oct;339:111412. doi: 10.1016/j.forsciint.2022.111412. Epub 2022 Jul 29.

Westwell-Roper CY, Ehses JA, Verchere CB. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 β production and β -cell dysfunction. *Diabetes*. 2014 May;63(5):1698-711. doi: 10.2337/db13-0863.

Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2018 Oct 23;138(17):e426-e483. doi: 10.1161/CIR.0000000000000597.

Whelton PK. Evolution of Blood Pressure Clinical Practice Guidelines: A Personal Perspective. *Can J Cardiol*. 2019 May;35(5):570-581. doi: 10.1016/j.cjca.2019.02.019.

White PJ, McGarrah RW, Herman MA, Bain JR, Shah SH, Newgard CB. Insulin action, type 2 diabetes, and branched-chain amino acids: A two-way street. *Mol Metab*. 2021 Oct;52:101261. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101261.

Whiteside SP, Lynam DR. Understanding the role of impulsivity and externalizing psychopathology in alcohol abuse: application of the UPPS impulsive behavior scale. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2003 Aug;11(3):210-7. doi: 10.1037/1064-1297.11.3.210.

Wichchukit S, O'Mahony M. The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: Some reappraisals and alternatives. *J. Sci. Food Agric*. 2015;95:2167–2178. doi: 10.1002/jsfa.6993.

Wielscher M, Mandaviya PR, Kuehnle B, Joehanes R, Mustafa R, Robinson O, Zhang Y, Bodinier B, Walton E, Mishra PP, Schlosser P, Wilson R, Tsai PC, Palaniswamy S, Marioni RE, Fiorito G, Cugliari G, Karhunen V, Ghanbari M, Psaty BM, Loh M, Bis JC, Lehne B, Sotoodehnia N, Deary IJ, Chadeau-Hyam M, Brody JA, Cardona A, Selvin E, Smith AK, Miller AH, Torres MA, Marouli E, Gao X, van Meurs JBJ, Graf-Schindler J, Rathmann W, Koenig W, Peters A, Weninger W, Farlik M, Zhang T, Chen W, Xia Y, Teumer A, Nauck M, Grabe HJ, Doerr M, Lehtimäki T, Guan W, Milani L, Tanaka T, Fisher K, Waite LL, Kasela S, Vineis P, Verweij N, van der Harst P, Iacoviello L, Sacerdote C, Panico S, Krogh V, Tumino R, Tzala E, Matullo G, Hurme MA, Raitakari OT, Colicino E, Baccarelli AA, Kähönen M, Herzig KH, Li S; BIOS consortium; Conneely KN, Kooner JS, Köttgen A, Heijmans BT, Deloukas P, Relton C, Ong KK, Bell JT, Boerwinkle E, Elliott P, Brenner H, Beekman M, Levy D, Waldenberger M, Chambers JC, Dehghan A, Jarvelin MR. DNA methylation signature of chronic low-grade inflammation and its role in cardio-respiratory diseases. *Nat Commun*. 2022 May 3;13(1):2408. doi: 10.1038/s41467-022-29792-6.

Wielscher M, Vierlinger K, Kegler U, Ziesche R, Gsur A, Weinhäusel A. Diagnostic Performance of Plasma DNA Methylation Profiles in Lung Cancer, Pulmonary Fibrosis and COPD. *EBioMedicine*. 2015 Jul 2;2(8):929-36. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.06.025.

Wijesooriya K, Jadaan SA, Perera KL, Kaur T, Ziemann M. Urgent Need for Consistent Standards in Functional Enrichment Analysis. *PLoS Comput Biol* 2022, 18, e1009935, doi:10.1371/journal.pcbi.1009935.

Wilhelm-Benartzi CS, Koestler DC, Karagas MR, Flanagan JM, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ, Houseman EA, Brown R. Review of processing and analysis methods for DNA methylation array data. *Br J Cancer*. 2013 Sep 17;109(6):1394-402. doi: 10.1038/bjc.2013.496.

Wilkie LM, Capaldi Phillips ED. Heterogeneous binary interactions of taste primaries: perceptual outcomes, physiology, and future directions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Nov;47:70-86. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.015.

Will Crescioni A, Ehrlinger J, Alquist JL, Conlon KE, Baumeister RF, Schatschneider C, Dutton GR. High trait self-control predicts positive health behaviors and success in weight loss. *J Health Psychol.* 2011 Jul;16(5):750-9. doi: 10.1177/1359105310390247.

Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, Kanoni S, Ganna A, Chen J, Buchkovich ML, Mora S, Beckmann JS, Bragg-Gresham JL, Chang HY, Demirkan A, Den Hertog HM, Do R, Donnelly LA, Ehret GB, Esko T, Feitosa MF, Ferreira T, Fischer K, Fontanillas P, Fraser RM, Freitag DF, Gurdasani D, Heikkilä K, Hyppönen E, Isaacs A, Jackson AU, Johansson Å, Johnson T, Kaakinen M, Kettunen J, Kleber ME, Li X, Luan J, Lyytikäinen LP, Magnusson PKE, Mangino M, Mihailov E, Montasser ME, Müller-Nurasyid M, Nolte IM, O'Connell JR, Palmer CD, Perola M, Petersen AK, Sanna S, Saxena R, Service SK, Shah S, Shungin D, Sidore C, Song C, Strawbridge RJ, Surakka I, Tanaka T, Teslovich TM, Thorleifsson G, Van den Herik EG, Voight BF, Volcik KA, Waite LL, Wong A, Wu Y, Zhang W, Absher D, Asiki G, Barroso I, Been LF, Bolton JL, Bonnycastle LL, Brambilla P, Burnett MS, Cesana G, Dimitriou M, Doney ASF, Döring A, Elliott P, Epstein SE, Ingi Eyjolfsson G, Gigante B, Goodarzi MO, Grallert H, Gravitto ML, Groves CJ, Hallmans G, Hartikainen AL, Hayward C, Hernandez D, Hicks AA, Holm H, Hung YJ, Illig T, Jones MR, Kaleebu P, Kastelein JJP, Khaw KT, Kim E, Klopp N, Komulainen P, Kumari M, Langenberg C, Lehtimäki T, Lin SY, Lindström J, Loos RJF, Mach F, McArdle WL, Meisinger C, Mitchell BD, Müller G, Nagaraja R, Narisu N, Nieminen TVM, Nsubuga RN, Olafsson I, Ong KK, Palotie A, Papamarkou T, Pomilla C, Pouta A, Rader DJ, Reilly MP, Ridker PM, Rivadeneira F, Rudan I, Ruukonen A, Samani N, Scharnagl H, Seeley J, Silander K, Stančáková A, Stirrups K, Swift AJ, Tiret L, Uitterlinden AG, van Pelt LJ, Vedantam S, Wainwright N, Wijmenga C, Wild SH, Willemsen G, Wilsgaard T, Wilson JF, Young EH, Zhao JH, Adair LS, Arveiler D, Assimes TL, Bandinelli S, Bennett F, Bochud M, Boehm BO, Boomsma DI, Borecki IB, Bornstein SR, Bovet P, Burnier M, Campbell H, Chakravarti A, Chambers JC, Chen YI, Collins FS, Cooper RS, Danesh J, Dedoussis G, de Faire U, Feranil AB, Ferrières J, Ferrucci L, Freimer NB, Gieger C, Groop LC, Gudnason V, Gyllenstein U, Hamsten A, Harris TB, Hingorani A, Hirschhorn JN, Hofman A, Hovingh GK, Hsiung CA, Humphries SE, Hunt SC, Hveem K, Iribarren C, Järvelin MR, Jula A, Kähönen M, Kaprio J, Kesäniemi A, Kivimäki M, Kooner JS, Koudstaal PJ, Krauss RM, Kuh D, Kuusisto J, Kyvik KO, Laakso M, Lakka TA, Lind L, Lindgren CM, Martin NG, März W, McCarthy MI, McKenzie CA, Meneton P, Metspalu A, Moilanen L, Morris AD, Munroe PB, Njølstad I, Pedersen NL, Power C, Pramstaller PP, Price JF, Psaty BM, Quertermous T, Rauramaa R, Saleheen D, Salomaa V, Sanghera DK, Saramies J, Schwarz PEH, Sheu WH, Shuldiner AR, Siegbahn A, Spector TD, Stefansson K, Strachan DP, Tayo BO, Tremoli E, Tuomilehto J, Uusitupa M, van Duijn CM, Vollenweider P, Wallentin L, Wareham NJ, Whitfield JB, Wolfenbuttel BHR, Ordovas JM, Boerwinkle E, Palmer CNA, Thorsteinsdottir U, Chasman DI, Rotter JJ, Franks PW, Ripatti S, Cupples LA, Sandhu MS, Rich SS, Boehnke M, Deloukas P, Kathiresan S, Mohlke KL, Ingelsson E, Abecasis GR; Global Lipids Genetics Consortium. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet.* 2013 Nov;45(11):1274-1283. doi: 10.1038/ng.2797.

Williams BL, Hornig M, Buie T, Bauman ML, Cho Paik M, Wick I, Bennett A, Jabado O, Hirschberg DL, Lipkin WI. Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. *PLoS One.* 2011;6(9):e24585. doi: 10.1371/journal.pone.0024585.

Williams JA, Bartoshuk LM, Fillingim RB, Dotson CD. Exploring Ethnic Differences in Taste Perception. *Chem Senses.* 2016 Jun;41(5):449-56. doi: 10.1093/chemse/bjw021.

Wilson BA, Alderman N, Burgess PW, Emslie H, Evans JJ. Behavioural assessment of the Dysexecutive Syndrome (BADS). Bury St. Edmunds, UK. 1996: Thames Valley Test Company.

Wilson DJ. Osteoporosis and sport. *Eur J Radiol.* 2019 Jan;110:169-174. doi: 10.1016/j.ejrad.2018.11.010.

Wing RR, Bolin P, Brancati FL, Bray GA, Clark JM, Coday M, Crow RS, Curtis JM, Egan CM, Espeland MA, Evans M, Foreyt JP, Ghazarian S, Gregg EW, Harrison B, Hazuda HP, Hill JO, Horton ES, Hubbard VS, Jakicic JM, Jeffery RW, Johnson KC, Kahn SE, Kitabchi AE, Knowler WC, Lewis CE, Maschak-Carey BJ, Montez MG, Murillo A, Nathan DM, Patricio J, Peters A, Pi-Sunyer X, Pownall H, Reboussin D, Regensteiner JG, Rickman AD, Ryan DH, Safford M, Wadden TA, Wagenknecht LE, West DS, Williamson

DF, Yanovski SZ. Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2013 Jul 11;369(2):145-54. doi: 10.1056/NEJMoa1212914.

Winkler TW, Kotalik Z, Gorski M, Lottaz C, Kronenberg F, Heid IM. Easy Strata: Evaluation and Visualization of Stratified Genome-Wide Association Meta-Analysis Data. *Bioinformatics* 2015, 31, 259–261, doi:10.1093/bioinformatics/btu621.

Wise PM, Hansen JL, Reed DR, Breslin PA. Twin study of the heritability of recognition thresholds for sour and salty taste. *Chem Senses*. 2007 Oct;32(8):749-54. doi: 10.1093/chemse/bjm042.

Wolfrum C, Besser D, Luca E, Stoffel M. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11624-9. doi: 10.1073/pnas.1931483100.

Wolters M, Ahrens J, Romani-Pérez M, Watkins C, Sanz Y, Benítez-Páez A, Stanton C, Günther K. Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health - A systematic review conducted within the MyNewGut project. *Clin Nutr*. 2019 Dec;38(6):2504-2520. doi: 10.1016/j.clnu.2018.12.024.

World Health Organization/Organización Mundial de la Salud (OMS). Prevalence of insufficient physical activity. (2018). Disponible en: www.who.int/gho/ncd/risk_factors/physical_activity_text/en/

World Health Organization/Organización Mundial de la Salud (OMS). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. (2018). Disponible en: www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/

World Organization Health (WHO)/Organización Mundial de la Salud (OMS). Consultado el 26 de marzo de 2020 en: <https://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/es/>

Wu Ct, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1103-5. doi: 10.1126/science.293.5532.1103.

Wu J, Deng H, Chen Q, Wu Q, Li X, Jiang S, Wang F, Ye F, Ou L, Gao H. Comprehensive Analysis of Differential Immunocyte Infiltration and Potential ceRNA Networks Involved in the Development of Atrial Fibrillation. *Biomed Res Int*. 2020 Sep 19;2020:8021208. doi: 10.1155/2020/8021208.

Wu J, Yang L, Li S, Huang P, Liu Y, Wang Y, Tang H. Metabolomics Insights into the Modulatory Effects of Long-Term Low Calorie Intake in Mice. *J Proteome Res*. 2016 Jul 1;15(7):2299-308. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00336.

Würtz P, Kangas AJ, Soininen P, Lawlor DA, Davey Smith G, Ala-Korpela M. Quantitative Serum Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics in Large-Scale Epidemiology: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiol*. 2017 Nov 1;186(9):1084-1096. doi: 10.1093/aje/kwx016.

Würtz P, Tiainen M, Mäkinen VP, Kangas AJ, Soininen P, Saltevo J, Keinänen-Kiukaanniemi S, Mäntyselkä P, Lehtimäki T, Laakso M, Jula A, Kähönen M, Vanhala M, Ala-Korpela M. Circulating metabolite predictors of glycemia in middle-aged men and women. *Diabetes Care*. 2012 Aug;35(8):1749-56. doi: 10.2337/dc11-1838.

Xiao FH, Wang HT, Kong QP. Dynamic DNA Methylation During Aging: A "Prophet" of Age-Related Outcomes. *Front Genet*. 2019 Feb 18;10:107. doi: 10.3389/fgene.2019.00107.

Xie C, Leung YK, Chen A, Lon, DX, Hoyo, C, Ho, SM. Differential Methylation Values in Differential Methylation Analysis. *Bioinformatics* 2019, 35, 1094–1097, doi:10.1093/bioinformatics/bty778.

Xie Y, Khan R, Wahab F, Hussain HMJ, Ali A, Ma H, Jiang H, Xu J, Zaman Q, Khan M, Jiang X, Shi Q. The testis-specifically expressed Dpep3 is not essential for male fertility in mice. *Gene*. 2019 Aug 30;711:143925. doi: 10.1016/j.gene.2019.06.015.

Xu F, Zhang K, Grunstein M. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell*. 2005;121:375–85. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.011.

Xu L, Jiang CQ, Lam TH, Zhang WS, Thomas GN, Cheng KK. Dose-response relation between physical activity and cognitive function: guangzhou biobank cohort study. *Ann Epidemiol*. 2011 Nov;21(11):857-63. doi: 10.1016/j.annepidem.2011.06.002.

Yamamoto K, Tsuchisaka A, Yukawa H. Branched-Chain Amino Acids. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2017;159:103-128. doi: 10.1007/10_2016_28.

Yan Q, Cai L, Guo W. New Advances in Improving Bone Health Based on Specific Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 4;12:821429. doi: 10.3389/fcimb.2022.821429.

Yanai H, Adachi H, Hakoshima M, Katsuyama H. Molecular Biological and Clinical Understanding of the Pathophysiology and Treatments of Hyperuricemia and Its Association with Metabolic Syndrome, Cardiovascular Diseases and Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 26;22(17):9221. doi: 10.3390/ijms22179221.

Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013 Oct 15;128(16):e240-327. doi: 10.1161/CIR.0b013e31829e8776.

Yang BT, Dayeh TA, Kirkpatrick CL, Taneera J, Kumar R, Groop L, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2011;54:360–367.

Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, Renström E, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*. 2012 Jul;26(7):1203-12. doi: 10.1210/me.2012-1004.

Yang BZ, Han S, Kranzler HR, Farrer LA, Gelernter J. A genomewide linkage scan of cocaine dependence and major depressive episode in two populations. *Neuropsychopharmacology*. 2011 Nov;36(12):2422-30. doi: 10.1038/npp.2011.122.

Yang L, Cui M, Liu B. Current Progress in Understanding the Structure and Function of Sweet Taste Receptor. *J Mol Neurosci*. 2021 Feb;71(2):234-244. doi: 10.1007/s12031-020-01642-4.

Yang P, Hu W, Fu Z, Sun L, Zhou Y, Gong Y, Yang T, Zhou H. The positive association of branched-chain amino acids and metabolic dyslipidemia in Chinese Han population. *Lipids Health Dis*. 2016 Jul 25;15:120. doi: 10.1186/s12944-016-0291-7.

Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*. 2015 Apr 9;161(2):264-76. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.047.

Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 May 9;486(7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053.

Yengo L, Sidorenko J, Kempner KE. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~ 700,000 individuals of European ancestry. *bioRxiv*. 2018. Accessed June. 2018;20. doi: <https://doi.org/10.1101/274654>.

Yew Tan C, Virtue S, Murfitt S, Roberts LD, Phua YH, Dale M, Griffin JL, Tinahones F, Scherer PE, Vidal-Puig A. Adipose tissue fatty acid chain length and mono-unsaturation increases with obesity and insulin resistance. *Sci Rep*. 2015 Dec 17;5:18366. doi: 10.1038/srep18366.

Yoo D, Park Y. Association between the Intake of Fermented Soy Products and Hypertension Risk in Postmenopausal Women and Men Aged 50 Years or Older: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2013-2018. *Nutrients*. 2020 Nov 25;12(12):3621. doi: 10.3390/nu12123621.

Yoo JY, Lee S, Lee HA, Park H, Park YJ, Ha EH, Kim YJ. Can proopiomelanocortin methylation be used as an early predictor of metabolic syndrome? *Diabetes Care*. 2014;37(3):734-9. doi: 10.2337/dc13-1012.

Yu H, Jansen R, Stolovitzky G, Gerstein M. Total ancestry measure: quantifying the similarity in tree-like classification, with genomic applications. *Bioinformatics*. 2007 Aug 15;23(16):2163-73. doi: 10.1093/bioinformatics/btm291.

Yu Y, Zhang YH, Liu L, Yu LL, Li JP, Rao JA, Hu F, Zhu LJ, Bao HH, Cheng XS. Bioinformatics analysis of candidate genes and potential therapeutic drugs targeting adipose tissue in obesity. *Adipocyte*. 2022 Dec;11(1):1-10. doi: 10.1080/21623945.2021.2013406.

Zabaneh D, Balding DJ. A genome-wide association study of the metabolic syndrome in Indian Asian men. *PLoS One*. 2010 Aug 4;5(8):e11961. doi: 10.1371/journal.pone.0011961.

Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, Weidinger S, Lattka E, Adamski J, Peters A, Strauch K, Waldenberger M, Illig T. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One*. 2013 May 17;8(5):e63812. doi: 10.1371/journal.pone.0063812.

Zhang B, Chen T, Cao M, Yuan C, Reiter RJ, Zhao Z, Zhao Y, Chen L, Fan W, Wang X, Zhou X, Li C. Gut Microbiota Dysbiosis Induced by Decreasing Endogenous Melatonin Mediates the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Obesity. *Front Immunol*. 2022 May 10;13:900132. doi: 10.3389/fimmu.2022.900132.

Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J*. 2010 Feb;4(2):232-41. doi: 10.1038/ismej.2009.112.

Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 17;106(7):2365-70. doi: 10.1073/pnas.0812600106.

Zhang Q, Ramlee MK, Brunmeir R, Villanueva CJ, Halperin D, Xu F. Dynamic and distinct histone modifications modulate the expression of key adipogenesis regulatory genes. *Cell Cycle*. 2012 Dec 1;11(23):4310-22. doi: 10.4161/cc.22224.

Zhang W, Song M, Qu J, Liu GH. Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases. *Circ Res*. 2018 Sep 14;123(7):773-786. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312497.

Zhang W, Song M, Qu J, Liu GH. Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases. *Circ Res* 2018; 123, 773–786, doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.312497.

Zhang X, Qi Q, Zhang C, Smith SR, Hu FB, Sacks FM, Bray GA, Qi L. FTO genotype and 2-year change in body composition and fat distribution in response to weight-loss diets: the POUNDS LOST Trial. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):3005-11. doi: 10.2337/db11-1799.

Zhang Y, Elgizouli M, Schöttker B, Holleczeck B, Nieters A, Brenner H. Smoking-associated DNA methylation markers predict lung cancer incidence. *Clin Epigenetics*. 2016 Nov 25;8:127. doi: 10.1186/s13148-016-0292-4.

Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003 Aug 12;108(6):661-3. doi: 10.1161/01.CIR.0000086981.09834.E0.

Zhao J, Zhang X, Liu H, Brown MA, Qiao S. Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function. *Curr Protein Pept Sci*. 2019;20(2):145-154. doi: 10.2174/1389203719666180514145437.

Zhao L, Kirkmeyer SV, Tepper BJ. A paper screening test to assess genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil. *Physiol Behav*. 2003 Apr;78(4-5):625-33. doi: 10.1016/s0031-9384(03)00057-x.

Zhenyukh O, González-Amor M, Rodrigues-Diez RR, Esteban V, Ruiz-Ortega M, Salas M, Mas S, Briones AM, Egido J. Branched-chain amino acids promote endothelial dysfunction through increased reactive oxygen species generation and inflammation. *J Cell Mol Med*. 2018 Oct;22(10):4948-4962. doi: 10.1111/jcmm.13759.

Zhong C, Lu Z, Che B, Qian S, Zheng X, Wang A, Bu X, Zhang J, Ju Z, Xu T, Zhang Y. Choline Pathway Nutrients and Metabolites and Cognitive Impairment After Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2021 Mar;52(3):887-895. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.031903.

Zhong J, Agha G, Baccarelli AA. The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease: Methodological Aspects, Study Design, and Data Analysis for Epidemiological Studies. *Circ Res* 2016, 118, 119–131, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305206.

Zhong VW, Kuang A, Danning RD, Kraft P, van Dam RM, Chasman DI, Cornelis MC. A genome-wide association study of bitter and sweet beverage consumption. *Hum Mol Genet*. 2019 Jul 15;28(14):2449-2457. doi: 10.1093/hmg/ddz061.

Zhong VW, Kuang A, Danning RD, Kraft P, van Dam RM, Chasman DI, Cornelis MC. A genome-wide association study of bitter and sweet beverage consumption. *Hum. Mol. Genet*. 2019, 28, 2449–2457.

Zhou M, Xu W, Wang J, Yan J, Shi Y, Zhang C, Ge W, Wu J, Du P, Chen Y. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF-κB pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury. *EBioMedicine*. 2018 Sep;35:345-360. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.08.035.

Zhou Y, Liu H, Zhang M. Analysis of the metabolic pathways affected by hot-humid or dry climate based on fecal metabolomics coupled with serum metabolic changes in broiler chickens. *Poult Sci*. 2020 Nov;99(11):5526-5546. doi: 10.1016/j.psj.2020.07.039.

Zhou ZJ, Luo CB, Xin HY, Hu ZQ, Zhu GQ, Li J, Zhou SL. MACROD2 deficiency promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis by activating GSK-3β/β-catenin signaling. *NPJ Genom Med*. 2020 Apr 1;5:15. doi: 10.1038/s41525-020-0122-7.

Zhu L, Xie Z, Lu J, Hao Q, Kang M, Chen S, Tang W, Ding H, Chen Y, Liu C, Wu H. TCF7L2 rs290481 T>C polymorphism is associated with an increased risk of type 2 diabetes mellitus and fasting plasma glucose level. *Oncotarget*. 2017 Aug 16;8(44):77000-77008. doi: 10.18632/oncotarget.20300.

Zilverschoon GR, Tack CJ, Joosten LA, Kullberg BJ, van der Meer JW, Netea MG. Interleukin-18 resistance in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Sep;32(9):1407-14. doi: 10.1038/ijo.2008.109.

Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S; IDF Consensus Group. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes*. 2007 Oct;8(5):299-306. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00271.x.

Zindler, T.; Frieling, H.; Neyazi, A.; Bleich, S.; Friedel, E. Simulating ComBat: How Batch Correction Can Lead to the Systematic Introduction of False Positive Results in DNA Methylation Microarray Studies. *BMC Bioinformatics* 2020, 21, 271, 951 doi:10.1186/s12859-020-03559-6.

Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, Gregoratos G, Klein G, Moss AJ, Myerburg RJ, Priori SG, Quinones MA, Roden DM, Silka MJ, Tracy C, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Antman EM, Anderson JL, Hunt SA, Halperin JL, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Blanc JJ, Budaj A, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2006 Sep 5;114(10):e385-484. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.178233.

Zomer E, Gurusamy K, Leach R, Trimmer C, Lobstein T, Morris S, James WP, Finer N. Interventions that cause weight loss and the impact on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2016 Oct;17(10):1001-11. doi: 10.1111/obr.12433.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):21-35. doi: 10.1038/nrm3025.

Zupancic ML, Cantarel BL, Liu Z, Drabek EF, Ryan KA, Cirimotich S, Jones C, Knight R, Walters WA, Knights D, Mongodin EF, Horenstein RB, Mitchell BD, Steinle N, Snitker S, Shuldiner AR, Fraser CM. Analysis of the gut microbiota in the old order Amish and its relation to the metabolic syndrome. *PLoS One*. 2012;7(8):e43052. doi: 10.1371/journal.pone.0043052.

Zuraikat FM, Wood RA, Barragán R, St-Onge MP. Sleep and Diet: Mounting Evidence of a Cyclical Relationship. *Annu Rev Nutr*. 2021 Oct 11;41:309-332. doi: 10.1146/annurev-nutr-120420-021719.

Figura 1.1. Mortalidad por cardiopatía isquémica estandarizada por la población europea por comunidad autónoma y razón estandarizada de prevalencia.	60
Figura 1.2. Principales causas de muerte según edad. Año 2018 Porcentaje sobre el total de fallecidos (INE, 2019).....	63
Figura 1.3. Mecanismos y efectos antiaterogénicos del c-HDL (Padró T, et al, 2017).....	73
Figura 1.4. Marcadores metabólicos de la dislipemia	75
Figura 1.5. Manhattan plot de los resultados del meta-análisis de descubrimiento de 26 GWAS de estudio único.	90
Figura 1.6. Manhattan plot que muestra la distribución de los valores de p de la asociación de sondas de metilación con el índice de masa corporal en la cohorte de descubrimiento.....	94
Figura 1.7. Manhattan plot de los resultados del metanálisis de diabetes tipo 2.	97
Figura 1.8. Manhattan plot de pruebas de resultados de todo el epigenoma para la asociación y el estado de metilación de la insulina en ayunas.....	99
Figura 1.9. Vínculo entre el SRA, el estrés oxidativo y el síndrome metabólico.	115
Figura 1.10. Asociaciones no lineales entre el comportamiento sedentario y los resultados de salud presentados con y sin ajuste de actividad física	124
Figura 1.11. Factores que influyen en los comportamientos alimentarios de los niños.	138
Figura 1.12. Resistencia a la insulina en la intersección de ABCD y DBCD.....	151
Figura 1.13. Variantes genéticas comunes y factores ambientales en el desarrollo de Síndrome Metabólico.	152
Figura 1.14. Diagrama sobre la asociación entre un aumento de 2 puntos del índice de adhesión a la Dieta Mediterránea y el riesgo de mortalidad por cualquier causa.	156
Figura 1.15. Asociaciones entre países y sexo, así como entre la puntuación obtenida en el cuestionario modificado para DietMed y el IMC (A) o CC (B) en los participantes del estudio EPIC-PANACEA.....	157
Figura 3.1. Diagrama de flujo estudio PREDIMED-Plus (Martínez-González MA et al., 2019).....	174

Figura 3.2. Esquema de asignación de tapones de color según contenido de alícuotas	187
Figura 3.3. Interacción entre factores ambientales y genéticos producen alteraciones epigenéticas que afectan a la cromatina y muestran fenotipos finales y/o alteraciones en el individuo	200
Figura 3.4. Illumina EPIC 850K y su respectivo lector permiten la obtención de resultados, cuyas asociaciones se plasman en distintos tipos de gráficos: Heat-map, Bar-plots, Scatter Plots and Manhattan Plot, correspondiendo con gráficos de variación de temperatura, de barras o columnas, dispersión y Manhattan.	201
Figura 3.5. Descripción plataforma metabolómica utilizada mediante resonancia magnética nuclear (RMN)	202
Figura 3.6. Procedimientos utilizados para organizar y anotar la base de datos GENES...	210
Figura 3.7. Figura de Rey-Osterrieth.....	216
Figura 4.1. Gráficas representativas de los niveles de calorías ingeridas diferenciando por sexo en panel A, y de los gramos consumidos de verdura diariamente por sexo en panel B con p-valor<0,05	228
Figura 4.2. Niveles de BCAA en suero de participantes PREDIMED-Plus Valencia. Las concentraciones séricas medias ($\pm$ desviación estándar; DE) en los sujetos del estudio.....	235
Figura 4.3. Representación espectro RMN plasmático LipoProfile que muestra en la expansión superior la señal de GlycA y el modelo de deconvolución utilizado para su cuantificación.	236
Figura 4.4. Manhattan plot para representar los resultados de GWAS de Bilirrubina de participantes PREDIMED-Plus Valencia	238
Figura 4.5. Representación gráfica de las puntuaciones en test de percepción de sabor para los distintos sabores	239
Figura 4.6. Representación de la distribución de frecuencias de la “total taste score” en la población estudiada, PREDIMED-Plus Valencia).....	240
Figura 4.7. Representación gráfica de la asociación entre las marcas obtenidas en el “total taste score” y los distintos grados de obesidad).....	241
Figura 4.8. Diagrama gráfico que representa el diseño del estudio, incluyendo las secuencias de experimentos y análisis estadísticos realizados.....	245
Figura 4.9. Gráficos de carga del análisis de componentes principales para los componentes rotados (rotación Varimax).....	252
Figura 4.10. Manhattan plot para el análisis GWAS sobre la preferencia por el sabor dulce (como variable dicotómica) en toda la población utilizando PLINK y un análisis GWAS basado en un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)	257

Figura 4.11. Diagrama cuantil-cuantil (QQ) para el GWAS basado en SNP sobre la preferencia de sabor dulce (variable dicotómica) en toda la población.....	258
Figura 4.12. Gráfico regional para el SNP principal rs2091718, ubicado en el gen del receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo N2 (PTPRN2), en el cromosoma 7, para la preferencia por el sabor dulce (como variable dicotómica)	259
Figura 4.13. Diagrama QQ para el GWAS basado en SNP sobre la preferencia de sabor dulce (variable dicotómica) en toda la población. Modelo ajustado por sexo, edad, diabetes y componentes principales PC1, PC2, PC3 y PC4.....	263
Figura 4.14. Gráfica regional para el SNP PTPRN2-rs2091718 principal, en el cromosoma 7. Cada SNP se colorea en función de r^2	264
Figura 4.15. Puntuación Regulome DB para el SNP PTPRN2-rs2091718	265
Figura 4.16. Mapa de calor de expresión génica basado en el conjunto de datos GTE×V8 (54 tipos de tejido), que muestra la expresión promedio por etiqueta para la expresión del gen PTPRN2 y los genes superpuestos regionales MIR5707, MIR595, AC078942.1 y LINC01022).....	266
Figura 4.17. Gráfica Q-Q para el GWAS basado en genes en la preferencia de sabor dulce (ajustado por sexo y edad), obtenida usando FUMA.	266
Figura 4.18. Manhattan plot para el análisis GWAS para la preferencia por el sabor dulce (como variable dicotómica) en toda la población utilizando un enfoque basado en genes (ajustado por sexo y edad).	267
Figura 4.19. Mapa de calor de expresión génica basado en el conjunto de datos GTExV8 (54 tipos de tejidos) (expresión promedio por etiqueta) para la expresión del gen PTPRN2 y tres genes mejor clasificados obtenidos del GWAS basado en genes sobre la preferencia de sabor dulce (variable dicotómica).	269
Figura 4.20. Medias ajustadas para la preferencia por el sabor dulce (Panel (A): usando la variable de preferencia por el sabor dulce como continua; y Panel (B): usando las puntuaciones del factor 2) dependiendo del SNP principal rs2091718, ubicado en el receptor de la proteína tirosina fosfatasa gen tipo N2 (PTPRN2) en toda la población.	272
Figura 4.21. Manhattan plot de asociaciones de epigenoma completo (EWAS) para el tabaquismo (5 niveles) ajustado por covariables en toda la muestra.	277
Figura 4.22. Gráfico cuantil-cuantil (QQ) para la asociación del sitio CpG en el EWAS para fumar (5 niveles).....	278
Figura 4.23. Diagramas de caja de distribuciones que muestran metilación (valores beta) del sitio cg21566642 (cromosoma 2) por tabaquismo (5 niveles).	280
Figura 4.24. Manhattan plot de la asociación de todo el epigenoma entre los nunca fumadores en relación con los fumadores actuales (ajustado multivariante)..	282

Figura 4.25. Manhattan plot de la asociación de todo el epigenoma entre ex fumadores en relación con los fumadores actuales (multivariado ajustado).	284
Figura 4.26. Diagrama de dispersión para la asociación entre los niveles de metilación en el sitio cp21566642 (valores beta) y los cigarrillos fumados por día (panel A), y los paquetes-años fumados (panel B) en fumadores actuales (n = 48).	290
Figura 4.27. En esta figura se muestran las curvas generadas de las características operativas del receptor (ROC) de los cinco sitios de metilación de CpG mejor clasificados para el tabaquismo, para discriminar a los fumadores actuales y nunca fumadores. Se presenta el área bajo la curva (AUC), los intervalos de confianza (IC) del 95% y los valores p correspondientes.	292
Figura 4.28. Miami plot para el análisis de metilación de todo el epigenoma para fumar (5 niveles), dependiendo de la adherencia a la dieta mediterránea: baja adherencia (por encima del eje x) y alta adherencia (por debajo del eje x). ...	294
Figura 4.29. Interacciones entre la dieta mediterránea (analizada como baja y alta adherencia) y el tabaquismo en la determinación de la metilación del ADN en sitios seleccionados de CpG: (A) cg21566642; (B) cg05575921; (C) cg09936388; y (D) cg01901332.	297
Figura 4.30. La prevalencia se ajustó con modelo multivariable para: la obesidad (a) y la diabetes (b) en categorías conjuntas de duración del sueño y variabilidad del sueño.	308
Figura 4.31. Coeficientes b ajustados multivariados e IC del 95% para diferentes factores de riesgo cardiovascular según categorías de consumo de jugo de fruta natural.	310
Figura 4.32. Porcentaje de individuos de la población estudiada que cumplen o no la recomendación de la EFSA para la ingesta total de agua de líquidos (TWIF) y la ingesta total de agua (TWI).	312
Figura 4.33. Odds ratio (IC 95%) de diversas pruebas neurofisiológicas según terciles de ingesta de cafeína.	313
Figura 4.34. Esquema de la distribución anual de las intervenciones individuales y grupales que se han realizado en cada grupo de intervención según protocolo a lo largo de los 6 años de intervención intensiva en el estudio PREDIMED-Plus Valencia	318
Figura 4.35. Evolución de la adherencia a la dieta mediterránea hipocalórica (escala 17p.) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia en función del grupo de intervención. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal	319
Figura 4.36. Evolución del aporte total de energía (kcal/día) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia en función del grupo de intervención. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal	320

Figura 4.37. Evolución de la act.física total realizada (medida en METs: equivalentes metabólicos min/sem) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal	321
Figura 4.38. Evolución del peso total a tiempo basal, 6 meses, 1 año y 2 años según grupo de intervención) en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia. Modelo de medidas repetidas (basal, 6 meses, 1 año y 2 años) ajustado por edad, sexo y diabetes basal	323
Figura 4.39. Cambios en la expresión de genes seleccionados tras 6 meses de intervención	325
Figura 4.40. Evolución anual del número de eventos totales (primarios y secundarios) declarados y verificados en el nodo de Valencia desde el inicio del estudio PREDIMED-Plus hasta el año 2020.....	328
Figura 4.41. Cambios en los parámetros antropométricos y lipídicos a los 6 meses y al año de intervención en el total de participantes del estudio PREDIMED-Plus tras las intervenciones realizadas	335
Figura 4.42. Diagrama de de ruta con los coeficientes estandarizados en el SEM durante el seguimiento (ajustado por nivel educativo).	337
Figura 4.43. Se evaluaron los períodos de confinamiento y los períodos en los que se evaluaron las medidas antropométricas y los componentes de la itnervencion PREDIMED-Plus.....	339
Figura 4.44. Interacción entre los distintos parámetros y/o factores en alteraciones cognitivas, conductuales y metabólicas. Interrelación entre factores fisiológicos, psicológicos y anatómicos	342
Figura 4.45. Resumen de los principales resultados del presente estudio (Soldevila-Domenech N et al., 2021).....	347
Figura 4.46. Asociaciones longitudinales entre la impulsividad y las puntuaciones de patrones dietéticos (n=438).	351

9

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Comparación de las definiciones clave publicadas de Síndrome metabólico para poblaciones pediátricas y adultas.....	55
Tabla 1.2. Criterios de Síndrome metabólico en infancia y adolescencia de Federación Internacional Diabetes (FDI)	56
Tabla 1.3. Declaración conjunta de la IDF, AHA/NHLBI, Federación Mundial del Corazón, Sociedad Internacional de Aterosclerosis y Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad.....	70
Tabla 1.4. Recomendaciones e indicaciones combinadas sobre los valores de IMC y perímetro de la cintura en relación al nivel de exceso de peso y su asociación a riesgo de enfermedad	71
Tabla 1.5. Criterios establecidos por la FDI para las diferencias entre sexo en perímetro de la cintura en los distintos grupos étnicos	71
Tabla 1.6. Genes vinculados a la obesidad.....	87
Tabla 1.7. Tabla adaptada de JS Dron y RA Hegele.	102
Tabla 1.8. Descripción de los cuatro tipos de ejercicios que se recomiendan en población adulta-envejecida (Lee PG et al., 2017).....	126
Tabla 1.9. Representación de las variables iniciales destacadas en el estudio (Estruch R, et al 2018).....	154
Tabla 3.1. Nodos y número de pacientes reclutados por nodo en el estudio PREDIMED-Plus.	168
Tabla 3.2. La tabla muestra las principales medidas y actividades de toma de datos por visita (Protocolo PREDIMED-Plus).....	176
Tabla 4.1. Descripción de características demográficas, clínicas, estilo de vida y genéticas, basales, según el sexo en participantes PREDIMED-Plus reclutados en el nodo de Valencia	222
Tabla 4.2. Prevalencia de consumo de tabaco, otras variables del estilo de vida, nivel de estudios y variables clínicas en los participantes en el estudio PREDIMED-Plus valencia.....	223

Tabla 4.3. Valores medios de consumo de energía, macro y micronutrientes y grupos de alimentos en los participantes del estudio PREDIMED-Plus Valencia	224
Tabla 4.4. Descripción de las características basales de los participantes PREDIMED-Plus por grupo aleatorizado, intervención o control	226
Tabla 4.5. Alimentos preferentes para picotear por muestra total y por sexo	231
Tabla 4.6. Asociación entre la intensidad de percepción de cada sabor y el peso, perímetro de cintura e IMC en los participantes PREDIMED-Plus Valencia	241
Tabla 4.7. Características demográficas, clínicas y genéticas de la población de estudio según sexo	246
Tabla 4.8. Preferencias gustativas (dulce, salado, agrio, umami y amargo) en el total de la población y estratificada por sexo y diabetes	247
Tabla 4.9. Preferencias de sabor (dulce, salado, ácido, umami y amargo) dependiendo del estado de obesidad	248
Tabla 4.10. Percepción del gusto (dulce, salado, agrio, umami y amargo) en el total de la población y estratificado por diabetes	248
Tabla 4.11. Asociación entre la preferencia por diferentes sabores	250
Tabla 4.12. Asociación entre la preferencia por diferentes gustos y su percepción (intensidad percibida)	250
Tabla 4.13. Matriz de componentes rotados para el análisis factorial, incluidas las cinco preferencias de sabor	252
Tabla 4.14. Asociación entre la preferencia por el sabor dulce (bajo/alto) y el gusto por los alimentos azucarados (bajo/alto) en la población total y por estado de diabetes	253
Tabla 4.15. Asociación entre la preferencia por el sabor dulce (bajo/alto) y el gusto por los alimentos azucarados (bajo/alto) en la población total y por estado de diabetes	255
Tabla 4.16. SNP mejor clasificados en el GWAS para la preferencia por el sabor dulce (variable categórica) en toda la población	259
Tabla 4.17. SNP mejor clasificados en el GWAS para la preferencia de sabor dulce (variable categórica) en toda la población	261
Tabla 4.18. SNP mejor clasificados en el GWAS para la preferencia de sabor dulce (variable categórica) en toda la población	262
Tabla 4.19. Los genes mejor clasificados en el GWAS basado en genes que usan MAGMA (de Leeuw CA et al., 2015; Watanabe K et al., 2017) y calcular el valor p a nivel de gen para la preferencia de sabor dulce en toda la población	268

Tabla 4.20. SNP mejor clasificados en el GWAS para el factor 2 (etiquetado como "sabor dulce/umami") en toda la población	270
Tabla 4.21. Asociaciones estadísticamente significativas entre la preferencia de sabor salado en población mediterránea y en población UK BiobanK	274
Tabla 4.22. Asociaciones estadísticamente significativas entre la preferencia de sabor ácido en población mediterránea y en población UK BiobanK	274
Tabla 4.23. Asociaciones estadísticamente significativas entre la preferencia de sabor ácido en población mediterránea y en población UK BiobanK	275
Tabla 4.24. Características demográficas, clínicas y de estilo de vida de la población estudiada según sexo	276
Tabla 4.25. Las CpG metiladas diferencialmente superiores para el tabaquismo (5 niveles)	278
Tabla 4.26. principales sitios de CpG metilados diferencialmente clasificados por valor p para la variable categórica tabaquismo (3 categorías) y comparación de fumadores y no fumadores	283
Tabla 4.27. Las CpG metiladas diferencialmente superiores para ex fumadores (F) en relación con los fumadores actuales (C)	285
Tabla 4.28. Muestra los nombres de las vías mejor clasificadas, los valores p de enriquecimiento y los valores p de enriquecimiento corregidos de Bonferroni. Detectamos 31 vías KEGG que pasaron la corrección de Bonferroni	287
Tabla 4.29. Muestra las primeras 22 funciones de enriquecimiento GO, incluido su tipo (proceso biológico, componente celular o función molecular), puntuación de enriquecimiento, valor p de enriquecimiento bruto y valor p de enriquecimiento corregido de Bonferroni	288
Tabla 4.30. La tabla muestra las correlaciones de la metilación (valores beta) con los cigarrillos fumados por día y el número de paquetes-año fumados para las otras CpG	290
Tabla 4.31. Principales CpG metiladas diferencialmente para el análisis de metilación de todo el epigenoma del estado de tabaquismo (5 niveles)	293
Tabla 4.32. Principales CpG metiladas diferencialmente para el análisis de metilación de todo el epigenoma de tabaquismo (5 niveles)	295
Tabla 4.33. Lista de islas o sitios CpG con mayor relevancia estadística en el EWAS de la influencia rural-urbano.	300
Tabla 4.34. Resultados de mayor significancia estadística de las principales vías metabólicas en el EWAS de la influencia rural-urbano.	301
Tabla 4.35. Lista de funciones moleculares con resultados de mayor relevancia estadística en el análisis GO del EWAS de la influencia rural-urbano.	301

Tabla 4.36. Ingesta de grupos de alimentos (g/día), adherencia a dieta mediterránea y perfiles nutricionales entre áreas geográficas analizadas.....	303
Tabla 4.37. Participantes con ingesta de nutrientes por debajo de 2/3 de las IDR por áreas geográficas, edad y sexo.....	304
Tabla 4.38. Coeficientes de un modelo de regresión lineal multivariable ajustado para evaluar la diferencia en la densidad de nutrientes por varias variables	306
Tabla 4.39. Temporalidad para la recogida de cuestionarios y muestras según el protocolo inicial del estudio PREDIMED-Plus	316
Tabla 4.40. Lugares CpG con los valores más significativos al analizar los cambios en la metilación tras el estudio de intervención intensiva con dieta mediterránea hipocalórica y aumento de la act.física en la compasión basal-año en 36 participantes del estudio piloto.....	327
Tabla 4.41. Pérdida de peso media a los 6 y 12 meses de intervención, expresada como pérdida absoluta de peso corporal (kilogramos), reducción porcentual en relación con el valor basal y cambio absoluto en el IMC por grupo de tratamiento	331
Tabla 4.42. Proporción de participantes (%) que cumplieron diferentes criterios de pérdida de peso a los 6 y 12 meses de intervención por grupo de tratamiento: intención de tratar (imputación múltiple) y solo para completar	332
Tabla 4.43. Cambios basales y de 12 meses en los biomarcadores de riesgo cardiovascular por grupo de tratamiento	334
Tabla 4.44. Efecto de la pandemia de COVID-19 (media [IC 95%]) sobre las principales variables de intervención en el ensayo PREDIMED-Plus por los dos grupos de intervención (A y B)	340
Tabla 4.45. Prueba del efecto de los SNP del TDAH del artículo publicado con resultados de genoma completo en participantes con TDAH (Demontis D et al., 2019).....	343
Tabla 4.46. Se muestran las distintas variantes de genes y su ubicación en cromosoma, así como frecuencia alélica y p-valor	343
Tabla 4.47. Se muestran p-valores de los genes seleccionados para ver asociación de GWAS de TDAH con nuestra población PREDIMED-Plus Valencia y fenotipo diabetes.....	344
Tabla 4.48. Se muestran p-valores de los genes seleccionados para ver asociación de GWAS de TDAH con nuestra población PREDIMED-Plus Valencia y fenotipo IMC	345
Tabla 4.49. Se muestran p-valores de los genes seleccionados para ver asociación de GWAS de TDAH con nuestra población PREDIMED-Plus Valencia y fenotipo de percepción de sabor dulce.....	345