

# Universidad de Navarra

## Facultad de Farmacia



# Identificación de modificaciones epigenéticas como posibles biomarcadores de la obesidad y el ictus.

Ana María Gómez Úriz

Pamplona, 2014



# Universidad de Navarra

## Facultad de Farmacia



Memoria presentada por **D<sup>a</sup> Ana María Gómez Úriz** para aspirar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Navarra

Ana María Gómez Úriz

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología y autorizamos su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 27 de Enero de 2014

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> Director

Dr. Javier Campión Zabalza

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> Director

Dr. Fermín I. Milagro Yoldi



Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Departamento de Industria y Tecnología, Comercio y Trabajo del Gobierno de Navarra (beca para la formación de tecnólogos 2010), y la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (beca predoctoral 2011-2013) además del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-16887).



*A mis padres Ana y Pepe*

*A mi tata Paula*

*A mis abuelos Miguel y Elisa*





*A Paúl*



*“El día que el hombre se dé cuenta de sus profundas equivocaciones,  
habrá terminado el progreso de la ciencia.”*

*Marie Curie (1867-1934)*



*Llega el momento que estaba esperando desde hace 4 años y revisando todo lo vivido creo que esta es la parte más difícil de escribir aunque, parezca mentira. Tanta gente a la que dar las gracias y que sin duda han escrito a esta tesis tanto o más que yo. Todo lo que aquí escriba siempre se quedará corto para expresar lo que realmente siento.*

*En primer lugar quisiera agradecer a la Universidad de Navarra, a la Facultad de Farmacia y al departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología la oportunidad de realizar la tesis doctoral aquí. También tengo que agradecer infinitamente a la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra por la beca concedida. Sobre todo en los tiempos que corren su ayuda es esencial para todo aquel doctorando que empieza con nada más que ilusión. Muchas gracias por dar sin esperar nada a cambio. También agradecer al Gobierno de Navarra por la beca de Tecnólogos concedida el primer año de este camino.*

*A mis directores de tesis por apoyarme, ayudarme y enseñarme desde el máster hasta ahora.*

*A Javier, por estar siempre ahí, por horas infinitas de paciencia con la estadística, por los cabezazos iniciales con las histonas, las reuniones de coaching y los cafés entre Anova y Anova. Nunca te podrás imaginar lo esencial que has sido estos 4 años, tanto a nivel profesional como personal. Espero haber estado a la altura (a pesar de ser no entender mucho de biología molecular). GRACIAS.*

*A Fermín, por tu tranquilidad y disponibilidad. Muchas gracias por atenderme siempre que llegaba en el último momento a por una corrección o una pregunta. Gracias por apostar por mí el año del Máster y dejarme ser tu doctoranda.*

*Quiero agradecerlos a los dos, sobretodo estos últimos meses en los que los problemas y las trabas han sido más presentes aún si cabe. Sin vosotros, y sin vuestro apoyo no tendría esta segunda oportunidad.*

*A Alfredo, por interesarse por el trabajo de todo el mundo y dar ánimos cada vez que nos cruzamos por el pasillo y por ayudar a los doctorandos en lo que puedes. A Marian por ser una gran coordinadora de prácticas, gracias a esto, he descubierto la pasión de la docencia.*

*A Diana, por preguntar siempre como nos va y por esa vitalidad contagiosa. A María Jesús y Pilar Lostao, por ser un contacto con mí tierra esos días que necesitaba sentirme un poco “maña” y por preguntar cómo va todo. A Amelia y Santi por el apoyo mostrado.*

*Marta Cuervo, Itziar Zazpe, Roncesvalles y Susana Santiago, por ser un ejemplo para las nutricionistas que queremos dedicarnos a la investigación. Gracias también a todos los que formáis parte de Bromatología.*

*A María Luisa, gracias por ser la epigenetista oficial, y por mostrar siempre ayuda y ser parte de este equipo ictus. Gracias también por escucharme en el refugio que hice del despacho al fondo del pasillo.*

*A Ana Lorente, ¿qué haríamos sin ti en el laboratorio?, tu ayuda ha sido esencia, sin ti este trabajo hubiese sido imposible. Desde que tomaste las riendas del chip, la cosa empezó a fluir (¿un poco verdad?). Muchísimas gracias por escucharme cuando necesitaba hablar en el laboratorio, por enseñar las técnicas como si no costara, y por tu eterna paciencia con esos seres que aparecen cada septiembre perdidos por el laboratorio dispuestos a romper todo lo que tocan. Esto es extensible a Vero, por hacer la bata un complemento fashion, por levantarme el ánimo fijándote en esos zapatos nuevos o en ese color de uñas. Por ser la experta de los Elis y estar siempre disponible para ayudar. A Asun y Jaione, aunque nos separa un tramo de escaleras, sois el alma del depar. Gracias por meter en vereda a Carlos y Jonai.*

*Gracias a Bea y a Paula, por toda la ayuda, las dudas resueltas y la alegría con lo que lo hacéis. Tenéis ganado el cielo aguantándonos a todos.*

*A Gonzalo y a Reyes por estos años de ayuda eficaz y rápida.*

*A todos los doctorandos que han pasado por el departamento, Itzi (gracias sobre todo por esta última etapa en la que hemos compartido también proyecto), Esti, Diego, Pablo, Laura, Tara, Adri, Ceci (suerte en Alemania), Almu, Silvia, Pedro P y Bea. Y a todos los que aun están, Miguel, Marta, Patri (casi casi nos vamos juntas), Ana Elsa, Ana Laura, Usune, Sonia (te quedas encargada de los decibelios), Leti, Aurora, Idoia y Laura (acabas de llegar pero vienes pisando fuerte). Sin todos vosotros nada hubiese sido lo mismo.*

*Al lunch team, porque la hora de comer siempre era entretenida. Gracias a todos por las horas de relax, a Jonai por animar el ambiente con sus historias y debates, a Txema, eres genial, gracias por tus risas y clases magistrales sobre filología. Natalia, acabas de llegar pero en seguida te has hecho un hueco. Merece mucho la pena conocerte. Nos vemos en London.*

*A nuestros vecinos de pasillo, al departamento de Bioquímica, en especial a los freaks (con cariño por supuesto) de Juego de Tronos, Álvaro, Antonia y Sara. Y al departamento de Farma, en especial, por el interés y cariño a Eli, Elena y Mikel.*

*A los bedeles, en especial a Gonzalo, Jesús y Enrique. A Martín y a todo el personal de la cafetería (gracias por darnos de comer todos los días). Y a todo el personal anónimo de la Universidad, que sin su trabajo, muchas veces olvidado, no podríamos trabajar.*

*Al Biobanco Vasco, y por la preparación de las muestras en particularmente a Maribel. A todos aquellos que han intervenido en este proyecto en el reclutamiento de los pacientes, la realización de la base de datos, el tratamiento de las muestras y la intervención nutricional. A Vanessa, Karmele, Ana de Arce y Adolfo por toda la ayuda, apoyo y accesibilidad en la realización este proyecto. Sin vosotros no hubiese sido posible la ejecución del proyecto. Gracias al Hospital Donostia y al Biodonostia. Y por supuesto gracias a todos los voluntarios que aceptaron participar en el proyecto. Sin ellos no hay nada que escribir ni investigar.*

*A los amigos que aquí he conocido, los que siguen en Pamplona y los que se han tenido que ir. A mi Mery, que tanto nos hemos contado, reído, bailado y llorado. Con tu alegría y bondad has hecho más llevadero el día a día. Cuando no estás se nota. Además gracias a ti conocimos a David, hoy tu marido, convirtiéndose en uno de los puntos de cordura que muchas veces nos falta. Gracias por el último regalo. Sé que estarás siempre. Pilar (mi Valdecantos), horas y horas hablando (como no nos cuesta...) y compartiendo momento y hasta sitio, no tengo más que decir que GRACIAS, gracias por tu sinceridad y comprensión en todo momento. A Teresa, gracias por tu amistad. Se te sigue echando mucho de menos en el pasillo. Has compartido conmigo el nacimiento de tu familia haciéndonos parte de ella. Junto con tu marido Toni, ponéis tranquilidad y sosiego a las 3 locas. Perdón por acaparar a vuestro (bueno, nuestro) Alvarito.*

*Rocio, juntas empezamos y (casi) juntas terminamos esta andadura. Con tu bondad has sido un pilar en este camino, espero haber sido lo mismo para ti. Ari, tu alegría y pasión son contagiosas, gracias por formar parte de mi vida. A pesar de no hablar todos los días, se que estas ahí. Las tres E-MENU investigadoras juntas hasta el final.*

*A Pedro "Gomun". Aunque suene raro verte en este párrafo, es que realmente te considero mi amigo. Gracias por escucharme horas y horas (y horas y horas...). Por ser el psicólogo del departamento para tanta gente. Ayudas sin darte cuenta, con tus consejos siempre sabios y sinceros. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí este tiempo. Eres una de las personas que más ha ayudado a que esto no se quedara a medias.*

*A mis compañeras de piso. Lorena, gracias por enseñarme el piso, fue lo mejor que pude hacer, mudarme contigo. Tu ayuda en esos momentos complicados fue esencial. Hasta enfadada eres graciosa. También gracias a tu Santi. A Cris, por las conversaciones de fin de semana mimetizadas con el sofá y la manta. Ánimo en tu último año de tesis. A Laura, aunque sólo nos conocemos hace un año, ha sido un placer vivir contigo, tienes una pasión por todo contagiosa. Lucha por lo que quieres, y ten paciencia que llegará.*

*A Rodrigo, aunque acabas de empezar a ser PIF, llevas integradísimo en el departamento dos años. Eres bueno y voluntarioso hasta el límite. Gracias por mostrar siempre tu ayuda sin esperar nada a cambio.*

*A Jose y Nerea, enhorabuena por Carmencita, espero ver muchos momentos felices como los que hemos compartido hasta ahora. Helen y Pablo, aunque nunca leáis esto, por la gran cantidad de kilómetros que nos separan, fue un placer conocerlos. He aprendido mucho de vosotros. De Helen, la tenacidad y el trabajo incansable, la pasión por la investigación y la responsabilidad. ¿Cómo sacabas tiempo para hacer planes con nosotros? Pablo, me enseñaste a disfrutar de la vida, y a saber desconectar.*

*A Noe y a Carmen (nunca os separamos eh?). Habéis sido sin ninguna duda dos de las mejores personas que he conocido durante la tesis. La alegría y generosidad con la que os comportáis con todo el mundo, es digna de admirar.*

*A Sancho, aunque a veces me desesperas, eres muy buena persona (aunque te empeñes en negarlo).*

*Finalmente a los dos brasileños que solo estuvieron un año, pero me marcaron. Flavia y André. Obrigada.*



*A todos vosotros gracias por haber estado, por estar y espero que por seguir estando.*

*A mis amigos de Zaragoza. Aunque estos años en los que nos empezamos a hacer adultos de verdad estamos físicamente separados, se que en este caso la distancia no es el olvido. Seguimos juntos este viaje (aunque no podamos votar el destino).*

*Finalmente a las personas más importantes de mi vida.*

*A mis padres, que son la generosidad pura, y el amor sin límites. Jamás podré ni lejanamente agradeceros todo lo que hacéis por nosotras. Sin vosotros no hubiese llegado a ningún sitio y mucho menos al final de la tesis. Lo sois todo para mí, todo lo que escriba aquí se quedará corto. Con que estéis una décima parte de orgullosos de mí que yo de vosotros, soy feliz. GRACIAS.*

*A mi tati Paula, gracias a ti intento ser mejor cada día. Gracias por decirme las cosas como son. Aprendo cada día de ti, de tu tenacidad, de tu fuerza, de tu sensatez y de tu generosidad. Es una suerte que tu mejor amiga sea tu hermana. Junto con papá y mamá eres el pilar que me sujeta. No queda nada para que llegue Aaron (estoy encantada de que forme parte de los Gómez, y de que te haga tan feliz).*

*A la yaya Elisa, muchas gracias por estar siempre ahí y ser la matriarca. Gracias por todos los buenos consejos. Eres mi ejemplo para todos aquellos que te tenemos cerca. Ahora más que nunca te tienes que sentir orgullosa de cómo eres. Gracias al yayo Miguel, por haber llenado nuestras vidas de alegría hasta el final. Sé que ahora estás cuidándonos desde el cielo y el día de mi tesis tocaras la ocarina para celebrarlo. Al final otra Úriz te sustituye en Pamplona.*

*OS QUIERO.*

*A mi Pierre Curie. Esta tesis es tuya Paúl. No sé ni por dónde empezar a agradecerte, porque todo lo que escriba no es suficiente. Tu paciencia y la tranquilidad que le aportas a todo el mundo. El amor que sientes por tu familia es todo un ejemplo. Lo he compartido todo hasta ahora contigo, dentro y fuera del laboratorio y quiero que así sea siempre. Ya explicaste en tu tesis como nos conocimos (Cordero 2012) así que no me voy a repetir, pero nuestra historia tenía que empezar así, de la manera menos convencional posible. Lo que venga después ya lo investigaremos juntos.*

***Gracias a todos los que habéis formado parte de esta aventura con malos pero sobretodo en los buenos momentos.***

***Tras estos últimos meses no muy fáciles, quisiera agradecer a todo el mundo que me rodea, PIFs, doctores, amigos, conocidos y sobretodo a mi familia por el apoyo incondicional, la confianza y el amor que me habeis dado. GRACIAS.***

## **ABREVIATURAS**

<b>ADN/DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico/Desoxiribonucleic acid
<b>ADNc/cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario/ Complement desoxiribonucleic acid
<b>AHEI</b>	Índice alternativo de salud de la alimentación
<b>ANCOVA</b>	Análisis de la covarianza
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>ARN/RNA</b>	Ácido ribonucleico/Ribonucleic acid
<b>ARNm/mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero/Messenger ribonucleic acid
<b>BDNF</b>	Factor neurológico derivado del cerebro
<b>CALD1</b>	Caldesmosina 1
<b>CETP</b>	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
<b>CRHR</b>	Receptor de la hormona liberadora de corticotropina
<b>DBP</b>	Presión sanguínea diastólica
<b>DEXA</b>	Absorciometría de Rayos X de energía doble
<b>Dnmt</b>	ADN metiltransferasa
<b>DQI</b>	Índice de calidad de la Dieta Mediterránea
<b>ECV</b>	Enfermedad cerebrovascular
<b>FABP3</b>	Proteína transportadora de ácidos grasos
<b>FDA</b>	Agencia de Alimentos y Medicamentos
<b>FESNAD</b>	Federación Española de Sociedades de Nutrición
<b>FFQ</b>	Cuestionario de frecuencia de alimentos
<b>FTO</b>	Gen asociado a masa grasa y obesidad
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GET</b>	Gasto energético total
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GPR24</b>	Receptor 24 acoplado a proteína C4
<b>GWAS</b>	Estudios de asociación de genoma completo
<b>HC</b>	Hidratos de carbono
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad

<b>HEI</b>	Índice de salud de la alimentación
<b>HOMA-IR</b>	Evaluación del modelo de homeostasis de la insulina
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IASO</b>	Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>KCNQ1</b>	Canal cardíaco de potasio 1
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LEP</b>	Leptina
<b>LINE-1</b>	Elemento nuclear 1 de larga secuencia
<b>MCR</b>	Receptor de la melanocortina
<b>MDQI</b>	Índice de calidad de la Dieta Mediterránea
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinasa 9
<b>NIH</b>	Escala de ictus del Instituto Nacional de Salud
<b>NIHSS</b>	Instituto Nacional de Salud
<b>NINDS</b>	Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos
<b>NMDA</b>	Receptor ionotrópico de glutamato
<b>ns</b>	no significativo
<b>NTRK2</b>	Receptor neurotrófico de tirosinquinasa tipo 2
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Proteína C Reactiva
<b>PCSK1</b>	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 2
<b>PM20D1</b>	Dominio 1 de la peptidasa 20
<b>PMNL</b>	Polimorfonucleares
<b>POMC</b>	Proopiomelanocortina
<b>PON</b>	Paraoxonasa
<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>rt-PA</b>	Activador tisular del plasminógeno
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
<b>SBP</b>	Presión sanguínea sistólica

<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SEEDO</b>	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
<b>SEN</b>	Sociedad Española de Neurología
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido simple
<b>TAC</b>	Tomografía axial computerizada
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento tisular
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UCP</b>	Proteína desacoplante
<b>WARG</b>	Tumor Willms-aniridia
<b>WT1</b>	Tumor Will 1



# Índice





# ÍNDICE

<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
1. OBESIDAD	3
1.1 Definición y criterios diagnósticos	3
1.2 Prevalencia	5
1.3 Etiología	7
1.3.1 Factores relacionados con el estilo de vida	8
1.3.2 Factores endocrinos	8
1.3.3 Factores genéticos	9
1.4 Comorbilidades asociadas a la obesidad	10
1.5 Tratamiento de la obesidad	13
2. ICTUS	17
2.1 Definición y criterios diagnósticos	17
2.2 Prevalencia	18
2.3 Etiología	20
2.4 Tratamiento	22
3. OBESIDAD E ICTUS	22
4. EPIGENÉTICA	24
5. BIOMARCADORES	26
5.1 Celulares y bioquímicos	28
5.1.1 Biomarcadores celulares y bioquímicos en obesidad	28
5.1.2 Biomarcadores celulares y bioquímicos en ictus	29
5.1.3 Biomarcadores celulares y bioquímicos en obesidad e ictus	31
5.2 Genéticos	32
5.2.1 Biomarcadores genéticos en obesidad	32
5.2.2 Biomarcadores genéticos en ictus	33
5.2.3 Biomarcadores genéticos en obesidad e ictus	35
5.3 Epigenéticos	35
5.3.1 Biomarcadores epigenéticos en obesidad	35
5.3.2 Biomarcadores epigenéticos en ictus	36
5.3.3 Biomarcadores epigenéticos en obesidad e ictus	36

6. BIBLIOGRAFÍA	38
<b>II. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>67</b>
1. HIPÓTESIS	69
2. OBJETIVOS	69
2.1 Objetivos principal	69
2.2 Objetivo específicos	70
<b>III. Material y Métodos</b>	<b>73</b>
1. MODELO EXPERIMENTAL GENERAL	76
1.1 Población Inicial	77
1.2 Población Selección	78
1.3 Población Validación	79
1.4 Población Intervención Nutricional	80
<b>IV. Resultados</b>	<b>83</b>
1. CAPÍTULO 1	85
2. CAPÍTULO 2	111
3. CAPÍTULO 3	151
<b>V. Discusión general</b>	<b>179</b>
1. ASPECTOS GENERALES DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA	181
2. EFECTOS FENOTÍPICOS DE LA OBESIDAD Y EL ICTUS	183
2.1 Parámetros bioquímicos	183
2.2 Presión arterial	186
2.3 Parámetros antropométricos	187
3. EFECTOS EPIGENÉTICOS Y EXPRESIÓN GÉNICA	188
4. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO	201
5. BIBLIOGRAFÍA	205

<b>VI. Conclusiones</b>	<b>219</b>
1. CONCLUSIONES	221
2. CONCLUSIÓN GENERAL	223

<b>VII. Anexos</b>	<b>225</b>
1. Anexo 1	i
2. Anexo 2	xv
3. Anexo 3	xxiii



# **I. Introducción**



## **1. OBESIDAD**

### **1.1 Definición y criterios diagnósticos**

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que se ha definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud [WHO 2012]. Este exceso de tejido adiposo se origina por un balance energético positivo entre la ingesta energética y el gasto calórico mantenido en el tiempo [Martí 2008, Martínez, 2008]. Estos factores están influenciados tanto por características genéticas como por el estilo de vida [McAllister 2009].

Considerada por la OMS como una epidemia mundial y calificándola de “globesidad”, se ha convertido rápidamente en el mayor problema de salud pública en muchas partes del mundo. Paradójicamente, coexiste con malnutrición por defecto en países en vías de desarrollo, que a su vez, en éstos se incrementa la prevalencia de sobrepeso, obesidad y patologías asociadas.

Evolutivamente, para la adaptación de la especie humana al medio, este acúmulo de exceso energético en forma de masa grasa presentaba una posibilidad de supervivencia en épocas de hambruna [Hales 2001]. Esto dio lugar a la teoría del genoma ahorrador desarrollada por Neel en la década de los 60, que hace referencia a que el *homo sapiens* al tener que enfrentarse a épocas de hambruna, fue desarrollando la capacidad biológica para comer y almacenar energía al máximo [Neel 1962]. En este sentido la amplia disponibilidad de alimentos, así como la gran palatabilidad de aquellos más calóricos y menos adecuados para una alimentación saludable [Garber 2011], ha superado la capacidad de adaptación del ser humano ante este nuevo ambiente y ha transformado esta capacidad de adaptación en una grave enfermedad pandémica con repercusión tanto directa como indirecta por medio de sus comorbilidades asociadas [Haslam 2005]. Además, en lo relativo al gasto energético, cambios en el estilo de vida actual han propiciado una reducción de la actividad física tanto en el trabajo como en el tiempo libre, con especial relevancia en la población infantil [Speakman 2013].

El criterio internacional más aceptado para definir la obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC), por la sencillez y rapidez en la aplicación y su fácil reproducibilidad. Éste relaciona el peso del individuo medido en kilogramos con la altura expresada en metros al cuadrado y permite clasificar el sobrepeso y la obesidad en diferentes grados y de una manera más exhaustiva también los diferentes tipos de malnutrición por exceso (Tabla 1) [Rubio 2007, WHO 2012]. El mayor inconveniente, es que paradójicamente, no diferencia los compartimentos del organismo [Rubio 2007]. Las clasificaciones de este índice tampoco resultan válidas para niños, cuyos valores deben compararse con los normales para su edad mediante el Z-Score [WHO 2012], ni para embarazadas o ancianos [Rubio 2007].

**Tabla 1.** Clasificación del estado nutricional en función del IMC según la SEEDO. Adaptado de OMS 2006 y Rubio *et al.* (2007).

<b>Categoría</b>	<b>Valores límite del IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>
Peso insuficiente	<18,5
Delgadez severa	<16,00
Delgadez moderada	16,00 - 16,99
Delgadez leve	17,00 - 18,49
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso	25,0-29,0
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad	≥ 30,0
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥50,0

Por este y otros motivos, en la rutina clínica y en los estudios epidemiológicos nutricionales también son utilizados otros parámetros directos o indirectos para completar el uso del IMC. Los más utilizados para diagnosticar la obesidad son la



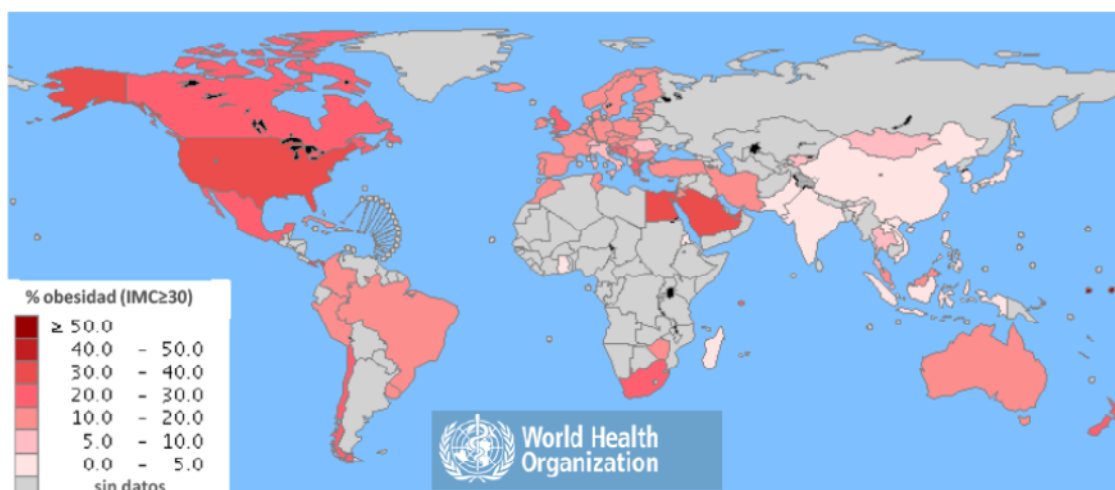
antropometría, que incluye la medida del peso, talla, circunferencias corporales y pliegues cutáneos, así como estimación del porcentaje de grasa por medio de la bioimpedancia eléctrica, [Karlsso 2013] la Absorciometría de Rayos X de Energía Doble (DEXA), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la Tomografía Axial Computarizada (TAC) o la pletismografía por desplazamiento de aire [WHO 2012]. Tal y como se define la misma, este valor tiene gran importancia en el diagnóstico objetivo de la obesidad. Se consideran valores de normalidad los porcentajes de grasa comprendidos entre 18 y 24% en varones y 25 y 31% en mujeres. Porcentajes superiores a estos valores de referencia son considerados como criterio diagnóstico de obesidad [Ho-Pham 2011].

## **1.2 Prevalencia**

En 2008 la OMS estimó que, aproximadamente, 1.500 millones de adultos mayores de 20 años tenían sobrepeso, de los cuales más de 300 millones de mujeres y 200 millones de varones eran obesos. Se ha estimado que para el año 2015 aproximadamente 2.300 millones de adultos sufrirán sobrepeso y más de 700 millones obesidad o lo que es lo mismo del 5 al 10% en varones y del 8 al 14% en mujeres [Colosia 2013]. La figura 1 muestra la distribución de obesidad en porcentaje en los diferentes países [Finucane 2011].

Inicialmente, se ha considerado la obesidad como un importante problema de salud en los países industrializados [Gesta 2006], sin embargo, hoy en día, la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas en todo el mundo.

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado un importante aumento en la frecuencia del sobrepeso y la obesidad en la población de la mayoría de los países desarrollados y en vías de desarrollo. Se estimó que la obesidad es el séptimo factor de riesgo que más mortalidad causa a nivel mundial [Lopez 2006]. En Estado Unidos la obesidad es la segunda causa de muerte prevenible, sólo por detrás del tabaco [Stewart 2009].



**Figura 1.** Prevalencia de obesidad por países según el IMC. Organización Mundial de la Salud [Funicane 2011].

En España, datos de la OMS cifraron la prevalencia de obesidad en 2008 en el 27%, mientras que la tasa de sobrepeso alcanzó valores muy superiores, con un 62% [WHO 2011]. Datos del informe consenso de la FESNAD y la SEEDO de 2011 [FESNAD-SEEDO 2011] corroboran esta elevada tasa de obesidad en población adulta española, de en torno al 25%, siendo una de las más elevadas de Europa y encontrándose incrementada en los últimos 10 años respecto a los niveles de prevalencia del 15,5% del informe DORICA de población española (figura 2) [Aranceta 2007, Gutierrez-Fisac 2012].



**Figura 2:** Prevalencia de la obesidad general en varones y mujeres españoles entre los años 2008 y 2010. [Gutierrez-Fisac, 2012]. Estudio DORICA.

Por otra parte, resulta también alarmante la tasa de obesidad infantil, cifrada por la IASO (Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad) en 50 millones de niños

obesos en edad escolar en todo el mundo. Estos datos resultan preocupantes teniendo en cuenta que se trata de una enfermedad crónica que disminuye tanto la esperanza como la calidad de vida de los niños con obesidad [Franks 2010].

Además de la importancia fisiopatológica de la obesidad, respecto a su vertiente socio-económica, estudios realizados a finales de los 90 intentaron relacionar los gastos del sistema de salud originados por la inactividad física, sobrepeso y obesidad. Así, en Inglaterra se concluyó en un estudio de 2001 que anualmente la obesidad es causa de 30.000 muertes, 18 millones de días de baja laboral, siendo además la causa de una disminución de nueve años en la esperanza de vida [Sevire 2001]. Estudios previos en Estados Unidos [Colditz 1999], estimaban que el 7% del gasto sanitario era invertido en esta enfermedad, y en 2005, la Unión Europea estimó un gasto anual relacionado con la obesidad de 33.000 millones de euros [Fry 2005]. Otro estudio realizado en 2005 en Estados Unidos estimó, incluyendo las comorbilidades asociadas, [Anderson 2005] que el gasto asociado a la inactividad física, sobrepeso y obesidad rondaba el 27% de la carga económica del sistema sanitario. Estos datos sobre una enfermedad crónica, como es la obesidad, con múltiples comorbilidades asociadas y con un importante descenso de la calidad y esperanza de vida permiten afirmar que la obesidad se ha convertido en la epidemia del siglo XXI [Popkin 2012].

### **1.3 Etiología**

La obesidad es una enfermedad metabólica resultante de la interacción entre factores relacionados con el estilo de vida, factores neuroendocrinos, factores genéticos y factores epigenéticos [Wareham 2008, Campión 2010]. Estos elementos afectan al balance energético superando la ingesta calórica al gasto metabólico y acumulando de esta forma el excedente como tejido adiposo.

### *1.3.1 Factores relacionados con el estilo de vida*

La nutrición es un aspecto crucial en el desarrollo de obesidad [Aller 2011, Fruhbeck 1997]. Los principales cambios en la distribución de nutrientes del modelo dietético de los países desarrollados se han caracterizado por un incremento en el consumo de grasas saturadas, sal, alcohol y azúcares simples en detrimento de los hidratos de carbono complejos y de la fibra alimentaria [Law 2007], incrementando la densidad energética de los alimentos. Por otra parte, también resulta importante la cantidad ingerida, que debe ser proporcional a la actividad física de cada individuo, y puede tener un importante efecto sobre el metabolismo y la regulación del apetito [Wadden 2012].

También hábitos de vida sedentarios como el incremento de inactividad en la sociedad occidental [Steeves 2012], el consumo excesivo de alcohol [Sayon-Orea 2011] o efectos asociados a la administración de determinados medicamentos [Tadger 2008] pueden afectar al aumento del peso corporal y la manifestación de obesidad clasificándose por algunos autores como estilo de vida proobesogénico [Wang 2002, Oben 2010, Cho 2013].

### *1.3.2 Factores endocrinos*

Las alteraciones endocrinas son frecuentes en cuadros de obesidad [Bjorntorp 1997, Cioffi 2010]. La hiperinsulinemia es el desequilibrio asociado más común, favoreciendo la acumulación de lípidos en el organismo. También participan otras hormonas mediante la regulación de la movilización de estos lípidos como la hormona de crecimiento, hormonas tiroideas u hormonas esteroideas.

La principal hormona asociada a la regulación del peso corporal y obesidad es la leptina [Stephens 1998], fundamentalmente secretada por los adipocitos e involucrada en la regulación del apetito [Marti 1999, Oswal 2010]. Pese a que inicialmente se consideraba que los adipocitos eran células cuya única misión era la acumulación de energía en forma de lípidos, su caracterización como importante órgano secretor ha cobrado relevancia los últimos años. Así este tejido produce sustancias implicadas en la regulación del peso corporal (leptina y adiponectina), en procesos inflamatorios o de respuesta del sistema inmune (factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina 1,

interleuquina 6), en funciones vasculares (angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), en el desarrollo de la resistencia insulínica (resistina) y en la función reproductora (estrógenos) [Moreno 2012].

Otra patología de origen endocrino relacionada con la obesidad es el hipotiroidismo. El hipotiroidismo se define como la disminución de los niveles de hormonas tiroideas en el plasma sanguíneo, que puede ser asintomática u ocasionar múltiples síntomas. Lo padece alrededor del 3% de la población y una de sus consecuencias es la disminución del gasto energético basal y el aumento de peso [Chen 2013].

### 1.3.3 Factores genéticos

Entre el 40 y el 70% de la variabilidad del peso corporal se ha atribuido a la herencia genética [Walley 2009], habiéndose descrito más de 600 regiones cromosómicas que pueden afectar a la regulación del peso corporal [Rankinen 2006]. Entre ellas, unos 20-30 genes han sido implicados de forma directa en la homeostasis energética, aunque este número está en aumento debido a la mejora de técnicas genómicas como los estudios de asociación de genoma completo o GWAS (Genome Wide Association Studies) [Lindgren 2008]. Estos estudios se basan en la relación de polimorfismos en determinados genes que pueden alterar la susceptibilidad al desarrollo de obesidad afectando la metabolización de los distintos nutrientes así como a la respuesta a la dieta, lo que es estudiado por la nutrigenética [Razquin 2011, Larsen 2012]. Así, el polimorfismo rs9939609 (A/T) del gen de la proteína asociada a masa grasa y obesidad (*FTO*) está asociado al apetito y la saciedad postprandial [den Hoed 2009], el rs2151916 (T/C) del gen transportador de ácidos grasos *CD36* se asocia a los niveles plasmáticos de HDL colesterol [Goyenechea 2008]. El rs17300539 (G/A) del gen adiponectina se asocia a la respuesta a una dieta hipocalórica [Goyenechea 2009] o variaciones en el gen del receptor de la melanocortina 4 (*MC4R*), como rs17782313 (T/T) que alteran la susceptibilidad al desarrollo de obesidad [Ochoa 2007, Xi 2013], entre otros ejemplos. Por otra parte, la ingesta de nutrientes también puede condicionar el perfil de expresión génica del organismo, campo que estudia la nutrigenómica [Bouchard 2012]. Por ejemplo, tras un tratamiento nutricional basado en una restricción calórica, aquellos

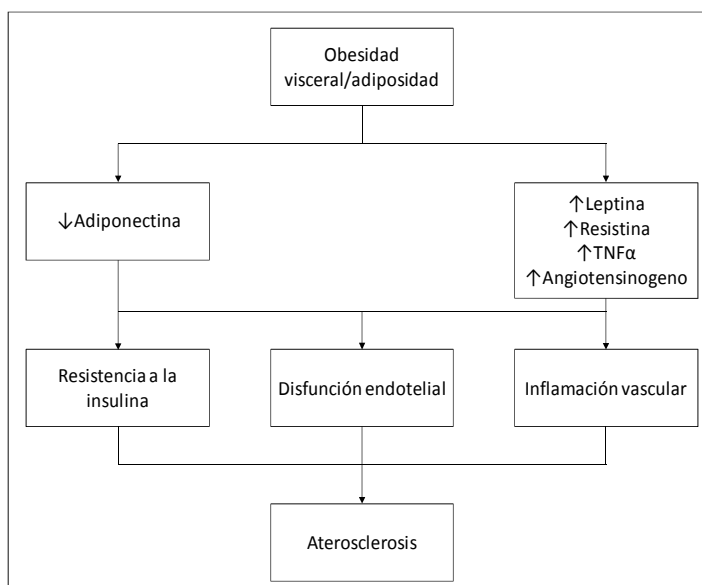
pacientes portadores del polimorfismo rs662799 T/C del gen *APO A5* presentaron mayor pérdida de peso [Aberle 2005]. Un aumento del consumo de fibra junto con una dieta hipocalórica, produce un incremento en la pérdida de peso en aquellos individuos portadores del polimorfismo rs1800588 C/T del gen *LIPC* [Santos 2006].

En este contexto, recientemente ha emergido la epigenética como una nueva herramienta en el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de obesidad [Campion 2009, Milagro 2012]. Esta nueva área de la ciencia se centra en el papel de las modificaciones covalentes que sin variar la disposición de los nucleótidos, afectan a la expresión de los genes [Junien 2007, Franks 2010]. Así, la interacción entre el ambiente, y más concretamente con la nutrición, puede influir y regular la expresión de los genes. Estos mecanismos junto con la regulación genética y la influencia de los SNPs puede determinar en gran medida la respuesta de un individuo a un patrón dietético o a una intervención nutricional.

#### **1.4 Comorbilidades asociadas a la obesidad**

La importancia clínica de la obesidad radica en sus comorbilidades tal y como se ha señalado previamente. Asimismo, la obesidad deja de ser un problema estético cuando adquiere un grado tal que aumenta la morbimortalidad y altera la calidad de vida de quien la padece [Black 2013]. La obesidad aumenta el riesgo de desórdenes metabólicos, producidos fundamentalmente por el acúmulo de tejido graso a nivel visceral y abdominal.

Los desórdenes clínicos asociados se generan como consecuencia primaria del aumento de la masa grasa, o bien de manera secundaria a la actividad secretora del tejido adiposo alterada en esta patología [Ntaios 2013]. Estas patologías derivadas de la adiposidad y la secreción de las distintas adipocinas derivan en desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina [Vidal-Puig 2010, Sanada 2012] y diabetes *mellitus* tipo 2, inflamación de bajo grado o disfunción endotelial (figura 3) y en último término, enfermedades cardiovasculares aterotrombóticas [Ntaios 2013].



**Figura 3:** Función de las adipocinas en la aterosclerosis y enfermedades asociadas a la obesidad abdominal. Modificado de Ntaios (2013).

Otras patologías relacionadas directamente con niveles de IMC clasificados como obesidad son:

- *Aparato digestivo:* Existe una relación evidente entre la obesidad y el reflujo gástroesofágico [Festi 2009]. Recientemente, un meta-análisis encontró que el sobrepeso y la obesidad estaban asociados con los síntomas de reflujo gastroesofágico, esofagitis erosiva, y adenocarcinoma de esófago [Hampel 2005], así como también con litiasis biliar [Petroni, 2000].
- *Aparato locomotor:* La obesidad se ha asociado con la osteoartritis y la artrosis, fundamentalmente, de rodilla [Gelber 1999; Coggon 2001], cadera y tobillos. Estas patologías se producen con mayor frecuencia en los obesos, principalmente por la sobrecarga que supone el incremento ponderal.
- *Aparato respiratorio:* En los obesos se encuentran disminuidas tanto la capacidad residual funcional como el volumen de reserva respiratoria. También los obesos tienden a ventilar exclusivamente los campos aéreos pulmonares superiores, lo que da lugar a una disminución en la concentración de oxígeno en la sangre. Otro problema que puede presentarse es la apnea del sueño (Vgontzas 1994; Ong 2012).

- *Cáncer*: Se ha asociado la obesidad con el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, como el de colon [Okabayashi 2012], cáncer de mama [Ballard-Barbash 1996] cáncer de páncreas e hígado o de vesícula biliar [Danaei 2005].
- *Diabetes mellitis tipo 2*: Los pacientes con obesidad mórbida desarrollan en un 23% de los casos resistencia a la insulina, que deriva en diabetes *mellitus* tipo 2 [Saydah 2004].
- *Enfermedad cardiovascular*: Las patologías cardiovasculares coexisten en los pacientes obesos en un 39% de los casos en varones y en un 25% en mujeres [Wang 2013]. El aumento de la carga cardíaca tiene como una de las causas la obesidad, ya que está asociada con un aumento de la demanda metabólica debida a la mayor cantidad de tejido adiposo. Esto produce un aumento de volumen de sangre, y por lo tanto, el aumento de precarga el sistema circulatorio y el corazón [Cote 2013]. Esta acumulación de grasa corporal, a nivel abdominal se ha asociado con el tejido adiposo epicárdico depositado alrededor del corazón entre el pericardio y la pared exterior del miocardio [Manco 2013] se propone ser un predictor de riesgo de ECV [de Jonge 2011].
- *Hipertensión*: El sobrepeso es un factor de riesgo determinante de la hipertensión arterial (HTA) [Nguyen 2012]. Según la *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), la prevalencia de hipertensión arterial (HTA) aumenta conforme se incrementa el IMC, de un 24% en aquellos con IMC <25,0 kg/m<sup>2</sup> a 54% para los que tienen IMC ≥35,0 kg/m<sup>2</sup> [Nguyen 2010].
- *Ictus*: La relación cintura-altura es un factor de riesgo modificable de obesidad que muestra con precisión el exceso de grasa corporal. Este índice, y por lo tanto, el porcentaje de grasa corporal se asocia con el aumento en la incidencia de ictus. Un estudio observacional llevado a cabo durante 12 meses, confirmó la asociación positiva entre el aumento de la circunferencia de la cintura y la incidencia del ictus isquémico agudo [Chiquete 2013].
- *Síndrome metabólico*: La compleja regulación del tejido adiposo, así como el acúmulo de factores de riesgo en el estilo de “vida obesogénico” explica este acúmulo de patologías en individuos con sobrepeso y obesidad; de ahí la importancia de estudiarlas en su conjunto. Esta coexistencia de comorbilidades de



la obesidad ha derivado a que en los últimos años, el síndrome metabólico (SM) ha causado un nuevo enfoque en la estratificación del riesgo vascular y ha pasado a ser uno de los conceptos más utilizados en el área de ciencias de la salud.

El SM describe la coexistencia en un individuo de varios trastornos muy prevalentes en el mundo occidental, que son factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes *mellitus* tipo 2 [de la Iglesia 2013]. Hay numerosas definiciones del SM. Los criterios más utilizados para el diagnóstico del SM son los establecidos por la *American Heart Association* (AHA) (tabla 2) en su última revisión del 2005 que engloban y completan los descritos en 2002 en la clasificación *Adult Treatment Panel III del National Cholesterol Education Program* estadounidense (ATP-III).

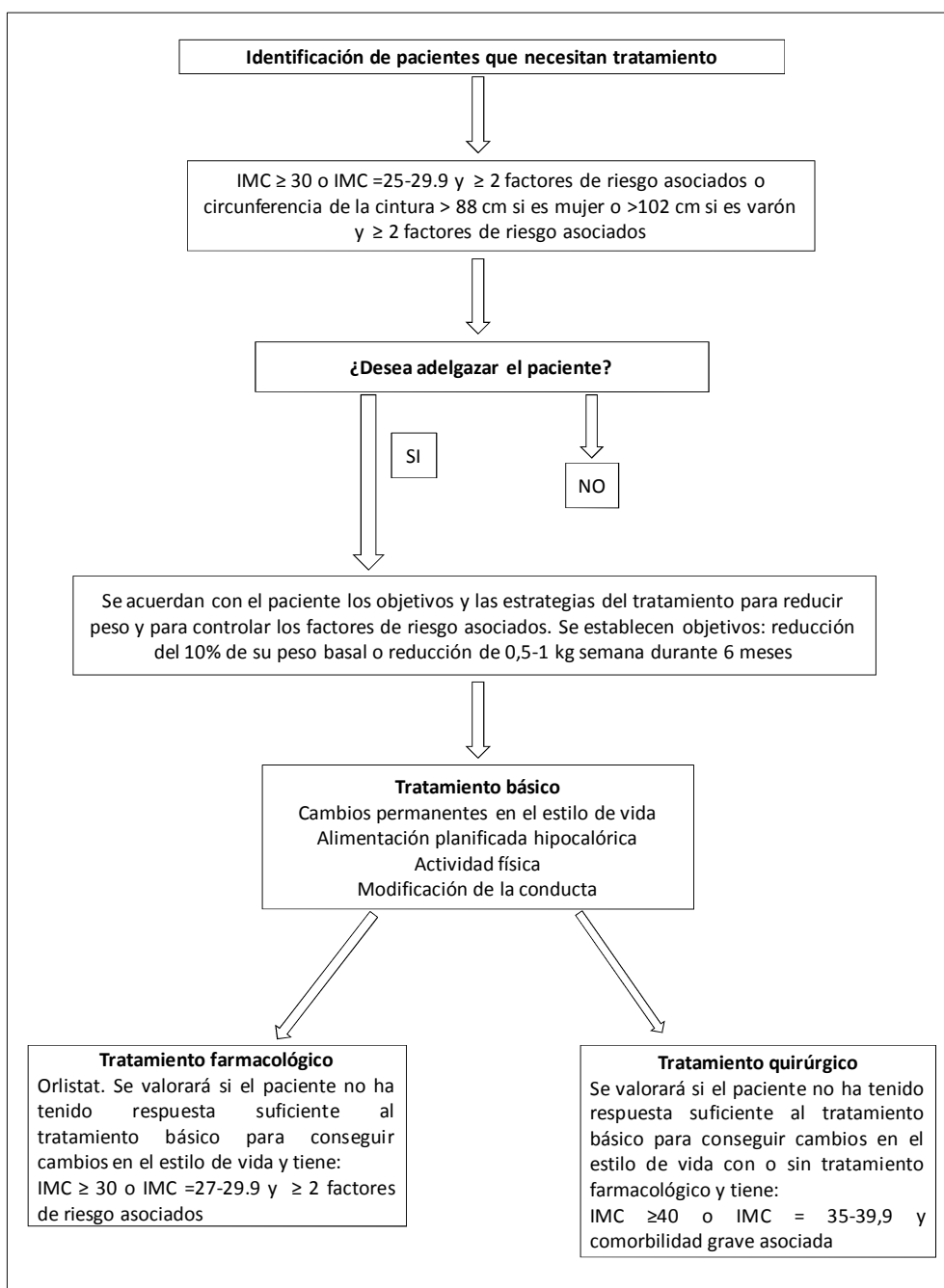
**Tabla 2.** Criterios diagnósticos del SM según la *American Heart Association* (AHA) 2005.

<b>Factor de riesgo (si se cumplen tres o más)</b>	<b>Valor diagnóstico</b>
Obesidad central o abdominal (medida por la circunferencia de la cintura)	
Hombres	> 102 cm
Mujeres	> 88 cm
Triglicéridos circulantes	>150 mg/dL (o tratamiento para la hipertrigliceridemia)
HDL colesterol	
Hombres	< 40 mg/dL (o tratamiento
Mujeres	< 50 mg/dL farmacológico)
Presión arterial	≥130/85 mmHg ( o tratamiento para la HTA)
Glucosa en ayunas	≥100 mg/dL (o tratamiento para hiperglucemia)

## 1.5 Tratamiento de la obesidad

Tradicionalmente, el tratamiento de la obesidad se ha centrado en tres pilares fundamentales; tratamiento dietético y modificación de hábitos de vida, tratamiento farmacológico y tratamiento quirúrgico. Varias sociedades han estandarizado los criterios para la elección de una estrategia u otra y la combinación de varias según las características personales de cada individuo. En la figura 4 se muestra el consenso de la

Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) [Arrizabalaga 2004] basada en las directrices del *National Institute of Health*.



**Figura 4.** Algoritmo para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en personas adultas. IMC: índice de masa corporal. Modificada del consenso de la Sociedad Española para el Estudio De la Obesidad (SEEDO) para el tratamiento de la obesidad, Arrizabalaga 2004.

- *Tratamiento dietético:* el tratamiento inicial en la pérdida de peso es la educación nutricional y los cambios permanentes en el estilo de vida a través de

tratamientos dietéticos planificados y personalizados, acompañados de ejercicio físico y unos hábitos de vida saludables. El objetivo principal es la reducción del 10% del peso corporal en una primera etapa, ya que esto conlleva una mejora en los factores de riesgo de las patologías asociadas al sobrepeso y la obesidad. Existen muchas estrategias dietéticas centradas en la distribución de macronutrientes o micronutrientes y la utilización de alimentos enriquecidos para el tratamiento de la obesidad [Abete 2010]. Sin embargo, el verdadero reto es encontrar el enfoque adecuado para mantener la pérdida de peso corporal y prevenir la subsecuente recaída, mientras que al mismo tiempo se reduzcan los síntomas de las comorbilidades y factores de riesgo asociados. Los tratamientos dietéticos clásicos utilizaban una reducción del 30% del Gasto Energético Total (GET) en el consumo calórico, con una distribución de macronutrientes del 55 al 60% de hidratos de carbono (HC), entre un 10 y un 15% de proteínas y menos del 30% del consumo total de energía en forma de lípidos. A pesar de que este tipo de dietas se ajustan a modelos dietéticos que de manera general se aceptan como equilibrados, existen evidencias de que un contenido moderadamente elevado de proteínas (alrededor del 30%), alta en grasas monoinsaturadas y omega-3, un porcentaje del 40% de HC de bajo índice glucémico y unas cantidades adecuadas de fibra, isoflavonas, calcio, minerales y antioxidantes aumentan la adhesión a hábitos saludables [Hermsdorff 2011, Clark 2012, Tang 2013].

- *Tratamiento farmacológico:* El tratamiento farmacológico en la obesidad es la opción tras el fracaso de otros tratamientos como la dieta y la actividad física, al no conseguirse una pérdida del peso superior al 10% [Gomi 2004]. El único fármaco actualmente autorizado para el tratamiento del exceso de peso corporal, es orlistat. Este fármaco es un inhibidor de las lipasas gastrointestinales que consigue bloquear la absorción del 30% de la grasa ingerida. Mejora la dislipemia y la tensión arterial, además de la diabetes mellitus, llegando a prevenir el desarrollo de esta patología en el 52% de los casos en los siguientes 4 años [Gomis 2004, Gray 2012, Mahmoud 2013]. Ayuda a reducir de manera modesta el peso corporal en pacientes con sobrepeso y obesidad cuando se combina con dietas hipocalóricas y actividad física [Hauptman 1992].

- *Tratamiento quirúrgico:* Como se observa en la figura 4, la cirugía bariátrica únicamente está indicada en casos de obesidad mórbida o premórbida con graves comorbilidades asociadas, y siempre que hayan fracasado las otras estrategias terapéuticas [NIH 1992]. Globalmente, la cirugía bariátrica tiene como objetivo corregir o controlar la patología asociada a la obesidad mórbida y mejorar la calidad de vida del paciente, a través de una pérdida de peso suficiente y mantenida en el tiempo y con un mínimo número de complicaciones [Rubio 2004, Clifton 2008, Lepor 2013]. A rasgos generales, las diferentes técnicas se pueden englobar en:

- *Técnicas restrictivas:* La banda gástrica ajustable es una técnica quirúrgica que consiste en la colocación de una anilla alrededor de la entrada del estómago. Esta anilla tiene un calibre ajustable cuyo objetivo es limitar la ingesta. Otro proceso similar es la gastrectomía vertical en la que se extrae aproximadamente el 80% del volumen del estómago con el objetivo de reducir la ingesta [Valentino 2011].

- *Técnicas malabsortivas:* Encontramos, por ejemplo, el cruce duodenal en el que se construye una gastrectomía vertical mediante la resección del aproximadamente el 80% del estómago y en segundo lugar se produce un cruce en el intestino delgado a la altura del duodeno para que se aproveche, aproximadamente, el 50% del mismo para la digestión y absorción de los alimentos. Otro ejemplo es la derivación biliopancreática. Esta técnica malabsortiva, consiste en reducir la capacidad del estómago a la mitad, y en un cruce en el intestino delgado; de manera que se utiliza sólo el 40% para la absorción y digestión de los alimentos. Esta cirugía se considera malabsortiva porque la principal causante de la pérdida de peso es el importante volumen de intestino delgado que se excluye del paso de los alimentos [Valentino 2011].

-*Técnicas mixtas:* El bypass gástrico consiste en un procedimiento quirúrgico que produce la pérdida de peso mediante dos mecanismos que coexisten en el paciente. En primer lugar se produce una reducción del volumen

estomacal y en segundo lugar se realiza un cruce en el intestino delgado en el que se absorben y digieren un 60% de los alimentos [Bretault 2013].

## **2. ICTUS**

### **2.1 Definición y criterios diagnósticos**

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) son el resultado de un trastorno circulatorio agudo a nivel de los vasos cerebrales que dan lugar a una alteración transitoria de las regiones del encéfalo que se ven afectadas por dicho trastorno [Ma 2013]. La enfermedad cerebrovascular (ECV) más relevante en cuanto a su prevalencia y a la incidencia en la sociedad es el ictus [Broderick 2013]. De una manera más específica, la OMS define el ictus como un conjunto de signos clínicos, de inicio brusco y desarrollo rápido, que suponen la presencia de una perturbación cerebral (global o focal) con más de 24 horas de duración y como una posible consecuencia de una lesión vascular subyacente [OMS 2004].

El ictus representa un reto sin resolver en los países desarrollados y en vías de desarrollo y tiene un gran impacto socio-económico. A pesar del gran esfuerzo realizado por las autoridades y los sistemas sanitarios para limitar la incidencia de accidente cerebrovascular y mejorar los resultados, las estrategias destinadas a proteger las neuronas dañadas, todas han fracasado [Alonso de Leciñana 2013]. Este fallo es probable que sea debido tanto a la heterogeneidad de la enfermedad y sus causas así como a la falta de comprensión de cómo los mecanismos sistémicos conducen a un evento cerebrovascular agudo o contribuyen al resultado [Tang 2006, Ahmad 2013]. Existen diversos tipos de ictus, según la naturaleza de la lesión producida en la isquemia cerebral y la hemorragia cerebral (Figura 5). Sin embargo, dada la gran heterogeneidad de las distintas enfermedades cerebrovasculares se utilizan multitud de términos para describir estas patologías [Crespi 2013].

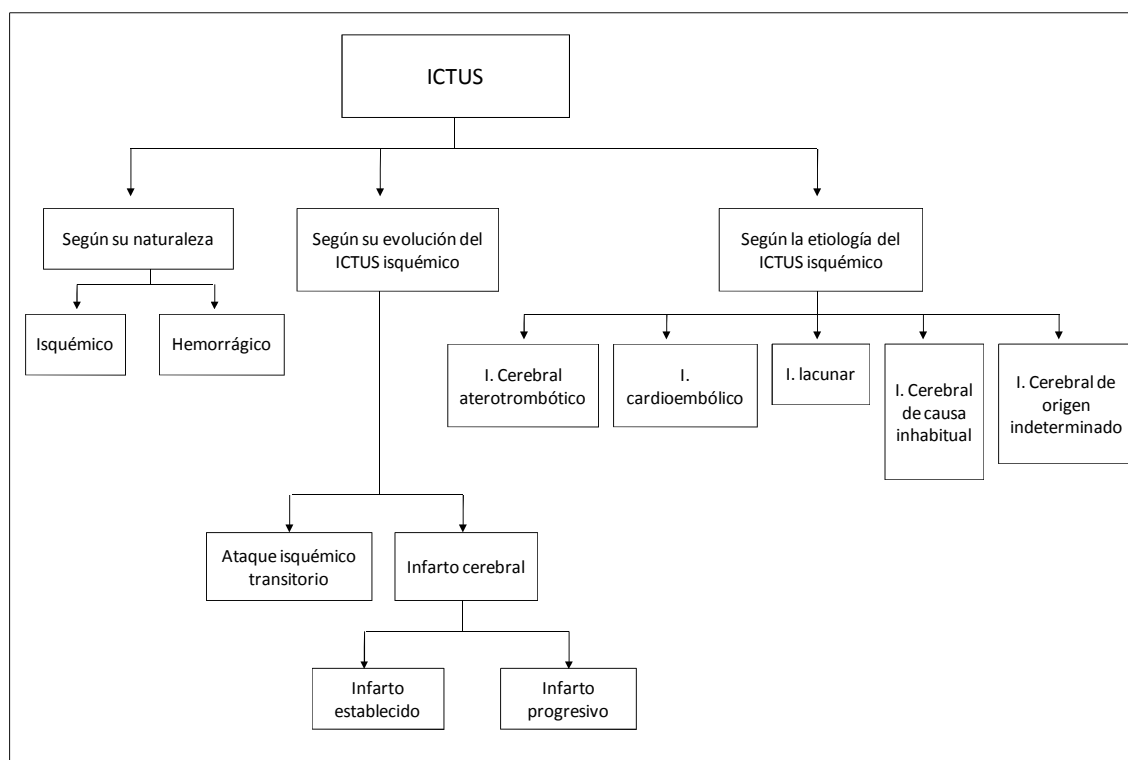


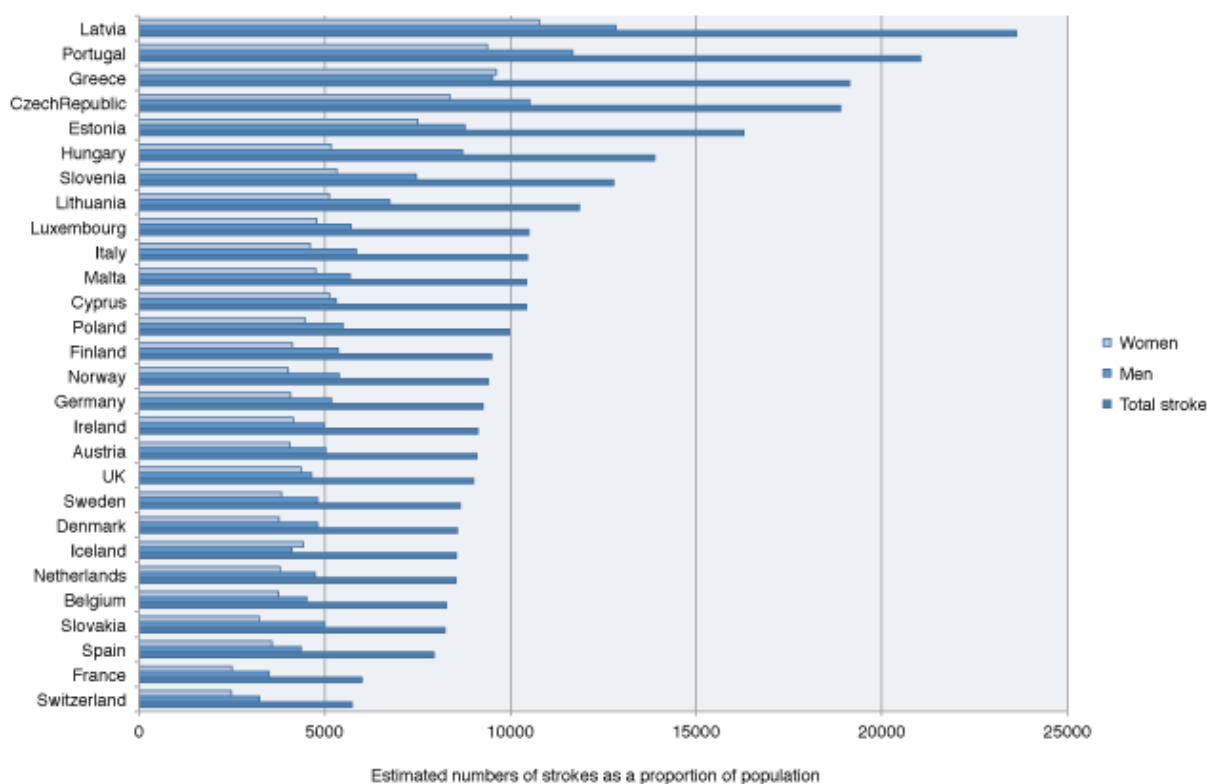
Figura 5. Clasificación del ictus. Modificado de Arboix 2006 [Arboix 2006].

## 2.2 Prevalencia

La incidencia de las enfermedades cerebrovasculares se incrementa con la edad. Por ello, aunque la mortalidad ha descendido considerablemente en los últimos años, el envejecimiento progresivo de la población determina que su incidencia y su carga social no sólo no disminuyan, sino que aumenten [Nickens 2013].

El ictus supone una de las primeras causas de muerte en el mundo y la primera causa de incapacidad y coste sanitario [Blanco 2012] (figura 6). La OMS publicó en el año 2004 que la mortalidad global producida por las enfermedades cerebrovasculares debidas al ictus ascendieron al 32% de la población (5,71 millones de muertes) [OMS 2005]. Datos publicados en el año 2013 mostraron que la prevalencia mundial del ictus es del 14% de los individuos mayores de 80 años [Go 2013, AHA 2013]. Se estima que esta cifra ascenderá a 6,3 millones para el 2015 y a 7,8 millones para el 2030 [Bonita

2007]. Estos datos son especialmente preocupantes en Europa, llegando a la cifra de 1,1 millones de personas afectadas por un ictus en el año 2000 (figura 6) [Truelsen 2006].



**Figura 6.** Prevalencia estimada en porcentaje de pacientes que han sufrido un ictus respecto a la población total en Europa [Truelsen 2006].

Según datos de la Sociedad Española de Neurología (SEN), la ECV aguda o ictus es la segunda causa de muerte global y la primera en la mujer en la población española [Díaz-Guzman 2008, Matías-Guiu 2007]. Se cuentan unos 150 casos por cada 100.000 habitantes y año y su prevalencia aproximada es de un a 8% en individuos mayores de 65 años [Díaz-Guzmán 2008]. Según los últimos datos de la AHA, el 87% de todos los tipos de ictus diagnosticados corresponden a ictus isquémicos, mientras que el 15-20% restante corresponde a ictus hemorrágicos [Vivancos 2003].

No solo es importante la incidencia y la prevalencia del ictus en el momento del accidente, sino que el mayor problema del ictus, tanto económica como socialmente, es la discapacidad que produce posteriormente [Schnitzler 2013]. A los 6 meses del ictus, el 26,1% de los pacientes han fallecido, el 32,4% tienen algún tipo de dependencia y el 41,5% son independientes, estimándose de forma global que entre los supervivientes

del ictus el 44% tienen una dependencia funcional [Duran 2004]. Según datos de la Encuesta sobre Discapacidades, Deficiencias y Estado de Salud [INE 1999], el 73% de los pacientes con ictus mayores de 65 años presentan una dependencia. De ellos, un tercio tiene dependencia moderada, el 50% dependencia grave, y el 16% dependencia muy grave. Los ancianos dependientes suponen el 17% del total de mayores.

### **2.3 Etiología**

Dentro de las causas de desarrollo de un accidente cerebrovascular, podemos encontrar una gran variedad de factores de riesgo. Los factores de riesgo, según su naturaleza, pueden ser clasificados como en toda patología en modificables o no modificables. En el caso de los factores de riesgo no modificables, los de mayor peso en el desarrollo del ictus son la edad (el riesgo de padecer un ictus crece de forma importante a partir de los 60 años) y el sexo [de Moraes 2013]. Los varones mayores de 45 años tienen un mayor riesgo de sufrir un ictus que las mujeres de la misma edad, ya que como toda enfermedad vascular, la fisiología propia de las mujeres en edad fértil lejos de ser un factor de riesgo es un factor protector [Soisson 2012 Haast 2012]. Otros factores no modificables que también predisponen a padecer un ictus son todos aquellos factores de origen genético, como la historia familiar de ictus, haber sufrido un ictus con anterioridad y la etnia [Jensen 2009, Markus 2012]. Existen varios estudios de GWAS en los que se han relacionado varios SNPs con el desarrollo o aumento del riesgo de sufrir un ictus. Así, se relacionaron dos SNPs en el cromosoma 2q23.3; rs2304556 en FMNL2 y rs1986743 en ARL6IP6 con el desarrollo temprano de un accidente cerebrovascular [Cheng 2011]. Otro polimorfismo, el rs4073259 A/A en el gen ALOX5P está asociado con un aumento de la incidencia del ictus isquémico [Yang 2013], al igual que el SNP rs5888 T/T del gen SCARB1 [Wu 2013].

Por otro lado, los factores de riesgo modificables que tienen una mayor influencia en la evolución del ictus son la HTA, tanto la sistólica, como la diastólica de manera independiente, como ambas [Dubow 2011, Floras 2013]. Otro grupo de factores de riesgo tienen relación con las enfermedades sufridas previamente. El haber sufrido o



sufrir enfermedades cardiovasculares como cardiopatías isquémicas, arteriosclerosis, fibrilación auricular o patologías como la diabetes, aumenta el riesgo de sufrir un ictus [Calvin 2009, Li 2013]. Finalmente, hábitos de vida, como el consumo excesivo de alcohol, el sedentarismo, el hábito tabáquico [Santanam 2012] o el uso de determinados fármacos, como los anticonceptivos orales aumentan el riesgo de sufrir un accidente cardiovascular y más concretamente un ictus [Vitale 2012]. En este sentido, la actividad física se ha relacionado con un descenso del riesgo de ictus, probablemente por el efecto beneficioso que tiene sobre la glucemia, presión arterial y perfil lipídico [Evenson 1999]. El tabaquismo está relacionado con la enfermedad vascular cerebral isquémica, multiplicando por dos el riesgo de ictus. También los fumadores pasivos tienen un 25% más de riesgo de ictus isquémico [Lee 2006].

Otro capítulo aparte merecen los procesos inflamatorios y su relación con los accidentes cerebrovasculares. Como se ha comentado anteriormente, la inflamación está relacionada tanto a nivel vascular con la acumulación del tejido adiposo [O'Rourke 2013], como a nivel sistémico con el desarrollo de obesidad [Labonte 2013]. Respecto al ictus, la inflamación se ha implicado en todas las formas de lesión cerebral y ahora está claro que los mecanismos inmunes influyen profundamente además de ser responsables en parte en el desarrollo y la posterior evolución de la isquemia cerebral [Tanaskovic 2011, Jin 2013]. Hasta hace muy poco, los mecanismos inflamatorios sistémicos, con respecto a las comorbilidades comunes en el accidente cerebrovascular, han sido ignorados en gran medida en los estudios experimentales. Sin embargo, actualmente, el comprender en profundidad las interacciones existentes entre el sistema inmune y la lesión cerebral se está utilizando en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos [Strong 2007]. Así, los datos recientes de la investigación clínica y experimental muestran claramente que las enfermedades inflamatorias sistémicas, tales como la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes, las infecciones, así como el estrés y la edad avanzada, están asociadas con respuestas inmunes patológicas que pueden contribuir profundamente a la inflamación y el ictus [Vogelgesang 2007].

## **2.4 Tratamiento**

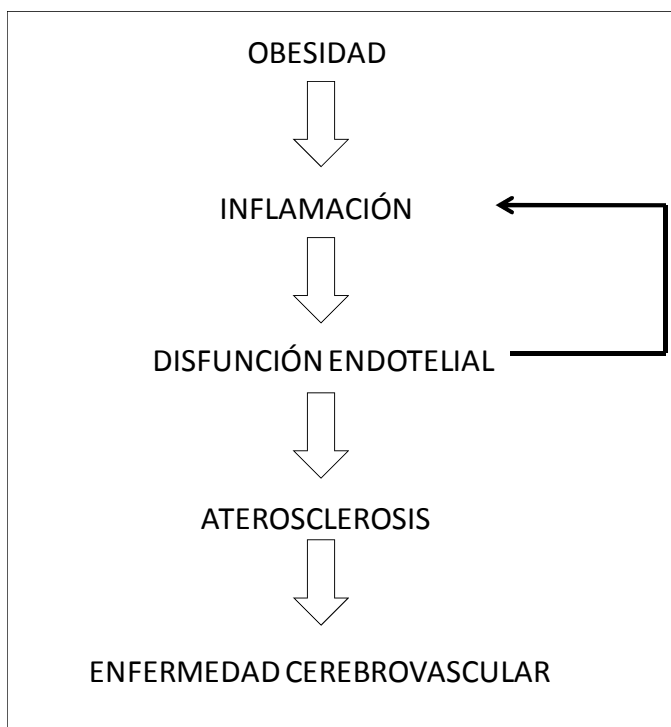
El principal tratamiento agudo del ictus dentro de las primeras horas tras el inicio de los síntomas es el recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) americana en el año 1996. Aumenta la recuperación de los síntomas producidos por la lesión cerebrovascular hasta un 50% [Bambauer 2006]. A pesar de la mejora de los pacientes, únicamente entre el 3 y el 8% de los pacientes reciben el tratamiento con rt-PA [Reeves 2005, Mendioroz 2010]. De ahí que se deban seguir buscando tratamientos agudos alternativos.

## **3. OBESIDAD E ICTUS**

A pesar de que la prevalencia de ECV, y más concretamente del ictus, no es exclusiva de individuos con sobrepeso, la obesidad o porcentajes de masa grasa superiores a los valores de normalidad, se relacionan con algunos de los principales factores de riesgo vascular, concretamente con la HTA, la diabetes y la dislipemia [Lloyd-Jones 2009, Blühe 2013]. Se estima que un 22% del total de las muertes por enfermedad cardiovascular y cerebrovascular en España son atribuibles al sobrepeso y la obesidad [Banegas 2003]. Por lo tanto, una disminución del IMC, y por consiguiente del porcentaje de grasa corporal, y la adhesión a un estilo de vida saludable y no obesogénico, conllevan una disminución en el riesgo de sufrir el primer ictus. Además tanto la obesidad general (medida por el IMC) como la obesidad abdominal (medida por el índice cintura-cadera) se han asociado, recientemente, de manera directa con un aumento del riesgo de ictus [Overvar 2013]. Un estudio de metaanálisis reciente, en el que se estudian más de 2.270.000 individuos, ha descrito, también, que el riesgo de sufrir un ictus isquémico es un 30% más elevado en los pacientes obesos que en los no obesos [Strazzullo 2013]. Como se ha indicado en el punto 1.3.1, la obesidad está causada en gran parte por un desequilibrio entre ingesta dietética y gasto energético.

Por lo tanto, mantener una dieta baja en calorías, grasas saturadas y grasas *trans* y colesterol ayudaría a controlar la obesidad y los niveles de colesterol en sangre, lo que también reducía el riesgo de accidente cerebrovascular [Franciosi 2009].

Finalmente varios estudios señalan la inflamación como uno de los puntos de unión entre la obesidad y las enfermedades cerebrovasculares. Se ha relacionado la inflamación producida en el tejido adiposo en pacientes obesos, con una disfunción endotelial, que a su vez se correlaciona con un incremento de las placas de ateroma, responsables de muchos de los casos de enfermedad cerebrovascular [Drake 2011, Cura 2013] (Figura 7).



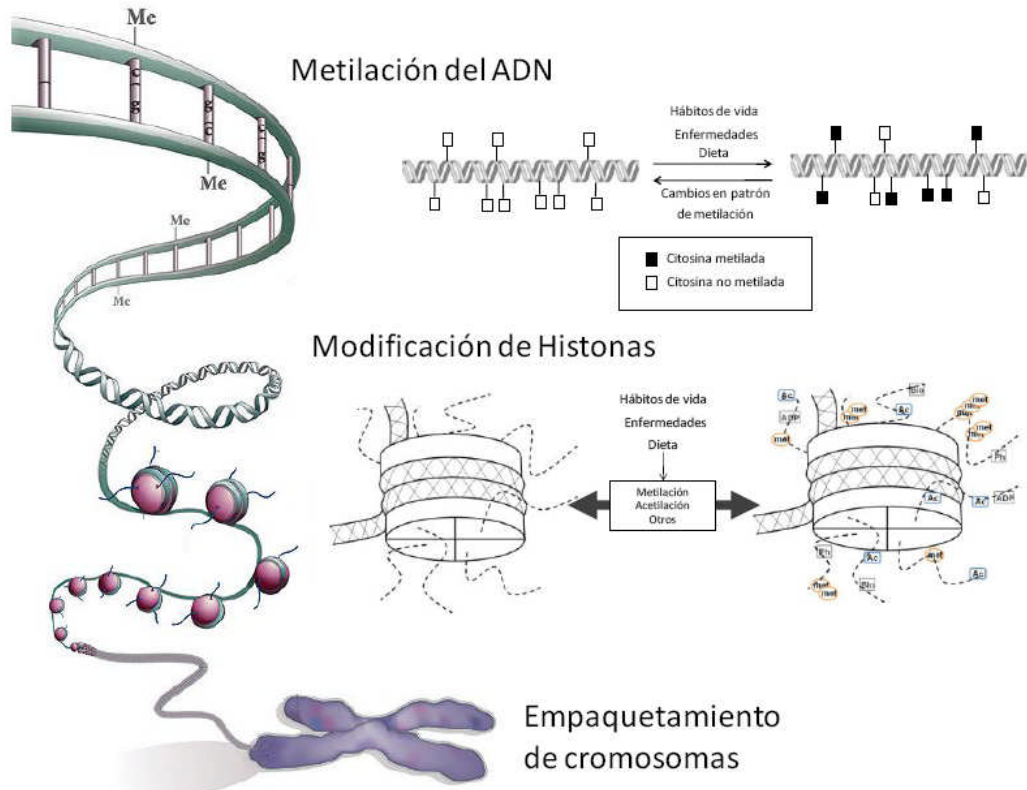
**Figura 7.** Relación entre obesidad y enfermedad cerebrovascular. Modificado de Cachofeiro 2006.

A parte de estas evidencias recientemente se ha descrito una nueva relación entre la obesidad y el ictus. La denominada “paradoja de la obesidad” [Andersen 2013a, Kim 2013]. Se denomina “paradoja de la obesidad” al descenso del riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular, con un IMC alto, aun cuando éste es un factor de riesgo para vasculopatía [Chiquete 2010]. Aunque la obesidad se asocia con un exceso de mortalidad y morbilidad, la mortalidad debida al ictus es menor en los obesos que en los

pacientes de peso normal. Algunos estudios [Andersen 2013b] indican que la obesidad no se asocia con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular recurrente en los años posteriores al primer accidente [Scherbakov 2011]. En este estudio, Andersen describió que la recurrencia en el ictus se asociaba con menores tasas de mortalidad en obesos en comparación con los pacientes de peso normal. A pesar de esto, se ha demostrado que sí aumenta la probabilidad de discapacidad grave después del ictus [Chiquete 2010]. A pesar de estos datos, y debido a que este fenómeno ha sido cuestionado, es arriesgado concluir que existe un efecto protector de la obesidad en la recuperación del ictus. Se necesitan más estudios en este sentido para discernir si es un artefacto o realmente una posible mecanismo compensatorio.

#### **4. EPIGENÉTICA**

La epigenética es un mecanismo de gran importancia en la regulación de la expresión génica. Este nuevo campo de investigación, como se ha descrito en el punto 1.3.3, se centra en el papel de las modificaciones covalentes que, sin variar la disposición de los nucleótidos, afectan a la expresión de los genes. Así, una secuencia de nucleótidos puede expresarse o no dependiendo de sus marcas epigenéticas [Fraga 2005]. Las principales modificaciones de control epigenético son la metilación de la cadena de ADN y los cambios en las colas terminales de las histonas (figura 8), principalmente metilaciones y acetilaciones [Dolinoy 2008, Campion 2010] Estas marcas epigenéticas no son permanentes a lo largo del tiempo. Así, diversos factores como la nutrición [Thaler 2009, Cordero 2010], el estrés oxidativo [Franco 2008], la hipoxia [Shahrzad 2007], el estrés [Paternain 2012] o la edad [Jiang 2008], entre otros, afectan a las modificaciones en el epigenoma, contribuyendo a su plasticidad a lo largo de la vida.



**Figura 8.** Principales modificaciones epigenéticas. Modificado de Yoo 2006 y Cordero 2010.

Además de los factores que pueden modificar el epigenoma, se ha detectado que la causa de muchos desórdenes patológicos se encuentra en un perfil epigenético anómalo, bien sea por errores en la metilación del DNA, bien por fallos en la organización de la cromatina. En cualquier caso, las modificaciones epigenéticas pueden producir cambios en el patrón de expresión génica, dando lugar a estados patológicos [Campion 2010]. Varios autores han descrito el papel esencial de estas modificaciones en patologías graves como el cáncer por ejemplo. También están involucrados en otras patologías como algunos desórdenes neurodegenerativos (enfermedad de Huntington) [Vashishtha 2013], autoinmunes (lupus eritematoso sistémico) [Strickland 2013] y del crecimiento (síndrome de Beckwith-Wiedemann) [Calvello 2013], o como se desarrollará posteriormente, la obesidad [Martin 2013, Crujeiras 2013] y el ictus isquémico [Baltan 2011, Schweizer 2013].

## 5. BIOMARCADORES

En los últimos años, la utilización de biomarcadores plasmáticos se ha extendido en la práctica clínica. En el año 2008, el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos definió el concepto de biomarcador como “una característica que se puede medir en forma objetiva y que permite evaluar un proceso biológico normal, un proceso patogénico o una respuesta farmacológica a intervenciones terapéuticas” [Strimbu 2011]. Pueden ser clasificados de acuerdo a diferentes parámetros [Vasan 2006], por ejemplo:

- Función: marcadores de efecto y de exposición
- Propiedades biológicas: proteínas, metabolitos, hormonas, citoquinas...
- Enfermedad de interés: de obesidad, de enfermedades cerebrovasculares, de diabetes...

Por lo tanto, un biomarcador puede reflejar diferentes conceptos. Por ejemplo, la proteína C-reactiva (PCR) puede ser clasificada como un marcador de la inflamación, un marcador de la obesidad, o un marcador de enfermedad cardiovascular. Además, la PCR puede ser utilizada como un marcador de la exposición (por ejemplo, la PCR como un factor de riesgo para ECV), pero también puede ser un marcador biológico de efectos (por ejemplo, midiendo el efecto del tratamiento con un fármaco).

Los biomarcadores deben cumplir una serie de características y ventajas en su utilización para que sean clínicamente útiles. El biomarcador ideal debe proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéutica adicional a la que se obtiene a partir de los datos clínicos del paciente y debe poseer, al menos, estas características químico-analíticas [Jensen 2009]:

- Alta especificidad: la medida de ese biomarcador debe ser específica a una enfermedad.
- Facilidad de muestreo: se debe evitar, en lo posible, la recogida de muestras invasivas. Por ejemplo, saliva mejor que orina y ésta mejor que sangre, ya que es menos molesto para el paciente.

- Representatividad: los niveles del biomarcador en la muestra recogida deben ser niveles representativos del biomarcador en el organismo.
- Se debe conocer tanto la cinética de formación como su estabilidad.

Es esencial la búsqueda de nuevos biomarcadores para completar la información sobre enfermedades, a parte de los ya conocidos [Guhathakurta 2013]. Para el caso de la obesidad, la identificación de biomarcadores puede realizarse a niveles como por ejemplo:

- Pronóstico temprano de la enfermedad.
- Pronóstico de comorbilidades asociadas al obeso establecido.
- Diagnóstico de la obesidad o de comorbilidades asociadas.
- Pronóstico de respuesta al tratamiento de la obesidad, sea este básico, farmacológico o quirúrgico.
- Recuperación del peso perdido tras una intervención.

Para el caso del ictus isquémico podríamos tener biomarcadores:

- Pronóstico del ictus
- Diagnóstico
- Evolución
- Pronóstico de recuperación del ictus
- Pronóstico de recurrencia.

La importancia de identificar y conocer los biomarcadores para reducir el impacto del ictus es esencial para elegir la terapia idónea y minimizar sus consecuencias cuando ocurre el accidente cerebrovascular [Rothstein 2013].

Los biomarcadores utilizados en los diferentes estadios del ictus están relacionados con los cambios moleculares que se producen tras la respuesta isquémica. Todas aquellas alteraciones producidas tras el accidente cerebrovascular deben ser observadas como biomarcadores potenciales [Hanson 2011]. Marcadores de la respuesta inflamatoria por ejemplo, como se desarrollará más adelante, además de ser considerados tradicionalmente como factores de riesgo están asociados con diferencias en signos clínicos y radiológicos entre pacientes que han sufrido un ictus. Además los

marcadores moleculares relacionados con la muerte neuronal pueden proporcionar información acerca del riesgo de infarto cerebral [Bang 2005, Rodriguez-Yanez 2011].

## 5.1 Celulares y bioquímicos

### 5.1.1 Biomarcadores celulares y bioquímicos en obesidad

A parte de los parámetros diagnósticos definidos en el punto 1, la obesidad presenta una serie de alteraciones asociadas que se traducen en cambios bioquímicos. Estos cambios bioquímicos se producen fundamentalmente por el aumento del tejido adiposo y los malos hábitos de vida que conducen a la obesidad.

Diversos estudios han indicado que existe una relación entre los adipocitos y las células del sistema inmune, tales como las células T y los macrófagos, que poseen características similares en cuanto a la producción de citoquinas proinflamatorias [Behan 2013]. La adiponectina es un potente inmunosupresor, mientras que la leptina activa los polimorfonucleares, ejerce actividad proliferativa y antiapoptótica sobre los linfocitos T, afecta a la síntesis de citoquinas, regula la activación de monocitos/macrófagos y contribuye a la curación de las heridas. La deficiencia genética de leptina se ha asociado además de con la obesidad, con un déficit en el sistema inmune, ya que se ha descrito un aumento en la mortalidad producida por infecciones. Estudios recientes en ratones genéticamente deficientes en leptina, mostró un aumento en infecciones bacterianas por *Listeria monocytogenes* y *Klebsiella pneumoniae* [Behan 2013].

Ahora se sabe que las adipoquinas contribuyen a la inflamación y la resistencia a la insulina que presenta el sujeto obeso. Estas adaptaciones, conjuntamente, con el estrés y el sedentarismo y una dieta desequilibrada contribuyen al deterioro del organismo y desencadenan inflamación en el tejido adiposo.

Como se ha comentado anteriormente, la leptina es el biomarcador proteico con función hormonal por excelencia. Es liberada por el tejido adiposo blanco [Masuzaki



1995], por lo que su secreción es directamente proporcional al porcentaje de masa grasa [Considine 1996]. Su principal función es la de regular el balance energético a nivel cerebral [Carter 2013].

Además de las citoquinas secretadas por el tejido adiposo, otros parámetros pueden ser utilizados como biomarcadores de la obesidad.

Por ejemplo, la resistencia a la insulina producida por el aumento del tejido adiposo, sobre todo a nivel abdominal, produce un aumento de la glucemia [Bouderba 2013] y por lo tanto un aumento de la secreción de insulina [Henderson 2013].

Por otro lado, el perfil lipídico generalmente se encuentra alterado en pacientes obesos, debido al aumento en la ingesta de alimentos con alto contenido en lípidos y otros patrones proobesogénicos como es el sedentarismo. Por lo tanto, en estos pacientes encontramos niveles de LDLc, y colesterol total por encima de los parámetros de normalidad (100 mg/dl y 200 mg/dl, respectivamente).

### 5.1.2 Biomarcadores celulares y bioquímicos en ictus

Dentro de estos biomarcadores podemos encontrar parámetros bioquímicos que sean útiles en el diagnóstico diferencial de la enfermedad, pudiendo descartar otras patologías que cursen con los mismos síntomas. Ésto es extremadamente útil para seleccionar de una manera temprana y más eficaz el mejor tratamiento para el paciente [Lloyd-Jones 2008]. En este sentido, encontramos biomarcadores como el LDL oxidado [Uno 2003], o el anticuerpo del receptor de *NMDA* (*NMDA-R-Ab*) [Dambinova 2012] que con un 92% de sensibilidad y un 96% de especificidad permiten la identificación de pacientes con ictus en las primeras horas del accidente cerebrovascular. Otros parámetros que son utilizados para este fin son parámetros como la proteína de unión al calcio de las células de la glia (S100B) [Lynch 2004], la glucoproteína de *von Willebrand* [Reynolds 2003] o la enzima MMP-9 [Sotgiu 2006] con un 90% de sensibilidad y especificidad en pacientes con ictus respecto a los pacientes con otras patologías neurológicas. Además de diferenciar entre ictus y otras patologías es importante diferenciar entre un ictus hemorrágico y un ictus isquémico. Biomarcadores

como el marcador de astrocitos GFAP presentan una especificidad del 98% en períodos menores a 6 horas desde el comienzo de los síntomas [Foerch 2012].

El accidente cerebrovascular agudo inicia una respuesta inflamatoria en el cerebro y la periferia, mientras que la respuesta a la infección también implica inflamación y una respuesta de fase aguda. Existe evidencia de que los accidentes cerebrovasculares contribuyen a la supresión del sistema inmune, que también pueden predisponer a infección cerebral [Chamorro 2006 y 2007, Braun 2007]. Hay varios biomarcadores candidatos que vale la pena explorar como factores de riesgo para la infección asociada a ictus. Las citoquinas proinflamatorias pueden ser los primeros biomarcadores para las complicaciones a nivel cerebral asociadas al ictus, así como tener acciones biológicas plausibles que predisponen hacia la infección. En este sentido, la respuesta inflamatoria tras el accidente cerebrovascular produce un aumento en el recuento de células T, así como un bajo porcentaje de linfocitos y granulocitos a las 24 horas posteriores al ictus, lo que puede predisponer a infección después de la isquemia cerebral [Vogelgesang 2008]. El valor predictivo de estos parámetros puede ser utilizado como biomarcador para obtener la identificar pacientes con alto riesgo de infección posterior al infarto cerebral [Franks 2010].

Los biomarcadores hormonales o proteicos en el ictus derivan de la respuesta inflamatoria producida por el accidente isquémico y la infección producida en la mayoría de los casos de ictus isquémico. La IL-1 $\beta$  tiene múltiples efectos sobre la expresión de genes de citoquinas y proteínas de fase aguda, así como sobre la inmunidad innata como adaptativa a través de la estimulación de linfocitos y una participación en el aclaramiento de las infecciones bacterianas [Miller 2007]. Estos nuevos biomarcadores se pueden usar en combinación con los parámetros más tradicionales, tales como la presión arterial y la edad, para producir un modelo sensible y predictivo para la infección asociada al ictus.

El aumento de el colesterol total y sobre todo del LDL, son unos de los principales factores de riesgo de las enfermedades cerebrovasculares [Henninger 2013], por lo tanto unos niveles de colesterol total por encima de 200 mg/dl, conllevarían un riesgo cerebrovascular asociado. Niveles de LDL por encima de la normalidad, aumentan el

flujo de transporte lipídico a nivel sanguíneo, aumentando la producción de placas de aterosclerosis y por lo tanto aumentando el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular [Lwow 2013].

Finalmente, un estudio reciente en el que se analizan muestras de 95 individuos de la cohorte PRIME, que habían sufrido un ictus isquémico, se han identificado como posibles biomarcadores, en este contexto de riesgo, la E-selectina y resistina [Prugger 2013].

### 5.1.3 Biomarcadores celulares y bioquímicos en obesidad e ictus

Como ya se ha expuesto anteriormente, el punto de unión entre la obesidad y el ictus es el proceso inflamatorio, ya sea causa o consecuencia de la obesidad o por estar presente antes, durante y después del episodio isquémico. La liberación de varias citoquinas en el tejido adiposo atrae a las células inmunes tales como linfocitos T y macrófagos proinflamatorios. La infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo visceral, se incrementa tanto en obesos como en sujetos con lipodistrofia [Sevastianova 2008]. Los macrófagos también experimentan un cambio en su activación. Este es el caso de IL-10 que producen macrófagos anti-inflamatorios M2 y se sustituyen por macrófagos M1 proinflamatorios [Chatterjee 2013]. Esta infiltración de macrófagos es precedida por la infiltración de linfocitos T proinflamatorios y mastocitos, y la disminución de linfocitos T anti-inflamatorios. Esta infiltración de células inmunes también contribuye a la producción de citoquinas proinflamatorias, que conduce a un círculo vicioso. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria tanto en el ictus como en la obesidad, se puede medir por el número de linfocitos T en una fase temprana y por macrófagos M1 y M2 en fases más tardías en el caso de no ser posible la medida directa de IL 10 [Carter 2013].

La IL-6 es un importante mediador de fase aguda que se eleva durante la infección post ictus [Smith 2006], además de encontrarse elevada en situación de obesidad [Cesari 2005, Kuo 2011, Moleris 2012] y en el accidente cerebrovascular agudo. Los niveles más elevados de IL-6 se asocian con un aumento de la mortalidad post-ictus [Balding 2004, Smith 2006, Whiteley 2012]. TNF- $\alpha$  es también un buen biomarcador

candidato. Cada vez existen más pruebas de que la inflamación puede suprimir la inmunidad celular innata y adaptativa en el ictus mediada a través de TNF- $\alpha$  [Haeusler 2008, Urra 2009], lo que sugiere que un estado proinflamatorio puede aumentar el riesgo de la infección post ictus, además de inducir la activación del endotelio [Smith 2002] y finalmente se asocia con un mal pronóstico por un deterioro neurológico precoz. Como también ocurre en la obesidad y a causa de la inflamación de bajo grado que se desencadena en esta patología, el TNF- $\alpha$  se encuentra elevado y es un biomarcador óptimo en situación de obesidad [Pamir 2009, Rose 2013]. Además de TNF- $\alpha$ , IL-6, la resistina, la leptina y la adiponectina [Montaner 2004] con influencia sobre la sensibilidad a la insulina así como el angiotensinógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) tienen efecto sobre la vascularización. Los efectos celulares y moleculares de la proteína C reactiva (PCR) sobre el sistema cardiovascular y el cerebro son similares a los de ejercicio físico regular, lo que sugiere mecanismos compartidos [de Paula 2011]. Similar es el caso del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Niveles disminuidos de este factor de crecimiento están relacionados con un aumento en la prevalencia de obesidad e ictus [Mattson 2005, Pikula 2013].

## 5.2 Genéticos

Gracias a la tecnología *microarray* aplicada a estudios tipo GWAS, cada vez se van describiendo más polimorfismos que pueden estar involucrados en el desarrollo de las diferentes enfermedades, incluyendo la obesidad y el ictus.

### 5.2.1 Biomarcadores genéticos en obesidad

Hasta el momento se considera que la obesidad debida a causas monogénicas no supera el 5% del total de casos [Cole 2010]. En éstos está bien establecido que diversas mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en la regulación del apetito son responsables de alteraciones patológicas cuyo fenotipo más evidente es la obesidad. A día de hoy, como se muestra en la tabla 3, se han asociado varios genes con la obesidad monogénica [Lenard 2010, Murphy 2013].

**Tabla 3.** Genes causantes de la obesidad de origen monogénico. De Ochoa 2007.

Gen	Nombre del gen	Región cromosómica
CRHR1	Receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina	17q12-q22
CRHR2	Receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina	7p14.3
GPR24	Receptor 24 acoplado a proteína C4	22q13.2
LEP	Leptina	7q31.3
LEPR	Receptor de leptina	11p31
MC3R	Receptor 3 de melanocortina	20q13.2-q13.3
MC4R	Receptor 4 de melanocortina	18q22
NTRK2	Receptor neurotrófico de tirosinquinasa tipo 2	19q22.1
PCSK1	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 1	5q15-q21
POMC	Proopiomelanocortina	2p23.3
SIM1	Homólogo 1 de la mente simple de <i>Drosophila</i>	6q16.3-q21

Pero el 95% restante de casos de obesidad se cree que están mediados por una combinación de variantes poligénicas. Numerosos estudios han analizado la asociación de diferentes variantes genéticas y distintos fenotipos asociados con obesidad mediante meta-análisis [Marti 2006, Jalba 2008, Wang 2010, Yu 2012]. En este sentido existen varios polimorfismos que presentan más evidencia y que, por lo tanto, tienen mayor importancia a la hora de ser utilizados como biomarcadores: *FTO* en rs9939609 (A); rs3751812 (T) [Kalnina 2013], *UCP2* en el polimorfismo rs659366 (T) [Andersen 2012], la leptina [Dougkas 2013], el receptor de la leptina en rs1137101 (G) [Wheeler 2013] o el *MC4R* en rs17782313 (C); rs10871777 (G); rs2229616 (A); rs12970134 (A) [Razquin 2011, San-Cristobal 2013].

### 5.2.2 Biomarcadores genéticos en ictus

La utilización de las variantes genéticas asociadas al ictus como biomarcadores, siguen patrones similares que en el caso de la obesidad. Se han identificado muchos genes de susceptibilidad asociados con accidente cerebrovascular isquémico. Sin embargo, estos genes de susceptibilidad explican sólo una pequeña fracción del riesgo

heredado del accidente cerebrovascular isquémico, y el resto eran atribuibles a las covariables tales como lípidos, la diabetes, la presión arterial, y el tabaquismo [Bersano 2008, Alvarez-Madrado 2013]. En el año 2007, se publicó el primer estudio GWAS en ictus isquémico que se realizó analizando aproximadamente 400.000 SNPs en una cohorte de 249 pacientes y 268 controles [Matarín 2007]. Este primer estudio, abre una nueva vía de estudio, en el que un mejor conocimiento de los antecedentes genéticos y genes de susceptibilidad, probablemente, ayudaría a centrarnos en el diagnóstico y el tratamiento precoz y mejorar los resultados del ictus isquémico en los pacientes afectados.

La expresión de algunos genes varía como consecuencia del ictus. Así, un estudio de la expresión de *IL-1 $\beta$*  en células periféricas mononucleares mostró un incremento en la fase aguda del ictus, con posterior normalización, correlacionándose con el grado de la afectación neurológica [Kostulas 1999]. También el factor de crecimiento tisular1 beta (*TGF- $\beta$ 1*) y su mRNA han sido detectados en tejido cerebral tras el ictus, especialmente en los márgenes del infarto [Krupinski 1996]. También se ha encontrado que sobreexpresión de caspasa 3 tras la isquemia cerebral se asocia con una mayor extensión de la lesión cerebral [Rami 2003]. La expresión de estos genes, cuyos cambios se producen tras el accidente cerebral y que determina la severidad del daño, pueden ser utilizados como biomarcadores agudos de diagnóstico y de adecuación del tratamiento.

Un gen muy importante a la hora de ser utilizado como biomarcador es CD40, es una glicoproteína de superficie celular transmembrana del receptor de *TNF- $\alpha$*  (TNFR), que se expresa en la superficie de células inmunes, incluyendo células B, monocitos y células dendríticas, así como las células no inmunes tales como endotelial células, células epiteliales, células mesenquimatosas, plaquetas y células tumorales malignas [Chen 2006]. CD40 se encuentra determina las respuestas de células T a la presentación de antígenos y las células B de cambio de isotipo de inmunoglobulina. Algunos estudios han demostrado que CD40/CD40 ligando (CD40L) se encuentra elevado en los monocitos o en el suero de los pacientes después de un ataque isquémico transitorio o accidente cerebrovascular, y que participan en la fisiopatología del accidente cerebrovascular isquémico que estaba relacionado con la respuesta inflamatoria,

componentes trombogénicos y el medio proaterogénico [Garlichs 2003, Grau 2003, Ishikawa 2005]. Existen alrededor de 45 SNPs en el gen CD40 descritos [Tian 2010]. Sin embargo, sólo un SNP conocido afectó los niveles de proteína CD40, CD40 - 1C / T, rs1883832 [Tomer 2002, Jacobson 2005]. Además del polimorfismo CD40 - 1C / T que asocia con el síndrome coronario agudo, se identificó calcificación de la arteria coronaria [Burdon 2006, Tian 2010], que podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de accidente cerebrovascular isquémico.

### *5.2.3 Biomarcadores genéticos en obesidad e ictus*

Por el momento, no se han descrito polimorfismos que aumenten la predisposición a sufrir ictus y obesidad de manera conjunta. Sin embargo, existen multitud de biomarcadores bioquímicos y celulares que podrían ser utilizados tanto en obesidad como en ictus dada la similitud en la respuesta de ambas patologías. BDNF por ejemplo, tiene un papel esencial en la regulación del apetito a nivel cerebral y en la plasticidad del sistema nervioso central. Se han descrito mutaciones relacionadas con ambas patologías a lo largo de dicho gen. Así, el SNP rs6265 se asocia con una mayor incidencia de obesidad [Ma 2012]. Mientras que el polimorfismo val66met se relaciona con un peor pronóstico de recuperación tras el accidente cerebral [Kim 2012].

## **5.3 Epigenéticos**

Como se ha expuesto tanto en el punto 1.3.3 como en el punto 4 del presente trabajo, la epigenética se expone como una nueva herramienta para el estudio de diferentes patologías. Los cambios epigenéticos, producidos en el DNA, pueden ser usados como biomarcadores de riesgo, diagnóstico o prognosis.

### *5.3.1 Biomarcadores epigenéticos en obesidad*

Recientemente, se ha descrito la asociación de los niveles de metilación específicos en los promotores de los genes reguladores del apetito *NPY* y *POMC*, en los leucocitos con éxito en el mantenimiento de peso de los hombres obesos después de un programa

de pérdida de peso de dieta lo que demuestra su posible uso como biomarcador predictor de respuesta a un tratamiento dietético [Crujeiras 2013]. En esta misma línea, niveles de metilación de los genes leptina, *TNF- $\alpha$* , acuaporina 9 o *CD44* pueden ser usados como biomarcadores predictores de respuesta a la dieta [Cordero 2010, Moleres 2013], así como genes relacionados con patologías que cursan con obesidad, como *WT1* [Milagro 2011].

Otros estudios relacionan los niveles de metilación de genes como *CETP* o *LPL* con niveles elevados sanguíneos de lípidos, asociando los niveles de metilación con biomarcadores de dislipemias relacionadas con la obesidad como el colesterol LDL o el HDL [Guay 2013]. El síndrome metabólico, en el que se aúnan obesidad y factores de riesgo cardiovascular y resistencia a la insulina, se ha asociado a niveles diferenciales en la metilación del gen *FABP3* entre pacientes con y sin SM [Zhang 2013].

### *5.3.2 Biomarcadores epigenéticos en ictus*

Pocos estudios han observado hasta ahora la relación entre epigenética e ictus. Un estudio en población china, reveló la relación entre el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y el porcentaje de metilación total del ADN. En relación con el ictus, estos niveles de metilación eran mayores en pacientes que habían sufrido un ictus isquémico [Kim 2010]. Otro estudio del mismo grupo y en la misma cohorte, demostró que los niveles de metilación en el promotor del gen *BDNF* se relacionaban con una mejora en la movilidad y otros parámetros relacionados con una mejor evolución después del ictus isquémico [Kim 2012], lo que puede usarse como biomarcador pronóstico de recuperación.

### *5.3.3 Biomarcadores epigenéticos en obesidad e ictus*

Hasta el momento, no se han descrito biomarcadores epigenéticos que relacionen la obesidad y el ictus. Por lo tanto, se abre un nuevo campo de trabajo estudio dedicado a determinar la influencia del ictus isquémico en el patrón epigenético de genes involucrados en enfermedades cerebrovasculares y la obesidad así como determinar si



algunas variaciones epigenéticas encontradas en pacientes obesos pueden estar relacionadas con el riesgo a sufrir ictus o, más especialmente, con la gravedad del episodio isquémico y su evolución posterior.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

### **A**

Aberle J, Evans D, Beil FU, Seedorf U. A polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with weight loss after short-term diet. *Clin Genet* 2005;68: 152-154.

Ahmad Y, Lip GY, Lane DA. Recent developments in understanding epidemiology and risk determinants of atrial fibrillation as a cause of stroke. *Can J Cardiol* 2013;29: S4-S13.

Aller EE, Abete I, Astrup A, Martinez JA, van Baak MA. Starches, sugars and obesity. *Nutrients* 2011 ;3:341-369.

Alonso de Lecinana M, Gutierrez-Fernandez M, Romano M, Cantu-Brito C, Arauz A, Olmos L, et al. Strategies to improve recovery in acute ischemic stroke patients: Iberoamerican Stroke Group Consensus. *Int J Stroke* 2013; 27.

Alvarez-Madrado S, Mackenzie SM, Davies E, Fraser R, Lee WK, Brown M, et al. Common polymorphisms in the CYP11B1 and CYP11B2 genes: evidence for a digenic influence on hypertension. *Hypertension* 2013; 61: 232-239.

American Heart Association (AHA). Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome 2013; Available at: [http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/More/MetabolicSyndrome/Prevention-and-Treatment-of-Metabolic-Syndrome\\_UCM\\_301927\\_Article.jsp](http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/More/MetabolicSyndrome/Prevention-and-Treatment-of-Metabolic-Syndrome_UCM_301927_Article.jsp). Accessed October, 2013.

Andersen G, Dalgaard LT, Justesen JM, Anthonsen S, Nielsen T, Thorner LW, et al. The frequent UCP2 -866G>A polymorphism protects against insulin resistance and is associated with obesity: a study of obesity and related metabolic traits among 17 636 Danes. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37: 175-181.

Anderson LH, Martinson BC, Crain AL, Pronk NP, Whitebird RR, O'Connor PJ, et al. Health care charges associated with physical inactivity, overweight, and obesity. *Prev Chronic Dis* 2005; 2: A09.

Aranceta J, Pérez-Rodrigo C, Serra-Majem L, Bellido D, de la Torre ML, Formiguera X, Moreno B. Prevention of overweight and obesity: a Spanish approach. *Public Health Nutr* 2007; 10: 1187-1193.

Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez Sabin J. ICTUS: TIPOS ETIOLÓGICOS Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS. In: Díez-Tejedor E, editor. *Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus*. 1ª ed. 2006: PROUSSCIENCE 2006. p. 1-23.

Arrizabalaga JJ, Masmiquel J, Vidal J, Calañas-Continente A, Díaz-Fernández MJ, García-Luna PP, Monereo S, Moreira J, Moreno B, Ricart W, Cordido F. Recomendaciones y algoritmo de tratamiento del sobrepeso y la obesidad en personas adultas. *Med Clín (Barc)* 2004; 122: 104-110.

## **B**

Balding J, Livingstone WJ, Pittock SJ, Mynett-Johnson L, Ahern T, Hodgson A, et al. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension. *Ir J Med Sci* 2004; 173: 200-203.

Ballard-Barbash R, Swanson CA. Body weight: estimation of risk for breast and endometrial cancers. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 437S-415.

Baltan S, Bachleda A, Morrison RS, Murphy SP. Expression of Histone Deacetylases in Cellular Compartments of the Mouse Brain and the Effects of Ischemia. *Transl Stroke Res* 2011 4; 2: 411-423.

Bambauer KZ, Johnston SC, Bambauer DE, Zivin JA. Reasons why few patients with acute stroke receive tissue plasminogen activator. *Arch Neurol* 2006; 63: 661-664.

Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Graciani A, Villar F, Herruzo R. Mortality attributable to cardiovascular risk factors in Spain. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: S18-21.

Bang OY, Lee PH, Yoon SR, Lee MA, Joo IS, Huh K. Inflammatory markers, rather than conventional risk factors, are different between carotid and MCA atherosclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1128–1134

Behan AL, Hauptman JG, Robinson NE. Telemetric analysis of breathing pattern variability in recurrent airway obstruction (heaves)-affected horses. *Am J Vet Res* 2013; 74: 925-933.

Behan AT, Breen B, Hogg M, Woods I, Coughlan K, Mitchem M, et al. Acidotoxicity and acid-sensing ion channels contribute to motoneuron degeneration. *Cell Death Differ* 2013; 20: 589-598.

Behan FC, Rozen WM, Wilson J, Kapila S, Sizeland A, Findlay MW. The cervico-submental keystone island flap for locoregional head and neck reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2013; 66: 23-28.

Behan JL, Cruickshank YE, Matthews-Smith G, Bruce M, Smith KD. The Glycosylation of AGP and Its Associations with the Binding to Methadone. *Biomed Res Int* 2013;2013:108902. doi: 10.1155/2013/108902

Behan JW, Ehsanipour EA, Sheng X, Pramanik R, Wang X, Hsieh YT, et al. Activation of adipose tissue macrophages in obese mice does not require lymphocytes. *Obesity* 2013; 21: 1380-1388.

Behan KJ, Dumas M, Johnston M. Sedimentation by gravity stabilizes plasma glucose for up to 60 minutes. *Clin Lab Sci* 2013; 26: 158-161.

Behan LA, O'Sullivan EP, Glynn N, Woods C, Crowley RK, Tun TK, et al. Serum prolactin concentration at presentation of non-functioning pituitary macroadenomas. *J Endocrinol Invest* 2013; 36: 508-514.

Bersano A, Ballabio E, Bresolin N, Candelise L. Genetic polymorphisms for the study of multifactorial stroke. *Hum Mutat* 2008; 29: 776-795.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.

Bjorntorp P. Neuroendocrine factors in obesity. *J Endocrinol* 1997; 155: 193-195.

Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* 2013; 382: 427-451.

Blanco M, Campos F, Rodriguez-Yanez M, Arias S, Fernandez-Ferro J, Gomez-Sanchez JC, et al. Neuroprotection or increased brain damage mediated by temperature in stroke is time dependent. *PLoS One* 2012; 7: e30700. doi: 10.1371/journal.pone.0030700.

Bogousslavsky J, Paciaroni M, Gallai V. Acute stroke treatment: thrombolysis. *Cerebrovasc Dis* 2000; 10: 14-16.

Bonita R, Beaglehole R. Stroke prevention in poor countries: time for action. *Stroke* 2007; 38: 2871-2872.

Bouchard C, Ordovas J. Preface. Advances in nutrigenetics and nutrigenomics. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 108: xv-0-12-398397-8.00025-3. doi: 10.1016/B978-0-12-398397-8.00025-3

Braun KP, Rafay MF, Uiterwaal CS, Pontigon AM, DeVeber G. Mode of onset predicts etiological diagnosis of arterial ischemic stroke in children. *Stroke* 2007; 38: 298-302.

Bretault M, Boillot A, Muzard L, Poitou C, Oppert JM, Barsamian C, et al. Clinical review: Bariatric surgery following treatment for craniopharyngioma: a systematic review and individual-level data meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2239-2246.

Burdon KP, Langefeld CD, Beck SR, Wagenknecht LE, Carr JJ, Rich SS, et al. Variants of the CD40 gene but not of the CD40L gene are associated with coronary artery calcification in the Diabetes Heart Study (DHS). *Am Heart J* 2006; 151: 706-711.

## C

Calvello M, Tabano S, Colapietro P, Maitz S, Pansa A, Augello C, et al. Quantitative DNA methylation analysis improves epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Epigenetics* 2013; 8: 1053-1060.

Calvin AD, Somers VK. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 2009; 24: 516-520.

Campion J, Milagro F, Martinez JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 94: 291-347.

Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Martinez JA. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity* 2009; 17: 1293-1297.

Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009; 10: 383-392.

Carrick D, Behan M, Foo F, Christie J, Hillis WS, Norrie J, et al. Usefulness of fractional flow reserve to improve diagnostic efficiency in patients with non-ST elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2013; 111: 45-50.

Carter CR, Aravind G, Smalle NL, Cole JY, Savic S, Wood PM. CVID patients with autoimmunity have elevated T cell expression of granzyme B and HLA-DR and reduced levels of Treg cells. *J Clin Pathol* 2013; 66: 146-150.

Carter S, Caron A, Richard D, Picard F. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin Interv Aging* 2013; 8: 829-844.

Cesari M, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Penninx BW, Holvoet P, Koh-Banerjee P, et al. Lipoprotein peroxidation and mobility limitation: results from the Health, Aging, and Body Composition Study. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2148-2154.

Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Torres F, et al. Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 1279-1281.

Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke* 2007; 38: 1097-1103.

Chatterjee P, Seal S, Mukherjee S, Kundu R, Mukherjee S, Ray S, et al. Adipocyte fetuin-A contributes to macrophage migration into adipose tissue and their polarization. *J Biol Chem* 2013; 288: 28324-28330.

Chen CY, Lee KT, Lee CT, Lai WT, Huang YB. Epidemiology and clinical characteristics of congenital hypothyroidism in an Asian population: a nationwide population-based study. *J Epidemiol* 2013; 23: 85-94.

Chen K, Huang J, Gong W, Zhang L, Yu P, Wang JM. CD40/CD40L dyad in the inflammatory and immune responses in the central nervous system. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 163-169.

Cheng YC, O'Connell JR, Cole JW, Stine OC, Dueker N, McArdle PF, et al. Genome-wide association analysis of ischemic stroke in young adults. *G3 (Bethesda)* 2011; 1: 505-514.

Chiquete E, Ruiz-Sandoval JL, Murillo-Bonilla L, Leon-Jimenez C, Ruiz-Madrigal B, Martinez-Lopez E, et al. Central adiposity and mortality after first-ever acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2013; 70: 117-123.

Cho CE, Sánchez-Hernández D, Reza-López SA, Huot PS, Kim YI, Anderson GH. Obesogenic phenotype of offspring of dams fed a high multivitamin diet is prevented by a post-weaning high multivitamin or high folate diet. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37: 1177-1182.

Cioffi F, Lanni A, Goglia F. Thyroid hormones, mitochondrial bioenergetics and lipid handling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 402-407.

Clark J, Craig L, McNeill G, Smith N, Norrie J, Devereux G. A Novel Dietary Intervention to Optimize Vitamin E Intake of Pregnant Women to 15 mg/Day. *J Am Diet Assoc* 2012; 112: 297-301.

Clifton PM. Dietary treatment for obesity. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 672-681.

Coggon D, Reading I, Croft P, McLaren M, Barrett D, Cooper C. Knee osteoarthritis and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 622-627.

Colditz GA. Economic costs of obesity and inactivity. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: S663-S667.

Colosia AD, Palencia R, Khan S. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2013; 6: 327-338.

Considine RV, Caro JF. Leptin in humans: current progress and future directions. *Clin Chem* 1996; 42: 843-844.

Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 463-470.

Cordero P, Gomez-Uriz AM, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the fatty acid synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet. *Genes Nutr* 2013; 8: 105-113.

Cote AT, Harris KC, Panagiotopoulos C, Sandor GG, Devlin AM. Childhood Obesity and Cardiovascular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: 1309-1319.

Crespi V, Braga M, Beretta S, Carolei A, Bignamini A, Sacco S. A practical definition of minor stroke. *Neurol Sci* 2011; 34: 1083-1086.

Crespi EJ, Vaudry H, Denver RJ. Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide Y and corticosterone in the regulation of food intake in *Xenopus laevis*. *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 279-288.



## D

Dambinova SA, Bettermann K, Glynn T, Tews M, Olson D, Weissman JD, et al. Diagnostic potential of the NMDA receptor peptide assay for acute ischemic stroke. *PLoS One* 2012; 7: e42362. doi: 10.1371/journal.pone.0042362

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 2005; 366: 1784-1793.

de Jonge LL, Steegers EA, Ernst GD, Lindemans J, Russcher H, Hofman A, et al. C-reactive protein levels, blood pressure and the risks of gestational hypertensive complications: the Generation R Study. *J Hypertens* 2011; 29:2413-2421.

de la Iglesia R, Lopez-Legarrea P, Abete I, Bondia-Pons I, Navas-Carretero S, Forga L, et al. A new dietary strategy for long-term treatment of the metabolic syndrome is compared with the American Heart Association (AHA) guidelines: the METabolic Syndrome REDuction in NAvarra (RESMENA) project. *Br J Nutr* 2013; 23: 1-10.

de Moraes AC, Musso C, Graffigna MN, Soutelo J, Migliano M, Carvalho HB, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors among Latin American adolescents: a multilevel analysis. *J Hum Hypertens* 2013; 28: 206-209

de Paula Sabino A, Ribeiro DD, Domingueti CP, Dos Santos MS, Gadelha T, Dusse LM, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 plasma levels in young patients with ischemic stroke. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 5355-5360.

den Hoed M, Westerterp-Plantenga MS, Bouwman FG, Mariman EC, Westerterp KR. Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 1426-1432.

Diaz-Guzman J, Egado-Herrero JA, Gabriel-Sanchez R, Barbera G, Fuentes B, Fernandez-Perez C, et al. Incidence of strokes in Spain. Methodological foundations of the Iberictus study. *Rev Neurol* 2008; 47: 617-623.

Dolinoy DC, Jirtle RL. Environmental epigenomics in human health and disease. *Environ Mol Mutagen* 2008; 49: 4-8.

Dougkas A, Yaqoob P, Givens DI, Reynolds CK, Miniñane AM. The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake. *Br J Nutr* 2013; 110: 1151-1156.

Drake C, Boutin H, Jones MS, Denes A, McColl BW, Selvarajah JR, et al. Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 1113-1122.

Dubow J, Fink ME. Impact of hypertension on stroke. *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13: 298-305.

Duran J, Villalbi JR, Guix J, Grupo de Trabajo sobre Clientes de la Agencia de Salud Publica de Barcelona. On the clients of public health organizations. *Gac Sanit* 2004; 18: 479-482.

## **E**

Ehsanipour EA, Sheng X, Behan JW, Wang X, Butturini A, Avramis VI, et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res* 2013; 73: 2998-3006.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 200; 358: 1148-1159.

Evenson KR, Rosamond WD, Cai J, Toole JF, Hutchinson RG, Shahar E, et al. Physical activity and ischemic stroke risk. The atherosclerosis risk in communities study. *Stroke* 1999; 30: 1333-1339.

## F

FESNAD y SEEDO. Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos (Consenso FESNAD-SEEDO). *Rev Esp Obes* 2011; 10: 80.

Festi D, Scaioli E, Baldi F, Vestito A, Pasqui F, Di Biase AR, et al. Body weight, lifestyle, dietary habits and gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1690-1701.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011; 377: 557-567.

Floras JS. Blood pressure variability: a novel and important risk factor. *Can J Cardiol* 2013; 29: 557-563.

Foerch C, Niessner M, Back T, Bauerle M, De Marchis GM, Ferbert A, Grehl H, Hamann GF, Jacobs A, Kastrup A, Klimpe S, Palm F, Thomalla G, Worthmann H, Sitzer M, BE FAST Study Group. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke.. *Clin Chem* 2012; 58: 237-245.

Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle* 2005; 4: 1377-1381.

Franciosi S, Gama Sosa MA, English DF, Oler E, Oung T, Janssen WG, et al. Novel cerebrovascular pathology in mice fed a high cholesterol diet. *Mol Neurodegener* 2009; 4:1326-1342.

Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 266: 6-11.

Franks PW. Diabetes family history: a metabolic storm you should not sit out. *Diabetes* 2010; 59: 2732-2734.

Franks ZG, Campbell RA, Weyrich AS, Rondina MT. Platelet-leukocyte interactions link inflammatory and thromboembolic events in ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 12: 11-17.

Fruhbeck G, Monreal I, Santidrian S. Hormonal implications of the hypocholesterolemic effect of intake of field beans (*Vicia faba* L.) by young men with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 1452-1460.

Fry J, Finley W. The prevalence and costs of obesity in the EU. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 359-362.

## **G**

Garber AK, Lustig RH. Is fast food addictive? *Curr Drug Abuse Rev* 2011; 4: 146-162.

Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, et al. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 2003; 34: 1412-1418.

Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis. *Am J Med* 1999; 107: 542-548.

Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 6676-6681.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; 127: e6-e245. doi: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80

Gomis Barbará R. Tratamiento farmacológico de la obesidad REV MED UNIV NAVARRA. 2004; 2: 63-65

Goyenechea E, Collins LJ, Parra D, Abete I, Crujeiras AB, O'Dell SD, et al. The - 11391 G/A polymorphism of the adiponectin gene promoter is associated with metabolic syndrome traits and the outcome of an energy-restricted diet in obese subjects. *Horm Metab Res* 2009; 41: 55-61.

Goyenechea E, Crujeiras AB, Abete I, Parra D, Martinez JA. Enhanced short-term improvement of insulin response to a low-caloric diet in obese carriers the Gly482Ser variant of the PGC-1alpha gene. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 82: 190-196.

Grau AJ, Lichy C. Editorial comment: Stroke and the CD40-CD40 ligand system: at the hinge between inflammation and thrombosis. *Stroke* 2003; 34: 1417-1418.

Gray LJ, Cooper N, Dunkley A, Warren FC, Ara R, Abrams K, et al. A systematic review and mixed treatment comparison of pharmacological interventions for the treatment of obesity. *Obes Rev* 2012; 13: 483-498.

Guay SP, Brisson D, Lamarche B, Marceau P, Vohl MC, Gaudet D, et al. DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: new molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis* 2013; 228: 413-420.

Guhathakurta D, Sheikh NA, Meagher TC, Letarte S, Trager JB. Applications of systems biology in cancer immunotherapy: from target discovery to biomarkers of clinical outcome. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2013; 6: 387-401.

Guiltinan AM, Kaidarova Z, Behan D, Marosi C, Hutching S, Kaiser M, et al. Major depression and generalized anxiety disorder among human T-lymphotropic virus types I- and II-infected former blood donors. *Transfusion* 2013 53: 60-68.

Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study. *Obes Rev* 2012; 13: 388-392.

Gutierrez-Fisac JL, Guallar-Castillon P, Leon-Munoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: the ENRICA study. *Obes Rev* 2012; 13: 388-392.

## H

Haast RA, Gustafson DR, Kiliaan AJ. Sex differences in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 2100-2107.

Haeusler KG, Schmidt WU, Fohring F, Meisel C, Helms T, Jungehulsing GJ, et al. Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans. *Cerebrovasc Dis* 2008; 25: 50-58.

Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001; 60: 5-20.

Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005; 143: 199-211.

Hannon MJ, Crowley RK, Behan LA, O'Sullivan EP, O'Brien MM, Sherlock M, et al. Acute glucocorticoid deficiency and diabetes insipidus are common after acute traumatic brain injury and predict mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 3229-3237.

Hanson E, Jood K, Karlsson S, Nilsson S, Blomstrand C, Jern C. Plasma levels of von Willebrand factor in the etiologic subtypes of ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 275-281.

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197-1209.

Hauptman JB, Jeunet FS, Hartmann D. Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *Am J Clin Nutr* 1992; 55: S309-S313.

Hean Lo C, Menezes H, Behan F. The island perforator flap design augments vascularity. *Plast Reconstr Surg* 2013; 132: 468e.469e.

Henderson M, Benedetti A, Gray-Donald K. Dietary composition and its associations with insulin sensitivity and insulin secretion in youth. *Br J Nutr* 2013; 19: 1-8.

Henninger N, Lin E, Haussen DC, Lehman LL, Takhtani D, Selim M, Moonis M. Leukoaraiosis and sex predict the hyperacute ischemic core volume. *Stroke* 2013; 44: 41-67.

Ho-Pham LT, Campbell LV, Nguyen TV. More on body fat cutoff points. *Mayo Clin Proc* 2011; 86: 584-585.

## I

Ishikawa M, Vowinkel T, Stokes KY, Arumugam TV, Yilmaz G, Nanda A, et al. CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion. *Circulation* 2005; 111: 1690-1696.

## J

Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. *Endocrinology* 2005; 146: 2684-2691.

Jalba MS, Rhoads GG, Demissie K. Association of codon 16 and codon 27 beta 2-adrenergic receptor gene polymorphisms with obesity: a meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 2096-2106.

Jensen MB, Chacon MR, Sattin JA, Levine RL, Vemuganti R. Potential biomarkers for the diagnosis of stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2009; 7: 389-393.

Jiang MH, Fei J, Lan MS, Lu ZP, Liu M, Fan WW, et al. Hypermethylation of hepatic Gck promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 2008; 51: 1525-1533.

Jin J, Kang HM, Jung J, Jeong JW, Park C. Related expressional change of HIF-1alpha to the neuroprotective activity of exendin-4 in transient global ischemia. *Neuroreport* 2013; 25: 65-70.

Joseph V, Behan M, Kinkead R. Sex, hormones, and stress: how they impact development and function of the carotid bodies and related reflexes. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 185: 75-86.

Junien C, Nathanielsz P. Report on the IASO Stock Conference 2006: early and lifelong environmental epigenomic programming of metabolic syndrome, obesity and type II diabetes. *Obes Rev* 2007; 8: 487-502.

## **K**

Kalnina I, Zaharenko L, Vaivade I, Rovite V, Nikitina-Zake L, Peculis R, et al. Polymorphisms in FTO and near TMEM18 associate with type 2 diabetes and predispose to younger age at diagnosis of diabetes. *Gene* 2013; 527: 462-468.

Karlsson AK, Kullberg J, Stokland E, Allvin K, Gronowitz E, Svensson PA, et al. Measurements of total and regional body composition in preschool children: A comparison of MRI, DXA, and anthropometric data. *Obesity* 2013; 21: 1018-1024.

Kim CK, Ryu WS, Kim BJ, Lee SH. Paradoxical effect of obesity on hemorrhagic transformation after acute ischemic stroke. *BMC Neurol* 2013; 13: doi: 10.1186/1471-2377-13-123.

Kim JM, Stewart R, Bae KY, Kim SW, Yang SJ, Park KH, et al. Role of BDNF val66met polymorphism on the association between physical activity and incident dementia. *Neurobiol Aging* 2011; 32: e5-551.12.

Kostulas N, Pelidou SH, Kivisakk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke* 1999 ; 30: 2174-2179.



Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke* 1996; 27: 852-857.

Kuo SM, Halpern MM. Lack of association between body mass index and plasma adiponectin levels in healthy adults. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35: 1487-1494.

## **L**

Labonte ME, Couture P, Richard C, Desroches S, Lamarche B. Impact of dairy products on biomarkers of inflammation: a systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* 2013; 97: 706-717.

Larsen LH, Angquist L, Vimalaswaran KS, Hager J, Viguerie N, Loos RJ, et al. Analyses of single nucleotide polymorphisms in selected nutrient-sensitive genes in weight-regain prevention: the DIOGENES study. *Am J Clin Nutr* 2012; 95: 1254-1260.

Lavdas I, Behan KC, Papadaki A, McRobbie DW, Aboagye EO. A phantom for diffusion-weighted MRI (DW-MRI). *J Magn Reson Imaging* 2013; 38: 173-179.

Law CS. The impact of changing parenting styles on the advancement of pediatric oral health. *J Calif Dent Assoc* 2007; 35: 192-197.

Lee PN, Forey BA. Environmental tobacco smoke exposure and risk of stroke in nonsmokers: a review with meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006; 15: 190-201.

Lenard NR, Zheng H, Berthoud HR. Chronic suppression of mu-opioid receptor signaling in the nucleus accumbens attenuates development of diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 1001-1010.

Lepor NE, Fouchia DD, McCullough PA. New vistas for the treatment of obesity: turning the tide against the leading cause of morbidity and cardiovascular mortality in the developed world. *Rev Cardiovasc Med* 2013; 14: 20-39.

Li M, Li Y, Liu J. Metabolic syndrome with hyperglycemia and the risk of ischemic stroke. *Yonsei Med J* 2013; 54: 283-287.

Li X, Wang Z, Liu Y, Zhang R, Guo X, Liu W, et al. Association of Imaging Classification of Intracranial Cerebral Atherosclerotic Vascular Stenosis in Ischemic Stroke and Renalase Gene Polymorphisms. *J Mol Neurosci* 2013 (en prensa)

Lindgren CM, McCarthy MI. Mechanisms of disease: genetic insights into the etiology of type 2 diabetes and obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4: 156-163.

Lopez RP, Hynes HP. Obesity, physical activity, and the urban environment: public health research needs. *Environ Health* 2006; 5: 25.

Lwow F, Jedrzejuk D, Dunajska K, Milewicz A, Szmigiero L. Cardiovascular disease risk factors associated with low level of physical activity in postmenopausal Polish women. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 683-686.

Lynch NJ, Willis CL, Nolan CC, Roscher S, Fowler MJ, Weihe E, et al. Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. *Mol Immunol* 2004; 40: 709-716.

## **M**

Ma J, Usui Y, Kezuka T, Okunuki Y, Zhang L, An X, et al. Costimulatory molecule expression on human uveal melanoma cells: functional analysis of CD40 and B7-H1. *Exp Eye Res* 2012; 96: 98-106.

Ma Y, Wang SX, Liu Y, Peng GG, Wang XM, Zhang B, et al. Single nucleotide polymorphism of CD40 in the 5'-untranslated region is associated with ischemic stroke. *Gene* 2013; 529: 257-261.

Macay J, Mensah G A. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Mace Weeks S, Baker K, Behan D, Manworren R, Moore P, Smith A, et al. Regional fellowship bridges gap between practice and academia. *Nurs Manage* 2013; 44: 19-22.

Mahmoud RH, Elnour WA. Comparative evaluation of the efficacy of ginger and orlistat on obesity management, pancreatic lipase and liver peroxisomal catalase enzyme in male albino rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 75-83.

Manco M, Morandi A, Marigliano M, Rigotti F, Manfredi R, Maffei C. Epicardial fat, abdominal adiposity and insulin resistance in obese pre-pubertal and early pubertal children. *Atherosclerosis* 2013; 226: 490-495.

Markus HS. Stroke genetics: prospects for personalized medicine. *BMC Med* 2012; 10: 113.

Marti A, Martinez JA. Leptin and body weight regulation. *An Sist Sanit Navar* 1999; 22: 353-363.

Marti A, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proc Nutr Soc* 2008; 67: 1-8.

Martin FL. Epigenetic influences in the aetiology of cancers arising from breast and prostate: a hypothesised transgenerational evolution in chromatin accessibility. *ISRN Oncol* 2013 doi: 10.1155/2013/624794.

Martinez JA, Parra MD, Santos JL, Moreno-Aliaga MJ, Marti A, Martinez-Gonzalez MA. Genotype-dependent response to energy-restricted diets in obese subjects: towards personalized nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17: 119-122.

Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, et al. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995; 44: 855-858.

Matarin M, Brown WM, Scholz S, Simon-Sanchez J, Fung HC, Hernandez D, et al. A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release. *Lancet Neurol* 2007; 6: 414-420.

Matías-Guiu J. La investigación en epidemiología del ictus en España. ¿Estudios de base poblacional o utilización de aproximaciones a partir del CMBD? *Rev Esp Cardiol* 2007;60(6):563-564.

Mattson MP, Wan R. Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 129-137.

Mendioroz Maite. Utilidad de los biomarcadores plasmáticos en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad cerebrovascular aguda. Dirigida por Joan Montaner Vilallonga, Israel Fernández-Cadenas y José Álvarez-Sabín. Tesis inédita. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. 2010.

McAllister EJ, Dhurandhar NV, Keith SW, Aronne LJ, Barger J, Baskin M, et al. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; 49: 868-913.

Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I, et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J* 2011; 25: 1378-1389.

Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009; 65: 1-9.

Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HH, Sobey CG. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. *Stroke* 2007; 38: 2142-2149.

Mintz PJ, Huang KW, Reebye V, Nteliopoulos G, Lai HS, Saetrom P, et al. Exploiting human CD34+ stem cell-conditioned medium for tissue repair. *Mol Ther* 2014; 22: 149-59

Moleres A, Rendo-Urteaga T, Zulet MA, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, et al. Obesity susceptibility loci on body mass index and weight loss in Spanish adolescents after a lifestyle intervention. *J Pediatr* 2012; 161: 466-470.

Montaner S, Sodhi A, Servitja JM, Ramsdell AK, Barac A, Sawai ET, Gutkind JS. The small GTPase Rac1 links the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vGPCR to cytokine secretion and paracrine neoplasia. *Blood* 2004; 104: 2903-2911.

Moreno LA, Moliner-Urdiales D, Ruiz JR, Mesana MI, Vicente-Rodriguez G, Rodriguez G, et al. Five year trends on total and abdominal adiposity in Spanish adolescents. *Nutr Hosp* 2012; 27: 731-738.

Murphy R, Carroll RW, Krebs JD. Pathogenesis of the metabolic syndrome: insights from monogenic disorders. *Mediators Inflamm* 2013. doi: 10.1155/2013/920214.

## **N**

Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 1962; 14: 353-362.

Nguyen FN, Kar J, Misra V. Aortogenic left middle cerebral artery ischemic stroke. *Neurohospitalist* 2012; 2: 106.

Nguyen P, Barte F, Shinada S, Yiu SC. Management of Corneal Graft Rejection - A Case Series Report and Review of the Literature. *J Clin Exp Ophthalmol* 2010; 1: 1000103.

Nickens MA, Long RC, Geraci SA. Cardiovascular disease in pregnancy: (women's health series). *South Med J* 2013; 106: 624-630

NIH Conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med* 1991; 115: 956-961.

Ntaios G, Gatselis NK, Makaritsis K, Dalekos GN. Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013; 227: 216-221.

## O

Oben JA, Patel T, Muralidarane A, Samuelsson AM, Matthews P, Pombo J, et al. Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 24-28.

Ochoa MC, Azcona C, Biebermann H, Brumm H, Razquin C, Wermter AK, et al. A novel mutation Thr162Arg of the melanocortin 4 receptor gene in a Spanish children and adolescent population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 66: 652-658.

O'Connor A, O'Sullivan PG, Behan L, Norman G, Murphy B. Initial results from the newborn hearing screening programme in Ireland. *Ir J Med Sci* 2013; 182: 551-556.

Okabayashi K, Ashrafian H, Hasegawa H, Yoo JH, Patel VM, Harling L, et al. Body mass index category as a risk factor for colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1175-1185.

Ong CW, O'Driscoll DM, Truby H, Naughton MT, Hamilton GS. The reciprocal interaction between obesity and obstructive sleep apnoea. *Sleep Med Rev* 2013; 17: 123-131.

O'Rourke RW, Lumeng CN. Obesity heats up adipose tissue lymphocytes. *Gastroenterology* 2013; 145: 282-285.

Osakidetza. Procedimiento de atención al ictus y trombólisis. 2011; Available at: [http://www.osakidetza.euskadi.net/r85-gkhgal03/es/contenidos/informacion/hgal\\_neurologia\\_actividad\\_asis/es\\_hgal/adjuntos/POASISTNEUR07.pdf](http://www.osakidetza.euskadi.net/r85-gkhgal03/es/contenidos/informacion/hgal_neurologia_actividad_asis/es_hgal/adjuntos/POASISTNEUR07.pdf). Accessed Septiembre, 2013.

Oswal A, Yeo G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 221-229.

Overvad TF, Rasmussen LH, Skjoth F, Overvad K, Lip GY, Larsen TB. Body mass index and adverse events in patients with incident atrial fibrillation. *Am J Med* 2013; 126: .e9-e17.

## P

Pamir N, McMillen TS, Kaiyala KJ, Schwartz MW, LeBoeuf RC. Receptors for tumor necrosis factor-alpha play a protective role against obesity and alter adipose tissue macrophage status. . *Endocrinology* 2009; 150: 4124-4134.

Petroni ML. Review article: gall-bladder motor function in obesity. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 48-50.

Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vargias D, DeCarli C, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke* 2013; 44: 2768-2775.

Pischon T. Use of obesity biomarkers in cardiovascular epidemiology. *Dis Markers* 2009; 26: 247-263.

Popkin BM. The public health implications of fast-food menu labeling. *Am J Prev Med* 2012; 43: 569-570.

Prugger C, Luc G, Haas B, Morange PE, Ferrieres J, Amouyel P, et al. Multiple biomarkers for the prediction of ischemic stroke: the PRIME study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 659-666.

## R

Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 136-149.

Razquin C, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Crehuet J, Santos JM, Marti A. A Mediterranean diet rich in virgin olive oil may reverse the effects of the -174G/C IL6 gene variant on 3-year body weight change. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: S75-S82.

Reeves MJ, Arora S, Broderick JP, Frankel M, Heinrich JP, Hickenbottom S et al. Acute stroke care in the US: results from 4 pilot prototypes of the Paul Coverdell National Acute Stroke Registry. *Stroke*. 2005; 36: 1232-1240.

Rodriguez-Yanez M, Sobrino T, Arias S, Vazquez-Herrero F, Brea D, Blanco M, et al. Early biomarkers of clinical-diffusion mismatch in acute ischemic stroke. *Stroke* 2011; 42: 2813–2818.

Rouine J, Gobbo OL, Campbell M, Gigliucci V, Ogden I, McHugh Smith K, et al. MDMA 'ecstasy' increases cerebral cortical perfusion determined by bolus-tracking arterial spin labelling (btASL) MRI. *Br J Pharmacol* 2013; 169: 974-987.

Rubio MA, Salas-Salvadó J, Barbany M, Moreno B, Aranceta J, Bellido D, Blay V, Carraro R, Formiguera X, Foz M, de Pablos P, García-Luna PP, Griera JL, López de la Torre M, Martínez JA, Remesar X, Tebar J, Vidal J. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes* 2007;7-48.

Rubio L, Torrero C, Regalado M, Salas M. Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation. *Nutr Neurosci* 2004; 7: 291-300.

## **S**

Sanada H, Yokokawa H, Yoneda M, Yatabe J, Sasaki Yatabe M, Williams SM, et al. High body mass index is an important risk factor for the development of type 2 diabetes. *Intern Med* 2012; 51: 1821-1826.

San-Cristobal R, Milagro FI, Martinez JA. Future challenges and present ethical considerations in the use of personalized nutrition based on genetic advice. *J Acad Nutr Diet* 2013; 113: 1447-1454.



Santanam N, Thornhill BA, Lau JK, Crabtree CM, Cook CR, Brown KC, et al. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2012; 225: 264-273.

Santos JL, Lera L, Perez-Bravo F, Albala C. Adiposity and bone mineral density of Chilean elderly women in relation to toll-like receptor 4 gene polymorphisms. *Ann Hum Biol* Saydah SH, Fradkin J, Cowie CC. Poor control of risk factors for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. *JAMA* 2004; 291: 335-342.

Sayon-Orea C, Bes-Rastrollo M, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Martinez-Gonzalez MA. Type of alcoholic beverage and incidence of overweight/obesity in a Mediterranean cohort: the SUN project. *Nutrition* 2011; 27: 802-808.

Scherbakov N, Sandek A, Martens-Lobenhoffer J, Kung T, Turhan G, Liman T, et al. Endothelial dysfunction of the peripheral vascular bed in the acute phase after ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2012; 33: 37-46.

Schnitzler A, Woimant F, Nicolau J, Tuppin P, de Peretti C. Effect of Rehabilitation Setting on Dependence Following Stroke: An Analysis of the French Inpatient Database. *Neurorehabil Neural Repair* 2014; 28: 36-44.

Schweizer S, Meisel A, Marschenz S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33: 1335-1346.

ebire NJ, Jolly M, Harris JP, Wadsworth J, Joffe M, Beard RW, et al. Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1175-1182.

Sevastianova K, Sutinen J, Kannisto K, Hamsten A, Ristola M, Yki-Jarvinen H. Adipose tissue inflammation and liver fat in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:e85-e91.

Shahrzad S, Bertrand K, Minhas K, Coomber BL. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics* 2007; 2: 119-125.

Smith CJ, Emsley HC, Vail A, Georgiou RF, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, et al. Variability of the systemic acute phase response after ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2006; 251: 77-81.

Smith LH, Boutaud O, Breyer M, Morrow JD, Oates JA, Vaughan DE. Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation is regulated by low density lipoprotein cholesterol in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 983-988.

Soisson V, Brailly-Tabard S, Empana JP, Feart C, Ryan J, Bertrand M, et al. Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: importance of low-grade inflammation in elderly men. *Atherosclerosis* 2012; 223: 244-249.

Sotgiu S, Zanda B, Marchetti B, Fois ML, Arru G, Pes GM, Salaris FS, Arru A, Pirisi A, Rosati G. Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia.. *Eur J Neurol* 2006; 13: 505-513.

Speakman JR. Evolutionary perspectives on the obesity epidemic: adaptive, maladaptive, and neutral viewpoints. *Annu Rev Nutr* 2013; 33: 289-317.

Steeves JA, Bassett DR, Jr, Thompson DL, Fitzhugh EC. Relationships of occupational and non-occupational physical activity to abdominal obesity. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36: 100-106.

Stephens TW, Caro JF. To be lean or not to be lean. Is leptin the answer? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106: 1-15.

Stewart L, Reilly JJ, Hughes AR. Evidence-based behavioral treatment of obesity in children and adolescents. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2009; 18: 189-198.

Strickland FM, Hewagama A, Wu A, Sawalha AH, Delaney C, Hoeltzel MF, Yung R, Johnson K, Mickelson B, Richardson BC. Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus. *Arthritis Rheum* 2010; 65: 1872-1881.

Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5: 463-466

## T

Tadger S, Melamed Y. Weight gain due to long term antipsychotic treatment of persistent mental disorders. *Psychiatr Danub* 2008; 20: 37-41.

Tanaskovic S, Isenovic ER, Radak D. Inflammation as a marker for the prediction of internal carotid artery restenosis following eversion endarterectomy-evidence from clinical studies. *Angiology* 2011; 62: 535-542.

Tang M, Armstrong CL, Leidy HJ, Campbell WW. Normal vs. high-protein weight loss diets in men: effects on body composition and indices of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21: e204-e210.

Tang Y, Xu H, Du X, Lit L, Walker W, Lu A, et al. Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1089-1102.

Thaler R, Karlic H, Rust P, Haslberger AG. Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr* 2009; 101: 743-749.

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-pa stroke study group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581-1588.

The Re-examining Acute Eligibility for Thrombolysis (TREAT) Task Force:, Levine SR, Khatri P, Broderick JP, Grotta JC, Kasner SE, et al. Review, Historical Context, and Clarifications of the NINDS rt-PA Stroke Trials Exclusion Criteria: Part 1: Rapidly Improving Stroke Symptoms. *Stroke* 2013; 44: 2500-2505.

Tian C, Qin W, Li L, Zheng W, Qiu F. A common polymorphism in CD40 Kozak sequence (-1C/T) is associated with acute coronary syndrome. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 191-194.

Tomer Y, Concepcion E, Greenberg DA. A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid* 2002;12: 1129-1135.

Truelsen T, Piechowski-Jozwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogouslavsky J, Boysen G. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol* 2006; 13: 581-598.

## U

Uno M, Kitazato KT, Nishi K, Itabe H, Nagahiro S. Raised plasma oxidised LDL in acute cerebral infarction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 312-316.

Urra X, Chamorro A. Stroke-induced immunodepression is a marker of severe brain damage. *Stroke* 2010; 41: e110-e111.

## V

Valentino D, Sriram K, Shankar P. Update on micronutrients in bariatric surgery. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14: 635-641.

Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006; 113: 2335-2362.

Vashishtha M, Ng CW, Yildirim F, Gipson TA, Kratter IH, Bodai L, et al. Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: e3027-e3036.

Vgontzas AN, Tan TL, Bixler EO, Martin LF, Shubert D, Kales A. Sleep apnea and sleep disruption in obese patients. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1705-1711.

Vidal-Puig A, Unger RH. Special issue on lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 207-208.

Vitale J. Stroke and myocardial infarction with hormonal contraception. *N Engl J Med* 2012; 367: 1264-1265.

Vogelgesang A, Grunwald U, Langner S, Jack R, Broker BM, Kessler C, et al. Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke. *Stroke* 2008; 39: 237-241.

## **W**

Wadden D, Cahill F, Amini P, Randell E, Vasdev S, Yi Y, et al. Serum acylated ghrelin concentrations in response to short-term overfeeding in normal weight, overweight, and obese men. *PLoS One* 2012; 7: e45748.

Walley AJ, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 431-442.

Wang L, Yamaguchi T, Yoshimine T, Katagiri A, Shirogane K, Ohashi Y. A case-control study of risk factors for development of type 2 diabetes: emphasis on physical activity. *J Epidemiol* 2002; 12: 424-430.

Wang X, Liu J, Ouyang Y, Fang M, Gao H, Liu L. The Association between the Pro12Ala Variant in the PPARgamma2 Gene and Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity in a Chinese Population. *PLoS One* 2013; 8: e71985.

Wareham NJ, Young EH, Loos RJ. Epidemiological study designs to investigate gene-behavior interactions in the context of human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: S66-S71.

Wheeler E, Huang N, Bochukova EG, Keogh JM, Lindsay S, Garg S, et al. Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity. *Nat Genet* 2013; 45: 513-517.

Whiteley W, Jackson C, Lewis S, Lowe G, Rumley A, Sandercock P, et al. Association of circulating inflammatory markers with recurrent vascular events after stroke: a prospective cohort study. *Stroke* 2011; 42: 10-16.

WHO. *Obesidad y sobrepeso*. 2012; Available at:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. Accessed Septiembre, 2013.

WHO. Obesity and Overweight. Fact Sheet Number. Fact Sheet Number 2011;311.

World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. 2011; Available at: <https://apps.who.int/infobase/>. Accessed Septiembre, 2013.

## **X**

Xi B, Cheng H, Shen Y, Chandak GR, Zhao X, Hou D, et al. Study of 11 BMI-associated loci identified in GWAS for associations with central obesity in the Chinese children. PLoS One 2013; 8: e56472.

## **Y**

Yang D, He Y, Li M, Shi C, Song G, Wang Q, et al. A Novel Risk Haplotype of ALOX5AP Gene is Associated with Ischemic Stroke in Chinese Han Population. J Mol Neurosci 2013. (en prensa)

## **II. Hipótesis y objetivos**





## **1. HIPÓTESIS**

La hipótesis principal de este trabajo es que el sufrir un ictus isquémico produce cambios agudos a nivel epigenético, siendo a su vez estos cambios diferentes según el IMC del paciente en el momento del accidente cerebrovascular. Estos cambios en los patrones de metilación de determinados genes, son reflejados en cambios transcriptómicos y fenotípicos. Esta diferencia en los niveles de metilación de genes implicados, tanto en obesidad como en ictus, cambian en el transcurso de una intervención dietética de 20 semanas en pacientes obesos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

El propósito del presente estudio se basa en determinar la influencia del ictus isquémico en el patrón epigenético de genes involucrados en enfermedades cerebrovasculares y la obesidad, y su interacción con el índice de masa corporal, además del estudio del efecto de una dieta hipocalórica en dichos cambios epigenéticos.

## 2.2 Objetivos específicos

1 Analizar en una **población inicial** el impacto de la obesidad y el patrón dietético sobre la incidencia del primer episodio de ictus isquémico, evaluando la influencia epigenética de estas patologías en los genes, Factor de Necrosis Tumoral alfa y Paraoxonasa (*TNF- $\alpha$*  y *PON*).

2 Buscar modificaciones epigenéticas en genes seleccionados a partir de una aproximación ómica en una **población de selección** de pacientes que han sufrido un ictus isquémico y su posible interacción con la obesidad (solo normopeso y obesidad) mediante:

a) Un estudio masivo en el epigenoma a partir de ADN de células blancas sanguíneas.

b) Validación en la misma población de las regiones de genes relevantes seleccionados del estudio masivo, para escoger potenciales biomarcadores.

c) El estudio de los cambios en la expresión de estos genes, como resultado de las modificaciones en la metilación.

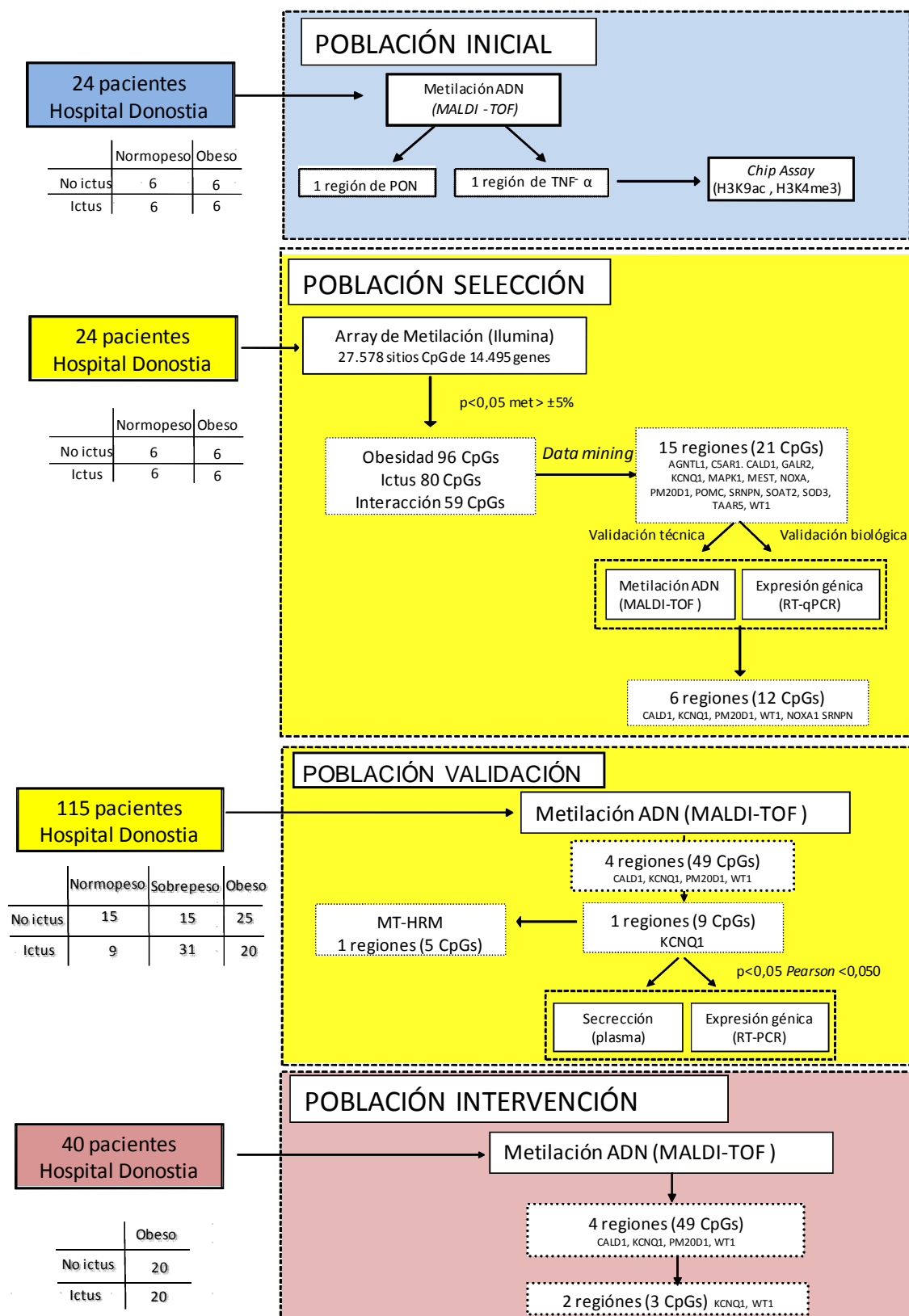
3 Determinar si los cambios en la metilación de los genes escogidos en la población de selección, son semejantes en una **población de validación**, compuesta por pacientes con y sin ictus isquémico, y con un IMC de normopeso, sobrepeso y obesidad.

- 4 Investigar los cambios encontrados en el patrón de metilación de los genes validados en una población mayor, y su efecto en los niveles de proteína a nivel plasmático y sus niveles de expresión génica.
  
- 5 Estudiar la respuesta de pacientes obesos ( $IMC >30\text{kg/m}^2$ ) que sufrieron o no un ictus isquémico, a un tratamiento dietético de 20 semanas de duración, en el perfil bioquímico y en las medidas antropométricas.
  
- 6 Analizar los cambios en la metilación de las regiones seleccionadas anteriormente, al inicio, a las 12 semanas y al final de la intervención en pacientes obesos con un ictus isquémico respecto a pacientes obesos sin ictus.

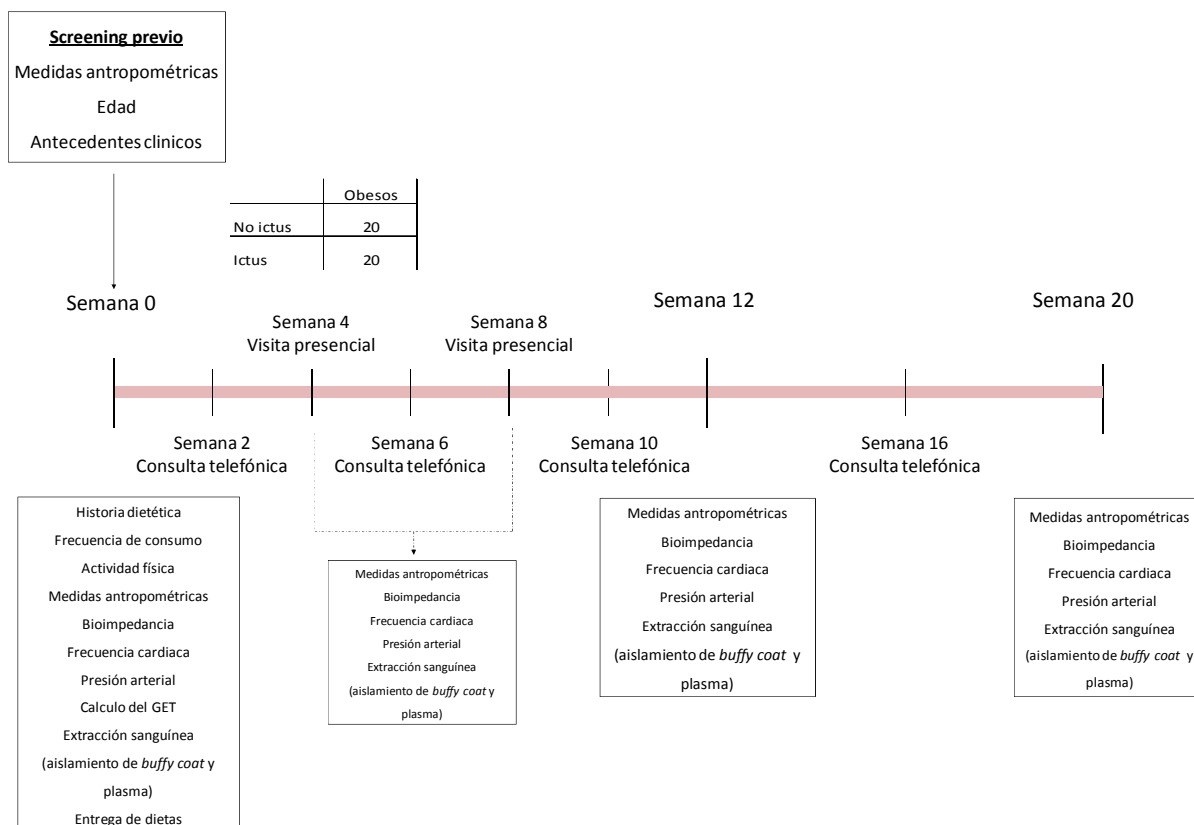


## **III. Material y Métodos**





**Figura 9.** Modelo experimental general. El fin del trabajo fue determinar las modificaciones epigenéticas en varias regiones de genes candidatos en pacientes que han sufrido un ictus isquémico y la interacción del IMC en esta. RT-qPCR, Real time quantitative polymerase chain reaction. MT-HRM, Methylation-sensitive high resolution melting



**Figura 10.** Modelo de intervención dietética. El objetivo de este estudio fue estudiar la respuesta de pacientes obesos a un tratamiento dietético de 20 semanas de duración comparando entre sí los que habían sufrido un ictus isquémico con los que no. El estudio consistió en una dieta con una reducción del 30% del gasto energético total (GET) y una distribución de macronutrientes del 50% de la energía en forma de hidratos de carbono, 30% de proteínas y 20% de lípidos.

## 1. MODELO EXPERIMENTAL

La presente proyecto de Tesis Doctoral fue diseñada en base a la realización de un modelo experimental compuesto de 4 poblaciones (figura 9) con el objetivo de buscar posibles biomarcadores del ictus isquémico y su relación con la obesidad. Además, se realizó una intervención de 20 semanas de duración a fin de estudiar la respuesta a una dieta hipocalórica en pacientes obesos que habían sufrido previamente un ictus. El protocolo de estudio y documento de consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación, de la Universidad de Navarra, y Comité Ético de



Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa con nº de actas 026/2011 y 2/10 respectivamente.

### **1.1 Población Inicial:**

El estudio consiste en un diseño de casos y controles. Los casos (n = 12) fueron seleccionados del Servicio de Neurología del Hospital Donostia, con un primer episodio de ictus isquémico, evaluado por un neurólogo en las primeras 24 horas del inicio de los síntomas. La etiología se definió según los criterios TOAST (*Trial de Org 10172* en el tratamiento *AcuteStroke*), después de completar un número mínimo de pruebas de diagnóstico. El grupo control (n=12) fue constituido por individuos sin ningún trastorno neurológico no vascular. En todos los casos, los pacientes del grupo control fueron emparejados por sexo y edad con los pacientes con accidente cerebrovascular, incluyendo 6 sujetos obesos y no obesos en cada uno de los grupos de casos y controles, y pareados también según IMC. Los criterios de inclusión para todos los pacientes y controles fueron: edad mayor de 50 años y menor de 80 años de edad. Los criterios de exclusión fueron presentar una historia previa de trastorno neurovascular y/o discapacidad física o sensorial para responder. En cuanto al IMC, los criterios de inclusión se ajustaban a la clasificación de normopeso y obesidad según la OMS [OMS 2007], es decir, IMC menor de 25 kg/m<sup>2</sup> en el caso de los pacientes del grupo no obeso e IMC mayor o igual de 30 kg/m<sup>2</sup> en los pacientes obesos.

Se obtuvieron muestras sanguíneas específicas para este estudio, en el momento del ingreso en la unidad de neurología, en el caso de los pacientes que sufrieron un ictus, o en el momento de participar en el estudio en el caso de los controles. La extracción sanguínea se realizó con dos fines. En primer, lugar la extracción del capa leucocitaria para el posterior aislamiento del ADN y del ARN para distintos estudios de metilación y expresión. En segundo lugar, la extracción del plasma para la medición de distintos parámetros bioquímicos.

Después de una explicación detallada del estudio, se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes o por un familiar directo en el caso de

discapacidad severa, antes del comienzo del estudio, de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

## 1.2 Población Selección:

**Tabla 4:** Características fenotípicas, antropométricas y bioquímicas de la Población Selección (PS).

	<u>Normopeso</u>	<u>Normopeso</u>	<u>Obesidad</u>	<u>Obesidad</u>	<u>ANOVA</u>		
	<u>No ictus</u> (n=6)	<u>Ictus</u> (n=6)	<u>No ictus</u> (n=6)	<u>Ictus</u> (n=6)	<u>Obesidad</u>	<u>Ictus</u>	<u>Interacción</u>
Edad (años)	69,8 ± 6,9	74,6 ± 3,0	67,5 ± 5,8	66,5 ± 6,7	n.s.	n.s.	n.s.
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,8 ± 2,0	22,5 ± 1,6	34,5 ± 3,4	33,4 ± 1,1	***	n.s.	n.s.
Circunferencia de la cintura (cm)	83,3 ± 12,4	84,5 ± 4,0	111,3 ± 9,3	117,5 ± 12,4	***	n.s.	n.s.
NIHSS al ingreso		6,0 ± 4,6		4,8 ± 6,2		n.s.	
Glucosa (mg/dl)	80,8 ± 39,7	97,2 ± 20,7	86,2 ± 21,1	143,3 ± 56,5	n.s.	*	n.s.
Presión arterial sistólica (mm/hg)	131,6 ± 20,2	180,2 ± 20,2	145,4 ± 34,0	200,2 ± 25,0	*	*	n.s.
Presión arterial diastólica (mm/hg)	80,0 ± 5,0	81,8 ± 19,3	83,0 ± 6,7	106,7 ± 16,3	n.s.	n.s.	n.s.
Colesterol total (mg/dl)	214,8 ± 34,3	177,2 ± 28,9	200,4 ± 36,7	205,8 ± 37,3	n.s.	n.s.	n.s.
Colesterol HDL (mg/dl)	55,4 ± 11,6	60,7 ± 17,5	52,0 ± 10,0	37,0 ± 11,2	*	n.s.	n.s.
Colesterol LDL (mg/dl)	135,4 ± 28,2a	88,0 ± 27,3b	123,2 ± 25,8a	151,9 ± 40,1a	*	n.s.	*
Triglicéridos (mg/dl)	119, ± 37,5a	86,2 ± 22,7b	125,8 ± 16,8a	164,0 ± 45,0a	n.s.	n.s.	*

n.s, no significativo; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

Esta segunda población, estuvo formada al igual que la población inicial, por 24 pacientes y pareada por sexo y edad en cada uno de los grupos (tabla 4).

Se marcaron los mismos criterios de inclusión y exclusión descritos en el punto 1.1. Este estudio fue también un estudio de casos y controles. Los pacientes del grupo caso estaba compuesto por 12 pacientes con un primer episodio de ictus isquémico diagnosticados en el Servicio de Neurología, del Hospital Donostia. Del mismo modo el grupo control fue constituido por 12 individuos sin trastorno neurológico no vascular. Los pacientes fueron seleccionados, al igual que la Población Inicial, a partir de una base de datos del Hospital Donostia. Debido a un mayor número de pacientes seleccionables, a partir de la base de datos dinámica del Hospital Donostia, se eligieron los pacientes mejor caracterizados y mejor pareados con el fin de obtener los resultados más concluyentes. La extracción de sangre se realizó en las mismas condiciones y con el mismo objetivo que en el punto 1.1.

### 1.3 Población Validación

**Tabla 5.** Características fenotípicas, antropométricas y bioquímicas de la Población Validación (PV).

	<u>Normopeso</u>	<u>Normopeso</u>	<u>Sobrepeso</u>	<u>Sobrepeso</u>	<u>Obesidad</u>	<u>Obesidad</u>	<u>ANOVA</u>		
	<u>Non ictus</u> (n=15)	<u>Ictus</u> (n=9)	<u>No ictus</u> (n=15)	<u>Ictus</u> (n=31)	<u>No ictus</u> (n=25)	<u>Ictus</u> (n=20)	<u>Obesidad</u>	<u>Ictus</u>	<u>Interacción</u>
Edad (años)	60,4 ± 7,8	72,6 ± 6,4	62,8 ± 8,6	69,6 ± 7,3	62,8 ± 8,2	69,0 ± 8,9	n.s.	***	n.s.
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23,0 ± 1,4	23,6 ± 1,4	27,6 ± 1,4	27,5 ± 1,6	32,7 ± 4,8	29,2 ± 4,3	***	n.s.	n.s.
Circunferencia de la cintura (cm)	82,7 ± 6,5	95,3 ± 8,6	97,9 ± 9,8	105,7 ± 15,1	97,8 ± 13,1	107,2 ± 15,5	***	***	n.s.
NIHSS al ingreso		3,1 ± 4,7		4,4 ± 4,4		4,2 ± 2,8	n.s.	n.p.	n.s.
Glucosa (mg/dl)	89,7 ± 6,2	106,7 ± 35,0	98,6 ± 19,5	124,0 ± 56,4	107,2 ± 19,4	121,1 ± 2,4	n.s.	*	n.s.
Presión arterial sistólica (mm/hg)	124,0 ± 10,6	165,3 ± 24,2	134,4 ± 11,5	162,9 ± 26,1	133,3 ± 15,8	173,7 ± 28,6	n.s.	***	n.s.
Presión arterial diastólica (mm/hg)	75,9 ± 6,6	84,7 ± 8,4	80,5 ± 6,8	85,3 ± 13,1	78,1 ± 6,2	91,3 ± 13,8	n.s.	***	n.s.
Colesterol total (mg/dl)	229,5 ± 29,0	185,7 ± 57,8	210,1 ± 28,7	186,4 ± 37,8	213,5 ± 30,3	207,0 ± 31,8	n.s.	*	n.s.
Colesterol HDL (mg/dl)	69,0 ± 13,8	53,2 ± 14,5	60,9 ± 13,3	44,6 ± 12,0	54,5 ± 13,3	47,8 ± 13,3	n.s.	***	n.s.
Colesterol LDL (mg/dl)	148,7 ± 33,3	133,6 ± 27,9	131,9 ± 29,9	119,3 ± 35,1	128,5 ± 25,2	132,0 ± 31,2	n.s.	n.s.	n.s.
Triglicéridos (mg/dl)	81,7 ± 30,8	79,2 ± 32,3	82,9 ± 26,7	123,6 ± 27,2	146,1 ± 83,2	166,0 ± 100,2	***	n.s.	n.s.

n.s, no significativo; \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,001.

Una vez seleccionados y validados los genes candidatos como se observa en la figura 9, se seleccionaron, para su validación en una población diferente y con un mayor número de pacientes: 115 individuos de la base de datos general del Servicio de Neurología del Hospital Donostia (tabla 5). Los criterios de inclusión en cuanto a las características de la patología y a la edad fueron los mismos que en la Población Inicial y en la Población Selección.

Con el objetivo de realizar un estudio pormenorizado de la respuesta epigenética al accidente cerebrovascular y la respuesta según el IMC, se seleccionaron pacientes con un índice de masa corporal entre 20,70 y 39,18 kg/m<sup>2</sup>. Con el fin de aparear los pacientes por sexo, edad e IMC, se dividió a la población en terciles según este último. Estos terciles tenían como puntos de corte 26,81 y 31,07 kg/m<sup>2</sup>. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en esta población, finalmente, se utilizaron los criterios de normopeso, sobrepeso y obesidad descritos por la OMS y utilizados en las poblaciones Inicial y Selección.

Por lo tanto, estos individuos constituyeron un estudio de casos y controles, con los mismos criterios de inclusión y exclusión de los puntos 1.1 y 1.2. La extracción de sangre se realizó en las mismas condiciones y con el mismo objetivo que en los puntos 1.1 y 1.2.

#### 1.4 Población Intervención Nutricional

**Tabla 6.** Características fenotípicas, antropométricas y bioquímicas de la Población Intervención en semana 0.

	<b>No ictus (n=20)</b>	<b>Ictus (n=20)</b>	<b>p</b>
<b>Edad (años)</b>	60,4 ± 7,8	72,6 ± 6,4	n.s.
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	34,4 ± 3,1	34,2 ± 3,2	n.s.
<b>Circunferencia de la cintura (cm)</b>	108,1 ± 8,6	109,5 ± 10,1	n.s.
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	105,5 ± 18,3	108,9 ± 26,7	n.s.
<b>Presión arterial sistólica (mm/hg)</b>	133,9 ± 16,7	137,7 ± 22,7	n.s.
<b>Presión arterial diastólica (mm/hg)</b>	78,9 ± 7,3	77,5 ± 11,4	n.s.
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	222,8 ± 28,5	189,0 ± 43,	n.s.
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	60,5 ± 15,6	47,2 ± 13,3	n.s.
<b>Colesterol LDL (mg/dl)</b>	147,2 ± 27,8	109,8 ± 34,4	n.s.
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	125,3 ± 70,0	114,6 ± 51,5	n.s.

n.s, no significativo

En primer lugar y con el objetivo de seleccionar los pacientes definitivos, se realizó un cribado telefónico a todos aquellos voluntarios interesados en participar en el estudio de intervención dietética. A los pacientes que habían sufrido un ictus, se les ofrecía la participación desde Servicio de Neurología en el momento del alta. Los pacientes controles interesados se ponían en contacto con las nutricionistas tras conocer el programa por medio de carteles informativos expuestos en el Hospital

Donostia. En el Hospital se recopilaban datos sobre edad, historia clínica, peso y talla con el fin de seleccionar los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión descritos en el punto 1.1.

Finalmente, se seleccionaron 61 pacientes obesos según la clasificación de la OMS, con un IMC mayor a 30 kg/m<sup>2</sup>. Treinta pacientes que habían sufrido un ictus previamente y 31 controles. De los pacientes que comenzaron la intervención dietética, 19 abandonaron voluntariamente, un paciente sufrió un ictus durante la intervención y un voluntario falleció a causa del accidente cerebrovascular previo. Por último, dos pacientes fueron eliminados de los análisis finales por carecer de muestra sanguínea en algún punto del estudio e imposibilitar la realización de las medidas de los niveles de metilación en las células blancas sanguíneas.

Finalmente y con los pacientes que terminaron el estudio con la totalidad de las muestras y datos requeridos, se diseñó un estudio de casos y controles con 20 voluntarios en cada grupo. Podemos observar las características fenotípicas de esta población al inicio de la intervención en la tabla 6.

La intervención dietética tuvo una duración de 20 semanas (figura 10). El día de inicio de dieta (ID), se citó a los pacientes seleccionados tras el cribaje, se realizó una historia clínica completa, historia dietética, frecuencia de consumo, actividad física, medidas antropométricas, composición corporal por bioimpedancia, cálculo del gasto energético, extracción sanguínea, medida de frecuencia cardíaca y presión arterial y se procedió a la entrega de las dietas personalizadas. En cuanto a las medidas antropométricas estas fueron:

- Peso
- Altura
- Circunferencia de la cintura
- Circunferencia de la cadera
- Perímetro del brazo
- Pliegue tricípital

Como se explica en la figura 10, las visitas presenciales hasta la semana 12, se realizaron cada 4 semanas. En estas visitas se realizaba un control de adhesión a la dieta y se

tomaban las medidas antropométricas anteriormente citadas, frecuencia cardíaca, presión arterial y bioimpedancia.

En las semanas 2, 6 y 16, se realizaron consultas telefónicas con el fin de solucionar dudas sobre las dietas pautadas y acompañar en el cumplimiento de éstas a los pacientes.

Tanto en la semana 12, como en la semana 20, se realizó una consulta presencial, se midieron todos los parámetros antropométricos citados, frecuencia cardíaca, presión arterial, composición corporal por medio de bioimpedancia y se procedió a la extracción sanguínea al igual que en la ID.

## **IV. Resultados**





**Capítulo 1: Epigenetic impact of two gene promoter methylation patterns (*TNF- $\alpha$*  and *PON*) in stroke when considering obesity condition and dietary intake.**



## **Epigenetic patterns of two gene promoter (TNF- $\alpha$ and PON) in stroke considering obesity condition and dietary intake**

A.M. Gómez-Uriz, E. Goyenechea, J. Campión, A. de Arce, MT. Martinez, B. Puchau, FI. Milagro, I. Abete, JA Martínez, A. Lopez de Munain.

**Publicado en Journal of Physiology and Biochemistry (FI: 1,65)**

**DOI: 10.1007/s13105-014-0316-5**

Resumen: Algunas de las causas del accidentes cerebrovasculares siguen sin estar claras, pero los efectos nutricionales sobre la regulación epigenética de diferentes genes pueden estar involucrados. El objetivo fue evaluar el impacto de los procesos epigenéticos en los promotores del factor de necrosis tumoral alfa humano (*TNF- $\alpha$* ) y la paraoxonasa (*PON*) en la susceptibilidad de sufrir un ictus considerando la composición corporal y la ingesta dietética. Veinticuatro pacientes (12 no ictus/12 ictus) fueron emparejados por sexo (12 hombres/12 mujeres), edad (media: 70  $\pm$  12 años) y el IMC (12 normopesos/12 obesos, con una media: 28,1  $\pm$  6,7 kg/m<sup>2</sup>). El ADN de las células sanguíneas se aisló y los niveles de metilación de ADN de los promotores de *TNF- $\alpha$*  (-186 a +349 pb) y (-231 a +250 pb) de *PON* se determinaron mediante *Sequenom MassArray® EpiTyper™*. Se analizaron las modificaciones de histonas (H3K9ac y H3K4me3) por inmunoprecipitación de la cromatina en una región de *TNF- $\alpha$*  (-297 a -185). La metilación del promotor de *TNF- $\alpha$*  total fue menor en pacientes con accidente cerebrovascular (p<0,001) y no mostró ninguna interacción con la composición corporal (p=0,807). Los niveles de metilación total de *TNF- $\alpha$*  y *PON* se correlacionaron entre sí (r=0,44, p=0,031), especialmente, en pacientes con accidente cerebrovascular (r=0,72, p=0,008). La metilación del sitio CpG +309 del promotor de *TNF- $\alpha$*  estaba relacionada con el peso corporal (p = 0,027) y la región que contiene tres CpG (-170 a -162 pb) correlacionados con el porcentaje de la ingesta de lípidos dietéticos y los índices (p<0,05) en pacientes no ictus. La metilación de los sitios CpG +15 y +241 de *PON* estaba relacionada con el peso corporal (p=0,021), la circunferencia de la cintura (p=0,020) y el consumo de energía (p=0,018), mientras que el CpG +214 se asoció con la calidad de la dieta (p<0,05) en los pacientes que no sufrieron un accidente cerebrovascular. Al

comparar los pacientes con y sin ictus respecto a las modificaciones de las histonas analizadas en el promotor de *TNF- $\alpha$* , no se encontraron cambios, aunque una asociación positiva fue identificada entre los niveles circulantes de *TNF- $\alpha$*  y los niveles de H3K9ac y H3K4me3. Los niveles de metilación de los promotores de *TNF- $\alpha$*  y *PON* podrían estar involucrados en la susceptibilidad de sufrir un accidente cerebrovascular y la obesidad, respectivamente. La ingesta alimentaria y la composición corporal pueden influir en estos cambios epigenéticos en individuos que no han sufrido un accidente cerebrovascular previo.

## **Epigenetic patterns of two gene promoter (TNF- $\alpha$ and PON) in stroke considering obesity condition and dietary intake**

A.M. Gómez-Uriz<sup>1,\*</sup>, E. Goyenechea<sup>3,\*</sup> PhD, J. Campión<sup>1,2</sup> PhD, A. de Arce<sup>3,4,5,6</sup> MD, MT. Martínez<sup>3,4,5,6,7</sup> MD, B. Puchau<sup>1</sup> PhD, Fl. Milagro<sup>1,2</sup> PhD, I. Abete<sup>3</sup> PhD, JA Martínez<sup>1,2</sup> PhD, A. Lopez de Munain<sup>3,4,5,6,7</sup> MD.

1 Department of Nutrition, Food Sciences and Physiology. University of Navarra, Pamplona, Spain.

2 CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Spain

3 Neuroscience Area, Institute Biodonostia, Donostia-San Sebastian, Spain

4 Department of Neurology Hospital Universitario Donostia, Donostia-San Sebastian, Spain

5 Department of Neurology. Neurovascular Unit. Hospital Universitario Donostia, Donostia-San Sebastian, Spain

6 CIBERNED (Ministry of Economy and Competitiveness, Institute Carlos III, Spain)

7 Department of Neurosciences. University of Basque Country UPV-EHU, San Sebastián, Spain

\* Both authors contributed equally to this work.

Running head: TNF $\alpha$  and PON methylation patterns in stroke

#Correspondence: PhD. Javier Campión Zabalza

E-mail address: [jcampion@unav.es](mailto:jcampion@unav.es)

Department of Nutrition, Food sciences and Physiology

University of Navarra

C/ Irunlarrea s/n Edif. Investigacion

Phone: 0034 948425600 ext. 806554

## ABSTRACT

Some causal bases of stroke remain unclear, but the nutritional effects on the epigenetic regulation of different genes may be involved. The aim was to assess the impact of epigenetic processes of human tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) and paraoxonase (PON) promoters in the susceptibility to stroke when considering body composition and dietary intake. Twenty-four patients (12 non-stroke/12 stroke) were matched by sex (12 male/12 female), age (mean: 70  $\pm$  12 y.o.) and BMI (12 normal-weight/12 obese; mean: 28.1  $\pm$  6.7 kg/m<sup>2</sup>). Blood cell DNA was isolated and DNA methylation levels of TNF $\alpha$  (-186 to +349 bp) and PON (-231 to +250 bp) promoters were analyzed by the Sequenom EpiTYPER approach. Histone modifications (H3K9ac and H3K4me3) were analyzed also by chromatin immunoprecipitation in a region of TNF $\alpha$  (-297 to -185). Total TNF $\alpha$  promoter methylation was lower in stroke patients ( $p < 0.001$ ) and showed no interaction with body composition ( $p = 0.807$ ). TNF $\alpha$  and PON total methylation levels correlated each other ( $r = 0.44$ ;  $p = 0.031$ ), especially in stroke patients ( $r = 0.72$ ;  $p = 0.008$ ). The +309 CpG methylation site from TNF $\alpha$  promoter was related to body weight ( $p = 0.027$ ) and the region containing three CpGs (from -170 to -162 bp) to the percentage of lipid intake and dietary indexes ( $p < 0.05$ ) in non-stroke patients. The methylation of PON +15 and +241 CpGs was related to body weight ( $p = 0.021$ ), waist circumference ( $p = 0.020$ ) and energy intake ( $p = 0.018$ ), whereas +214 was associated to the quality of the diet ( $p < 0.05$ ) in non-stroke patients. When comparing stroke vs non-stroke patients regarding the histone modifications analyzed at TNF $\alpha$  promoter, no changes were found, although a significant association was identified between circulating TNF $\alpha$  level and H3K9ac with H3K4me3. TNF $\alpha$  and PON promoter methylation levels could be involved in the susceptibility to stroke and obesity outcome, respectively. The dietary intake and body composition may influence this epigenetic regulation in non-stroke patients.

Keyword: DNA methylation, histones modifications, cerebrovascular accident, body composition, food habits, and biomarkers.

## **1. INTRODUCTION**

Stroke is the leading neurologic cause of death and disability, with hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, and smoking habit as the main risk factors for stroke [43]. Although the impact of obesity on the incidence of the first episode of stroke is controversial [10], visceral adiposity seems to be associated with an increased risk of stroke [5].

Genome-wide association studies, suggest that the risk of stroke has a substantial genetic component and numerous epidemiologic studies support the notion that occurs at the interface between genes and environment [22]. However, the genetic risk of ischemic stroke in obese subjects is not well characterized. Therefore, knowledge of the genetic component in the common forms of stroke, along with the influence of obesity-related environmental factors, such as dietary components and energy intake, would provide a powerful opportunity to find out new genes and genetic pathways involved in the incidence and pathogenesis of the disease, and for the future design of personalized preventive strategies [5]. In other terms, in the last few years a great deal of research has been carried out into the links between diet and stroke [26]. Apart from the known relationship between salt intake and increasing blood pressure in the risk of stroke development, other research works have shown that low levels of folic acid, vitamin B6 and vitamin B12 in the diet are directly linked to high levels of homocysteine, which might lead to an increased risk of stroke [9]. A number of large-scale studies have shown that people who eat a diet rich in fruit and vegetables have a lower risk of stroke [10]. As previously mentioned, obesity and stroke are heterogenic diseases resulting from the interaction between genes and environment. The multiple genes involved in each disease may be modified by posttranscriptional factors, which are influenced by other genes or exogenous factors, or by the interaction between gene expression regulators (microRNA) and environmental factors [15]. The modifications of the activation of these genes, but not the basic structure of DNA, constitute the molecular basis of epigenetics [41]. Several types of epigenetic inheritance systems may play a role in these diseases, such as DNA methylation and chromatin remodelling. As reported by

Hwang et al [18], DNA methylation is important for controlling gene expression in patients with stroke. In that work, DNA hypermethylation reduced Dnmt1 levels, one of the key enzymes implicated in DNA methylation processes, and protected from cerebral ischemia in ischemic mice. Regarding body weight control, TNF $\alpha$  promoter methylation has been reported to be implicated in weight regulation in obese patients [7]. However, few studies describing the influence of these epigenetic modifications in relation to stroke have been published [13] and virtually none taking into account obesity or dietary intake.

On the other hand, the term chromatin remodeling encompasses a wide variety of changes in chromatin structure that can be defined as a discernible change in histone–DNA contacts. An important enzymatic mechanism for altering chromatin structure involves the covalent modification of histones [50]. There are over 60 different residues on histones whose modifications, including acetylation, methylation, phosphorylation, or ubiquitination, are able to regulate gene transcription. Many stimuli can activate histone acetylation and methylation, such as inflammation (including TNF alpha), oxidative stress, hypoxia, or glucose availability [18]. In this sense, histone hypoacetylation and transcriptional dysfunction have been identified in a large number of neurological diseases, including ischemic and hemorrhagic stroke [6]. Thus, as Qureshi et al suggest [40], understanding these mechanisms may be important for discovering more sensitive and specific biomarkers for risk, onset, and progression of stroke.

Thus, the main aim of the study was to analyze the impact of epigenetic modifications related with obesity and dietary composition and their relationship with stroke, along with the evaluation of epigenetic biomarkers and the gene-nutrient/diet interactions that confer susceptibility to stroke.

## **2. RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **2.1. Subjects**

The study consists on a case-control design. Cases (n=12) were selected from the Neurology Service of Donostia Hospital, with a first episode of parenchymal ischemic stroke, evaluated by a neurologist in the first 24 hours of the onset of symptoms.



Etiology was defined according to the TOAST criteria (Trial of Org 10172 in AcuteStroke Treatment), after completion of a minimum number of diagnostic tests. The control group (n=12) was constituted by non-vascular neurological disorder patients. In all cases, patients from the control group were matched by sex and age with patients with stroke, including 6 obese and 6 non-obese subjects in each of the case-control groups, and matching also by body mass index (BMI). The inclusion criteria for all patients and controls were age lower than 80 years old and the exclusion criteria were to present a prior history of neurovascular disorder, physical or sensorial impairment to answer and stroke risk factors that could interfered the outcome of the study such as hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, cardiopathy, smoking habit and pharmacological treatments.

After a detailed explanation of the study, a written informed acceptance was obtained from all participants or by a direct familiar in the case of severe disability, before the beginning of the trial, in agreement with the Helsinki Declaration. The study protocol and informed consent document were approved by the Medical Ethical Committee.

## 2.2. Anthropometrical measurements and body composition

Anthropometric measurements were performed following standard procedures [15]. Body weight (BW) and height were measured using a digital balance accurate and a wall-mounted stadiometer (Fazzini S7300HR SRL, Vimodrone, Italia). Measurements were carried out in underwear after an overnight fast. The waist circumference (WC) was measured at the site of the smallest circumference between the rib cage and the iliac crest. Body composition was measured by bioelectric impedance (Quadscan 1500, Bodystat, Isle of Man, UK), based on a previously described procedure [15]. Blood pressure was assessed with a standard mercury sphygmomanometer after at least 5 minutes of rest in a sitting position (Heinne Gamma G5, Germany) according to the World Health Organization criteria. The mean of 3 measurements of systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures was calculated and used in the analysis.

## 2.3. Dietary intake and nutritional index assessment

Habitual diet was assessed with a semi-quantitative food-frequency questionnaire (FFQ) previously validated in Spanish population for energy and nutrient intake [29,37] and subsequently applied in many further investigations involving nutritional epidemiology studies [1,28]. Each item in the questionnaire included a typical portion size. For each food item, daily food consumption was estimated after multiplying the portion size by the consumption frequency. Nutrient composition of the food items was derived from accepted Spanish food composition tables [34,39,51]. In order to cover a wider spectrum, several nutritional indexes were calculated. The Mediterranean Diet Quality Index (MDQI) was obtained regarding the Mediterranean Diet. Likewise, different indexes were computed considering non-Mediterranean hypothesis-oriented dietary patterns, the Healthy Eating Index (HEI), the Alternate Healthy Eating Index (AHEI), the Diet Quality Index (DQI) and the Diet Quality Index-International (DQII), as previously described [33].

#### 2.4. DNA methylation analysis

DNA was extracted from total blood cells using the salting-out protocol as previously described [23]. DNA was modified by using a bisulfite treatment kit (Epitect, Qiagen, Hilden, Germany), and the human TNF-alpha and PON promoter regions were amplified. CpGs were selected for their differential methylation relevance, 19 CpGs sites from the TNFalpha promoter (-186 to +349 bp) and 22 sites from the PON promoter (-231 to +250 bp). These regions were analyzed by the Sequenom EpiTYPER approach, which employs base specific cleavage followed by MALDI-TOF mass spectrometry, as previously validated and published [7,11].

#### 2.5 Chromatin immunoprecipitation assay analyses

Nuclei were cross-linked (1% formaldehyde for 10 min) and, after lysing and shearing, chromatin was immunoprecipitated (ChIP IT express, Active Motif, Carlsbad, USA) with antibodies against H3K4me3, H3K9ac and non-specific IgG (Abcam, Cambridge, UK). Bound and input fractions were analyzed by quantitative real time PCR using the primers: TNF-alpha Forward 5'-CAGCCTCCAGGGTCCTAC3' and TNF-alpha Reverse 5'-GGGGACACACAAGCT3'; GAPDH Forward 5' TCGACAGTCAGCCGCATCT3' and GAPDH Reverse 5'-CTAGCCTCCCGGGTTTCTCT3'. The following cycling conditions were used:

10 min at 95°C 40 cycles at 95°C for 15s and 62° 1 min. Data were analyzed by  $\Delta\Delta C_t$  method, and reported as fold enrichment of immunoprecipitated DNA from each sample relative to the DNA immunoprecipitated with the non-specific antibody, and were plotted in a scale in which the final value of IgG was arbitrarily set to 1.

## 2.6. Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov and the Shapiro-Wilk tests were used to determine variable distribution. Analyses of comparisons between groups were undertaken by Student t test or U-Mann-Whitney test for parametric or non-parametrical variables, respectively. Spearman's correlation coefficient was calculated to determine relationships between variables. A lineal regression analysis was used to evaluate the effect of stroke diagnosis on methylation levels and adjusted for potential confounding factors. Differences in the diagnosis groups and potential interaction between body composition and total gene promoter methylations were analysed by factorial ANCOVA. A logistic regression analysis was applied to assess the potential relationship between the promoter methylation markers and stroke or obesity condition and considering the dietary intake. The median cut-off criteria (values above and below the 50th percentile) were used to classify as dichotomous variable the baseline TNF $\alpha$  and PON total methylation levels.

Results are reported as mean  $\pm$  SD, while the two-sided statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were carried out using the SPSS 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## 3. RESULTS

Clinical and anthropometric characteristics along with the dietary intake of the study patients are reported in Table 1. In order to control the heterogeneity between groups, both diagnosis groups were matched by gender, age and BMI and did not present clinical complications. The percentage of fat mass, fasting glucose and SBP tended to be higher in stroke patients ( $p < 0.100$ ), showing no differences in the rest of anthropometrical variables.

**Table 1:** Clinical characteristics, anthropometrical variables and dietary intake and quality of the study population. Patients were matched by sex, age and BMI.

	Stroke (n=12)	Non-stroke (n=12)	p value *
Gender (M/F)	6 / 6	6 / 6	
Age (y.o)	71.8 ± 11.7	72.4 ± 11.8	0.759
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.1 ± 5.9	28.2 ± 7.7	0.976
Weight (kg)	77.6 ± 18.6	72.2 ± 22.8	0.527
WC (cm)	99.8 ± 17.9	96.0 ± 16.8	0.594
Fat mass (%)	40.9 ± 7.1	34.3 ± 10.7	0.086
Water (%)	49.0 ± 7.8	51.0 ± 7.3	0.535
Fasting glucose (mg/dl)	104.2 ± 32.3	90.4 ± 24.7	0.054
SBP (mmHg)	159 ± 33	138 ± 18	0.080
DBP (mmHg)	86 ± 13	79 ± 6	0.154
Dietary intake			
Energy (kcal/day) #	2818 ± 680	2378 ± 542	0.093
Carbohydrates (%)	40.7 ± 7.9	44.8 ± 4.3	0.126
Protein (%) #	20.9 ± 7.4	16.5 ± 2.2	0.074
Lipids (%)	35.3 ± 3.7	36.5 ± 5.2	0.528
PUFA (g/day)	20.6 ± 7.3	15.9 ± 4.8	0.076
MUFA (g/day)	47.9 ± 10.3	46.0 ± 12.1	0.682
SFA (g/day)	35.3 ± 8.1	26.9 ± 7.0	0.013*
Quality of diet			
HEI	67.8 ± 10.5	68.4 ± 9.1	0.880
MDQI	6.2 ± 2.1	5.9 ± 1.4	0.736
DQI	9.2 ± 1.6	8.7 ± 1.4	0.489
AHEI	40.8 ± 11.8	43.5 ± 8.7	0.526

Abbreviations: AHEI: Alternate Healthy Eating Index; BMI, body mass index; DQI: Diet Quality Index; DQII: Diet Quality Index-International; HEI: Healthy Eating Index; MDQI: Mediterranean Diet Quality Index; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; WC, waist circumference.

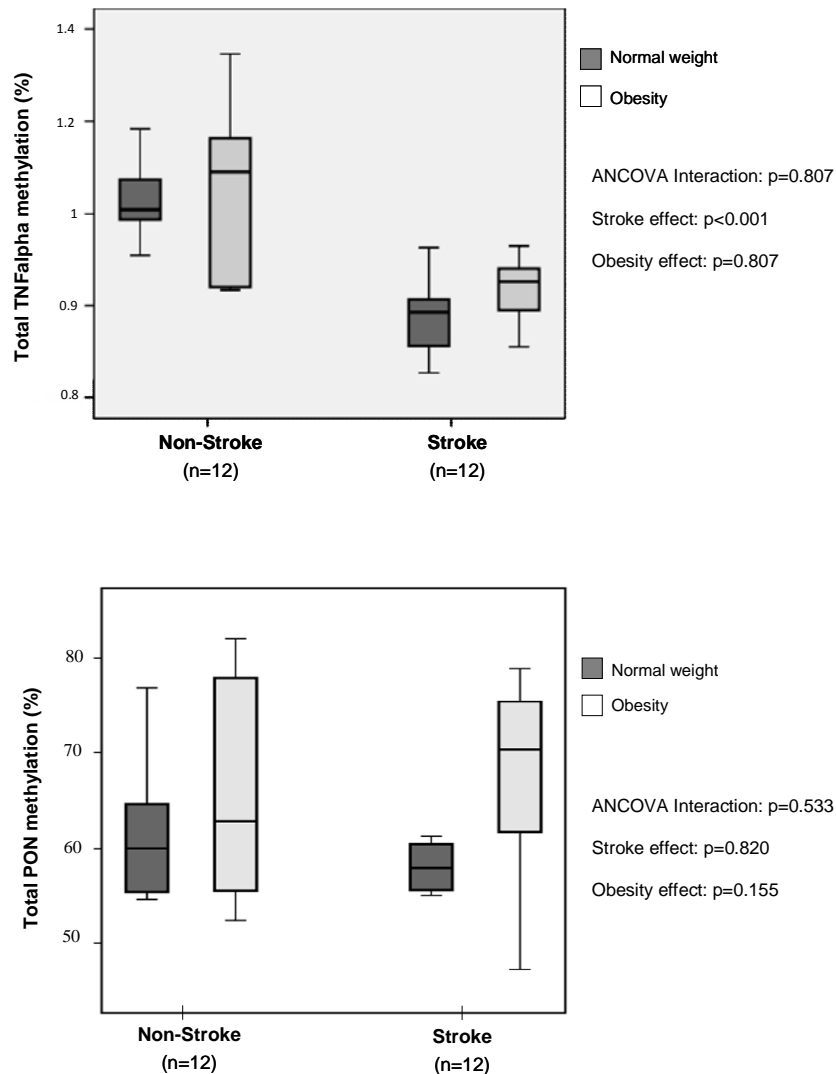
\* p value for comparison among two diagnosis groups by student t test.

# Non parametrical variables. p value is obtained by Mann-Whitney U test.

With respect to the dietary intake, the percentage of energy and protein intake, as well as the polyunsaturated fatty acid (PUFA) intake tended to be higher in stroke patients and the saturated fatty acid (SFA) intake was significantly higher in the same group

( $p=0.013$ ). The quality of the diet at baseline, as assessed by the nutritional indexes was not different between both groups ( $p>0.05$ ).

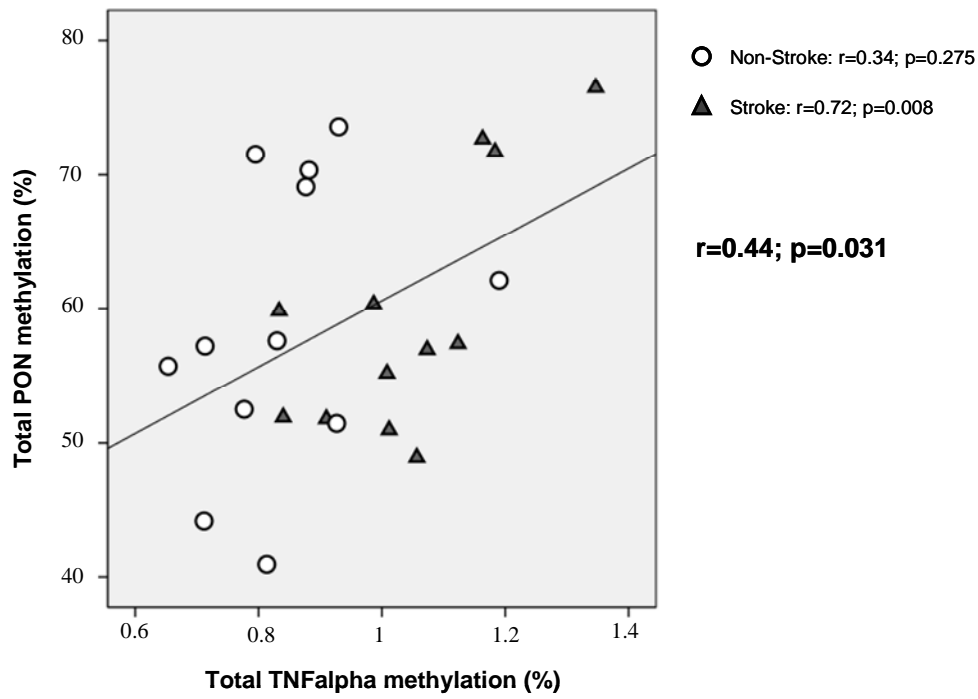
Total *TNF- $\alpha$*  promoter methylation was lower in stroke patients ( $p<0.001$ ), showing no differences due to body composition ( $p=0.807$ ). No relevant changes were observed in the *PON* total methylation patterns (%) considering stroke or obesity conditions (Figure 1).



**Figure 1:** Total methylation patterns (%) of tumor necrosis factor alpha (*TNF- $\alpha$* ) and paraoxonase (*PON*) gene promoters according to stroke diagnosis criteria and considering the body composition.

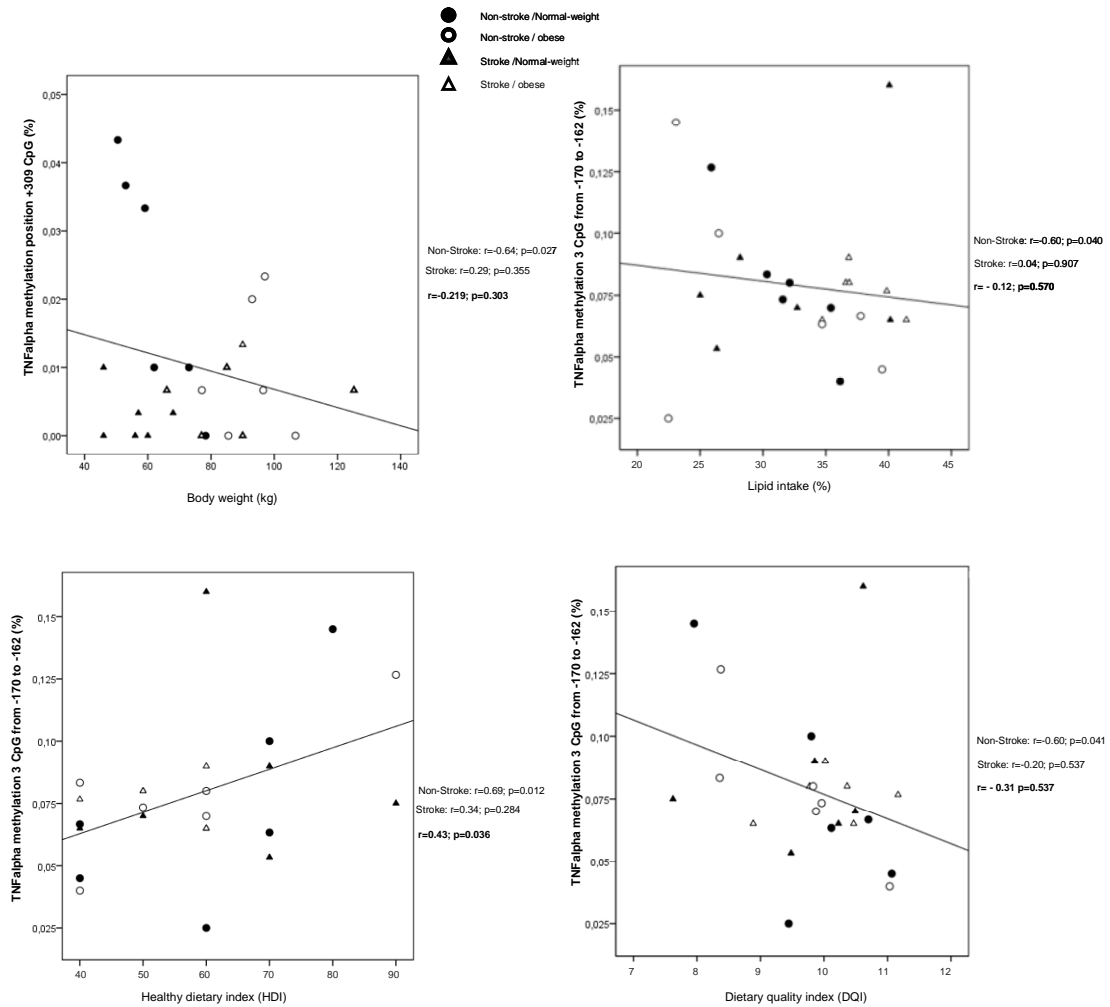
Both gene total promoter methylation patterns (%) strongly correlated each other, especially in the group of patients with stroke (Figure 2). In fact, a lineal regression analysis confirmed the relation of both methylation patterns ( $r^2=0.54$ ;  $p<0.001$ ), which

was mainly due to the stroke diagnosis ( $p=0.001$ ) rather than to the body composition impact ( $p=0.488$ ).



**Figure 2:** Association between total methylation patterns (%) of tumor necrosis factor alpha (*TNF- $\alpha$* ) and paraoxonase (*PON*) gene promoters considering the stroke condition ( $n=24$ ).

The association of different CpG methylation patterns of both genes were then analysed depending on anthropometrical and nutritional variables and concerning the stroke diagnosis criteria and depending on obesity condition. With respect to the *TNF- $\alpha$*  CpG methylation patterns, the healthy dietary index (HEI) correlated with the *TNF- $\alpha$*  methylation in the region containing three CpGs from -170 to -162 bp in all patients ( $r=0.43$ ;  $p=0.036$ ), but especially in non-stroke patients ( $r=0.69$ ;  $p=0.012$ ). No other associations were observed in the whole cohort ( $p>0.05$ ). However, in non-stroke patients and independently of the body composition, the *TNF- $\alpha$*  methylation at +309 bp was related to BW and the region from -170 to -162 bp to the % of lipid intake and dietary quality index (DQI) (Figure 3).

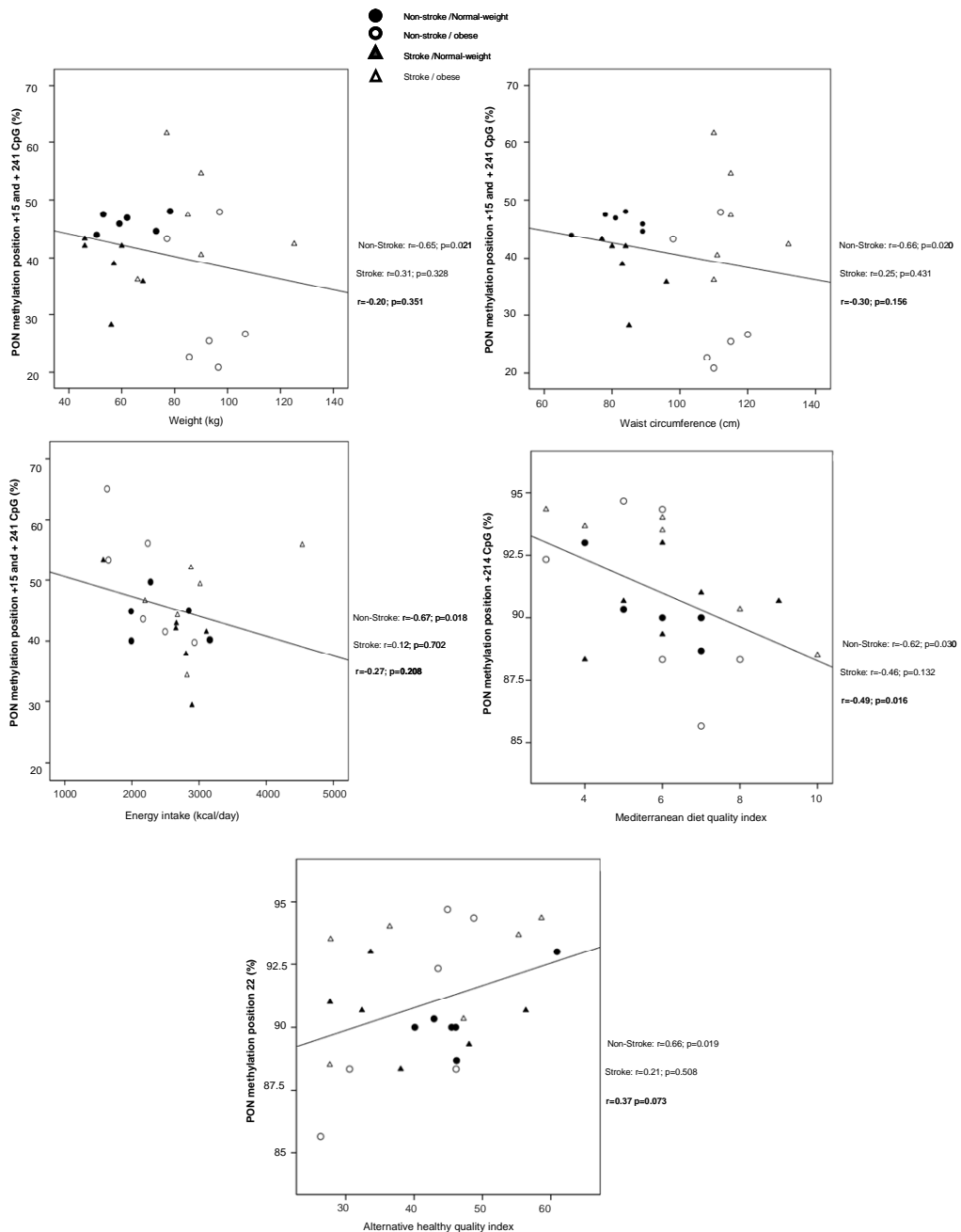


**Figure 3:** Association between different CpG methylation patterns (%) of tumor necrosis factor alpha (*TNF- $\alpha$* ) promoter and body weight and dietary composition (% of lipid intake) and quality (Healthy Dietary Index and Dietary Quality Index) when considering the body composition and stroke diagnosis criteria.

With respect to the *PON* methylation patterns, the CpG at +214 bp was related to the Mediterranean diet quality index (MDQI) and tended to be associated with alternative healthy quality index (AHEI) in the whole cohort, especially due to the non-stroke patients (Figure 4). Other CpGs, the +15 bp and +241bp in *PON* promoter, were related to weight, waist circumference and energy intake in the group of patients without stroke ( $p<0.05$ ). No other associations were observed between *TNF- $\alpha$*  and *PON* methylation patterns, body composition, and dietary patterns in stroke patients (Figure 3 and 4).

In order to search epigenetic biomarkers a logistic regression analysis was carried out, considering the stroke or obesity diagnosis criteria as dependent variable and *TNF- $\alpha$*  and

*PON* promoter methylation as dichotomous variables and considering the dietary composition. Thus, higher *PON* total promoter methylation values (median: 0.571) were predictors of the obesity condition (OR: 6.1; IC95%: 1.0-35.4;  $p=0.048$ ).



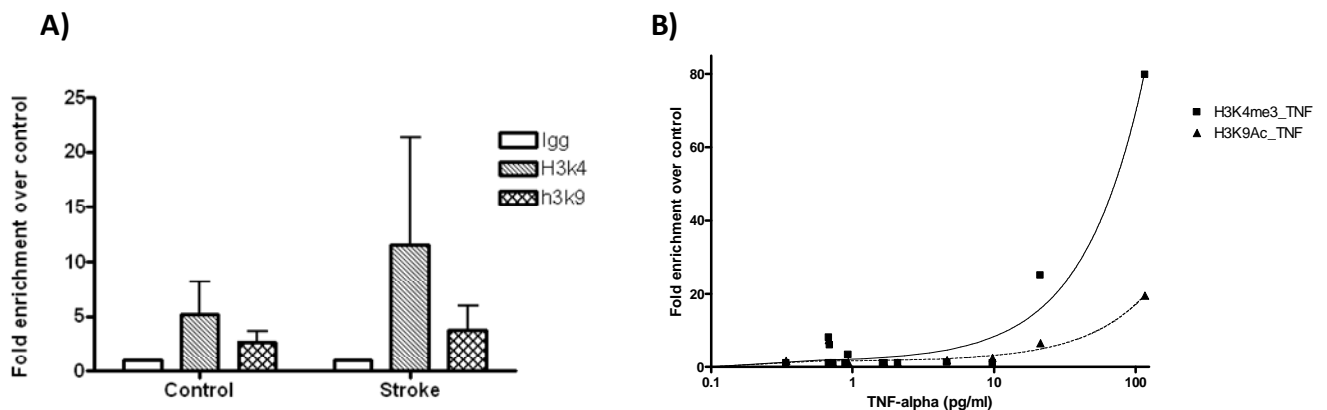
**Figure 4:** Association between different CpG methylation patterns (%) of paraoxonase (*PON*) gene promoter and body composition and dietary intake (energy intake) and quality (Mediterranean Quality Index and Alternative Healthy Quality Index) when considering the body composition and stroke diagnosis criteria.

An interaction was observed between the energy intake and total *PON* promoter methylation in the prediction of stroke condition ( $p=0.017$ ). On the other hand, lower



values of total *TNF- $\alpha$*  promoter methylation, using the median value as cut off (median: 0.918) appeared as a potential predictor of stroke diagnosis (OR: 9.0; IC95%: 1.4-57.1;  $p=0.020$ ).

With respect to the study by ChIP analysis of the histone modifications (acetylation at lysine 9 and trimethylatyon at lysine 4, both signals of activation of the transcription) of a downstream region of *TNF- $\alpha$*  promoter (-297 to -185), GAPDH (-197 to -78) analysis was included in order to use as positive control of activated gene expression in these cells. As shown in figure 5, the binding of both antibodies was increased in both genes, in comparison to non-specific IgG antibody, indicating potential gene expression activation in these cells. This binding pattern of H3K4me3 and H3K9ac was similar when comparing non-stroke and stroke conditions, indicating that this epigenetic mechanism at *TNF- $\alpha$*  region is not apparently involved in the susceptibility to stroke. Moreover, in figure 5C, a significant non-linear fit curve comparing fold enrichment levels of *TNF- $\alpha$*  downstream region with H3K4me3 and H3K9ac and plasma levels of *TNF- $\alpha$*  is shown, indicating a positive association between histone modifications related with activated transcription in white cells and secretion of this cytokine in the blood, independently of the stroke condition.



**Figure 5:** ChIP analysis of the *TNF- $\alpha$*  promoter region. DNA from each group was immunoprecipitated in the absence or presence of the antibodies against H3K4me3 and H3K9ac and a non-specific antibody (IgG). Rt-PCR for each ChIP–DNA sample was performed for *TNF- $\alpha$*  and promoter region. Results are reported as fold enrichment of immunoprecipitated DNA from each sample relative to the DNA immunoprecipitated with the non-specific antibody, and were plotted in a scale in which the final value of IgG was arbitrarily set to 1. (A) ChIP analysis of *TNF- $\alpha$*  comparing non-stroke and stroke groups (B) Nonlinear regression study between fold enrichment over control (*TNF- $\alpha$* ) and blood *TNF- $\alpha$*  levels (pg/ml).

#### **4. DISCUSSION**

The investigation of those mechanisms concerning stroke development is a major issue that a number of research studies are trying to characterize and manage [48]. Some of the current research works are focused on genome-wide association studies, analysing multiple SNPs related to this disease [22]. However, the effect of the epigenetic modulation on stroke outcome has not been studied. Thus, for the first time, the present work investigates the influence of the methylation of TNF $\alpha$  and PON promoters in stroke outcome. Moreover, we further analyse this outcome considering the body composition of the patients, and the dietary intake and quality of the diet.

In order to dismiss possible heterogeneity between stroke and non-stroke patients, a case-control study was designed, matching by gender, age and BMI, as previously published [46]. Moreover, patients were selected with no other complications or drug treatment that could interfere with the aim of the study. In despite of the case-control design and the exclusion criteria, the percentage of fat mass, fasting glucose levels and SBP tended to be higher in the stroke patients, suggesting a higher risk associated to these patients, as expected by the disease onset. With respect to the dietary intake, those patients having a first episode of stroke tended to present higher energy intake, higher percentage of protein and PUFA intake, as well as higher SFA intake. These results suggest that the dietary intake could be a factor involved in the risk of stroke onset. Although we did not observe differences in specific nutrients or food composition (data not shown), previously published studies have described links between diet and stroke. Thus, low levels of folic acid, vitamin B6 and vitamin B12 in the diet might lead to an increased risk of stroke [26], whereas diets rich in fruit and vegetables could be associated to a lower risk of stroke [9]. In accordance with our results, other research works describe a higher risk of stroke in patients with high fat intake, especially SFA [26]. However, there are still conflicting results about this issue, highlighting a need for further investigation of these endpoints.

In addition, a big deal of research has reported relationship between gene polymorphism and the risk of stroke [22,33]. However, only few investigations have evaluated the link between the genetic predisposition and dietary intake or body composition in the risk of the disease [2], or the interaction between genes and

environment in stroke risk factors [24]. Moreover, different studies have analysed the impact of epigenetic modulation, such as those related to the methylation patterns in different diseases [18], but only few have investigated the impact on neurological diseases [3,47], and no one in relation to stroke and considering the dietary intake and body composition. Thus, the main aim of the present study was to analyse the impact of the epigenetic regulation of two gene promoters by cytosine methylation in the susceptibility to stroke and considering the body composition and dietary intake. We did select the promoter methylation of TNF $\alpha$  and PON, because of their previous implication in the onset and severity of stroke [35,45], obesity [44], abdominal adiposity [17] and related diseases [13].

We firstly observed that those patients with stroke presented lower total TNF promoter methylation as compared to the non-stroke patients. These findings support a putative role of epigenetic regulation in the control of TNF- $\alpha$  expression [12,38], in those patients suffering a stroke, as we recently reported for weight regulation [14]. A logistic regression analysis confirmed this association describing that lower values of total TNF $\alpha$  promoter methylation could be used as a potential predictor of stroke diagnosis. The present trial also describes for the first time that, independently of stroke condition and dietary intake, the PON total promoter methylation values are predictors of body composition. Concretely, those patients with obesity presented higher values of total PON methylation. Other researchers have previously described changes in the human PON activity depending on body composition [20,45]. A recent work showed that PON activity correlated positively with adiponectin and negatively with leptin [21], supporting a positive role in obesity. Our investigation confirms this outcome, concluding that higher PON methylation values could induce lower expression of PON in obese patients. Moreover, both gene promoter methylation levels appeared strongly related each other, especially in the group of patients with stroke, suggesting a possible conjoint effect on the disease onset. In this context, several research works showed the association between the PON activity and different proinflammatory cytokines, such as TNF $\alpha$  [16,21,44]. In contrast to other reports [8,19,21], we did not observe differences in the promoter methylation levels of both genes when considering age and gender.

With respect to the specific TNF $\alpha$  promoter methylation patterns and considering the diet and body composition, + 309 bp CpG was related to body weight and the region

including three CpGs from -170 to -162 bp to the dietary intake and quality in non-stroke patients. The association of dietary intake and epigenetic markers only in non-stroke patients suggested a putative role of epigenetic regulation in stroke, but independently of environmental factors. Moreover, the region from -170 to +359 bp was previously related with n-6 PUFA intake in women [17], furthermore women with higher truncal fat showed lower methylation levels of TNF $\alpha$  promoter in peripheral white blood cells and higher plasma TNF $\alpha$  concentrations suggesting that this region could be strongly implicated in the regulation of TNF $\alpha$  gene expression, and closely associated to the dietary composition [36].

Our study also revealed that several CpGs in the PON promoter were related to body composition (+15 bp and +241 bp) and to the dietary intake and quality (+214 bp). This relation was even more evident in the stroke patients group. The absence of associations in stroke patients supports a pivotal role of epigenetic regulation in stroke onset that is independent of the dietary intake or body composition, which could be added to the recently reported genetic predisposition for the risk of stroke [33].

On the other hand, the case-control design and the exclusion criteria, dismiss the heterogeneity of the studied groups and sustain a sufficient statistical power to obtain the outcome of the present study. Moreover, the number of patients studied is comparable to other works analyzing epigenetic modulation in different diseases [42], whereas the existence of significant differences suggests absence of statistical error type beta [49]. Nevertheless, it would be of interest to test the validity of this translational research in a larger replicate study.

The identification of epigenetic biomarkers is emerging as one of the most promising molecular strategies for early detection of disease [22]. In fact, DNA methylation profiles represent a more chemically and biologically stable source of molecular diagnostic information than RNA or most proteins [22]. This strategy may facilitate prognosis of the patient's treatment and constitutes a novel approach to apply for stroke management purposes. In this respect, this study suggests that TNF $\alpha$  and PON promoter methylation patterns could be considered as biomarkers, and that the epigenetic regulation of both genes expression in blood cells could be involved in the onset and response to stroke and obesity. In addition, the findings supporting a role to TNF $\alpha$  promoter methylation in stroke outcome and the PON methylation levels in

obesity may be helpful to understand the interaction between genes and environment in some cases.

Other epigenetic mechanisms, as for example histone modifications, could be involved in the regulation of body weight and cardiovascular diseases. Thus, some studies have uncovered that changes in histone modification are a key component of an epigenetic network controlling adipogenesis and energy homeostasis [25]. Recent data suggest that modification of histone H3 could be the link between proliferation action of butyrate and vascular smooth muscle cells that is an essential feature of vascular occlusive diseases such as atherosclerosis or hypertension [32,35]. Diabetic state also induced histone lysine methylation variations in human peripheral blood cells [30], suggesting an epigenetic role for histone H3K9me2 in the lymphocytes of type 1 diabetic patients [27,30,31]. In the results of this study suggest that neither H3K4me3 nor H3k9ac can be used as biomarkers of stroke or obesity. However, ChIP studies show that circulating TNF $\alpha$  levels are positively associated with an increase of histone H3K9 acetylation and H3K4 trimethylation in TNF $\alpha$  promoter in white blood cells from stroke patients, which could be interesting for disease therapy.

#### SUMMARY:

In summary, both TNF $\alpha$  and PON gene promoter methylation could be involved in the susceptibility to stroke and body composition, respectively and the dietary intake could influence the epigenetic regulation in non-stroke patients. This new approach will be useful to predict the stroke outcome and will be of interest to personalize the treatment based on epigenetic criteria and considering body composition.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** Authors wish to thank to all patients who volunteered to participate in this study.

**REFERENCES:**

1. Alcacera MA, Marques-Lopes I, Fajo-Pascual M, Foncillas JP, Carmona-Torre F, Martinez-Gonzalez MA (2008) Alcoholic beverage preference and dietary pattern in Spanish university graduates: the SUN cohort study. *Eur J Clin Nutr* 62:1178-1186
2. Anderson CD, Biffi A, Rost NS, Cortellini L, Furie KL, Rosand J (2010) Chromosome 9p21 in Ischemic Stroke. Population Structure and Meta-Analysis. *Stroke* 41:1123-1131.
3. Barrachina M, Ferrer I (2009) DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:880-891.
4. Bendavid C, Dubourg C, Pasquier L, Gicquel I, Le Gallou S, Mottier S et al. (2007) MLPA screening reveals novel subtelomeric rearrangements in holoprosencephaly. *Hum Mutat* 28:1189-1197.
5. Bodenat M, Kuulasmaa K, Wagner A, Kee F, Palmieri L, Ferrario MM et al. (2011) Measures of Abdominal Adiposity and the Risk of Stroke: The MONica Risk, Genetics, Archiving and Monograph (MORGAM) Study. *Stroke* 42:2872-2877
6. Campión J, Milagro F, Martínez JA (2010) Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 94:291-347
7. Campión J, Milagro FI, Goyenechea E, Martínez JÁ (2009) TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity* 17:1293-1297
8. Chmurzynska A (2010) Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutr Rev* 68:87-98
9. Chomistek AK, Manson JE, Stefanick ML, Lu B, Sands-Lincoln M, Going SB, Garcia L, Allison MA, Sims ST, LaMonte MJ, Johnson KC, Eaton CB (2013) Relationship of sedentary behavior and physical activity to incident cardiovascular disease: results from the Women's Health Initiative. *J Am Coll Cardiol* 11;61:2346-54
10. Curioni C, André C, Veras R. (2006) Weight reduction for primary prevention of stroke in adults with overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev* 18: CD006062
11. Docherty SJ, Davis OS, Haworth CM, Plomin R, Mill J (2009) Bisulfite-based epityping on pooled genomic DNA provides an accurate estimate of average group DNA methylation. *Epigenetics Chromatin* 2: 3.

12. El Gazzar M, Yoza BK, Hu JY, Cousart SL, McCall CE (2010) Epigenetic silencing of tumor necrosis factor alpha during endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 282: 26857-26864.
13. Garden GA (2013) Epigenetics and the modulation of neuroinflammation. *Neurotherapeutics* 10: 782-788
14. Gorelick PB, Sacco RL, Smith DB, Alberts M, Mustone-Alexander L, Rader D et al. (1999) Prevention of a first stroke: a review of guidelines and a multidisciplinary consensus statement from the National Stroke Association. *JAMA* 281: 1112-1120
15. Goyenechea E, Parra D, Crujeiras AB, Abete I, Martínez JA (2009) A nutrigenomic inflammation-related PBMC-based approach to predict the weight-loss regain in obese subjects. *Ann Nutr Metab* 54: 43-51.
16. Goyenechea E, Parra D, Martínez JA (2007) Impact of interleukin 6 -174G>C polymorphism on obesity-related metabolic disorders in people with excess in body weight. *Metabolism* 56: 1643-1648
17. Hermsdorf HH, Mansego ML, Campión J, Milagro FI, Zulet MA, Martínez JA (2013) TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: Relationship with circulating TNF $\alpha$ , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine*, 64: 265-71
18. Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin RS (2013) Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy. *Neuropsychopharmacology* ;38:167-82.
19. Kirsch-Volders M, Bonassi S, Herceg Z, Hirvonen A, Möller L, Phillips DH (2010) Gender-related differences in response to mutagens and carcinogens. *Mutagenesis*. 25:213-21.
20. Kotani K, Sakane N, Sano Y, Tsuzaki K, Matsuoka Y, Egawa K et al (2009) Changes on the physiological lactonase activity of serum paraoxonase 1 by a diet intervention for weight loss in healthy overweight and obese women. *J Clin Biochem Nutr* 45: 329-334.
21. Kumon Y, Nakauchi Y, Suehiro T, Shiinoki T, Tanimoto N, Inoue M et al (2002) Proinflammatory cytokines but not acute phase serum amyloid A or C-reactive protein, downregulate paraoxonase 1 (PON1) expression by HepG2 cells. *Amyloid* 9:160-164.

22. Laborde CM, Mourino-Alvarez L, Akerstrom F, Padiá LR, Vivanco F, Gil-Dones F, Barderas MG (2012) Potential blood biomarkers for stroke. *Expert Rev Proteomics* 9:437-49
23. Lachin JM (2005) A review of methods for futility stopping based on conditional power. *Stat Med* 24: 2747–2764.
24. Lai CQ, Parnell LD, Troen AM, Shen J, Caouette H, Warodomwicht D et al. (2010) MAT1A variants are associated with hypertension, stroke, and markers of DNA damage and are modulated by plasma vitamin B-6 and folate. *Am J Clin Nutr* 91:1377-1386.
25. Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev* 3:253-66.
26. Lanktree MB, Dichgans M, Hegele RA (2010) Advances in genomic analysis of stroke: what have we learned and where are we headed? *Stroke*. 41:825-832
27. Lv L, Tang YP, Han X, Wang X, Dong Q (2011) Therapeutic Application of Histone Deacetylase Inhibitors for Stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 11:138-149
28. Martínez-González MA, Sanchez-Villegas A, Faulin FJ (2006) *Bioestadística amigable*, 2ª Edit. Díaz-Santos.
29. Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S et al. (1993) Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* 22:512-519
30. Mathew OP, Ranganna K, Yatsu FM (2010) Butyrate, an HDAC inhibitor, stimulates interplay between different posttranslational modifications of histone H3 and differently alters G1-specific cell cycle proteins in vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother* 64:733-740.
31. Miao F, Smith D. D, Zhang L, Min A, Feng W, Natarajan R. (2008) Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9 dimethylation: an epigenetic study in diabetes. *Diabetes* 57:3189-3198.
32. Miao F, Wu X, Zhang L, Yuan Y. C, Riggs A. D, Natarajan R (2007) Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes. *J Biol Chem* 282:13854-13863.



33. Micha R, Mozaffarian D (2010) Saturated Fat and Cardiometabolic Risk Factors, Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes: a Fresh Look at the Evidence. *Lipids* 45:893-905.
34. Moreiras O, Carvajal A and Cabrera L (2009) "Tablas de composición de alimentos [Food composition tables]". Madrid: Pirámide.
35. Okamura M, Inagaki T, Tanaka T, Sakai J (2010) Role of histone methylation and demethylation in adipogenesis and obesity. *Organogenesis* 6:24-32.
36. Pereira TV, Rudnicki M, Franco RF, Pereira AC, Krieger JE (2007) Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: a meta-analysis. *Am Heart J* 153:821-830.
37. Pérez S, Parra MD, Martínez de Morentin B, Rodríguez MC, Martínez JA (2005) Evaluación de la variabilidad intraindividual de la medida de composición corporal mediante bioimpedancia en voluntarias sanas y su relación con el índice de masa corporal y el pliegue tricótipal. *Enferm Clin* 15: 307-314
38. Popa C, van Tits LJ, Barrera P, Lemmers HL, van den Hoogen FH, van Riel PL et al (2009) Anti-inflammatory therapy with tumour necrosis factor alpha inhibitors improves high-density lipoprotein cholesterol antioxidative capacity in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*.68:868-872.
39. Puchau B, Zulet MA, de Echávarri AG, Hermsdorff HH, Martínez JA (2010) Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. *Nutrition* 26: 534-541.
40. Qureshi IA, Mehler MF (2010) Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications. *Arch Neurol* 67:1316-1322
41. Rando OJ, Verstrepen KJ (2007) Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 128:655-668
42. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM et al. (2011) Heart disease and stroke statistic update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123:240
43. Ross OA, Meschia JF (2009) Genetics of ischemic stroke: inheritance of a sporadic disorder. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9:19-27.

44. Seres I, Bajnok L, Harangi M, Sztanek F, Koncsos P, Paragh G (2010) Alteration of PON1 Activity in Adult and Childhood Obesity and Its Relation to Adipokine Levels. *Adv Exp Med Biol* 660:129-42.
45. Shin BS, Oh SY, Kim YS, Kim KW (2008) The paraoxonase gene polymorphism in stroke patients and lipid profile. *Acta Neurol Scand* 117:237-243.
46. Timpson NJ, Harbord R, Davey Smith G, Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (2009) Does greater adiposity increase blood pressure and hypertension risk?: Mendelian randomization using the FTO/MC4R genotype. *Hypertension* 54:84-90.
47. Urdinguio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M (2009) Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 8:1056-1072.
48. Wang X, Cheng S, Brophy VH, Erlich HA, Mannhalter C, Berger K et al (2009) A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients. *Stroke* 40 :683-695.
49. Wang Z, Leng Y, Tsai LK, Leeds P, Chuang DM (2011) Valproic acid attenuates blood-brain barrier disruption in a rat model of transient focal cerebral ischemia: the roles of HDAC and MMP-9 inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:52-57
50. Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Goto M, Higashi M, Nomoto M, et al (2010) Expression of MUC5AC, an early marker of pancreatobiliary cancer, is regulated by DNA methylation in the distal promoter region in cancer cells. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 17:844-854.
51. Zulet MA, Puchau B, Hermsdorff HH, Navarro C, Martínez JA (2009) Dietary selenium intake is negatively associated with serum sialic acid and metabolic syndrome features in healthy young adults. *Nutr Re* 29: 41-48

**Capítulo 2: Epigenomic approach for the search of stroke and obesity biomarkers: *KCNQ1* shows differential methylation depending of clinical conditions**



## **Epigenomic approach for the search of stroke and obesity biomarkers: *KCNQ1* shows differential methylation depending of clinical conditions**

Gómez-Úriz AM; Milagro FI; Mansego ML; Cordero P; Abete I; de Arce A; Goyenechea E; Blázquez V; Martínez-Zabaleta M; Martínez JA; López de Munain A; Campión J.

### **Resumen**

La obesidad e ictus son patologías multifactoriales lo que conduce a que sea difícil su estudio. La epigenética se ha mostrado en los últimos años como una herramienta útil para la comprensión de la regulación de estas enfermedades. Los objetivos de este estudio fueron, la descripción de genes seleccionados, que presenten una posible regulación epigenética diferencial en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico y, determinar la importancia de algunas regiones de estos genes en diferentes procesos biológicos mediados por el IMC. Se diseñó un estudio de casos y controles utilizando dos poblaciones. Los casos habían sufrido un accidente cerebrovascular isquémico. La primera población estuvo formada por 24 voluntarios (12 casos/ 12 controles) pareados por edad, sexo e IMC (12 normopesos/ 12 obesos). La segunda población incluyó 60 casos y 55 controles y se clasificaron según el IMC (24 normopesos/ 46 sobrepesos/ 45 obesos). El ADN de las células sanguíneas se aisló a partir de muestras de los 24 pacientes y se realizó un *array* de metilación. Con el fin de validar el *array*, se realizó un estudio mediante *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, R. El análisis del *array* mostró 80 sitios CpG metilados diferencialmente en pacientes con accidente cerebrovascular, 96 sitios CpG fueron diferentes en obesos y 59 sitios CpG presentaron interacción entre la obesidad y el accidente cerebrovascular (difbeta >5%, p <0,05). Después de validar algunos de los CpGs diferencialmente metilados, la región promotora del gen *PM20D1* muestra una hipermetilación significativa en pacientes con accidente cerebrovascular (p = 0,035). Por otra parte, un sitio CpG en el promotor del gen *CALD1* se observó una hipometilación por el accidente cerebrovascular y en el caso de pacientes obesos (interacción, p = 0,007). Los sitios CpG analizados en las regiones seleccionadas de los genes *WT1* y *KCNQ1*, presentaron una hipermetilación en pacientes obesos (p = 0,015 y p = 0,026). En la población de validación, *KCNQ1* mostró una hipermetilación de los pacientes obesos en comparación con los no obesos. Finalmente

se realizó una validación por otra técnica (*Methylation-sensitive high resolution melting*) para corroborar los resultados obtenidos. Dos sitios CpG de la misma region estudiada previamente del gen *KCNQ1* presentaron cambios. Uno de ellos causados por la obesidad y en el otro sitio CpG presentando una interacción entre ambas patologías ( $p>0.001$ ). En conclusión, la obesidad y sobrepeso causan cambios en los niveles de metilación de la región *KCNQ1* estudiada, en ambas poblaciones. Estas modificaciones están reguladas por una situación de accidente cerebrovascular isquémico. Las diferencias se traducen en cambios fenotípicos en la secreción de *KCNQ1* en el accidente cerebrovascular y la obesidad sin presentar una interacción.

**Epigenomic approach for the search of stroke and obesity biomarkers:  
*KCNQ1* shows differential methylation depending of clinical conditions**

Gómez-Úriz AM<sup>1</sup>; Milagro FI<sup>1,2</sup>; Mansego ML<sup>1,2</sup>; Cordero P<sup>1</sup>; Abete I<sup>3</sup>; de Arce A<sup>4,5</sup>; Goyenechea E<sup>3</sup>; Blázquez V<sup>3</sup>; Martínez-Zabaleta M<sup>4,5,7</sup>; Martínez JA<sup>1,2</sup>; López de Munain A<sup>3,4,6,7</sup>; Campión J<sup>1,2</sup>.

1 Department of Nutrition, Food Sciences and Physiology. University of Navarra, Pamplona, Spain.

2 CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Spain

3 Neuroscience Area, Institute Biodonostia, Donostia-San Sebastian, Spain

4 Department of Neurology Hospital Universitario Donostia, Donostia-San Sebastian, Spain

5 Department of Neurology. Neurovascular Unit. Hospital Universitario Donostia, Donostia-San Sebastian, Spain

6 CIBERNED (Ministry of Economy and Competitiveness, Institute Carlos III, Spain)

7 Department of Neurosciences. University of Basque Country UPV-EHU, San Sebastián, Spain

#Correspondence: PhD. Javier Campión Zabalza

E-mail address: [jcampion@unav.es](mailto:jcampion@unav.es)

Department of Nutrition, Food sciences and Physiology

University of Navarra

C/ Irunlarrea s/n Edif. Investigacion

Phone: 0034 948425600 ext. 806554

**ABSTRACT**

Obesity and stroke are multifactorial pathologies including genetic and lifestyle factors. Epigenetic processes could be involved in the regulation of these diseases. The main goals of this study were to describe of candidate genes with differential epigenetic regulation in patients with ischemic stroke and, to determine the importance of some regions of these candidate genes in different biological processes mediated by BMI. A case-control study using two populations was designed. The first population consisted of 24 volunteers (12 cases/12 controls) matched by age, sex and BMI (12 normalweight/12 obese). The second population included 60 cases and 55 controls that were classified by BMI (24 normalweight/ 46 overweight/ 45 obese). Blood cell DNA isolated from the 24 patients of the first population was analyzed with a methylation array (Illumina Methylation 27 BeadChip array). The array analysis showed 80 CpG sites differentially methylated in stroke patients, 96 CpG sites in obese and 59 CpG sites presented interaction between obesity and stroke (diftbeta>5%,  $p<0.05$ ). After validating some of the differentially methylated CpGs by *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, the promoter region of *PM20D1* gene showed a significant hypermethylation in stroke patients ( $p=0.035$ ). Moreover, a CpG site at *CALD1* gene promoter was hypomethylated by stroke and hypermethylated in obese case patients (interaction,  $p=0.007$ ). *WT1* and *KCNQ1* CpG sites presented a hypermethylation in obese patients ( $p=0.015$ ;  $p=0.026$ ). In the second population *KCNQ1* was hypermethylated in the obese patients compared to the non-obese. Finally a validation by Methylation-sensitive high resolution melting approach, in the second population, corroborated changes in two CpG sites in the same region of *KCNQ1* in obese patients and changes with interaction ( $p<0.001$ ). In conclusion obesity and overweight cause changes in the methylation levels of the *KCNQ1* studied region, in both populations. These changes are regulated by ischemic stroke situation. These modifications translate into changes at phenotypic in the secretion of the protein in stroke and obesity without interaction. In conclusion, epigenetic marks produced by and ischemic stroke are mediated by the previous obesogénico state. These changes in DNA methylation could be a potential biomarker in acute stroke in the future.

**Key words:** BMI, ischemic accident, epigenetics, DNA methylation, CpG site, mRNA.



## **INTRODUCTION**

Obesity is defined as excessive adiposity in relation to lean body mass, which may involve both altered body fat distribution throughout the body and enlarged adipose depot size (Marti, 2008). Excessive fat accumulation is associated with increased expression of genes related to inflammation, oxidative stress or immune response in adipose tissue and white blood cells (Abete 2009, Hermsdorff 2010, Giordano 2013, Inzaugarat 2013).

Ischemic stroke results from the occlusion of an afferent blood vessel and the subsequent reduction of the blood and oxygen supply to the affected brain regions. It accounts for roughly 80% of all clinical strokes (Kovalchu 2012). As for cerebrovascular diseases, stroke, either ischemic or hemorrhagic, represents the second most common cause of death worldwide and is the leading cause of long-term and permanent disability (Strong 2007, Lloyd-Jones 2009). There are many factors risk of stroke such as smoke habit, sedentarism, raised blood pressure, raised cholesterol, LDL cholesterol and obesity (Strong 2007, Gulsvik 2012, Xu 2013, Teo 2013). Besides modifiable risk factors, genetics may contribute to increase susceptibility to suffered from both obesity and stroke. However classic genetics cannot explain the diversity of phenotypes within population disorders such as obesity or stroke (Abete 2012, Fox 2013, Stepanyan 2013). There are certain environmental factors that seem to interact with gene sequence to increase the odds of the disorders (Rankinen 2006). In this sense, epigenetic could explain at least in part this genetic heterogeneity. Epigenetic is defined as stable and heritable patterns of gene expression and genome function that do not involve changes in DNA sequence (Feinberg 2007). The best-known epigenetic mechanism is DNA methylation. DNA methylation is a long-term, fairly stable epigenetic modification that consists in the covalent binding of a methyl group to the 5' carbon of cytosine mostly occurring at CpG dinucleotide sequences in the mammalian genome (Feinberg 2007). The main function of DNA methylation is to modulate the expression of the genetic information by modifying the accessibility of the transcriptional machinery to the DNA. There is increasing evidence that regulatory activity at the level of DNA methylation plays an integral part in the causation of human diseases, including cancer, diabetes, neuronal diseases and obesity (Esteller

2008). Recent studies had demonstrated that DNA methylation levels of TNF $\alpha$  gene promoter were associated with metabolic features (Hermsdorff 2013) and dietary response (Campion 2010, Cordero 2011). The involvement of epigenetic mechanisms in gene expression regulation of stroke-related genes has been also explored in recent human studies (Chen 2010). Furthermore, the role of neural cell reprogramming pathways regulated by epigenetic marks appears to hold important potential for possible innovative therapeutic approaches of brain damaged (Qureshi 2010). For this hypothesis some authors suggested that altering transcriptional regulation, epigenetic modifiers can exert an influence on all known pathways involved in the complex course of ischemic disease development (Schweizer 2013, Kalani 2013). Epigenetic analysis of white blood cells, easily accessible in humans, is a promising approach for diagnosing disease (Terry 2011). For example, it could help to predict the risk of age-related diseases, such as ischemic heart disease and stroke (Baccarelli 2010).

The two main goals of this study were, first, the description of genes with differential epigenetic regulation obtained by an omic approach in patients with ischemic stroke and, secondary, to determine the importance of some regions of these differential selected genes in different biological processes mediated by the BMI.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subjects**

The study consisted in a case-control design with two populations. In both populations, cases were selected from the Neurology Service of Hospital Donostia, with a first episode of ischemic stroke, evaluated in the first 24 hours for a neurologist of the onset of symptoms. National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) (Woo 1999) was passed to stroke patients at the time of hospital admission, in order to determine and measure neurologic deficits. The control groups were constituted by non-vascular neurological disorder patients that were matched by sex and age with the cases.

The screening population (SP) included 6 obese and 6 non-obese subjects in each group, matched also by body mass index (BMI) and waist circumference with cases. Non-obese groups were defined by a BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> and a waist circumference < 88 cm in women and < 92 cm in men. Obese groups included subjects with a BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> and a waist circumference > 88 cm in women and > 92 cm in men.

The validation population (VP) included 115 voluntaries. It was divided by BMI according to WHO classification in normal weight, overweight and obesity. Exclusion criteria were age lower than 50 years old and higher than 80 years old in both groups. In stroke groups, those patients having suffered a hemorrhagic stroke or another cerebro-vascular disease different to ischemic stroke were excluded. The control group did not include patients having suffered a vascular or neurological disorder.

A written informed acceptance was obtained from all participants or by a direct familiar in the case of severe disability, in agreement with the Helsinki Declaration. The study protocol and informed consent document were approved by the Medical Ethical Committee.

## **Measures**

For all voluntaries, anthropometric parameters were measured by standard methods. BMI was calculated as weight/height<sup>2</sup>. Peripheral blood samples were extracted in first visit in control volunteers and in the emergency service in the stroke patients. From peripheral blood, buffy coat and plasma were extracted and subsequently stored at - 80°C. DNA was extracted using the Qiagen Flexigen kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentrations were determined with a NanoDrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Glucose, total, HDL and LDL cholesterol, triglycerides and hemogram (leucocytes, neutrophyles, lymphocytes, monocytes, eosynophyles and basophiles) were analyzed with Pentra C-200 autoanalyser (HORIBA ABX, Madrid, Spain). Blood pressure was assessed according to the World Health Organization criteria (WHO 2004). Plasma concentration of KCNQ1 was quantified by a specific ELISA as described by the manufacturer (Cusabio, Hubei, China).

### **DNA methylation**

In order to identify candidate genes, 500 ng of DNA isolated from buffy coat of the SP (n=24) was analyzed by the Illumina Methylation 27 BeadChip array (Illumina, San Diego, CA, USA). Bisulfite modification of genomic DNA (500 ng for Illumina array and MALDI-TOF approaches) was carried out using the EZ DNA methylation kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. This array can analyze 27,578 CpG dinucleotides from 14,495 genes. For the validation of 15 CpG candidate sites ( $p < 0.050$ ;  $\Delta\text{met} > 5\%$ ) identified from the microarray were selected for validation of the DNA methylation levels were measured in SP by a MALDI-TOF mass spectrometry-based method, *Sequenom MassArray® EpiTyper™* approach (Sequenom, CA, USA) after designing specific primers. Those CpG sites positively correlated with the array and EpiTyper approach were selected for analysis with the VP. In order to validate the results of *Sequenom MassArray® EpiTyper™* approach in VP technique Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) was used to corroborate the results (Bruzzone 2013, Stefanska 2013).

### **Gene expression**

Perfect Pure RNA Blood Kit (5 Prime, Hamburg, Germany) was used for RNA isolation from white blood cells. DNase treatment was performed with a DNA-free™ kit (Applied Biosystems, Austin TX, USA), while cDNA was synthesized using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Quantitative real time PCR was performed following manufacturer's recommendations using ABI PRISM 7900 HT Fast Real-Time PCR System and pre-designed Taqman probes for human genes (Applied Biosystems, Austin TX, USA) (table 1). cDNA levels were normalized with two housekeeping genes: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Hs03929097\_g1) and 18s (Hs03003631\_g1) and

using Genorm Software. Fold changes between groups were calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### **Statistical analysis**

Illumina's Genome Studio program was used to analyze BeadArray data to assign site-specific DNA methylation values to each CpG site. The proportion of methylation (%) for each subject at each CpG site was computed by subtracting the background signal intensity of negative controls from both the methylated and unmethylated signals and then dividing the ratio of the methylated signal intensity by the sum of both methylated and unmethylated signals. Thus, the percentage value is a continuous variable ranging between 0 and 1. Array Statistical analysis was performed using with ArrayStudio. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Differences in the diagnosis groups and potential interaction between body composition and stroke were analysed by two-way ANOVA (obesity, stroke, obesity x stroke, or BMI, stroke and BMI x stroke), followed by a DMS test for multiple comparisons. A lineal regression analysis was performed to explain the variation of related variables. The associations were calculated with Pearson's correlation coefficient  $r$ . All analyses were performed with SPSS 15.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA);  $p$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

In order to analyze and classify this SP population, the individuals were matched by sex and age. Differences in anthropometric and biochemical parameters are shown in table 1.

**Table 1:** Differences (mean±SE) in anthropometric characteristics, and biochemical parameters in the four subgroups of the Screening Population (n=24).

	<u>Non obesity</u> <u>non stroke</u> (n=6)	<u>Non obesity</u> <u>Stroke</u> (n=6)	<u>Obesity</u> <u>non stroke</u> (n=6)	<u>Obesity</u> <u>Stroke</u> (n=6)	<u>ANOVA</u>		
					<u>Obesity</u>	<u>Stroke</u>	<u>Interaction</u>
Gender (Females/Males)	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3			
Age (years)	69.8 ± 6.9	74.6 ± 3.0	67.5 ± 5.8	66.5 ± 6.7	n.s.	n.s.	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.8 ± 2.0	22.5 ± 1.6	34.5 ± 3.4	33.4 ± 1.1	***	n.s.	n.s.
Waist circumference (cm)	83.3 ± 12.4	84.5 ± 4.0	111.3 ± 9.3	117.5 ± 12.4	***	n.s.	n.s.
NIHSS at admission		6.0 ± 4.6		4.8 ± 6.2		n.s.	
Glucose (mg/dl)	80.8 ± 39.7	97.2 ± 20.7	86.2 ± 21.1	143.3 ± 56.5	n.s.	*	n.s.
Systolic Blood Pressure (mm/hg)	131.6 ± 20.2	180.2 ± 20.2	145.4 ± 34.0	200.2 ± 25.0	*	*	n.s.
Dyastolic Blood Pressure (mm/hg)	80.0 ± 5.0	81.8 ± 19.3	83.0 ± 6.7	106.7 ± 16.3	n.s.	n.s.	n.s.
Total cholesterol (mg/dl)	214.8 ± 34.3	177.2 ± 28.9	200.4 ± 36.7	205.8 ± 37.3	n.s.	n.s.	n.s.
HDL cholesterol (mg/dl)	55.4 ± 11.6	60.7 ± 17.5	52.0 ± 10.0	37.0 ± 11.2	*	n.s.	n.s.
LDL cholesterol (mg/dl)	135.4 ± 28.2a	88.0 ± 27.3b	123.2 ± 25.8a	151.9 ± 40.1a	*	n.s.	*
Triglycerides (mg/dl)	119.0 ± 37.5a	86.2 ± 22.7b	125.8 ± 16.8a	164.0 ± 45.0a	n.s.	n.s.	*
Leucocytes (mil/mm <sup>3</sup> )	5.0 ± 0.8	8.3 ± 2.1	6.5 ± 1.7	7.4 ± 2.7	n.s.	*	n.s.
Neutrophils (%)	54.6 ± 6.8	64.4 ± 10.7	55.7 ± 7.7	59.3 ± 11.1	n.s.	n.s.	n.s.
Lymphocytes (%)	31.7 ± 7.7	24.8 ± 8.4	33.4 ± 7.1	24.6 ± 13.9	n.s.	n.s.	n.s.
Monocytes (%)	9.6 ± 2.9	7.8 ± 1.8	7.9 ± 1.7	8.8 ± 2.2	n.s.	n.s.	n.s.
Eosinophils (%)	3.2 ± 2.3	2.2 ± 1.5	2.2 ± 1.5	1.3 ± 0.9	n.s.	n.s.	n.s.
Basophils (%)	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.1	n.s.	n.s.	n.s.

Two way ANOVA test to analyze the interaction between obesity and stroke. DMS post-hoc was applied when possible. Values are means ± SD. n.s. non significant \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.

The results of the HumanMethylation27 Beads array showed 96 CpG sites differentially methylated between obese and non obese subjects. 80 CpG sites were differentially methylated in patients who suffered an ischemic stroke and 59 CpG sites presented interaction between stroke and obesity. 21 CpG sites from 15 genes

(supplementary data 2) were selected for further validation by taking into account CpGs with absolute methylation differences  $\geq 5\%$  and  $p \leq 0.05$ , in addition to evidence about the relationship of these genes with obesity or stroke. Although all CpG sites differed  $< 0.05$ , none of the array probes were significant when applying the FDR correction.

The analysis by MassArray® EpiTyper™ technology of the DNA methylation patterns for the 15 candidate genes evidenced that some of these regions presented changes between groups. The methylation levels of the genes *WT1*, *PM20D1*, *CALD1* and *KCNQ1* quantified by this technique showed a positive correlation ( $p < 0.05$ ) respect to the methylation levels measured by microarray studies (supplementary data figures 3 to 5). These results were considered as a validation between the two techniques.

In addition to a correlation with the results of the array, CpG sites 10\_11\_12, 19\_20, 25, of the studied regions of *WT1* presented a hypermethylation in obese patients compared to non-obese. The site 19\_20 presented a hypermethylation in patients who had suffered a stroke with no interaction with obesity.

In the region of the gene *PM20D1* measured, the general trend was a hypermethylation in patients that had suffered a stroke compared to the non-stroke group without interaction with BMI. Differences in this region were significant at sites 1\_2\_10, 11, 12, 13, 14, 16\_17, 18, 22 and whole values. Furthermore, these results were accompanied by a decrease of expression of *PM20D1* and therefore a negative correlation was found between the levels of methylation and expression. CpG sites 1 and 8 of the studied region of *CALD1* showed an interaction between stroke and obesity. Although we did not find a correlation between methylation levels analyzed in the array and MassArray® EpiTyper™ approach in the studied region of *KCNQ1* CpG sites 2 and 9 also had higher methylation levels in obese patients compared to non obese without interaction with stroke.

For the validation of the epigenetic results obtained in SP, similar technique and primers were used in the VP (n=115). Table 2 shows the biochemical and phenotypic characteristic of VP. Specifically for this population, only CpG2 and CpG4 sites from *KCNQ1* gene (supplementary data 6) showed changes between groups. Due to

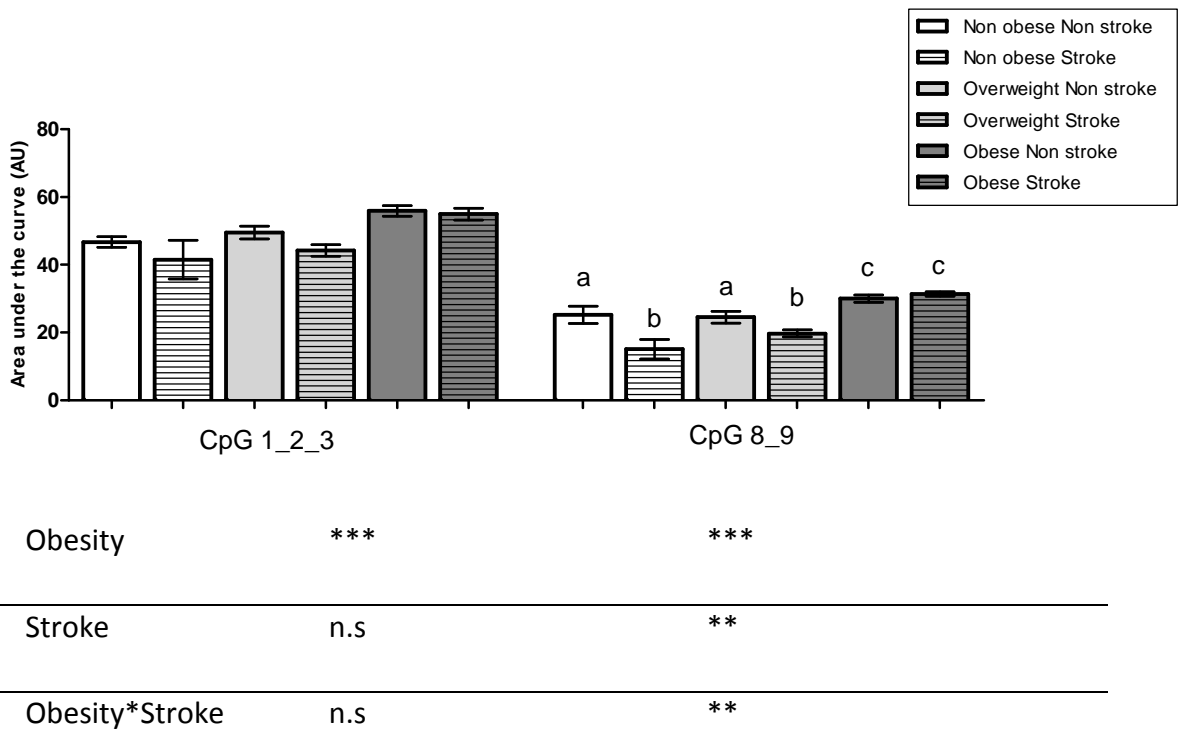
this fact, we decided to perform also a second technical validation by a third method, a MS-HRM approach. The primers designed for this purpose flanked two regions: one equivalent to CpGs 1\_2\_3 sites measured by MassArray® Epityper™ technique and another equivalent to CpG8\_9 sites. 80 samples from VP were analyzed by this approach. The results (Figure 1) showed an increased hypermethylation on both regions due to the BMI of the patients. DNA methylation levels of CpG 8\_9 sites showed also an interaction between stroke and obesity. Changes obtained in stroke are derived by and hypomethylation in normal weight patients who suffered and ischemic stroke. Correlation analysis for the methylation levels of 1\_2\_3 and 8\_9 CpG sites showed a significant and positive association with the BMI ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.493$  and  $p < 0.001$ ,  $r = 0.486$  respectively) and there was also observed a positive correlation between the methylation levels of CPG 1\_2\_3 and NIH ( $p = 0.016$ ,  $r = 0.371$ ). Finally, a lineal regression analyses were carried out in order to explain the influence of methylation changes of both CpGs on obesity status and stroke situation and severity. Both CpG sites explained a 27% and 26.5% ( $p_{\text{model}} < 0.001$ ) the variability observed by BMI. It was observed an increased in  $r^2$  analysis by analyzing stroke or NIH (31% and 33% for the case of stroke and 43% to 57% in the case of NIH) ( $p_{\text{model}} = 0.001$ ).

**Table 2:** Differences (mean $\pm$ SE) in anthropometric characteristics and biochemical parameters in the six groups of the Validation Population (n=115).



	<u>Normal weight Non</u> (n=15)	<u>Normal weight Stroke</u> (n=9)	<u>Overweight Non stroke</u> (n=15)	<u>Overweight Stroke</u> (n=31)	<u>Obesity Non stroke</u> (n=25)	<u>Obesity Stroke</u> (n=20)	ANOVA		
							BMI	Stroke	Interaction
Gender (Females/Males)	14 / 1	5 / 4	6 / 9	16 / 15	13 / 12	11 / 9			
Age (years)	60.4 ± 7.8	72.6 ± 6.4	62.8 ± 8.6	69.6 ± 7.3	62.8 ± 8.2	69.0 ± 8.9	n.s.	***	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.0 ± 1.4	23.6 ± 1.4	27.6 ± 1.4	27.5 ± 1.6	32.7 ± 4.8	29.2 ± 4.3	***	n.s.	n.s.
Waist circumference (cm)	82.7 ± 6.5	95.3 ± 8.6	97.9 ± 9.8	105.7 ± 15.1	97.8 ± 13.1	107.2 ± 15.5	***	***	n.s.
NIHSS at admission		3.1 ± 4.7		4.4 ± 4.4		4.2 ± 2.8	n.s.	n.p.	n.s.
Glucose (mg/dl)	89.7 ± 6.2	106.7 ± 35.0	98.6 ± 19.5	124.0 ± 56.4	107.2 ± 19.4	121.1 ± 2.4	n.s.	*	n.s.
Systolic Blood Pressure (mm/hg)	124.0 ± 10.6	165.3 ± 24.2	134.4 ± 11.5	162.9 ± 26.1	133.3 ± 15.8	173.7 ± 28.6	n.s.	***	n.s.
Dyastolic Blood Pressure (mm/hg)	75.9 ± 6.6	84.7 ± 8.4	80.5 ± 6.8	85.3 ± 13.1	78.1 ± 6.2	91.3 ± 13.8	n.s.	***	n.s.
Total cholesterol (mg/dl)	229.5 ± 29.0	185.7 ± 57.8	210.1 ± 28.7	186.4 ± 37.8	213.5 ± 30.3	207.0 ± 31.8	n.s.	*	n.s.
HDL cholesterol (mg/dl)	69.0 ± 13.8	53.2 ± 14.5	60.9 ± 13.3	44.6 ± 12.0	54.5 ± 13.3	47.8 ± 13.3	n.s.	***	n.s.
LDL cholesterol (mg/dl)	148.7 ± 33.3	133.6 ± 27.9	131.9 ± 29.9	119.3 ± 35.1	128.5 ± 25.2	132.0 ± 31.2	n.s.	n.s.	n.s.
Triglycerides (mg/dl)	81.7 ± 30.8	79.2 ± 32.3	82.9 ± 26.7	123.6 ± 27.2	146.1 ± 83.2	166.0 ± 100.2	***	n.s.	n.s.
Leucocytes (mil/mm <sup>3</sup> )	4.9 ± 1.1	7.5 ± 1.8	5.6 ± 1.6	7.2 ± 1.8	6.8 ± 2.1	7.8 ± 2.4	*	***	n.s.
Neutrophils (%)	51.2 ± 10.4	57.3 ± 1.3	54.1 ± 10.1	59.2 ± 10.4	57.4 ± 6.7	63.0 ± 9.1	*	*	n.s.
Lymphocytes (%)	37.4 ± 9.4	28.9 ± 9.8	34.6 ± 9.4	28.8 ± 8.6	30.1 ± 6.3	26.2 ± 7.2	*	*	n.s.
Monocytes (%)	8.1 ± 2.5	7.8 ± 2.0	7.4 ± 1.4	8.7 ± 2.3	8.1 ± 1.8	7.8 ± 2.1	n.s.	n.s.	n.s.
Eosinophils (%)	2.3 ± 1.1	2.6 ± 2.2	2.7 ± 1.5	2.6 ± 2.1	3.3 ± 1.4	1.7 ± 1.	n.s.	n.s.	n.s.
Basophils (%)	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.2	n.s.	n.s.	n.s.

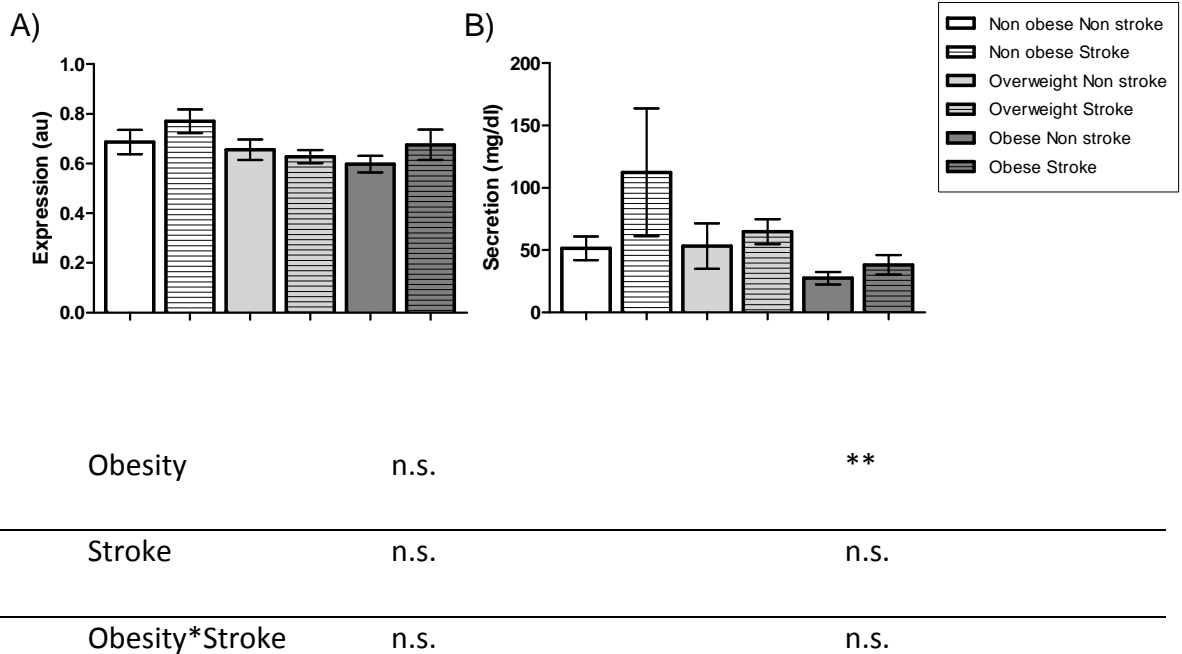
Two way ANOVA test to analyze the interaction between obesity and stroke. Values are means ± SD. n.s. non significant \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.



**Figure 1:** Methylation levels (area under the curve) of CpG 1\_2\_3 and 8\_9 through Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) in VP (n=80). n.s Non

significant, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Two way ANOVA test to analyze the interaction between obesity and stroke.

These changes were also observed in the plasma levels of KCNQ1. Significant differences were observed in obese patients compared with normal weight and overweight patients ( $p = 0.006$ ). Although expression studies were only performed in SP, the methylation changes also corresponded to variations in gene expression, presenting an interaction between obesity and stroke (figure 2). No differences in *PM20D1*, *WT1* and *CALD1* methylation levels were found in VP patients.



**F**

**figure 2:** A) Gene expression *KCNQ1* in total white blood cells from SV (n=101). B) Plasma levels of *KCNQ1* in VP (n=80). n.s Non significant, \*\*  $p < 0.01$  Two way ANOVA test to analyze the interaction between obesity and stroke.

## DISCUSSION:

The aim of this study was to identify selected genes with epigenetic regulation that could be used as biomarkers of stroke severity and recovery. Thus we analyzed the DNA methylation changes in patients that suffered an ischemic stroke and studied the implications of BMI. Our hypothesis was that there are epigenetically regulated genes that change after stroke and that these changes are mediated by their previous body composition. The phenotypic data from both populations (SP and VP) were similar. Besides the differences in BMI derived from the selection of different groups, significant differences were observed in the waist circumference between stroke and non stroke patients. These data are consistent with those of other authors, who determined that the waist circumference is one of the major risk factors of stroke (Preiss 2013, Karcher 2013). In both populations glucose data were higher in stroke patients regardless of BMI. These data are consistent with those described by Rundek in a cohort of more than 1500 non-diabetic individuals (Rundek 2010). Rundek *et al* described that glucose and HOMA index were markers of increased risk of incident stroke in non diabetic individuals. Moreover, post-stroke hyperglycemia is a common phenomenon, with up to 50% of patients in two-thirds of ischemic stroke subtypes having blood glucose levels of above 108 mg/dl (Kuramitsu 2013). There is wide evidence to suggest that hyperglycaemia is detrimental in cerebral ischemia (Wardlaw 2009). These biochemical changes may explain changes in methylation patterns in patients who suffered an ischemic stroke, as in obese or overweight patients. Several authors have described that the hyperglycemia may be mediated by the promoter hypomethylation of insulin gene, producing a lower secretion of the hormone (Kuroda 2009).

Another phenotypic alteration that could be influenced by obesity and stroke is the blood cell distribution. In both populations, leukocyte number was higher in stroke patients. These results can be explained by the rupture in the blood–brain barrier (BBB) that allows immune system cell to gain access to the brain after an ischemic stroke accident (Jander 1995). A large number of stroke patients in clinical studies showed a significant elevation in total leukocyte count and polymorphonuclears (PMNL) count in peripheral blood after ischemia (Buck 2008, Kriz 2009, Mo 2013). This

increase in PMNL is confirmed in stroke patients, in the percentage of neutrophils, lymphocytes and monocytes, but only in the VP. Also only in the VP, differences in the number of leukocytes, neutrophils and lymphocytes were found between obese and non obese patients. In obesity a similar process occurs, with higher total white cells and more specifically leukocytes as a consequence of increased low-grade inflammation resulting from an increase in adipose tissue (Carvalho 2013). Leukocyte number was markedly correlated to leptin levels, insulin resistance, lipid profile, and adiposity (Snyder-Cappione 2012, Marzullo 2013).

Epigenetic marks, especially DNA methylation, play an important role in cellular differentiation and gene regulation (Toperoff 2012) and have been linked to different pathologies as cancer (Esteller 2008). These changes in epigenetic marks could be related to the risk of developing obesity and ischemic stroke. For example, previous studies of our group have described that obesity, weight loss and dietary response are mediated by epigenetic mechanisms (Campion 2010, Cordero 2011, Milagro 2011). On the other hand, a high fat diet induced changes in DNA methylation pattern of genes involved in appetite regulation (Paternain 2012). However, the effect of the epigenetic modulation on stroke outcome has not been extensively studied. Other study also analyzed the possible association of a hypermethylation in BDNF promoter region with low outcomes at 1 year, and with the worsening of physical disability and cognitive function (Kim 2012).

In order to study more widely epigenetic mechanisms involved in stroke and its relationship to obesity and overweight, a methylation array was performed in the PS. From the results of methylation array, those CpGs that showed differences between groups ( $p = 0.05$ ) and changes higher than 5% were selected. With these criteria, we found 96 CpG modified in obesity, 80 CpG in stroke and 59 CpG that presented an interaction. Finally 21 CpG from 15 regions of genes were selected for validation by *EpiTyper* approach. A biological and technical validation was observed in four regions of four genes when the DNA methylations of two the techniques were compared. Results obtained with the methylation array were positively correlated with the methylation levels observed with the *EpiTyper* approach. The validation approach was used by our group and other authors in other populations (Milagro 2011, Moleres

2013, Masliah 2013). The four regions selected for this first approach were in the genes *WT1*, *CALD1*, *PM20D1*, and *KCNQ1*.

*WT1* is a gene involved in the development of Wilms's tumor aniridia, genitourinary and mental retardation (WAGR) syndrome, which in many cases is accompanied by obesity (Fischbach 2005). *WT1* methylation has been extensively tackled in cancer research, but our group found in its methylation pattern after a nutritional treatment that suggests a possible implication in obesity (Milagro 2011). In this study a hypermethylation was observed in patients who presented a higher weight loss. In our study the hypermethylation was observed in obese patients respect to non obese individuals in CpG sites 10\_11\_12, 19\_20. However we found a hypermethylation in CpG site 19\_20 in patients who suffered a stroke without interaction with obesity.

*CALD1* encodes a calmodulin- and actin-binding protein that plays an essential role in the regulation of smooth muscle and non muscle contraction. This gene is involved in the contraction and relaxation of arterial muscle (Mayanagi 2011). The present study is the first that analyzes the methylation levels of *CALD1* and the possible implication in obesity and stroke development. Two CpG sites presented an interaction between stroke and obesity (CpG 1 and CpG8).

Up to now, the function of *PM20D1* is unknown. The region of this gene was selected because of the high differences in methylation levels between patients and controls shown in the methylation array results. These differences were observed in several CpG from the studied region in the first validation in the SP.

*KCNQ1* encodes a voltage-gated potassium channel required for repolarization phase of the cardiac action potential. Several SNPs along this gene have been linked to diabetes development (Sun 2012). *KCNQ1* increases the risk of cardiac events with physical or emotional stress. *KCNQ1* is also imprinted gene.

Genomic imprinting refers to an epigenetic phenomenon by which the allelic expression of a gene depends on the parental origin. It has evolved independently in placental mammals (Zhang 2013). This reinforces the epigenetic involvement of this

gene. Despite the evidence found, our results showed differences in the methylation levels of two CpG sites in obese patients compared to non-obese in the SP.

The methylation data in the VP were correlated with the methylation levels in the SP. This is the most important result of this study: stroke and obesity previous to the vascular accident modulate the DNA methylation pattern of *KCNQ1* in both populations.

A possible explanation for the lack of validation of *WT1*, *PM20D1* and *CALD1* regions may be the specificity of methylation in the different cell types. Studies on DNA methylation using whole blood DNA frequently do not control inter-individual variation in the cellular population from which the DNA is derived, the white blood cells; lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophiles and monocytes. This has been criticized due to hypothesized potential for confounding effect when cellular heterogeneity is present in conjunction with cell type specific DNA methylation (Adalsteinsson 2012, Garden 2013). Adalsteinsson *et al.* showed a correlation between the methylation of *PM20D1* regions and changes in the methylation percentage of different types of white blood cells. This author suggested that the use of whole blood into the epigenetic approach is a confusing factor that increases the inter-individual variability. These arguments could explain that there were observed differences of up to 20% in *PM20D1* CpG sites in the SP, but no differences were found in the VP. As discussed above, differences were found in the different cell types of the total white cells. In this sense, many articles had demonstrated the utility of white blood cells and concretely, the leukocytes, in isolation, as biomarkers of methylation status and the impact of the epigenetic variations on common complex diseases (Crujeiras 2013, Masliah 2013).

Finally, data obtained in relation to *KCNQ1* expression and secretion levels are coincident with those given by other authors. Dayeh *et al.* observed that high of DNA methylation, in pancreatic islet of 84 volunteers is associated with an inhibition of *KCNQ1* expression (Dayeh 2013). The *KCNQ1* region was analyzed by the Genomatix platform (MatInspector application) in order to find a potential consensus sequence for transcription factors, which could be indicate possible mechanisms affected by

DNA methylation. In the entire sequence of *KCNQ1* gene region analyzed, a putative response element of transcription factor HIF-1 covering CpG sites 8\_9 was found, which was not present in the rest of the studied region. HIF, also known as Hypoxia-Inducible Factor, is necessary for synthesize the active form of HIF-1 $\beta$  subunit (Semenza 2002). Specifically, it has been reported that the CpG site present in the consensus sequence for the HIF needs to be demethylated to facilitate the protein binding to the DNA and the regulation of gene transcription (Ratan 2007). Therefore, *KCNQ1* expression levels are potentially regulated by HIF-1 when hypoxia levels are increased (Karuppagounder 2012). This is consistent with the work of Karuppagounder et al., which described in patients who have suffered a stroke that HIF-1 is increased in the brain tissue during hours after the ischemic event. The same approach was carried out in CpG 1\_2\_3, where a putative presence of transcription factor HESF was observed. This factor is related with proteins found in *Drosophyla homeodomain melanogaster*, which are regulated by the *NOTCH* gene. Although there is no direct references studying the transcriptional regulation of the CpG site consensus sequence, as in the case of HIF, this protein family has been defined as a transcriptional repressor that modifies neurological cell expansion and differentiation after a stroke (Wang 2009), and as a mediator of fasting lipid metabolism (Herzig 2003). Surprisingly, it has been disclosed a combined effect of HIF and HES1 (Yun 2002) as a mechanism for regulating adipogenesis by hypoxia, inhibiting PPAR2G, as well as a mechanism for the differentiation of pancreatic beta cells induced by hypoxia (Heinis 2010).

Finally, E -box consensus sequence was found in the 1\_2\_3 and 8\_9 CpGs sites, without presence in the rest of the analyzed region. This DNA sequence was discovered in 1985 (Church 1985) as an element for control the promoters of the immunoglobulin heavy chain and has been recently linked to an integral part of the feedback loop, a part of the circadian rhythm (Minami 2013) and the regulation of genes related with glucose and lipid metabolism (Fujimoto 2013). Several studies have shown that the E-box sequence is epigenetically regulated, since the methylation levels of the consensus sequence containing the CpG sites regulate the expression levels of different genes, including those associated with circadian rhythm (Ji 2009,

Murphy 2009 Swarnalatha 2012). In this line, a recent study in zebra fish larvae described a bidirectional interaction by HIF and E-box between hypoxia signals and the molecular circadian clock, although these data have to be confirmed in humans (Egg 2013). Other authors have described also an interaction between the E-box consensus sequences and HIF in humans (Hu J 2014). Therefore, the potential role of the changes in specific CpG sites from *KCNQ1* promoter potentially regulated by HES1 response elements, E-box and HIF-1 should be investigated in more detail in stroke and neural cells, as in obesity and adipogenesis, lipid and glucose metabolism.

In conclusion, the analysis of DNA methylation levels could be useful as potential biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke. Specifically for the studied region of the *KCNQ1* gene, these determinations could be used as a biomarker of diagnosis, although always depending on the obesity condition of the patients.



**REFERENCES:**

- Abete I, Goyenechea E, Crujeiras AB, Martinez JA. Inflammatory state and stress condition in weight-lowering Lys109Arg LEPR gene polymorphism carriers. *Arch Med Res* 2009; 40: 306-310.
- Abete I, Navas-Carretero S, Marti A, Martinez JA. Nutrigenetics and nutrigenomics of caloric restriction. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 108: 323-346.
- Adalsteinsson BT, Gudnason H, Aspelund T, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, et al. Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. *PLoS One* 2012;7: e46705.
- Baccarelli A, Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology* 2010; 21: 819-828.
- Bruzzone CM, Tawadros PS, Boardman LA, Steer CJ. Enhanced primer selection and synthetic amplicon templates optimize high-resolution melting analysis of single-nucleotide polymorphisms in a large population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17: 675-680.
- Buck BH, Liebeskind DS, Saver JL, Bang OY, Yun SW, Starkman S, et al. Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke* 2008; 39: 355-360.
- Champion J, Milagro F, Martinez JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 94: 291-347.
- Chen ES, Ernst C, Turecki G. The epigenetic effects of antidepressant treatment on human prefrontal cortex BDNF expression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; 14: 427-429.
- Cordero P, Champion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 463-470.

- Crujeiras AB, Campion J, Diaz-Lagares A, Milagro FI, Goyenechea E, Abete I, et al. 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; 186C: 1-6.
- Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P, Almgren P, Ronn T, Ling C. Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia* 2013; 56: 1036-1046.
- Egg M, Koblitz L, Hirayama J, Schwerte T, Folterbauer C, Kurz A, et al. Linking oxygen to time: the bidirectional interaction between the hypoxic signaling pathway and the circadian clock. *Chronobiol Int* 2013; 30: 510-529.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159.
- Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007; 447: 433-440.
- Fischbach BV, Trout KL, Lewis J, Luis CA, Sika M. WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics* 2005; 116: 984-988.
- Fox CS, Pencina MJ, Heard-Costa NL, Shrader P, Jaquish C, O'Donnell CJ, et al. Trends in the association of parental history of obesity over 60 years. *Obesity (Silver Spring)* 2013. doi: 10.1002.
- Fujimoto Y, Shimoyama A, Saeki A, Kitayama N, Kasamatsu C, Tsutsui H, et al. Innate immunomodulation by lipophilic termini of lipopolysaccharide; synthesis of lipid A from *Porphyromonas gingivalis* and other bacteria and their immunomodulative responses. *Mol Biosyst* 2013; 9: 987-996.
- Garden GA. Epigenetics and the Modulation of Neuroinflammation. *Neurotherapeutics* 2013; 10: 782-788.
- Giordano A, Murano I, Mondini E, Perugini J, Smorlesi A, Severi I, et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res* 2013; 54: 2423-2436.

- Gulsvik AK, Thelle DS, Samuelsen SO, Myrstad M, Mowe M, Wyller TB. Ageing, physical activity and mortality--a 42-year follow-up study. *Int J Epidemiol* 2012; 41: 521-530.
- Heinis M, Simon MT, Ilc K, Mazure NM, Pouyssegur J, Scharfmann R, et al. Oxygen tension regulates pancreatic beta-cell differentiation through hypoxia-inducible factor 1alpha. *Diabetes* 2010; 59: 662-669.
- Hermsdorff HH, Mansego ML, Campion J, Milagro FI, Zulet MA, Martinez JA. TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: Relationship with circulating TNFalpha, truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine* 2013; 64: 265-271.
- Hermsdorff HH, Zulet MA, Martinez JA. The implication of unknown bioactive compounds and cooking techniques in relations between the variety in fruit and vegetable intake and inflammation. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 1384-1385
- Hu X, Fang Y, Zheng J, He Y, Zan X, Lin S, et al. The association between HIF-1alpha polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2014; 35: 903-916.
- Inzaugarat ME, Billordo LA, Vodanovich F, Cervini GM, Casavalle PL, Vedire C, et al. Alterations in innate and adaptive immune leukocytes are involved in paediatric obesity. *Pediatr Obes* 2013. doi: 10.1111/j.2047-6310.2013.00179.x.
- Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 42-51.
- Ji Y, Qin Y, Shu H, Li X. Methylation analyses on promoters of mPer1, mPer2, and mCry1 during perinatal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1742-1747.
- Kalani A, Kamat PK, Tyagi SC, Tyagi N. Synergy of homocysteine, MicroRNA, and epigenetics: a novel therapeutic approach for stroke. *Mol Neurobiol* 2013; 48: 157-168.

- Karcher HS, Holzwarth R, Mueller HP, Ludolph AC, Huber R, Kassubek J, et al. Body fat distribution as a risk factor for cerebrovascular disease: an MRI-based body fat quantification study. *Cerebrovasc Dis* 2013; 35: 341-348.
- Karuppagounder SS, Ratan RR. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics? *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 1347-1361.
- Kriz J, Lalancette-Hebert M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 497-509.
- Kuramitsu S, Yokoi H, Domei T, Nomura A, Watanabe H, Yamaji K, et al. Impact of post-challenge hyperglycemia on clinical outcomes in Japanese patients with stable angina undergoing percutaneous coronary intervention. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12: 74.
- Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, et al. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One* 2009; 4: e6953.
- Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009; 119: 480-486.
- Marzullo P, Minocci A, Giarda P, Marconi C, Tagliaferri A, Walker GE, et al. Lymphocytes and immunoglobulin patterns across the threshold of severe obesity. *Endocrine* 2013. (Epub ahead of print).
- Masliah E, Dumaop W, Galasko D, Desplats P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: Identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics* 2013; 8: 1030-1038.
- Mayanagi T, Sobue K. Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adh Migr* 2011; 5: 150-159.

- Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I, et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J* 2011; 25: 1378-1389.
- Mina A, Moran S, Ortiz-Olvera N, Mera R, Uribe M. Prevalence of Minimal Hepatic Encephalopathy and Quality of Life in Patients with Decompensated Cirrhosis. *Hepatol Res* 2013. doi: 10.1111/hepr.12227.
- Minami Y, Ode KL, Ueda HR. Mammalian circadian clock: the roles of transcriptional repression and delay. *Handb Exp Pharmacol* 2013; 217: 359-377.
- Mo X, Li T, Ji G, Lu W, Hu Z. Peripheral polymorphonuclear leukocyte activation as a systemic inflammatory response in ischemic stroke. *Neurol Sci* 2013; 34: 1509-1516..
- Molerés A, Campion J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, et al. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. *FASEB J* 2013; 27: 2504-2512.
- Mosley RL, Gendelman HE. Control of neuroinflammation as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Exp Neurol* 2010; 222: 1-5.
- Murphy BA. Chronobiology and the horse: recent revelations and future directions. *Vet J* 2010; 185: 105-114.
- Paternain L, Batlle MA, De la Garza AL, Milagro FI, Martínez JA, Campion J. Transcriptomic and epigenetic changes in the hypothalamus are involved in an increased susceptibility to a high-fat-sucrose diet in prenatally stressed female rats. *Neuroendocrinology* 2012; 96: 249-260.
- Preiss D, Giles TD, Thomas LE, Sun JL, Haffner SM, Holman RR, et al. Predictors of Stroke in Patients with Impaired Glucose Tolerance: Results From the Nateglinide and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research Trial. *Stroke* 2013; 44: 2590-2593.

- Qureshi AI, Sapkota BL. Blood pressure reduction in secondary stroke prevention. *Continuum (Minneapolis)* 2011; 17: 1233-1241.
- Qureshi IA, Mehler MF. The emerging role of epigenetics in stroke: II. RNA regulatory circuitry. *Arch Neurol* 2010; 67: 1435-1441.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 529-644.
- Ratan RR, Siddiq A, Smirnova N, Karpisheva K, Haskew-Layton R, McConoughey S, et al. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85: 1331-1338.
- Rundek T, Gardener H, Xu Q, Goldberg RB, Wright CB, Boden-Albala B, et al. Insulin resistance and risk of ischemic stroke among nondiabetic individuals from the northern Manhattan study. *Arch Neurol* 2010; 67: 1195-1200.
- Schweizer S, Meisel A, Marschenz S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33: 1335-1346.
- Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 993-998.
- Snyder-Cappione JE, Nikolajczyk BS. When diet and exercise are not enough, think immunomodulation. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 30-38.
- Stefanska B, Bouzelmat A, Huang J, Suderman M, Hallett M, Han ZG, et al. Discovery and validation of DNA hypomethylation biomarkers for liver cancer using HRM-specific probes. *PLoS One* 2013; 8: e68439.
- Stepanyan A, Zakharyan R, Boyajyan A. The netrin G1 gene rs628117 polymorphism is associated with ischemic stroke. *Neurosci Lett* 2013; 549: 74-77.
- Stergiou GS, Salgami EV, World Health Organization-International Society of Hypertension (WHO-ISH), USA Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC-7), European Society of Hypertension-European Society of Cardiology (ESH-ESC). New European, American and

International guidelines for hypertension management: agreement and disagreement. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2: 359-368.

- Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 2007; 6: 182-187.

- Sun Q, Song K, Shen X, Cai Y. The association between KCNQ1 gene polymorphism and type 2 diabetes risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7: e48578.

- Swarnalatha M, Singh AK, Kumar V. The epigenetic control of E-box and Myc-dependent chromatin modifications regulate the licensing of lamin B2 origin during cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 9021-9035.

- Teo KK, Goldstein LB, Chaitman BR, Grant S, Weintraub WS, Anderson DC, et al. Extended-Release Niacin Therapy and Risk of Ischemic Stroke in Patients With Cardiovascular Disease: The Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcome (AIM-HIGH) Trial. *Stroke* 2013; 44: 2688-2693.

- Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics* 2011; 6: 828-837.

- Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 371-383.

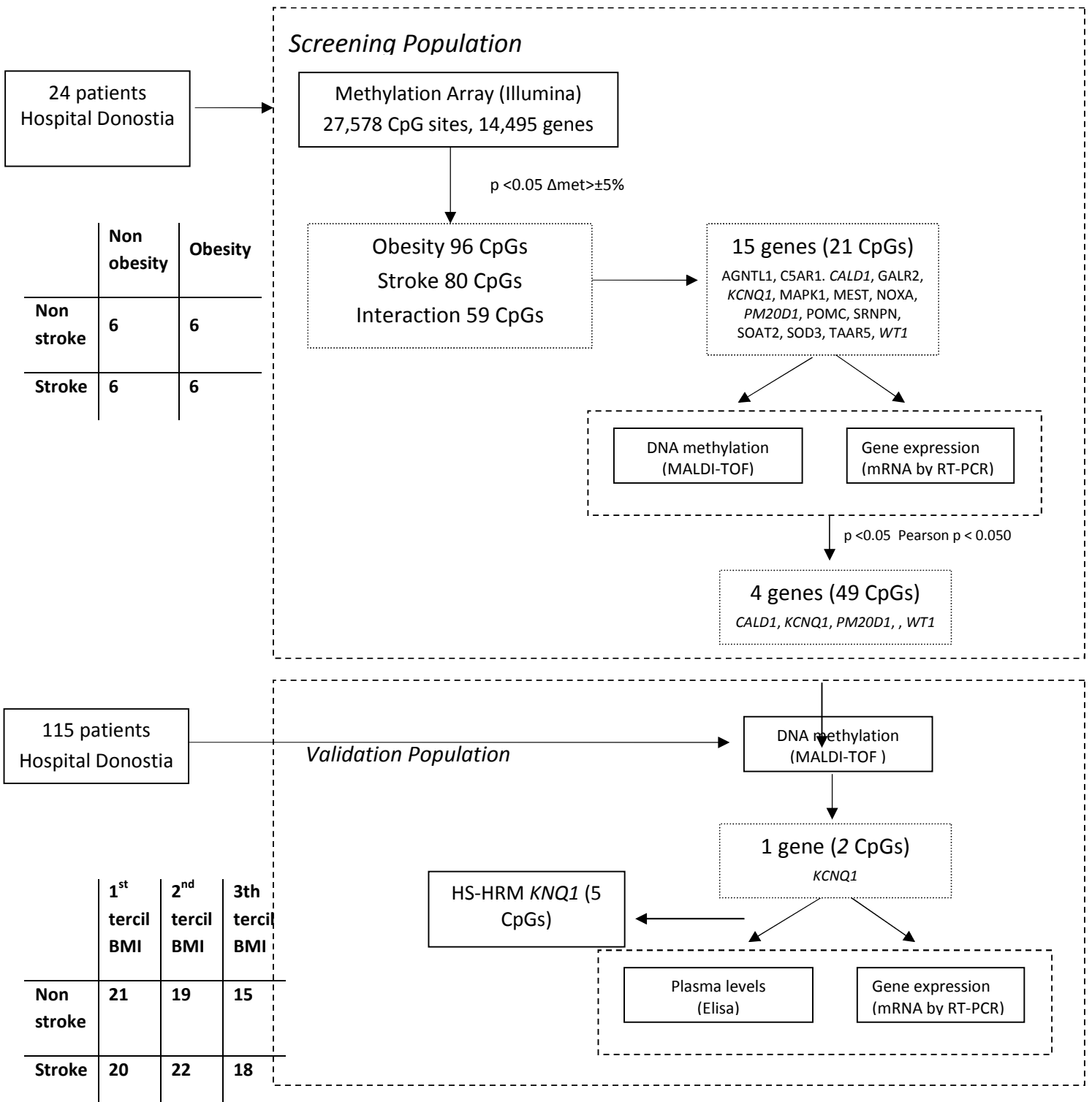
- Wang L, Zhu YP, Li MX. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase in the pathogenesis of hypoxia-induced pulmonary hypertension of the newborn. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2011; 13: 8-11.

- Wardlaw JM, Sandercock PA, Murray V. Should more patients with acute ischaemic stroke receive thrombolytic treatment? *BMJ* 2009; 339: b4584.

- Woo D, Broderick JP, Kothari RU, Lu M, Brott T, Lyden PD, et al. Does the National Institutes of Health Stroke Scale favor left hemisphere strokes? NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* 1999; 30: 2355-2359.
- Xu T, Bu X, Li H, Zhang M, Wang A, Tong W, et al. Smoking, heart rate, and ischemic stroke: a population-based prospective cohort study among inner mongolians in china. *Stroke* 2013; 44: 2457-2461.
- Zhang H, Chaudhury A, Wu X. Imprinting in plants and its underlying mechanisms. *J Genet Genomics* 2013; 40: 239-247.



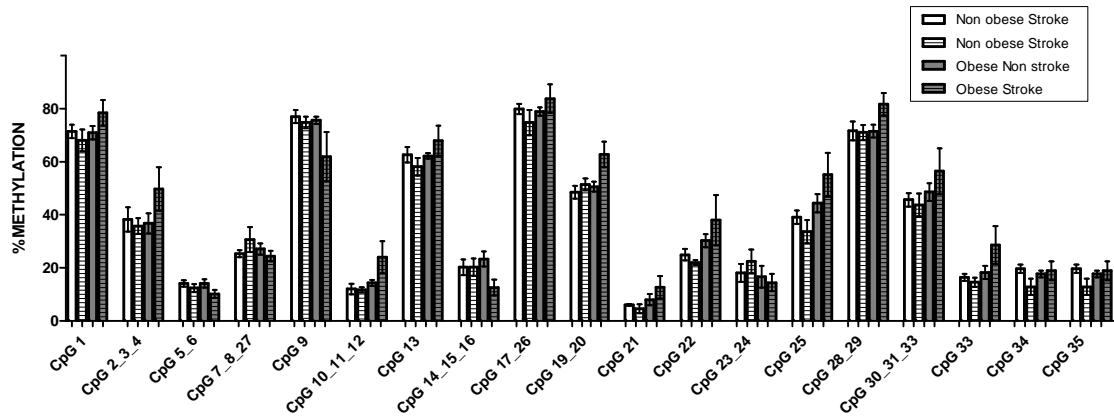
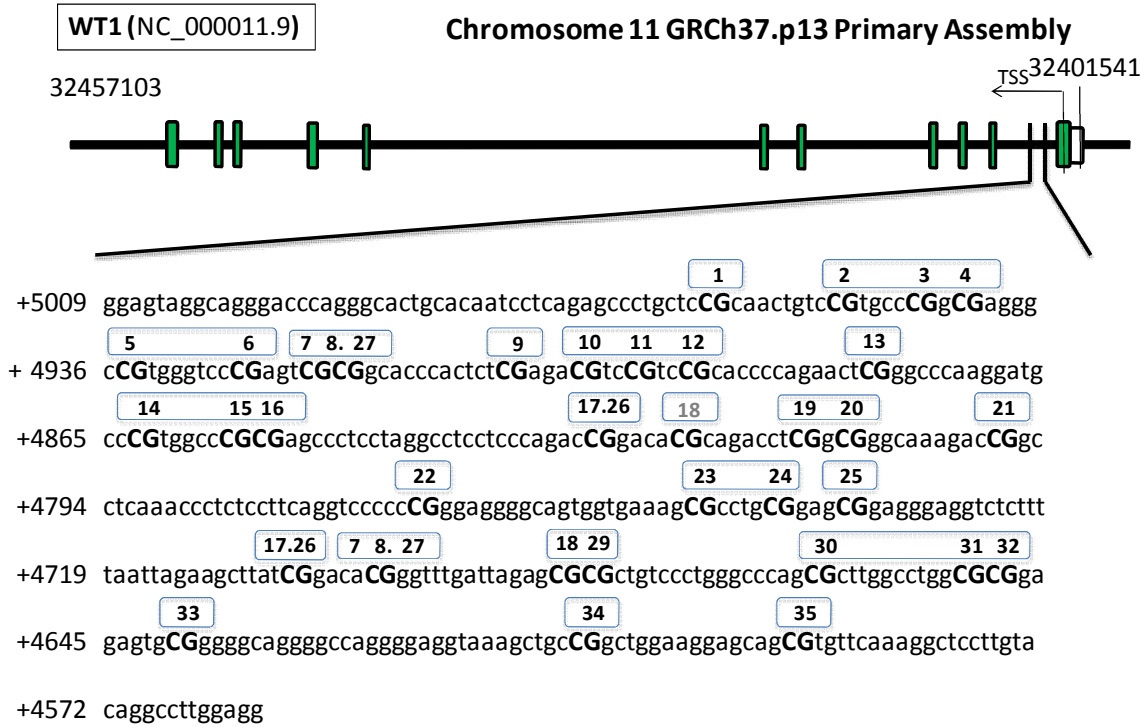
SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary data 1: Experimental model.

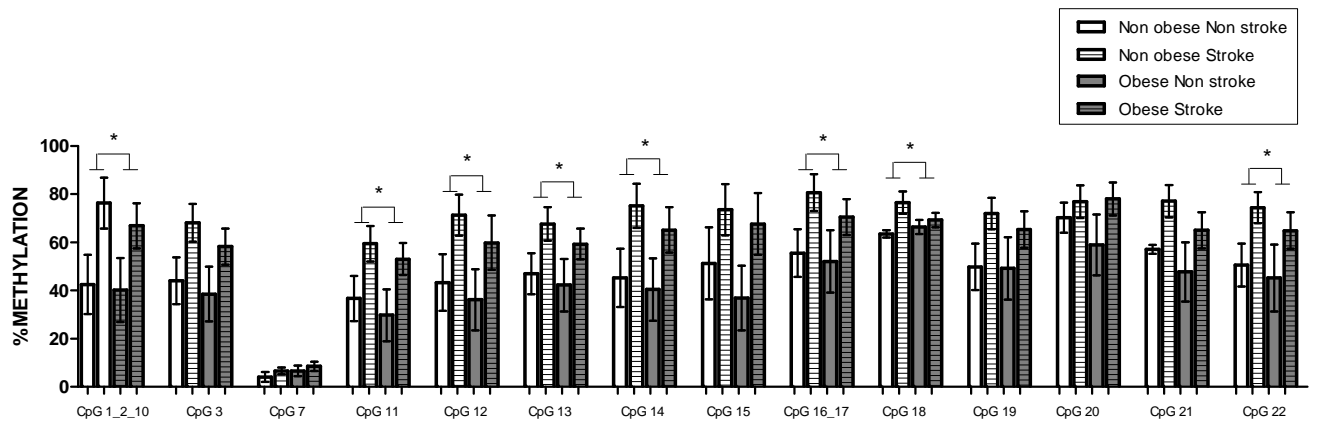
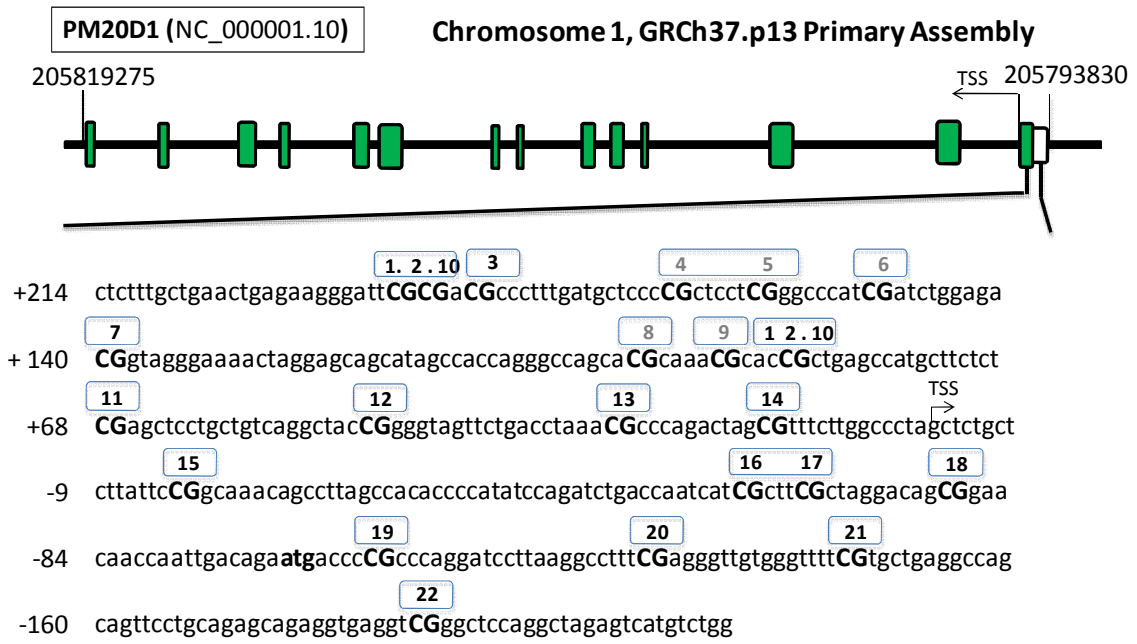
Supplementary data 2:

SYMBOL	CpG NAME	Methylation array (n=24)			Epityper SP (n=24)			Expression (n=24)		
		STROKE	OBESITY*STROKE	OBESITY	STROKE	OBESITY*STROKE	OBESITY	STROKE	OBESITY*STROKE	OBESITY
ANGPTL2	cg09427311	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
C5AR1	cg02149446	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
CALD1	cg24956866	n.s.	*	n.s.				n.s.	n.s.	*
CALD1	cg14009688	n.s.	*	n.s.	n.s.	**	n.s.			
FLJ32569	cg14159672	*	n.s.	n.s.				*	n.s.	n.s.
FLJ32569	cg14893161	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.			
GALR2	cg14165663	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KCNQ1	cg12949760	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
MAPK1	cg05546044	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
MEST	cg17347253	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NOXA1	cg04837071	n.s.	**	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
POMC	cg16302441	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
POMC	cg08030082	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
SNRPN	cg27644292	***	n.s.	n.s.				n.s.	n.s.	n.s.
SNRPN	cg24993443	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	**			
SOAT2	cg23841186	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SOD3	cg10307548	n.s.	n.s.	*	*	n.s.	n.s.			
TAAR5	cg17829936	n.s.	n.s.	n.s.				n.s.	n.s.	n.s.
WT1	cg01693350	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
WT1	cg15446391	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	*			

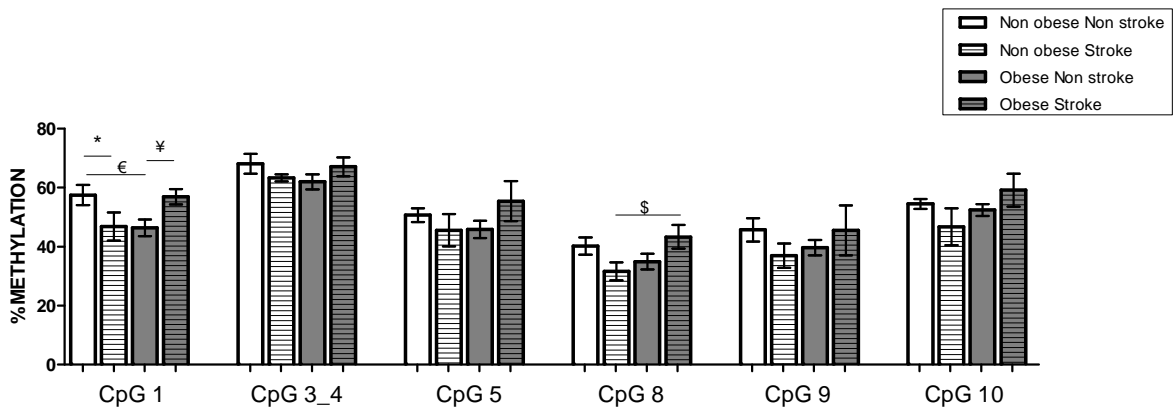
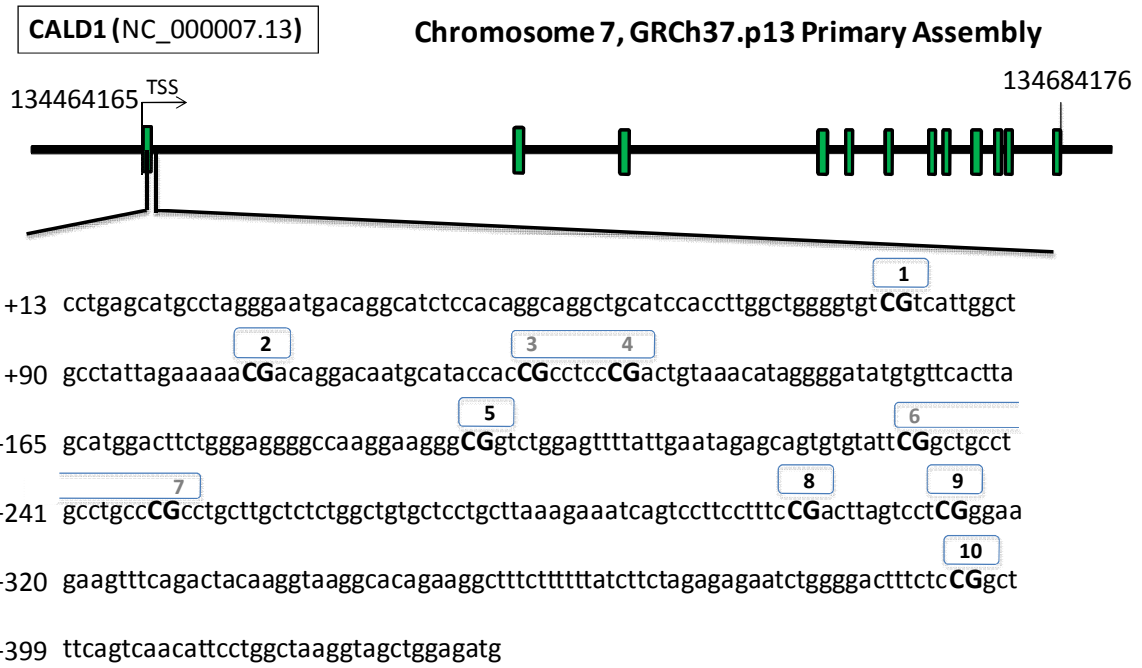


<b>Obesity</b>	n.	n.	n.	n.	*	n.s	n.	n.	*	n.	n.	n.	*	n.s	n.	n.	n.	n.s	n.
	s	s	s	s			s	s		s	s	s			s	s	s		s
<b>Stroke</b>	n.	n.	n.	n.	n.	n.s	n.	n.	*	n.	n.	n.	n.s	n.s	n.	n.	n.	n.s	n.
	s	s	s	s	s		s	s		s	s	s			s	s	s		s
<b>Obesity*Stroke</b>	n.	n.	n.	n.	n.	n.s	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.s	n.s	n.	n.	n.	n.s	n.
	s	s	s	s	s		s	s	s	s	s	s			s	s	s		s

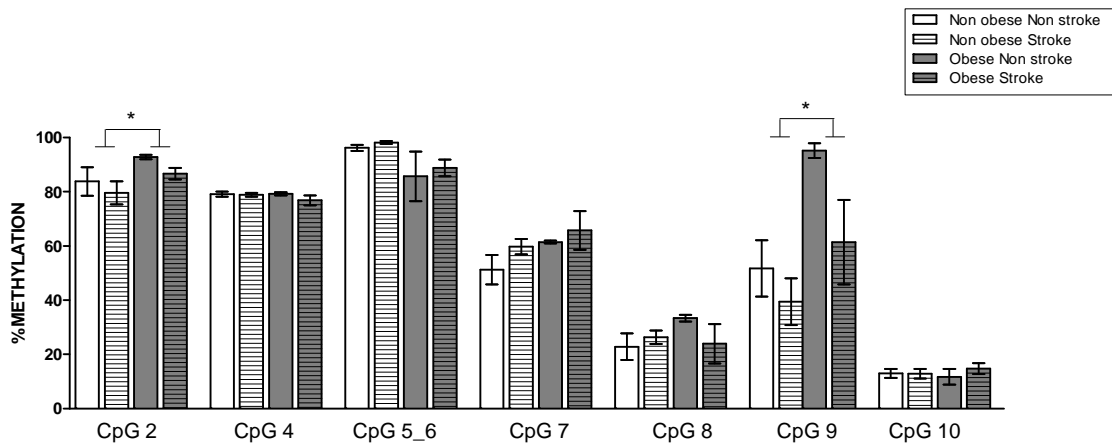
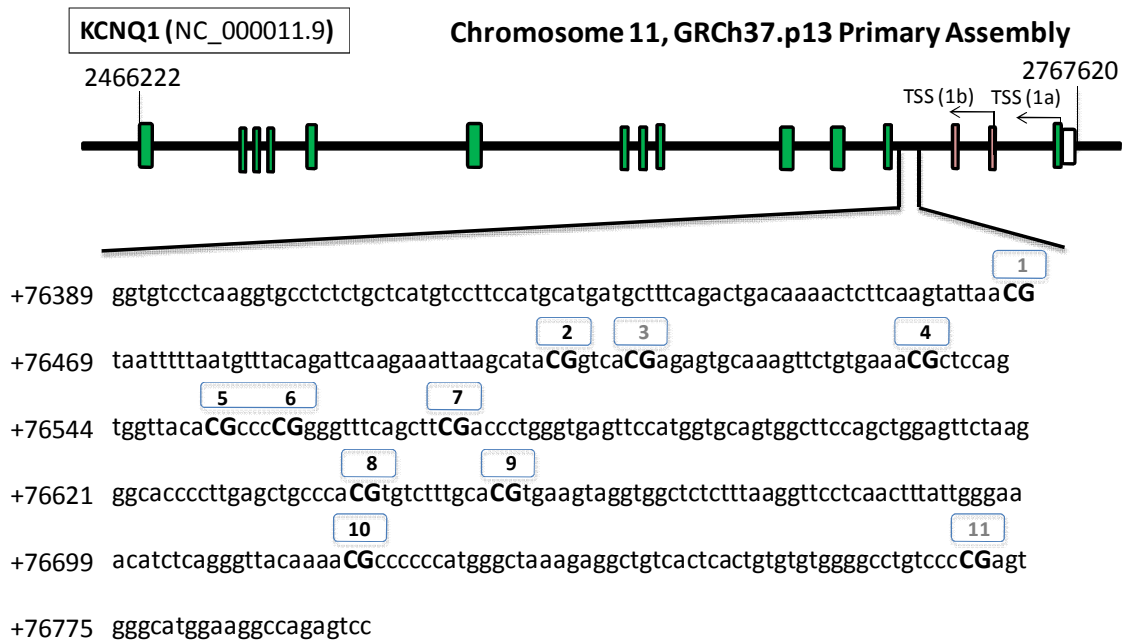
**Supplementary data figure 3:** Baseline DNA methylation status (%) of CpG sites of *WT1* in obese and non obese and stroke and non stroke patients (n=24). Studies of CpG methylation were measured by EpiTyper. Results are shown as mean ± SE. \* p<0.05, n.s. non significance.



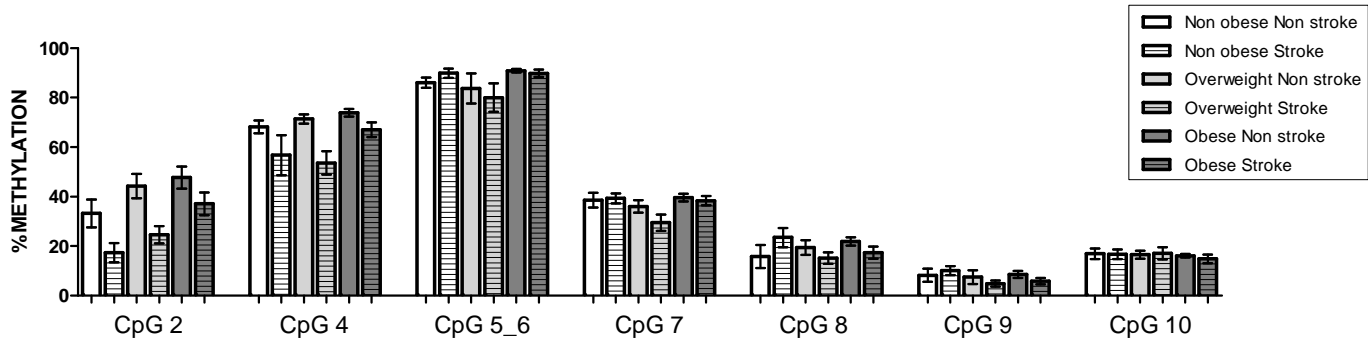
**Supplementary data figure 3:** Baseline DNA methylation status (%) of CpG sites of *PM20D1* in obese and non obese and stroke and non stroke patients (n=24). Studies of CpG methylation were measured by EpiTyper. Results are shown as mean  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$ .



**Supplementary data 4:** Baseline DNA methylation status (%) of CpG sites of *CALD1* in obese and non obese and stroke and non stroke patients (n=24). Studies of CpG methylation were measured by EpiTyper. Results are shown as mean ± SE. \* Non obese non stroke vs Non obese Stroke, € Non obese non stroke vs Obese Non stroke, ¥ Obese non stroke vs obese stroke, \$ Non obese stroke vs obese stroke.



**Supplementary data Figure 5:** Baseline DNA methylation status (%) of CpG sites of *KCNQ1* in obese and non obese and stroke and non stroke patients (n=24). Studies of CpG methylation were measured by EpiTyper. Results are shown as mean  $\pm$  SE. \* p<0.05.



Obesity	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Stroke	**	*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Obesity*Stroke	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

**Supplementary data 6:** Baseline DNA methylation status (%) of CpG sites of *KCNQ1* in VC (n=115). Studies of CpG methylation were measured by EpiTyper. Two way ANOVA test to analyze the interaction between obesity and stroke. Values are means  $\pm$  SD. n.s. non significant, \*  $p < 0.050$ , \*\*  $p < 0.01$ .





**Capítulo 3: Effect of a nutritional intervention on C-reactive protein concentration, HOMA index and methylation pattern of two stroke related genes in patients after suffering an ischemic stroke**



## **Effect of a nutritional intervention on C-reactive protein concentration, HOMA index and methylation pattern of two stroke related genes in patients after suffering an ischemic stroke**

Gomez-Uriz A, Abete I, Blazquez V, Mansego ML, Gonzalez-Muniesa P, de Arce A, Lopez de Munain, Martinez JA, Milagro FI, Campion.

### **Resumen**

Se ha descrito que en los sujetos que han sufrido un ictus isquémico se ven incrementados los marcadores inflamatorios que aumentan el riesgo de recurrencia. Por otro lado, se han descrito cambios epigenéticos después de un accidente cerebrovascular isquémico lo que sugiere que pueden participar en los procesos inflamatorios. La terapia nutricional no se considera como parte del tratamiento de estos casos, sin embargo, los beneficios que se podrían lograr con ello podrían ser de especial relevancia.

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de un programa de intervención nutricional en la antropometría, la composición corporal y las variables bioquímicas, como la concentración de proteína C- reactiva y el patrón de metilación de dos genes relacionados con el accidente cerebrovascular en pacientes después de sufrir un accidente cerebrovascular isquémico. Fueron incluidos en el estudio pacientes entre 50-80 años de edad, e IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> y que habían sufrido un accidente cerebrovascular isquémico. El grupo control consistió en sujetos de la misma edad e IMC que no habían sufrido un accidente cerebrovascular. Los participantes seleccionados iniciaron un programa nutricional de 20 semanas, basado en una dieta equilibrada restringida en energía (-30% del total de energía requerida) con una alta adherencia a la dieta mediterránea. El patrón de metilación de dos genes relacionados con el accidente cerebrovascular fue estudiada al inicio y al final del programa de intervención al igual que las medidas antropométricas, la composición corporal y las variables bioquímicas. Además fue estudiada la influencia de los cambios en la metilación en la regulación de

estos cambios antropométricos y bioquímicos. El programa de intervención nutricional mejoró significativamente las variables antropométricas y de composición corporal, sin diferencias entre los grupos. La insulina y el índice HOMA-IR mejoraron significativamente en ambos grupos después del programa nutricional. La concentración de proteína C-reactiva (PCR) se redujo significativamente sólo en los pacientes que habían sufrido un ictus con anterioridad. Los niveles de metilación del ADN de los sitios CpG analizados fueron modificados significativamente por el programa de intervención nutricional. Curiosamente, algunos de estos cambios en la metilación explican parte de la variabilidad observada en la circunferencia de la cintura, la composición de la grasa corporal, la concentración de PCR y el índice HOMA-IR, lo que sugiere un posible patrón de regulación. En conclusión, el establecimiento de un programa de intervención nutricional en los pacientes después de sufrir un accidente cerebrovascular isquémico fue eficaz, mejorando parámetros antropométricos, de composición corporal y variables metabólicas tales como HOMA-IR y la concentración de PCR y cambios importantes inducidos en el patrón de metilación de dos genes relacionados con el accidente cerebrovascular. Los cambios observados en la antropometría, composición corporal y las variables bioquímicas parecían ser modulada por los cambios en la metilación obtenidos a través del programa nutricional.

## **Effect of a nutritional intervention on C-reactive protein concentration, HOMA index and methylation pattern of two stroke related genes in patients after suffering an ischemic stroke**

Gomez-Uriz A<sup>1\*</sup>, Abete I<sup>3\*</sup>, Blazquez V<sup>3</sup>, Mansego ML<sup>1,2</sup>, Gonzalez-Muniesa P<sup>1,2</sup>, De Arce A<sup>3,4,5,6</sup>, Lopez de Munain<sup>3,4,5,6,7</sup>, Martinez JA<sup>1,2</sup>, Milagro F<sup>1,2</sup>, Campion J<sup>1,2</sup>.

1 Department of Nutrition, Food Sciences and Physiology. University of Navarra, Pamplona, Spain.

2 CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Spain

3 Neuroscience Area, Institute Biodonostia, Donostia-San Sebastian, Spain

4 Department of Neurology Hospital Universitario Donostia, Donostia-San Sebastian, Spain

5 Department of Neurology. Neurovascular Unit. Hospital Universitario Donostia, Donostia-San Sebastian, Spain

6 CIBERNED (Ministry of Economy and Competitiveness, Institute Carlos III, Spain)

7 Department of Neurosciences. University of Basque Country UPV-EHU, San Sebastián, Spain

\* Both authors contributed equally to this work.

#Correspondence: PhD. Javier Campión Zabalza

E-mail address: [jcampion@unav.es](mailto:jcampion@unav.es)

Department of Nutrition, Food sciences and Physiology

University of Navarra

C/ Irunlarrea s/n Edif. Investigacion

Phone: 0034 948425600 ext. 806554



## ABSTRACT

**Introduction:** It has been described that subjects who have suffered an ischemic stroke have increased inflammatory markers which increase the risk of recurrence. Epigenetic changes have been described after an ischemic stroke and have been suggested to be involved in inflammatory processes. The nutritional therapy is not considered as part of the treatment of these subjects; however, the benefits that could be achieved with it might be of special relevance.

**Objective:** To investigate the effect of a nutritional intervention programme on anthropometric, body composition and biochemical variables such as C-reactive protein concentration and on the methylation pattern of two stroke related genes in subjects after suffering an ischemic stroke.

**Methods:** Patients between 50-80 years old, BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> and having suffered an ischemic stroke were included to participate. The control group consisted in subjects of the same age range and BMI as patients who had not suffered a cerebrovascular event. Selected participants started a 20-week nutritional programme based in an energy restricted balanced diet (-30% from total energy requirements) with high adherence to the Mediterranean diet. The methylation pattern of two stroke related genes was explored at baseline and at the end of the intervention programme. Anthropometric, body composition and biochemical variables were analysed at baseline and endpoint, and the influence of the methylation changes on the regulation of these anthropometrical and biochemical changes was investigated.

**Results:** The nutritional intervention programme significantly improved anthropometrical and body composition variables with no differences between groups. Insulin and HOMA-IR index were significantly improved in both groups after the nutritional programme. C-reactive protein (CRP) concentration was significantly decreased only in patients. Methylation levels of the CpG sites analysed were significantly modified by the nutritional intervention programme. Interestingly, some of these methylation changes explained part of the variability observed in waist circumference, body fat composition, CRP concentration and HOMA-IR index, suggesting a possible regulation pattern.

**Conclusion:** The establishment of a nutritional intervention programme in patients after suffering an ischemic stroke was effective improving anthropometric, body composition and metabolic variables such as HOMA-IR and CRP concentration, and induced important changes in the methylation pattern of two stroke related genes. Changes observed in anthropometry, body composition and biochemical variables seemed to be modulated by the methylation changes achieved through the nutritional programme.



## INTRODUCTION

Stroke is the second leading cause of death and long-term disability in developed countries (Truelsen et al., 2006). In the face of an elderly population of increasing size, stroke is likely to be responsible for even greater disability and death. Risk factors for stroke are well established: advanced age, gender, race, genetic susceptibility, hypertension, diabetes *mellitus*, left ventricular hypertrophy, atrial fibrillation, smoking, alcohol consumption and diet (Zhang et al., 2011).

Since several years ago obesity is also considered a risk factor for stroke and chronic low-grade inflammation has been hypothesized as the underlying pathophysiological mechanism between obesity and chronic disease risk (Brooks et al., 2010). It is known that inflammation is involved in atherosclerotic processes favouring cardiovascular disease development. Elevated C-reactive protein (CRP) concentration has been associated with an increased risk of cerebrovascular and cardiovascular events and recurrent risk of vascular events among patients with established coronary artery disease (Rajeshwar K et al., 2012). Thus, a number of prospective studies suggest CRP as a predictor of first ever or recurrent cerebrovascular events.

Nutrition plays much more important role in cerebrovascular events than it is appreciated by health professionals (Foroughi M et al., 2013). Dietary intake in relation to low-grade inflammation has been investigated in a number of studies. Higher consumption of red and processed meat, refined carbohydrates and animal fats has been positively associated with CRP concentration (Oude Griep et al., 2013), whereas “healthy” dietary patterns characterised by higher intakes of vegetables, legumes, fruits, nuts, whole-grain products and mono- and polyunsaturated rather than saturated fats have shown negative associations, offering protection against cardiovascular diseases and stroke (Barbaresko et al., 2013). Nutritional intervention programs have shown to be effective decreasing inflammatory cytokines in obese subjects (Hermsdorff et al., 2011). However, there is a lack of information about nutritional intervention trials on subjects who have suffered a stroke, and similar benefits could be achieved if a controlled nutritional therapy would be considered together with the conventional treatment.

On the other hand, “epigenetics” has emerged as a highly promising possibility to target diverse pathologies, including stroke (Qureshi et al., 2010). Epigenetics is the study of heritable changes in gene expression that are not due to changes in DNA sequence. The most studied epigenetic mechanisms are changes in chromatin organization by histone modifications and DNA methylation at cytosines followed by guanines (CpG regions). The methylated CpG dinucleotides are clustered in small stretches called CpG islands prominently within the promoter regions of genes. DNA methylation can result in reduction or cessation of mRNA transcription (Qureshi et al., 2013). When these CpG islands are highly methylated, they are usually associated with an inhibition of gene expression. In this sense, it is known that ischemia leads to great alterations in gene expression and epigenetic changes have been suggested as the main precursors. The global amount of DNA methylation rises after an ischemic insult and this increase correlates with augmented brain injury (Schweizer et al., 2013). Inflammatory processes after stroke are rapidly increased increasing the negative consequences of the event and also epigenetic mechanisms have been suggested to be involved. Thus, the manipulation of transcription on the epigenetic players could lead to a protection level. Epigenetic modulation of some genes has been shown by dietary manipulation, however, most striking results have been observed in animals (Cordero et al., 2013). In this sense, nutritional intervention programs could play an important role in the regulation of epigenetic mechanisms and a deeper knowledge is necessary in this area. Thus, the present study aimed at investigate the effect of a nutritional intervention programme on C-reactive protein concentration and on the methylation pattern of stroke related genes in subjects who have already suffered an ischemic stroke.

## **METHODS**

### *Subjects*

Stroke patients (16 men; 6 women), presenting with new stroke evaluated in the Stroke Unit of the Donostia University Hospital (Spain), between September 2010 and September 2012 were evaluated to be included in the study. All patients were examined

by a qualified neurologist who performed the anamnesis, evaluated the somatic and neurological status and determined the type of stroke. Isquemic stroke was differentiated by computer tomography scan and magnetic resonance imaging. Inclusion criteria to participate in the intervention programme were defined as age 50-80 years old, BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> and having suffered an ischemic stroke. Only patients with acute ischemic stroke hospitalized within 24 hours from the occurrence of symptoms were included.

The control group (9 men; 9 women) consisted in subjects of the same age range as patients with also a BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> who had not suffered a cerebrovascular event.

Subjects with major cardiac, renal, hepatic, endocrinological disorders, skeletal disorders, cancer, inflammatory diseases and recent infections were not included in the study. After a detailed explanation of the study protocol, all subjects gave written informed consent to participate in the trial, which was previously approved by the Ethics Committee of the Hospital.

### *Study design*

Subjects were enrolled in the study and started a 20-week nutritional programme. Dietary treatment consisted in an energy restricted balanced diet designed to provide a macronutrient distribution of 50% of energy as carbohydrates, 20% as proteins and 30% as fat, maintaining the proportion of fatty acids within recommended levels MUFA <10%, PUFA >10% and SFA =10%. Fibre content was about 25-30 g/d and dietary cholesterol <300 mg/d. Foods were distributed in 4-5 meals during the day, and consumption of fruits, vegetables, legumes, fatty fish, nuts and olive oil was encouraged. Participants were individually instructed by a trained dietician to follow the prescribed dietary regime for twenty consecutive weeks. The induced energy restriction was -30% with respect to the total energy requirements of each participant previously calculated by the Harris-Benedict equation (Harris and Benedict, 1918) and corrected by the individual physical activity level (WHO, 2000). Participants were asked to maintain the same habitual physical activity habits during the intervention period, which was assessed through specific questions during fortnightly interviews. Weight loss and body composition were monitored every 15 days by a dietician and the intake was controlled

by 3-day weighted food records (2 weekdays and 1 weekend day). Food records were performed during the week before the beginning of the intervention (week -1) and during the week before the end of the nutritional trial (week 19). These data provided information about baseline intake and the adherence to the prescribed diets. Blood samples were assessed at baseline (day 0) and at the endpoint (day 140).

#### *Anthropometric and body composition*

Anthropometric measurements (body weight, height, waist and hip circumferences) were carried out with the subjects in their underwear. Body weight was measured to the nearest 0.1 kg (Seca 767, Vogel & Halke, Germany). Height was estimated with a stadiometer (Seca 713 model, Postfach, Germany) to the nearest 1 mm. BMI was calculated as the body weight divided by the squared height ( $\text{kg/m}^2$ ). Waist circumference was measured at the site of the smallest circumference between the rib cage and the iliac crest, and hip circumference was measured on the maximum circumference over the buttocks with the subject in standing position. Body composition was assessed by bioelectrical impedance (Quadscan 4000, Bodystat, UK).

#### *Blood pressure and biochemical assessments*

Blood pressure was measured with a standard mercury sphygmomanometer (Minimus II, Riester, Jungingen, Germany) after the subject was quietly sitting for 5 minutes following WHO criteria (WHO, 2000). Venous blood samples were drawn in a fasting state (12 h). EDTA plasma and serum were separated from whole blood by centrifugation (3,500 rpm, 15 min, 5°C) and stored at -20°C until assay. Glucose, total cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG) serum concentrations were measured in an autoanalyser Pentra C-200 (HORIBA ABX, Madrid, Spain) with specific kits.

Insulin concentrations were determined by an enzyme linked immunosorbent assay kit (Mercodia, Uppsala, Sweden) in a Triturus autoanalyzer (Grifols SA, Barcelona, Spain). Insulin resistance was estimated by the HOMA index [ $\text{HOMA-IR} = [\text{glucose (mmol/L)} \times$

insulin ( $\mu\text{U/ml}$ )]/ 22.5. Low density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) levels were calculated following the Friedewald formula:  $\text{LDL-c} = \text{TC} - \text{HDL-c} - \text{TG}/5$  (Friedewald et al. 1972).

Inflammation was assessed by means of plasma protein C-reactive concentration which was determined in a Triturus autoanalyzer (Grifols SA, Barcelona, Spain) by using an Immundiagnostik AG kit, (Bensheim, Germany).

#### *Cardiovascular risk factors*

Hypertension was defined as systolic blood pressure  $>140$  mmHg and/or a diastolic blood pressure  $>90$  mmHg based on the average of two blood pressure measurements, or a patient's self-reported history of hypertension or antihypertensive use. Diabetes was diagnosed if fasting plasma glucose was  $>110$  mg/dl or patient was on anti-diabetic medications. Dyslipidaemia was diagnosed if LDL-cholesterol was  $>200$  mg/dl or TG  $>150$  mg/dl or patient was on medication.

Smokers were defined as those reporting daily smoking. Ex-smokers and occasional smokers were classified as non-smokers. Alcohol consumption was defined as consumption of at least one alcoholic drink per week.

#### *Methylation measurement*

DNA was isolated from total blood cells by using the MasterPure kit (Epicenter, Madison, WI, USA), and its quality was assessed with PicoGreen dsDNA Quantification Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA (500 ng) was bisulfite converted by using the EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, CA, USA). The samples were randomly distributed to the bisulfate treatment independently of the group to control for the conversion efficiency variability between groups. The methylation profiles of *KCNQ1* and *WT1* were assessed by the *Sequenom MassArray® EpiTyper™* approach (Sequenom, San Diego, CA, USA), which relies on base-specific cleavage followed by MALDI-TOF mass spectrometry. Briefly, 4 amplicons (400–500 bp) covering the relevant CpGs in the promoter region were designed (Supplementary Data) and tested as previously described (Milagro et al., 2011). The CpGs were numbered according to the position in the studied region.

### *Statistical analysis*

Sample size was established considering the CRP concentration as the main variable. Nutritional treatment was designed to induce a weight loss of at least 5% from baseline weight which in turn will induce an improvement in CRP concentration. Thus, published values for the standard deviation (SD) of CRP concentration were applied (Sharman and Volek, 2004) and 1.1 mg/L (Hermsdorff et al., 2011) was considered as the potential difference between baseline and endpoint measurements within each group. The statistical power was set up at 90% and by applying a  $p$ -value  $< 0.05$ , the sample size required was a minimum of 14 subjects per group. A 25% withdrawal was expected during the intervention period, thus, the sample size was established in 18 subjects per group. The results are expressed as mean  $\pm$  SD.

Normality distributions of the measured variables were determined according to the Shapiro–Wilk test. Differences between the beginning and the end of the nutritional period were analyzed by a paired t-test for parametric variables or Wilcoxon test for non-parametric. The analysis between groups (control/patient) was performed through an independent measures t-test for parametric or U-Mann Whitney test for non-parametric variables. Pearson's or Spearman's correlation coefficients were driven in order to analyse the relationship between variables. And a lineal regression analysis was performed to explain the variation of related variables. To assess the global methylation level of each gene, the methylation of each CpG site analysed was summed. Then the median of the global methylation of each gene was considered as the cut-off point to divide the groups in higher and lower methylated (medians: 3.14 for *KCNQ1* and 5.14 for *WT1*). Thus, those controls and patients below the median were considered as lower methylated than those above the median.

Analyses were carried out using SPSS 15.1 software for Windows (SPSS Inc, Chicago, USA). Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant.

## RESULTS

A total of 65 subjects (37 patients; 28 controls) were enrolled to participate in the study and 40 (22 patients; 18 controls) completed the 20-week nutritional intervention programme.

### *Anthropometric, blood pressure and biochemical variables*

Baseline characteristics are shown in Table 1. The nutritional intervention programme induced significant changes in anthropometric and body composition variables in both groups without statistically significant differences between them (Table 2).

**Table 1:** Baseline characteristics

Variables	Controls	Patients	p-value
n (men/women)	18(9/9)	22(16/6)	-
Age (years)	62.8±7.2	65.9±7.5	0.199
<b><i>Anthropometric and body composition</i></b>			
Weight (kg)	92.5±10.7	92.5±10.3	0.994
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34.4±3.2	34.3±3.2	0.955
Waist (cm)	108.1±8.6	109.5±10.1	0.647
Hip (cm)	116.3±10.1	112.1±8.5	0.156
WHR	0.93±0.12	0.98±0.10	0.201
Fat mass (%)	41.5±7.5	37.2±8.9	0.123
Fat mass (kg)	38.2±7.1	34.1±7.5	0.094
Lean mass (kg)	54.9±11.1	58.3±11.9	0.377
<b><i>Blood pressure</i></b>			
SBP (mmHg)	133.9±16.7	137.7±22.7	0.597
DBP (mmHg)	78.9±7.4	77.5±11.4	0.684
<b><i>Risk factors*</i></b>			
Current smokers (%)	5.6	18.2	0.240
Alcohol habit (%)	50	50	0.624
Diabetes (%)	5.6	31.8	<b>0.044</b>
Dyslipidaemia (%)	33.3	54.5	0.153
HTA (%)	33.3	86.4	<b>0.001</b>
<b><i>Biochemical</i></b>			
Glucose (mg/dl)	105.6±18.3	108.9±26.7	0.667
Insulin (µU/mL)	14.2±6.9	13.5±3.8	0.747
HOMA-IR	3.81±2.1	3.81±1.35	0.996
TC (mg/dl)	222.8±28.5	180±43.7	<b>0.001</b>
HDL-c (mg/dl)	60.5±15.6	47.2±13.3	<b>0.006</b>
LDL-c (mg/dl)	137.2±27.8	109.8±34.4	<b>0.010</b>
TG (mg/dl)	125.4±69.9	114.6±51.5	0.628
TC/HDL-c index	3.8±0.9	3.9±1.2	0.793
LDL-c/HDL-c index	2.4±0.6	2.4±0.9	0.886
CRP (mg/L)	3.2±2.2	3.4±3.1	0.848

HTA hypertension; WHR waist-to-hip ratio; SBP systolic blood pressure; DBP diastolic blood pressure; TC total cholesterol; TG triglycerides; CRP c-reactive protein. \*p value from  $\chi^2$  test

Blood pressure was maintained without statistically significant changes during the intervention programme in both groups. Regarding biochemical variables both groups showed significant improvements in glucose metabolism with no differences between them. Lipid profile (TC, LDL-c, HDL-c) did not change significantly in any group, only triglycerides concentration was significantly decreased in both groups. Two atherogenic indexes were calculated and no significant differences were observed after the nutritional intervention programme, neither within nor between groups. Interestingly, C-reactive protein concentration significantly decreased in patients; however, the change did not reach statistical significance between groups (Table 2).

**Table 2:** Anthropometric, body composition, blood pressure and biochemical changes after nutritional intervention programme

Variables	Controls	Patients	p-value
<b><i>Anthropometric and body composition</i></b>			
Weight (kg)	-7.4±4.7*	-6.4±4.5*	0.494
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-7.2±4.9*	-6.6±4.3*	0.680
Waist (cm)	-5.5±2.8*	-4.5±3.9*	0.391
Hip (cm)	-4.6±3.5*	-4.4±2.8*	0.868
WHR	-0.84±4.2	-0.05±4.9	0.593
Fat mass (%)	-3.6±3.5*	-3.0±4.1*	0.635
Fat mass (kg)	-16.8±13.4*	-14.2±13.6*	0.550
Lean mass (kg)	-4.1±5.6*	-2.6±4.9*	0.394
<b><i>Blood pressure</i></b>			
SBP (mmHg)	0.5±16.6	-4.1±18.4	0.456
DBP (mmHg)	-2.0±10.7	2.8±18.1	0.333
<b><i>Biochemical</i></b>			
Glucose (mg/dl)	-11.8±23.9	-4.4±14.2	0.249
Insulin (µU/mL)	-35.1±27.8*	-30.8±24.7*	0.650
HOMA-IR	-42.1±32.8*	-38.5±23.9*	0.732
TC (mg/dl)	-5.1±11.2	2.0±19.4	0.189
HDL-c (mg/dl)	2.4±17.1	8.2±18.5	0.326
LDL-c (mg/dl)	-2.9±15.6	5.0±26.2	0.274
TG (mg/dl)	-24.5±23.9*	-13.5±27.9*	0.202
TC/HDL-c index	-5.7±14.6	-4.5±15.5	0.816
LDL-c/HDL-c index	-3.6±18.4	-1.8±21.5	0.787
CRP (mg/L)	-11.9±40.4	-27.8±30.4*	0.190

\*Statistical differences between baseline and endpoint within each group.



*Methylation pattern*

The methylation pattern of several CpG sites of two genes (*KCNQ1* and *WT1*) was analysed (Table 3). Before starting the nutritional intervention programme, patients showed significantly lower methylation levels in the 10-CpG site of *KCNQ1* and significantly higher methylation levels in the 21-CpG site of *WT1*. Methylation levels of the 10-CpG site from the *KCNQ1* gene were significantly associated with baseline BMI (Spearman's  $\rho=0.559$ ,  $p=0.007$ ) and body fat (Pearson's  $r=0.588$ ,  $p=0.006$ ) only in patients, and with total (Pearson's  $r=0.341$ ,  $p=0.032$ ) and HDL-c levels (Pearson's  $r=0.432$ ,  $p=0.005$ ) when both groups (controls and patients) were considered together. After the nutritional intervention the methylation level of the 10-CpG site from the *KCNQ1* gene significantly increased in patients while in controls tended to decrease, and remained positively associated to BMI (Spearman's  $\rho=0.574$ ,  $p=0.005$ ) and body fat content (Pearson's  $r=0.559$ ,  $p=0.008$ ) only in patients. The change observed in BMI was negatively correlated with the methylation change observed in this CpG site (Pearson's  $r=-0.573$ ,  $p=0.010$ ), suggesting a possible regulation pattern of the 10-CpG site from the *KCNQ1* gene and body composition.

On the other hand, baseline methylation level of the 21-CpG site of *WT1* was negatively correlated to baseline waist circumference only in patients (Pearson  $r=-0.513$ ,  $p=0.015$ ), and the association was not maintained after the nutritional intervention programme.

In general, the 20-week nutritional intervention induced statistically significant changes in the methylation level of most CpG sites analysed in both groups. The methylation level of the 22-CpG site of *WT1* was significantly decreased during the nutritional intervention only in patients reaching statistically significant differences between groups (Table 3). The methylation change in this CpG site was positively correlated to the change observed in total cholesterol (Spearman's  $\rho=0.665$ ,  $p=0.036$ ) only in controls and to the change in HOMA-IR (Spearman's  $\rho=0.743$ ,  $p=0.022$ ) only in patients, which could suggest possible regulation pathways of lipid and glucose metabolism respectively.

In order to assess the influence of the total methylation level of each gene on the response to the nutritional programme, the methylation level of each CpG site analysed was summed for each gene. Nutritional intervention programme significantly reduced

the total methylation level of both genes with no differences between groups (Table 3 a, b).

**Table 3a:** Methylation levels of WT1 region observed at baseline and endpoint in controls and patients, and methylation change in both groups during nutritional intervention.

CpG site numbers	Controls		Patients		Change		P-value (between changes)
	Baseline	Endpoint	Baseline	Endpoint	Controls	Patients	
<i>WT1</i>							
<b>1</b>	0.89±0.05	0.42±0.31	0.88±0.07	0.38±0.33	-0.46±0.33*	-0.51±0.35*	0.719
<b>2.3.4</b>	0.40±0.06	0.20±0.06	0.39±0.07	0.23±0.10	-0.20±0.06*	-0.16±0.13*	0.192
<b>5.6</b>	0.23±0.04	0.05±0.07	0.24±0.08	0.06±0.07	-0.18±0.08*	-0.18±0.10*	0.933
<b>7.8</b>	0.16±0.03	0.05±0.01	0.17±0.04	0.04±0.01	-0.11±0.03*	-0.12±0.05*	0.438
<b>9</b>	0.21±0.04	0.67±0.23	0.19±0.09	0.66±0.24	0.47±0.24*	0.46±0.24*	0.976
<b>10.11.12</b>	0.48±0.04	0.18±0.12	0.48±0.07	0.24±0.13	-0.30±0.11*	-0.24±0.16*	0.138
<b>13</b>	0.10±0.03	0.01±0.02	0.12±0.05	0.04±0.06	-0.09±0.04*	-0.08±0.06*	0.483
<b>14.15.16</b>	0.33±0.05	0.07±0.09	0.35±0.07	0.08±0.10	-0.26±0.11*	-0.27±0.12*	0.891
<b>17.26</b>	0.31±0.05	0.02±0.04	0.31±0.06	0.002±0.01	-0.29±0.07*	-0.30±0.06*	0.51
<b>19.2</b>	0.52±0.05	0.51±0.03	0.52±0.05	0.51±0.04	0.01±0.04	0.01±0.05	0.656
<b>21<sup>#</sup></b>	0.50±0.07	0.92±0.08	0.55±0.06	0.92±0.09	0.42±0.09*	0.38±0.11*	0.192
<b>22<sup>§</sup></b>	0.03±0.03	0.05±0.04	0.05±0.05	0.01±0.02	0.02±0.06	-0.04±0.06*	<b>0.015</b>
<b>23.24</b>	0.15±0.04	0.01±0.01	0.16±0.05	0.02±0.02	-0.14±0.04*	-0.13±0.06*	0.819
<b>25</b>	0.31±0.12	0.01±0.02	0.30±0.21	0.01±0.03	-0.29±0.12*	-0.28±0.22*	0.964
<b>27</b>	0.07±0.02	0.02±0.01	0.07±0.02	0.01±0.005	-0.05±0.02*	-0.06±0.02*	0.591
<b>28.29</b>	0.27±0.09	0.04±0.13	0.30±0.07	0.09±0.18	-0.23±0.16*	-0.21±0.20*	0.732
<b>30.31.32</b>	0.42±0.05	0.37±0.25	0.41±0.07	0.53±0.37	-0.07±0.23	0.15±0.35	0.348
<b>33</b>	0.45±0.07	0.38±0.25	0.46±0.09	0.22±0.22	-0.11±0.20	-0.18±0.19*	0.563
<b>34</b>	0.13±0.04	0.24±0.06	0.14±0.06	0.25±0.07	0.11±0.06*	0.10±0.08*	0.774
<b>35</b>	0.13±0.03	0.16±0.15	0.14±0.04	0.25±0.26	0.03±0.16	0.11±0.26	0.219
<b>Total</b>	6.15±0.62	3.50±0.81	6.24±1.08	3.91±0.75	-42.7±13*	-35.7±14.9*	0.13

**Table 3b:** Methylation levels of KCNQ1 region observed at baseline and endpoint in controls and patients, and methylation change in both groups during nutritional intervention.

CpG site numbers	Controls		Patients		Change		P-value (between changes)
	Baseline	Endpoint	Baseline	Endpoint	Controls	Patients	
<i>KCNQ1</i>							
2	0.57±0.14	0.21±0.23	0.51±0.21	0.19±0.18	-0.32±0.18*	-0.34±0.28*	0.769
4	0.75±0.08	0.57±0.13	0.73±0.09	0.59±0.14	-0.18±0.10*	-0.14±0.18*	0.334
5.6	0.92±0.02	0.78±0.17	0.90±0.03	0.83±0.08	-0.13±0.17*	-0.07±0.08*	0.132
7	0.41±0.08	0.41±0.18	0.38±0.08	0.43±0.14	0.01±0.20	0.04±0.13	0.543
8	0.23±0.08	0.18±0.06	0.21±0.08	0.17±0.04	-0.04±0.12*	-0.05±0.07	0.944
9	0.08±0.06	0.03±0.04	0.10±0.14	0.02±0.03	-0.04±0.07*	-0.08±0.13*	0.3
10 <sup>#</sup>	0.17±0.04	0.16±0.06	0.12±0.05	0.16±0.07	-0.01±0.08	0.04±0.07*	0.124
<b>Total</b>	3.08±0.36	2.36±0.56	3.02±0.44	2.38±0.41	-23.4±14.7*	-19.1±18.5*	0.43

\*Baseline differences in methylation levels between controls and patients. <sup>5</sup>Endpoint differences in methylation levels between controls and patients. \*Statistical differences between baseline and endpoint methylation levels within groups.

Considering the median of the total methylation of each gene (*KCNQ1*=3.14; *WT1*= 5.14) before starting the nutritional programme, a new analysis was performed. Those subjects with methylation levels above the median were considered as more methylated while subjects below the median were considered as less methylated. Comparison of baseline characteristics between subjects with higher and lower methylation levels regarding to the *KCNQ1* gene showed no significant differences in anthropometric, body composition and biochemical variables (data not shown). Nevertheless, when the groups (patients/controls) were separately considered, patients with higher methylation levels showed higher baseline body fat content (higher methylated: 30.7±5.9 kg vs lower methylated: 37.4±7.7 kg, p=0.045) and a tendency to higher BMI (higher methylated: 33.1±2.7 kg/m<sup>2</sup> vs lower methylated: 35.6±3.2 kg/m<sup>2</sup>, p=0.055) in comparison to lower methylated patients. In the group of controls no significant differences were observed at baseline between higher and lower methylated subjects (data not shown). After the nutritional intervention programme no significant differences were observed between

higher and lower methylated subjects in any group, controls and patients (Table 4a). Regarding biochemical variables, no significant differences were registered in controls between higher and lower methylated subjects, however, significant improvements were observed in insulin and C-reactive protein in lower methylated compared to higher methylated patients. Only, changes in insulin and HOMA index were significantly higher in lower methylated than in higher methylated patients (Table 4a).

The same analysis was carried out considering the total methylation median of the *WT1* gene. No significant differences were obtained between higher and lower methylated subjects in any group (control/patient) in anthropometrical, body composition and blood pressure after the nutritional programme (Table 4b). In general, subjects (controls and patients) with higher methylation levels tended to show better results than those with lower methylation levels. Insulin and HOMA-R were significantly improved in controls and patients with higher methylation levels. Only, the change in LDL-c was significantly different between lower and higher methylated control subjects (Table 4b).

**Table 4** :Anthropometric, body composition and biochemical changes considering the median of the total methylation level of each gene (*KCNQ1* and *WT1*)a) *KCNQ1* gene

<i>KCNQ1</i> gene methylation pattern	Controls			Patients		
	Methylation level <3.14	Methylation level >3.14	p-value	Methylation level <3.14	Methylation level >3.14	p-value
<b><i>Anthropometric and body composition variables</i></b>						
Weight (kg)	-9.0±4.1*	-6.1±4.9*	0.212	-6.8±3.9*	-5.9±5.2*	0.680
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-9.2±4.2*	-5.6±5.0*	0.127	-7.1±3.3*	-6.0±5.2*	0.584
Waist (cm)	-5.9±2.9*	-5.1±2.8*	0.515	-5.3±2.5*	-3.7±4.9*	0.338
WHR	0.40±3.94	-1.84±4.37	0.275	-0.91±4.56	0.81±5.34	0.425
Fat mass (kg)	-19.6±15.9*	-14.5±11.5*	0.439	-17.6±14.2*	-10.7±12.6*	0.271
Lean mass (kg)	-5.6±5.6*	-2.8±5.5	0.312	-2.0±5.7	-3.2±4.2*	0.614
<b><i>Blood pressure</i></b>						
SBP (mmHg)	2.5±23.7	-1.5±5.1	0.672	-4.3±17.2	-3.9±20.5	0.961
DBP (mmHg)	-3.2±10.4	-0.8±11.7	0.689	6.1±16.4	-0.39±20.0	0.440
<b><i>Biochemical variables</i></b>						
Glucose (mg/dl)	-14.1±32.0	-9.6±13.6	0.722	-8.3±15.5	-0.2±12.0	0.198
Insulin (μU/ml)	-33.3±23.5*	-36.7±33.1*	0.817	-44.6±12.2*	-16.9±26.9	<b>0.025</b>
HOMA-IR	-44.6±30.1*	-39.3±37.9*	0.769	-50.3±15.8	-24.9±25.4*	<b>0.035</b>
TC (mg/dl)	-2.5±12.4	-7.3±10.2	0.393	-0.2±19.0	4.2±20.4	0.607
LDL-c (mg/dl)	-3.1±15.3	-2.8±16.8	0.968	3.3±27.3	6.7±26.3	0.765
HDL-c (mg/dl)	7.6±19.6	-2.2±14.1	0.249	11.2±19.3	5.1±18.1	0.451
TG (mg/dl)	-26.2±24.5	-22.9±24.7	0.789	-23.4±24.7	-3.5±28.4	0.096
TC/HDL-c	-8.1±12.3	-3.5±16.9	0.542	-8.7±18.0	-0.4±12.0	0.219
LDL-c/HDL-c	-8.5±15.8	0.68±20.3	0.318	-5.8±23.6	2.0±19.4	0.404
CRP (mg/L)	-5.5±47.8	-17.7±34.4	0.553	-23.1±32.4*	-33.1±29.0	0.493

b) *WT1* gene

<i>WT1</i> gene methylation pattern	Controls			Patients		
	Methylation level <5.14	Methylation level >5.14	p-value	Methylation level <5.14	Methylation level >5.14	p-value
<b><i>Anthropometric and body composition variables</i></b>						
Weight (kg)	-6.7±4.7*	-7.9±4.8*	0.630	-7.4±5.3*	-5.5±3.7*	0.327
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-6.1±4.9*	-8.0±4.9*	0.442	-7.7±4.8*	-5.6±3.7*	0.251
Waist (cm)	-5.1±3.3*	-5.8±2.5*	0.611	-5.9±4.8*	-3.3±2.6*	0.140
WHR	-0.82±4.4	-0.86±4.2	0.984	-0.44±6.89	0.27±2.69	0.762
Fat mass (kg)	-16.7±18.0*	-16.9±9.4*	0.982	-15.2±15.8*	-13.2±11.6*	0.750
Lean mass (kg)	-3.8±7.3	-4.2±4.2*	0.881	-2.9±6.0	-2.2±3.8*	0.767
<b><i>Blood pressure</i></b>						
SBP (mmHg)	-1.3±11.3	1.9±20.4	0.728	-6.5±15.8	-2.2±20.9	0.619
DBP (mmHg)	-5.7±7.9	0.7±12.2	0.288	-0.3±18.5	5.4±18.3	0.498
<b><i>Biochemical variables</i></b>						
Glucose (mg/dl)	-20.6±31.6	-3.1±7.1	0.148	-6.0±10.5	-3.0±17.3	0.643
Insulin (μU/ml)	-21.2±25.2	-45.8±26.1*	0.078	-29.5±25.9	-31.7±25.3*	0.868
HOMA-IR	-38.2±37.5*	-45.5±30.3*	0.683	-33.3±28.9	-43.1±19.5*	0.449
TC (mg/dl)	0.2±8.1	-9.7±11.9*	0.067	-2.0±14.8	5.3±22.6	0.387
LDL-c (mg/dl)	4.8±11.3	-9.9±16.1	<b>0.048</b>	-0.7±21.9	9.7±29.4	0.364
HDL-c (mg/dl)	1.8±13.3	2.9±20.7	0.898	3.1±12.33	12.3±22.1	0.254
TG (mg/dl)	-22.6±26.4	-26.2±23.0	0.769	-11.1±28.9	-15.5±28.2	0.722
TC/HDL-c	-0.24±14.5	-10.5±13.7*	0.153	-3.9±16.9	-5.1±15.0	0.872
LDL-c/HDL-c	4.5±17.7	-10.9±16.7	0.084	-2.3±25.0	-1.5±19.2	0.932
CRP (mg/L)	-9.4±31.9	-14.2±48.6	0.816	-25.1±32.7	-30.3±29.7	0.721

\*significant differences between baseline and endpoint values within groups.

Finally, lineal regression analyses were carried out trying to explain the influence of methylation changes of several CpG sites on some metabolic changes observed in both groups after the nutritional intervention programme. Regarding anthropometry and body composition the change percentage in waist circumference and body fat content were studied and regarding biochemical variables HOMA-IR index and CRP changes were studied. Thus, the 7-CpG site of the *KCNQ1* gene and 28.29 and 33 of the *WT1* explained in a 51.2% ( $p_{\text{model}}=0.023$ ) the total variability observed in waist circumference (Table 5). The change in body fat content was explained in a 29.7% ( $p_{\text{model}}=0.005$ ) by changes registered in the 2 and 5 CpG sites of the *KCNQ1* gene and the 14.15.16 and 25 CpG sites of the *WT1* gene (Table 5). The change observed in HOMA-IR was explained in a 28.5% ( $p_{\text{model}}=0.021$ ) by methylation changes registered in 2, 5.6, 7 and 8 CpG sites of *KCNQ1* gene. And finally the change observed in CRP concentration was explained in a 37.3% ( $p_{\text{model}}=0.030$ ) by the group (control or patient) and the methylation changes in 19.20, 22, 25 and 27 CpG sites of *WT1* (Table 5).

**Table 5:** Lineal regression analyses that explain part of the variability observed in some of the anthropometrical, body composition and biochemical changes registered through the nutritional intervention programme in both groups (controls and patients), using methylation changes in the CpG sites of the genes (*KCNQ1* and *WT1*) as the main predictors of the changes.

Variables	$\beta$	p	$R^2_{\text{adj}}$	$P_{\text{model}}$
<b>Waist (% change)</b>				
7-CpG of <i>KCNQ1</i>	0.044	0.018		
28.29-CpG of <i>WT1</i>	-0.011	0.102	0.512	0.023
33-CpG of <i>WT1</i>	0.028	0.021		
<b>Body fat (% change)</b>				
2-CpG of <i>KCNQ1</i>	-0.092	0.122		
5.6-CpG of <i>KCNQ1</i>	0.399	0.005		
14.15.16-CpG of <i>WT1</i>	-0.186	0.013	0.297	0.005
25-CpG of <i>WT1</i>	0.084	0.408		
<b>HOMA-IR (% change)</b>				
2-CpG of <i>KCNQ1</i>	-0.014	0.952		
5.6-CpG of <i>KCNQ1</i>	0.940	0.080	0.285	0.021
7-CpG of <i>KCNQ1</i>	-0.353	0.077		
8-CpG of <i>KCNQ1</i>	-0.391	0.031		
<b>CRP (% change)</b>				
Group (control/patient)	-	0.034		
19.20-CpG of <i>WT1</i>	-1.011	0.035	0.373	0.030
22-CpG of <i>WT1</i>	0.017	0.677		
25-CpG of <i>WT1</i>	-1.912	0.138		
27-CpG of <i>WT1</i>	-1.302	0.130		

## DISCUSSION

The present study has investigated the effect of a nutritional intervention programme on anthropometric and biochemical variables in patients after an ischemic stroke and on the methylation pattern of two stroke related genes. Main results have shown that the nutritional therapy which was based on a balanced hypocaloric diet with high adherence to the Mediterranean diet effectively improved weight, waist circumference, body fat content, insulin and HOMA-IR, reducing cardiovascular risk factors in both groups. Inflammatory state, by means of plasmatic CRP concentration, was significantly decreased only in patients, suggesting an important effect of the nutritional intervention programme on the inflammatory state of these subjects. The relation between nutrition and inflammation seem to be well established by nutritional epidemiology and interventional trials. Many observational studies have shown lower plasmatic inflammatory cytokines in subjects following a Mediterranean dietary pattern (Van Bussel et al., 2013; Barbaresko et al., 2013; Viscogliosi et al., 2013). And clinical intervention trials have shown significant improvements in the inflammatory state of obese subjects after a balanced energy-restricted treatment (Hermsdorff et al., 2011). However, there is not a nutritional control in patients after an ischemic stroke and many benefits could be achieved if it was taken into account in conjunction with the habitual pharmacological treatment. In the present study, the nutritional programme was very useful improving anthropometry and body composition, and almost all biochemical variables, especially CRP concentration in stroke patients. Increased C-reactive protein levels in subjects who have already suffered an ischemic stroke increases the risk of recurrence (Rajeshwar et al., 2012). Thus, the improvement of the inflammatory state is an important point to decrease the risk of recurrence in stroke patients.

Epigenetic mechanisms have been suggested to be involved in the regulation of inflammatory pathways after an ischemic stroke as well as on the regulation of cardiovascular risk factors.

Interestingly, methylation levels of the CpG sites analysed of *KCNQ1* and *WT1* genes were significantly changed in groups, controls and patients, showing the important role of the nutritional therapy in the modulation of these epigenetic changes. Most of the



methylation changes were similar between controls and patients. The general tendency in both groups was the reduction of methylation levels of the CpG sites, but there were also some CpG sites that tended to increase their methylation level through the nutritional therapy. Animal studies have demonstrated that DNA methylation increases after an ischemic stroke modulating inflammatory mechanisms which are positively correlated with brain injury (Endres et al., 2000; Qureshi and Mehler, 2010). Thus, the fact that a nutritional intervention programme has decreased the methylation levels of the analysed CpG regions and the relationship of these epigenetic changes with the improvements observed in anthropometrical and biochemical variables is of great interest. In the present work, the lineal regression analyses showed that the methylation changes in several CpG sites were involved in the change observed in waist circumference and body fat content in controls and patients. Also, changes in HOMA-IR index and CRP concentration were partly explained by the change in several CpG sites. Only the 22 CpG site of the *WT1* was significantly different between groups. The change in this CpG site was associated with the change registered in HOMA-IR only in patients and was also related with the change observed in CRP concentration. More CpG sites of the *WT1* gene were involved in the reduction of the CRP concentration in patients. Thus, epigenetic mechanisms might be involved in the modulation of some cardiovascular risk factors and inflammatory state of stroke patients. Previous studies have considered epigenetic markers as predictive tools to assess individual differences in the response to a nutritional intervention (Moleres et al., 2013; Milagro et al., 2011). And the present study adds the evidence that a nutritional intervention can modify the methylation pattern of a specific gene leading to specific metabolic changes.

In conclusion, a nutritional intervention programme was able to modify the methylation pattern of two stroke related genes and was also effective improving anthropometric, body composition and metabolic variables such as CRP concentration in stroke patients. Most of these changes seemed to be modulated by the methylation changes achieved in both groups.

In this sense, more studies are necessary in order to better understand these epigenetic changes and manage specific nutritional intervention programmes to achieve the necessary epigenetic changes to control and regulate metabolic and cardiovascular risk factors.

## BIBLIOGRAPHY

- Barbaresko J, Koch M, Schulze MB, Nöthlings U. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutr Rev.* 2013; 71: 511-27.
- Brooks GC, Blaha MJ, Blumenthal RS. Relation of C-reactive protein to abdominal adiposity. *Am J Cardiol.* 2010; 106: 56-61.
- Cordero P, Gomez-Uriz AM, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the fatty acid synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet. *Genes Nutr.* 2013; 8: 105-13.
- Endres M, Meisel A, Biniszkiwicz D, Namura S, Prass K, Ruscher K, Lipski A, Jaenisch R, Moskowitz MA, Dirnagl U. DNA methyltransferase contributes to delayed ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2000; 20: 3175-81.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.
- Gibson RS. *Principles of nutritional assessment.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2005.
- Harris JA, Benedict FG. A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1918; 4: 370-3.
- Hermsdorff HH, Zulet MÁ, Abete I, Martínez JA. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *Eur J Nutr.* 2011; 50: 61-9.

- Moleres A, Campión J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, Gómez-Martínez S, Martínez JA, Azcona-Sanjulián MC, Martí A; EVASYON Study Group. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. *FASEB J.* 2013; 27: 2504-12.
- Oude Griep LM, Wang H, Chan Q. Empirically-derived dietary patterns, diet quality scores, and markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Curr Nutr Rep.* 2013; 2: 97-104.
- Qureshi IA, Mehler MF. Emerging role of epigenetics in stroke: part 1: DNA methylation and chromatin modifications. *Arch Neurol.* 2010; 67: 1316-22.
- Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A, Babu MS, Balakrishna N, Sharma V, Jyothy A, Munshi A. C-reactive protein and nitric oxide levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with clinical outcome. *Inflammation.* 2012; 35: 978-84.
- Report of a WHO consultation. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000; 894: i-xii, 1-253.
- Truelsen T, Piechowski-Jozwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogousslavsky J, Boysen G. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol* 2006; 13: 581-98.
- van Bussel BC, Soedamah-Muthu SS, Henry RM, Schalkwijk CG, Ferreira I, Chaturvedi N, Toeller M, Fuller JH, Stehouwer CD; EURODIAB Prospective Complications Study Group. Unhealthy dietary patterns associated with inflammation and endothelial dysfunction in type 1 diabetes: the EURODIAB study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013; 23: 758-64.

- Viscogliosi G, Cipriani E, Liguori ML, Marigliano B, Saliola M, Ettorre E, Andreozzi P. Mediterranean dietary pattern adherence: associations with prediabetes, metabolic syndrome, and related microinflammation. *Metab Syndr Relat Disord*. 2013; 11: 210-6.

## **V. Discusión general**



## 1. ASPECTOS GENERALES DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA

En los últimos años, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas en todo el mundo [Finucane 2011]. Recientes estudios estiman que la obesidad es el séptimo factor de riesgo de mortalidad a nivel mundial [Masters 2013]. La importancia de este aumento en la prevalencia de la obesidad, se debe fundamentalmente a las comorbilidades asociadas. La obesidad y en particular la obesidad abdominal, se ha asociado con el desarrollo de enfermedades como la diabetes *mellitus* tipo 2 [González-Serrano 2013], enfermedades cardiovasculares [Cote 2013], algunos tipos de cáncer [Gukovsky 2013] o enfermedades cerebrovasculares como el ictus [Chiquete 2013]. En este sentido, el ictus, supone la segunda causa de muerte en los países industrializados y la primera causa de dependencia y de gasto sanitario por discapacidad [Gong 2013].

Tanto las ECV y en concreto el ictus, como la obesidad, representan un reto en su estudio y abordaje terapéutico, ya que las causas como la sintomatología de estas patologías son muy heterogéneas. Además de su estudio de manera independiente, se aumenta la dificultad de análisis si se abordan en conjunto, pudiendo presentar una interacción entre ambas, ya que la obesidad se ha descrito como un factor de riesgo en el desarrollo de la patología cerebrovascular [Strazzullo 2010]. Por otra parte, tanto la inflamación producida en el momento del accidente cerebrovascular, como la inflamación de bajo grado presente en el pacientes obesos, podría ser el punto de unión que relacionaría estas dos patologías, que comparten mecanismos relacionados con su desarrollo [Strazzullo, 2010].

Tradicionalmente, el estilo de vida y la influencia genética se han descrito como las principales causas de estas dos patologías [Pezzini 2013], aunque recientemente ha emergido el estudio de una nueva aproximación que se postula como una prometedora herramienta para el estudio de diferentes patologías y un mecanismo que influye en estos desórdenes afectando a la regulación génica: la epigenética. Como ya se ha expuesto en la introducción, la epigenética hace referencia a toda aquella modificación que regula la expresión génica, sin cambios en la secuencia de nucleótidos. El mecanismo epigenético más estudiado es la metilación del ADN, que consiste en la

unión covalente de un grupo metilo a una citosina seguida de una guanina. A esta secuencia se le denomina sitio CpG [Wachsmann 1997].

El papel de la regulación epigenética se ha demostrado ampliamente en los últimos años en el caso de la obesidad y el sobrepeso. Así, se han descrito marcas epigenéticas diferenciales entre pacientes obesos y no obesos y una posible desregulación epigenética causada por el desarrollo de la obesidad [Symonds 2011] podría determinar la aparición de síndromes relacionados. Como se comenta también en la introducción, estas marcas epigenéticas diferenciales se pueden asociar, finalmente, a diferencias en los niveles de expresión génica entre las distintas enfermedades estudiadas, así como alteraciones a nivel plasmático, todos ellos responsables de la regulación de procesos clave como la adipogénesis [Zhue 2012], la inflamación [Toubal 2013] o la apoptosis [Fu 2012]. Estos cambios a nivel epigenético podrían determinar también la diferente respuesta a una intervención nutricional. En este sentido, varios estudios que analizan la respuesta de pacientes obesos a un tratamiento dietético de pérdida de peso, describen como dicha respuesta está influenciada por el patrón de metilación previo [Cordero, 2011, Milagro 2011, Moleres 2013]. Estos patrones diferenciales en la metilación de ADN podrían ayudar en un futuro en el diseño de una nutrición epigenéticamente personalizada.

A pesar de la gran evidencia que existe sobre la implicación de la epigenética en el desarrollo de determinadas patologías como el cáncer [Esteller 2008], o como se ha explicado anteriormente, en la obesidad y el sobrepeso, no existen muchos estudios en los que se analice la influencia de estos mecanismos en las enfermedades neurológicas [Barrachina 2009]. De acuerdo con la evidencia adquirida en otras patologías, el conocimiento y análisis de los mecanismos epigenéticos emerge como una posibilidad muy prometedora para mejorar diversas patologías neurológicas, como el ictus isquémico [Udali 2013]. Mediante la alteración de la regulación transcripcional, los mecanismos epigenéticos pueden ejercer influencia sobre todas las vías implicadas en el desarrollo de la enfermedad isquémica. Ya que los efectos a nivel transcripcional pueden ser beneficiosos en procesos que induzcan a muerte celular, procesos inflamatorios, o aquellos en los que se activen vías relacionadas con mecanismos de reparación [Schweizer 2013], los mecanismos epigenéticos pueden ayudarnos a comprender no solo el desarrollo de la ECV sino posibles estrategias terapéuticas.



En este contexto, la finalidad de este trabajo fue analizar e identificar la influencia del ictus isquémico y del IMC en los patrones de metilación del ADN. Además se pretendió determinar si estos cambios epigenéticos producidos por un accidente cerebrovascular isquémico determinaban la respuesta a una dieta hipocalórica en pacientes con obesidad establecida y un episodio isquémico, con el fin de lograr identificar posibles biomarcadores.

## **2. EFECTOS FENOTÍPICOS DEL ICTUS Y LA OBESIDAD**

### **2.1 Parámetros bioquímicos, celulares y hematológicos.**

Con el fin de descartar la posible heterogeneidad entre los pacientes que habían sufrido un accidente cerebrovascular y los controles, se diseñaron similares criterios de inclusión para los cuatro estudios de casos y controles de este proyecto de Tesis Doctoral. Estas poblaciones están ampliamente descritas en el apartado de material y métodos.

Tanto la primera como la segunda población (PI y PS), compuestas por 24 pacientes cada una, fueron pareadas por edad, sexo e IMC, según los criterios utilizados por Wang en 2009 [Wang 2009].

El primer capítulo se basa en el análisis de los datos obtenidos de la población inicial (PI). A pesar del diseño de casos y controles y los criterios de inclusión y exclusión, los niveles de glucosa en ayunas tendieron a ser mayores en la población que había sufrido un accidente cerebrovascular respecto a los voluntarios controles, lo que implica un mayor riesgo de volver a sufrir un ictus asociado a estos pacientes [Preiss 2013], como consecuencia de las alteraciones producidas por el ictus isquémico. Estos datos concuerdan con los expuestos por otros autores, en los que se describen cambios en este parámetro en las horas siguientes al accidente cerebrovascular. Diversos estudios han demostrado que la hiperglucemia es una de las complicaciones más frecuentes en la fase aguda del ictus. Se ha descrito que hasta un 50% de los pacientes presentan niveles de glucemia superiores a 6,9 mmol/l (124 mg/dl) y en cerca de un

70% las cifras de glucemia son superiores a 6,0 mmol/l (108 mg/dl), afectando a todos los subgrupos clínicos de infarto cerebral [Allport 2008].

Se propone por estos autores que este hecho puede ser debido a un aumento de los niveles sanguíneos de glucosa producidos como consecuencia del propio ictus [Guyomard 2009] y además como efecto derivado del tratamiento con rt-PA [Southerland\_ 2012]. En el capítulo 2, cuando se analizan la población selección (PS) y la población validación (PV), encontramos resultados similares que en la PI respecto a la glucemia. Por tanto de acuerdo a los estudios de este trabajo los niveles de glucosa son significativamente mayores en los pacientes que sufrieron un ictus isquémico respecto a los pacientes control. A pesar que en este trabajo la selección de los pacientes siguió unos criterios de inclusión y exclusión semejantes a la de diversos autores [Vauthey 2000, Paciaroni 2010, Boekholdt 2013] que señalan la presencia de niveles más altos de colesterol total, LDL y niveles menores de HDL en pacientes que han sufrido un ictus o cualquier ECV, no se encontró homogeneidad en cuanto a los cambios encontrados en el perfil lipídico entre poblaciones debidos al ictus.

Por otro lado, en las poblaciones PS y PV, se analizaron todas las fracciones de las células blancas totales. En ambas, los leucocitos se encontraban elevados en los pacientes que habían sufrido un ictus isquémico, datos derivados de la propia naturaleza del accidente cerebrovascular, en el cual se inicia una respuesta inflamatoria a nivel cerebral y la periférica, que desencadena el aumento de células del sistema inmune [Chamorro 2007, Kim 2012]. Además, en PV, se encuentran significativamente aumentados los neutrófilos y los linfocitos también en los pacientes con un accidente cerebrovascular. Si bien la causa es similar, estudios de expresión génica han señalado que en pacientes que han sufrido un ictus la expresión de genes implicados en la síntesis de neutrófilos se ven aumentada en las primeras horas tras el accidente [Tang 2006, Easton 2013].

Con el fin de analizar la respuesta de pacientes obesos que habían sufrido previamente un ictus isquémico, se diseñó un estudio de casos y controles denominada población intervención (PI) en el que se sometió a los voluntarios a un tratamiento dietético hipocalórico. En primer lugar, se analizaron los parámetros bioquímicos y antropométricos antes de comenzar dicho tratamiento, lo que en principio derivaría en cambios derivados de haber sufrido el ictus. No se encontraron diferencias significativas

entre los grupos en ningún parámetro excepto en el perfil lipídico. A pesar de que como se ha comentado anteriormente diversos autores apuntan a un aumento en los niveles de colesterol total, LDL y una disminución en los niveles de HDL en pacientes que han sufrido un ictus, los pacientes estudiados en esta población (PI) presentaban niveles menores en los tres parámetros incluyendo, además, los triglicéridos. Este dato puede ser debido a varios acontecimientos consecuentes al ictus, a la discapacidad producida por éste o a la estancia hospitalaria. Así un problema de deglución como la disfagia afecta a entre un 27% y un 64% de los pacientes que han sufrido un ictus. Esto imposibilita una deglución de los alimentos adecuada y por lo tanto puede producir déficits nutricionales que provocarían una disminución de las fracciones lipídicas [Geeganage 2012]. Por otro lado, existe un riesgo de malnutrición en los pacientes hospitalizados y más concretamente en los pacientes con ECV. Se estima que entre el 6,1% y el 62% de los pacientes que han sufrido un ictus, han sufrido o están en riesgo de desnutrición durante el ingreso hospitalario [Rowat 2011, Mosselman 2013]. Al igual que con la disfagia, el resultado final de la desnutrición es la pérdida de masa grasa y masa magra, y la disminución de la mayoría de los parámetros bioquímicos y metabólicos.

Por otro lado, tras someterse esta población a una dieta hipocalórica equilibrada, incluida una alta adhesión a la dieta mediterránea, se vieron disminuidos los valores de insulina y el HOMA-IR, lo que se asocia con una disminución de los factores de riesgo cardiovascular en ambos grupos, independientemente de que los pacientes hubiesen sufrido un ictus previo o no. Esta reducción, además se vio influenciada por la reducción del estado inflamatorio de todos los pacientes de PI. Estos datos están reforzados por multitud de artículos en los que la disminución de los niveles de insulina, y del HOMA-IR disminuyen el riesgo cardiovascular [Hermsdorff 2010, Leow 2012] y el riesgo de padecer un ictus [Barone-Rochette 2012]. Además, estudios con pacientes con obesidad mórbida han demostrado que parámetros inflamatorios como la IL-6, se relacionan con la resistencia a la insulina, medida por el HOMA-IR, sugiriendo que la inflamación desempeñaría un papel fundamental en esta alteración metabólica [Civera 2010].

El estudio de intervención dietética mejoró casi todas las variables bioquímicas, principalmente, la concentración de PCR en pacientes que habían sufrido un accidente cerebrovascular previamente. En este sentido, el aumento de los niveles de PCR en

pacientes que ya han sufrido un ictus isquémico aumenta el riesgo de recurrencia [Rajeshwar 2012]. Por otro lado, y ya que la PCR es una proteína con función proinflamatoria, la disminución de los niveles de PCR sugiere una reducción esta inflamación producida tanto por la obesidad como por el ictus. Este hecho se revela como un punto importante para disminuir el riesgo de recurrencia en pacientes con accidente cerebrovascular. Numerosos estudios de intervención nutricional clínicos han mostrado mejoras significativas en el estado inflamatorio de los sujetos obesos después de un tratamiento con restricción equilibrada de energía [Hermsdorff 2011, Lim 2013]. Esta disminución ayuda a reducir el riesgo de complicaciones como la diabetes *mellitus* tipo 2, la ECV, la hipertensión o la hipercolesterolemia entre otras.

## 2.2 Presión arterial

En el primer capítulo, junto con la tendencia al aumento de otros parámetros, la presión arterial sistólica presentaba valores mayores en la población que había sufrido un accidente cerebrovascular respecto a los voluntarios controles, como se esperaba a consecuencia de las alteraciones producidas por el ictus isquémico. Datos similares fueron descritos por Peters y col. en pacientes que habían sufrido un ictus. Estos pacientes presentaban una elevación de los niveles de presión arterial sistólica [Peters 2013], aunque la mayoría de los autores señalan que los cambios se producen tanto en la presión arterial sistólica como en la diastólica [Yadav 2013]. A pesar de que en las otras dos poblaciones los valores de presión arterial son similares, en PS, la presión sistólica, además, es mayor en los pacientes obesos. Esto concuerda con los datos obtenidos en otros estudios con pacientes obesos [Zhang 2013], aunque nos indica que existe una gran heterogeneidad en estos valores y que aunque relacionados posiblemente con los mecanismos epigenéticos [Cordero 2011], los resultados de presión arterial en este trabajo no son concluyentes.

## 2.3 Parámetros antropométricos

Todas las poblaciones analizadas en el presente trabajo fueron seleccionadas mediante un diseño de casos y controles y por el IMC. Tanto PI como PS fueron divididas en pacientes con normopeso ( $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ) y pacientes obesos ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) según los criterios de la OMS [WHO 2011]. En la PV además, se añadió otro grupo experimental de acuerdo con el IMC, el sobrepeso, que incluía pacientes con IMC comprendido entre 25,0 y 29,9  $\text{kg/m}^2$ . Finalmente, todos los pacientes de la PI eran obesos ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) independientemente de haber sufrido o no un ictus isquémico.

Esto dio lugar por lo tanto, y por la propia naturaleza del diseño, a diferencias en PI, PS, y PV en los valores de IMC y circunferencia de la cintura entre los grupos a medida que el IMC aumentaba. A pesar de estos criterios de inclusión y tras haber pareado los casos con los controles, en PI los pacientes que habían sufrido un accidente cerebrovascular tenían valores de circunferencia de la cintura y de masa grasa que tendían a ser mayores. Estos datos de circunferencia de la cintura eran similares también en la población selección. Además, las diferencias en la circunferencia de la cintura eran significativamente mayores en los pacientes que habían sufrido un ictus respecto a los controles en la población validación. Estos datos se deben a que tanto la adiposidad excesiva, principalmente, a nivel abdominal [Karcher 2013], como el aumento progresivo de IMC se han asociado con un incremento en la incidencia de accidentes cerebrovasculares [Overvad 2013].

En PI, aunque no existían diferencias en los parámetros antropométricos en el momento del inicio de la dieta, ambos grupos disminuyeron significativamente el peso, la circunferencia de la cintura y el contenido de grasa corporal, independientemente de la historia de ECV previa. Esto concuerda con los datos expuestos anteriormente, ya que esta pérdida de peso, asociada a una disminución de masa grasa, fundamentalmente a nivel abdominal, ayuda a la reducción del riesgo cardiovascular porque desciende la secreción de adipoquinas proinflamatorias [Bremer 2013]. Además, según han descrito otros autores en el caso de los pacientes que no habían sufrido un ictus disminuye el riesgo de padecerlo y, en los pacientes con antecedentes de accidente cerebrovascular,

reduce las posibilidades de recurrencia [Andersen 2013] y mejora la sintomatología asociada al ictus [Rincon 2008].

### **3. EFECTOS EPIGENÉTICOS Y EN LA EXPRESIÓN GÉNICA**

Gran cantidad de investigaciones han observado una relación entre la modulación epigenética y diferentes enfermedades [Esteller 2008, Gyparaki 2013]. Las evidencias sobre la regulación epigenética de la obesidad y el sobrepeso cada vez son mayores como se ha expuesto en la introducción de este trabajo y en el inicio de esta discusión. En este sentido, se puede observar en la bibliografía modificaciones a nivel de la metilación del ADN entre obesos y no obesos [Bouchard 2010], así como diferencias a nivel estas marcas que podrían predisponer a la respuesta a un determinado tratamiento dietético [Moleres 2013]. También se ha comentado anteriormente que no existen suficientes evidencias sobre la posible implicación de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo fisiopatológico de enfermedades neurológicas [D'Addario 2012] y concretamente del ictus [Krupinski 2013]. Un estudio prospectivo describe una asociación positiva entre la hipometilación de *LINE-1* en células sanguíneas totales y el aumento del riesgo cardiovascular y cerebrovascular. Este estudio señaló por primera vez que aquellos pacientes que sufrieron un ictus o un accidente cardiovascular tenían un porcentaje de metilación menor en dicho retrotransposón [Baccarelli 2010] que se utiliza como medida de metilación global.

En el primer capítulo se investigó por primera vez la influencia de la metilación de los promotores de los genes *TNF- $\alpha$*  y *PON* en el pronóstico del accidente cerebrovascular. Se seleccionaron los promotores de estos genes por la implicación en el inicio y el desarrollo de los accidentes cerebrovasculares [Pereira 2007, Urdinguio 2009] y la obesidad [Shin 2008] y por estudios previos del grupo, en los que se había demostrado la relación entre la obesidad y la regulación epigenética de *TNF- $\alpha$*  en relación con la obesidad [Campion 2010, Cordero 2011].

En este trabajo, se observó en primer lugar que los pacientes con accidente cerebrovascular previo presentaban una metilación total menor en la región del

promotor de *TNF- $\alpha$*  estudiada en comparación con los pacientes que no habían sufrido un ictus. Estos datos concuerdan con los descritos por otros autores que indican un aumento de la expresión de este gen en situaciones de inflamación subsiguientes al ictus isquémico [Ali 2013] y a la obesidad [Meerson 2013]. Además estos resultados a nivel epigenético concuerdan con los expuestos por otros autores, en los que también se observa una regulación epigenética en el promotor de *TNF- $\alpha$*  en los premonocitos que presentan niveles elevados de citoquinas proinflamatorias [ElGazzar 2008]. Un análisis de regresión logística confirmó esta asociación, en la que los valores de metilación del promotor de *TNF- $\alpha$*  podrían ser utilizados como un predictor potencial de diagnóstico de accidente cerebrovascular.

Además, en este trabajo también se describe por primera vez que, independientemente de la condición del accidente cerebrovascular y la ingesta dietética, los valores de metilación del promotor de *PON* son predictores de la composición corporal. Los pacientes con obesidad presentan niveles mayores de metilación total del promotor de *PON*. Estos datos concuerdan con los de otros autores que describen una correlación negativa entre la expresión de *PON* y el acúmulo de grasa fundamentalmente a nivel abdominal [Krzystek-Korpicka 2013]. Asimismo se ha implicado a *PON* en procesos inflamatorios, correlacionando con diferentes citoquinas proinflamatorias como *TNF- $\alpha$*  [Précourt 2012]. Estos datos pueden completarse con los observados en nuestro estudio, en los que existe una correlación positiva entre los niveles de metilación total del promotor de *PON* y los de *TNF- $\alpha$* .

Con respecto a los patrones de metilación del promotor de *TNF- $\alpha$*  específicos, el sitio CpG +309 pb estaba relacionado con el peso corporal, mientras que una región más amplia que incluía 3 sitios CpG (de -170 pb a -162pb) estaba relacionada con la calidad de la dieta, pero únicamente en los pacientes que no habían sufrido un accidente cerebrovascular. La asociación de la ingesta alimentaria y diferentes marcas epigenéticas sugiere un relación entre los factores dietéticos y la metilación del DNA en pacientes que han sufrido un ictus, independiente de otros factores ambientales. Además esta misma región estudiada en este trabajo (de -170 pb a -162 pb) ha sido previamente relacionada con una respuesta diferente a un tratamiento dietético hipocalórico en pacientes obesos [Campion 2009, Hermsdorff 2013]. Nuestro estudio también reveló que los niveles de metilación de los sitios CpG +15 bp y + 241 bp del

gen de *PON* se relacionaban con la composición corporal y, este último, con la ingesta energética y con dos índices; el índice de dieta saludable y el índice de calidad de la dieta [Goyenechea 2009]. Estos resultados también apuntan a que los niveles de metilación de la región estudiada de *PON* podrían ser utilizados en el futuro, y tras convenientes validaciones, como un biomarcador de nutrición personalizada.

Finalmente en este capítulo y con la misma población (PI), se realizó un estudio de *Chip Assay* con el objetivo de cuantificar las posibles modificaciones epigenéticas en las histonas H3 Lisina 9 acetilada, y H3 Lisina 4 trimetilada en la misma región de *TNF- $\alpha$*  analizada en los estudios de metilación. No se encontraron diferencias entre los pacientes que sufrieron un accidente cerebrovascular respecto a los pacientes que no habían sufrido ninguna ECV, ni entre los pacientes obesos respecto a los pacientes normopeso. A pesar de descartar la posibilidad de su utilización como biomarcadores, los estudios de Chip mostraron que los niveles de *TNF- $\alpha$*  circulantes se asociaban positivamente con un aumento de las modificaciones en H3 Lisina 9 acetilada y H3 Lisina 4 trimetilada en el promotor de *TNF- $\alpha$*  en las células blancas de los pacientes de la PI. Estos resultados son similares a los publicados por Engdahl y col. en el 2007, en los que se describe una asociación positiva entre los niveles de expresión de *TNF- $\alpha$*  y modificaciones en las histonas H3 y H4 acetiladas [Engdahl 2007].

Tras observar que la metilación del ADN podría estar involucrada en la susceptibilidad de padecer un accidente cerebrovascular y en la composición corporal, se procedió a realizar un estudio epigenético masivo en una población similar (PS). Para ello, se seleccionaron 24 pacientes con criterios de selección iguales a la PI (ver material y métodos). Tras extraer el ADN de las células blancas sanguíneas de todos los pacientes, fue realizado un *array* de metilación en el cual se analizaron 27.578 sitios CpG, localizados en 14.495 genes. Tras realizar un primer análisis, se seleccionaron todos aquellos sitios CpG en los que las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas, y además estos cambios en la metilación eran mayores en valor absoluto al 5%. Tras esta primera selección, se encontraron 96 sitios CpG diferencialmente metilados en los pacientes obesos respecto a los no obesos, 80 sitios CpG con cambios entre los pacientes que habían sufrido un accidente cerebrovascular respecto a los pacientes controles, y 59 sitios que presentaron una interacción entre el ictus y la obesidad. A partir de estos resultados, se decidió validar los resultados



mediante la tecnología *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, por la cual se analizaron un mayor número de sitios CpG colindantes al CpG seleccionado a partir del *array*.

Las 15 regiones seleccionadas para la validación se escogieron en base a estudios previos que describían previamente una regulación epigenética de genes relacionados con esas regiones, implicación en el desarrollo del ictus o la obesidad o sus comorbilidades, y mayor diferencia en los niveles de metilación entre los grupos experimentales. De los 21 sitios CpG analizados, previamente, por el *array* e incluidos en estas 15 regiones, 10 sitios CpG mostraron una gran correlación entre los niveles de metilación obtenidos mediante el *array* de metilación y los obtenidos mediante *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, validando parcialmente en un 66% los resultados previos. En este sentido, estos datos corroboraron que la técnica del *array* de metilación genera un gran número de falsos positivos y es necesario validar mediante otras técnicas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo y por otros autores, que tras validar un *array* de metilación obtenían resultados de validación similares [Milagro 2011, Moleres 2013]. Los sitios CpG de las regiones analizadas que además de validarse presentaron diferencias entre grupos pertenecían a los genes *CALD1*, *PM20D1*, *WT1* y *KCNQ1*.

El gen *CALD1* codifica la proteína calmodulina, el cual se une a la actina, desempeñando un papel esencial en la regulación de la contracción del músculo liso. Es un potente inhibidor de la actina-miosina activada y sirve como factor mediador para el  $Ca^{+2}$ . Además, se ha relacionado con procesos de neoangiogénesis y microvascularización en algunos gliomas sólidos [Zheng 2009]. En nuestro estudio, la región estudiada presentó cambios en los sitios CpG 1 y 8, mostrando además una interacción entre el ictus y la obesidad. Así, en los pacientes con normopeso que habían sufrido un accidente cerebrovascular se observó una hipometilación respecto a los pacientes normopeso que no habían sufrido un ictus isquémico. Este efecto era el contrario en los pacientes que sufrieron un ictus siendo obesos. Estos presentaron una hipometilación respecto a su grupo control. Estos datos sugieren una regulación epigenética producida por el ictus, además de un posible patrón de metilación diferencial dependiente del IMC. Es la primera vez que este gen se asocia con ictus o con obesidad, aunque la posible implicación de estos cambios debe ser analizado en futuros estudios.

Cuando se analizó la región del gen *PM20D1*, se encontró en los pacientes que habían sufrido un ictus respecto a los controles una hipermetilación en 8 de los 14 sitios CpG medidos. Los cambios en los porcentajes de metilación llegaron al 20%, por lo podría ser una región con una gran susceptibilidad a la metilación. Esto confirma los datos de Adalsteinsson y col., que en 2012 ya observaron diferencias en la metilación del promotor de *PM20D1* entre diferentes poblaciones de células blancas [Adalsteinsson 2012]. Estos datos apuntan a que los cambios detectados en la metilación de este gen, podrían estar relacionados con cambios en las proporciones entre los distintos tipos celulares de la fracción blanca de la sangre.

Cuando se analizó la expresión de este gen a partir de ARN extraído de células blancas totales de los mismos pacientes que formaban la PS, se observó una disminución de la expresión de este gen solo en las personas que habían sufrido un accidente cerebrovascular, presentando además una correlación negativa. Esta asociación entre ambas determinaciones nos indica un patrón clásico de regulación epigenética, donde un incremento en los niveles de metilación del promotor de un gen está asociado con un descenso en sus niveles de expresión [Campion 2009]. En cuanto a la implicación de *PM20D1* con el desarrollo de algún proceso patológico, únicamente un estudio asoció diversos SNPs localizados en una región cromosómica en la que se encontraba este gen con la enfermedad de Parkinson, por lo que podría estar implicado en el desarrollo de patologías neurológicas [Satake 2009].

En la región estudiada de *WT1* a partir de las muestras de los pacientes de PS, se observó una hipermetilación en los sitios CpG 9, 19\_20 y 25. Además en el sitio 19\_20 se observaron cambios en los pacientes que habían sufrido un ictus sin interacción con la obesidad, presentando una hipermetilación en los pacientes que habían sufrido un ictus respecto a los pacientes que no padecían ninguna ECV. Estos cambios en la metilación de la región del gen *WT1* estudiada, se ven reforzados por los obtenidos en un estudio previo de nuestro grupo [Milagro 2011], en el que se sugiere la implicación de la metilación en una región de este gen en la respuesta a la dieta por parte de pacientes obesos. Aunque los resultados no son similares a los obtenidos en el presente trabajo, ya que se modifican sitios CpGs diferentes y el efecto se muestra significativo tras una intervención dietética, nos confirman que existe una asociación entre la obesidad y cambios en la metilación del DNA de esta región genómica.

Finalmente, se analizó una región del gen *KCNQ1*, el cual codifica un canal de potasio dependiente de voltaje, requerido para la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco. En relación a este gen, se describen varios SNP a lo largo del gen que están asociados con un aumento de prevalencia de hiperglucemia [Torekov 2013] y diabetes *mellitus* tipo 2 [Sun 2012]. Concretamente para nuestro estudio, se encontró una hipermetilación en los pacientes obesos respecto a los pacientes no obesos en los sitios CpG 2 y 9, lo que sugiere de nuevo una posible relación de la metilación del ADN con el desarrollo de la obesidad. Esto confirmaría lo publicado por Yu y col. en 2012, que relaciona un SNP en este gen con el aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 [Yu 2012]. Un artículo reciente, ha relacionado la pérdida de peso a través de un plan de ejercicio físico con una hipermetilación de una región del promotor de *KCNQ1* [Rönn 2013]. Este artículo describe una regulación epigenética del gen *KCNQ1* en pacientes obesos y aunque los resultados no señalan hacia la misma modificación ni concuerdan en la magnitud de cambio, esto puede ser debido al tipo de pacientes, ya que además de la situación de obesidad tenían antecedentes familiares de diabetes *mellitus* como factor riesgo asociado. Más aún, junto con estas diferencias en las características fenotípicas de los pacientes, éstos sujetos habían perdido masa grasa a través de ejercicio físico. Más relevante aún es que el estudio se realizó analizando tejido adiposo, y la metilación del ADN es dependiente del tipo celular, por lo que aun confirmando la implicación de este gen en la fisiopatología de la obesidad, no se encuentran resultados similares.

Además de los estudios epigenéticos en la región del gen *KCNQ1*, se realizaron en los pacientes de PS estudios de expresión del ARNm codificado por este gen y de secreción por ELISA. Estos estudios mostraron diferencias entre los pacientes controles normopeso y los controles obesos, que fueron debidas a una disminución en los niveles de expresión y secreción de los pacientes obesos. Al igual que sucedía en el caso de *PM20D1*, además, existía una correlación negativa entre los niveles de metilación de la región estudiada de *KCNQ1* y su nivel de expresión. Estos datos concuerdan con los expuestos también por Rönn y col, en los que existe una correlación negativa entre los niveles de expresión y los niveles de metilación del DNA [Rönn 2013]. A la luz de todos estos datos, se confirma que la regulación transcripcional en células blancas de *KCNQ1* está relacionada con la obesidad y alguna de sus comorbilidades asociadas. Así como

ocurre con CALD1 y PM20D1, son necesarias más investigaciones para conocer el papel bioquímico y fisiológico de las modificaciones descritas en este trabajo y su implicación a nivel fisiopatológico.

Una vez analizados los resultados en la PS, y observando cambios relevantes en la metilación del DNA en las regiones analizadas previamente de *CALD1*, *PM20D1*, *WT1* y *KCNQ1*, se procedió a validar los resultados por segunda vez en una población mayor. Esta población (PV), como se explica en el apartado de material y métodos del presente trabajo, fue seleccionada de la base de datos del Hospital Donostia. Constó de 115 pacientes con un diseño experimental de casos y controles, en el que además de los dos grupos clasificados según IMC presentes en PI y PS, se añadieron pacientes con sobrepeso, para profundizar en la importancia del IMC en la regulación epigenética del ictus.

Se analizó el DNA extraído a partir de células blancas de los 115 pacientes de PV, mediante la misma técnica, y se estudiaron las mismas regiones que habían presentado en primer lugar una validación técnica, y biológica entre el estudio de *array* de metilación y *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, y que presentaron diferencias entre los grupos experimentales.

En este estudio, ampliado por tanto en distintos individuos y con un mayor número de pacientes (de 24 a 115), únicamente, los niveles de metilación de la región de *KCNQ1* mostró diferencias significativas entre los grupos. Estas diferencias se observaron en los sitios CpG 2 y 4. En el sitio CpG 2 se produjeron cambios dependientes de obesidad e ictus, sin presentar una interacción entre las dos patologías. Se observó una hipermetilación en los pacientes con sobrepeso y obesidad respecto a los pacientes con normopeso, y en los pacientes que habían sufrido un ictus respecto a los pacientes sin ECV. En el sitio CpG 4 se encontró un aumento en el porcentaje de metilación de los pacientes que sufrieron un ictus isquémico, pero no se observaron diferencias por IMC. En estos pacientes además se realizó un estudio de secreción de *KCNQ1*, que mostró unos niveles plasmáticos (al igual que sucedía en la PS con la expresión) menores en los pacientes obesos, tanto en el caso de los que habían sufrido un accidente cerebrovascular y eran comparados con los pacientes normopeso que sufrieron un ictus, como aquellos obesos sin ECV comparados con pacientes normopeso equivalentes. Estos cambios descritos sobre una región del gen de *KCNQ1* podrían, por

tanto, estar directamente relacionados con el hecho de sufrir obesidad e ictus. Esta relación entre la metilación en una región concreta de un gen, y la obesidad por ejemplo, ha sido ampliamente estudiado por otros autores [Bouchard 2010, Bultmann 2013]. De nuevo es necesario profundizar en el impacto de estos cambios sobre la regulación a nivel metabólico en un ambiente inflamatorio relacionado con la obesidad y el ictus, así como para poder demostrar un papel real de estas marcas como biomarcadores en el futuro.

Una vez asociada con obesidad la región de *KCNQ1* (Cromosoma 11:2542610-2542016) en la población PS y mediante el array de metilación 27k e identificado en dos poblaciones (PS y PV) por la técnica de análisis *Epityper* que los niveles de metilación del sitio CpG 2 de la región del gen *KCNQ1* están asociadas significativamente con los niveles de IMC y con el ictus, el siguiente paso fue confirmar estos resultados en la PV utilizando una tercera técnica. La técnica utilizada fue MT-HRM (*High resolution Melting*), ampliamente utilizada para la detección de SNPs mediante RT-PCR [Bruzzone 2013] y que también puede ser aplicada con excelentes resultados en el estudio de los niveles de metilación del ADN tras tratamiento previo con bisulfito [Hernández 2013]. Para ello, se diseñaron cebadores que amplifican la región de interés y tras la realización de la técnica se obtienen un único valor (en este caso el área bajo la curva) que refleja el valor de metilación medio de los CpGs presentes dentro de la región analizada, incluyendo los CpGs presentes en los cebadores utilizados [Stefanska 2013].

Para el propósito de esta Tesis Doctoral se diseñaron doce parejas de cebadores para el estudio en la población PV de los niveles de metilación por separado de los sitios CpG\_2 y CpG\_9 de la región de interés en *KCNQ1*. Tras una validación técnica, fueron seleccionadas dos parejas de cebadores. Su utilización englobaba debido a los requerimientos internos de la técnica (longitud del amplicón, número de CpGs, Tm de los cebadores, etc) el análisis conjunto de los CpGs 1-2-3 y de los CpGs 8-9 para el caso de mix B).

Cuando se determinaron los niveles de metilación utilizando ambas parejas de cebadores en la población PV se confirmó que tanto los niveles de metilación de la región que contenía al CpG 2 como la que contenía al CpG 9 están asociadas positiva y

significativamente con el IMC. Confirmándose además que los niveles de metilación de ambas regiones están disminuidos debido al ictus, pero solo en los pacientes normopeso. Cuando se realizó el análisis de regresión se observó como los niveles de metilación (utilizando el área bajo la curva) de ambas regiones se ven explicados significativamente ( $p < 0.001$ ) en un 27% y un 26,5% respectivamente por el IMC. Al incluir el ictus o el NIH al inicio como variable independiente aumentaron tanto la significancia como el  $r^2$  del análisis (pasando al 31 y 33% para el caso del ictus y 43 y 57% para el caso de NIH).

Curiosamente, estos resultados confirman los obtenidos en la PS utilizando el *array* de metilación y *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, así como los obtenidos por esta misma técnica en el sitio CpG 2 y 4 utilizando la población PV. La pérdida de asociación entre la obesidad y el CpG 9 utilizando *EpiTyper* en la población PV, puede ser debida a problemas internos de la técnica de *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, como una limitada diferencia en el peso molecular de los nucleótidos, y por lo tanto errores en la medición, lo que puede mostrar una falta de reproductibilidad en algunas situaciones [Kwon 2001] y que hace necesario una segunda validación utilizando otra técnica de análisis si se quiere profundizar en el sitio CpG directamente relacionado o la medición de los niveles de ARNm, si solo se pretende relacionar la región con cambios de metilación.

Estos resultados, por tanto, confirman que los niveles de metilación de dos zonas de la región KCNQ1 (Cromosoma 11:2542610-2542016 GRCh37.p13) están asociadas con los niveles de IMC y con el hecho de que las muestras provengan o no de manera aguda de pacientes que han sufrido un ictus. Estos datos avanzan en la búsqueda de nuevos biomarcadores de obesidad e ictus, aunque serán necesarios más estudios que puedan catalogar finalmente estas mediciones como biomarcadores para ambas enfermedades. El hecho de que los niveles de metilación se vean aumentados conforme aumentan los niveles de IMC podría estar relacionado el estado inflamatorio de los pacientes de estudio, incluido un cambio en el hemograma de dichos voluntarios debido a su estado obesogénico. Esto se describe en varios trabajos en los que se ven aumentados los linfocitos. Es necesario remarcar también cómo la disminución de los niveles de metilación inducida por el ictus en fase aguda no ocurre en los pacientes

obesos, por lo que el uso de estas determinaciones como potencial biomarcador de ictus debería estar restringido a un sector de la población. La falta de disminución en los niveles de metilación debidas al ictus en los pacientes obesos puede ser debido a un efecto compensatorio [Andersen 2012], ya que como los niveles de metilación se ven aumentados por el IMC, los pacientes obesos presentan estos valores de por sí elevados y quizás los mecanismos responsables de reducirlos debido al ictus, se ven alterados.

Estos resultados nos animaron a analizar bioinformáticamente si los sitios CpGs (la zona del 2\_3\_4 y la zona del 8\_9) para la búsqueda de secuencias consenso que contengan potenciales elementos de respuesta a factores de transcripción, lo que nos podría indicar en qué dirección estudiar los posibles mecanismos implicados en la asociación de los niveles de metilación con la obesidad y el ictus. Al analizar mediante la plataforma Genomatix, concretamente la aplicación MatInspector, toda la secuencia de la región del gen KCNQ1 analizada (+76389 a +76796) en esta Tesis Doctoral, encontramos en la zona 8\_9 la presencia putativa de elementos de respuesta al factor de transcripción HIF-1, sin estar presente en el resto de CpGs de la región estudiada. El HIF es el factor inducible por la hipoxia ya que se necesita la activación por medio de este proceso de la subunidad HIF-1 $\beta$  [Semenza 2002]. Concretamente, se ha descrito que el sitio CpG presente en la secuencia consenso para el HIF necesita estar desmetilado para que se una correctamente la proteína al ADN, y así regular la transcripción [Ratan 2007]. Por tanto, los niveles de expresión del gen KCNQ1 está potencialmente regulados por el HIF-1, es decir por los niveles de hipoxia, lo cual concuerda con los trabajos Karuppagounder y col., que describen cómo en pacientes que han sufrido un ictus, HIF-1 se encuentra aumentado en el tejido cerebral a las pocas horas del episodio isquémico [Karuppagounder 2012].

A pesar de la prometedora presencia de esta secuencia consenso en la zona 8\_9, al ver que la otra zona asociada con obesidad e ictus en este trabajo (la zona 2\_3\_4) carece de dicha secuencia continuamos estudiando en profundidad dicha región, a la búsqueda de elementos de respuesta presentes únicamente en las dos zonas de interés y que en su secuencia consenso la presencia de un sitio CpG fuera clave en su regulación. Tras realizar esta aproximación, se encontró que las familias de proteínas que se unen a la secuencia consenso HESF (*Vertebrate homologues of enhancer of split*

*complex*) y a la secuencia consenso E-box cumplían los requerimientos propuestos. HESF está relacionado con proteínas homodominio encontradas en *Drosophyla Melanogaster*, y que son regulados por el gen *NOTCH*. Aunque no existen referencias directas de una regulación transcripcional mediada por el sitio CpG de esta secuencia consenso como para el caso de HIF, se ha relacionado la función de proteínas de esta familia como un represor de la transcripción que modifica la expansión celular y diferenciación celular de células progenitoras neuronales después de sufrir un ictus [Wang 2009], y como mediadora del metabolismo lipídico en ayunas [Herzig 2003]. Sorprendentemente, se ha descrito además un efecto combinado de HIF y HES1 [Yun 2002] como un mecanismo de regulación de la adipogénesis mediante la hipoxia, concretamente, inhibiendo PPAR2G, y como un mecanismo de diferenciación de las células beta del páncreas también mediada por hipoxia [Heinis 2010].

Finalmente, la secuencia consenso E-box aparece significativamente relacionada con los sitios CpGs 2, 8 y 9, y sin presentar esta asociación en el resto de la región analizada. Esta secuencia de ADN fue descubierta en 1985 [Church 1985] como un elemento de control de los promotores de inmunoglobulina de cadena pesada (*immunoglobulin heavy-chain promoters*) y, recientemente, se ha relacionado con una parte integral del bucle de realimentación que forma parte del ritmo circadiano [Minami 2013] y la regulación de genes relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico [Corre 2013, Fujimoto 2013]. Diversos estudios han mostrado que la secuencia E-box está regulada epigenéticamente, ya que los niveles de metilación que aparecen en el sitio CpG de la secuencia consenso regulan los niveles de expresión de diversos genes, incluidos promotores relacionados con el ciclo circadiano [Ji 2009, Murphy 2009, Swarnalatha 2012]. En esta línea, encontramos en un estudio reciente en larva de *zebra fish* que existe una interacción bidireccional mediada por HIF y E-box entre las señales moleculares de hipoxia y el reloj circadiano, aunque estos datos no están confirmados en humanos [Egg 2013]. En este sentido otros autores [Hu 2013] han descrito una interacción entre los sitios E-box y las secuencias consenso para HIF en humanos. Por tanto, el potencial papel de los cambios en los niveles de metilación de los sitios CpGs que presentan elementos de respuesta a HES1, E-box y HIF1 en el gen del *KCNQ1* deben ser investigados en mayor profundidad tanto para el caso del ictus y las células de



origen neuronal, como para el caso de la obesidad, relacionada con la adipogénesis, el metabolismo lipídico y glucídico.

Finalmente, y para investigar el efecto de un programa de intervención nutricional en el patrón de metilación en pacientes obesos que habían sufrido un accidente cerebrovascular isquémico, se utilizó la PI, descrita anteriormente. Se analizaron muestras de 40 pacientes obesos, con un diseño de casos y controles (20 pacientes / 20 controles) que realizaron una dieta hipocalórica con una reducción del 30% en el GET y con una duración de 20 semanas. Se realizaron estudios de metilación mediante tecnología *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, igual que en las otras poblaciones, y se analizaron las 4 regiones validadas en el capítulo 2.

Además de los resultados expuestos en el punto 2 de la discusión del presente trabajo, se encontraron cambios en la metilación de *KCNQ1* y *WT1*. Por el contrario, no se encontraron cambios significativos en los niveles de metilación de las regiones analizadas de *CALD1* y *PM20D1* en la población PV.

Curiosamente, los niveles de metilación de la mayoría de los sitios CpG analizados en las regiones de los genes *KCNQ1* y *WT1* cambiaron significativamente en ambos grupos, independientemente de la patología cerebrovascular previa a la intervención. Únicamente el sitio CpG 21 de la región de *WT1* analizada, y el sitio CpG 10 de la región de *KCNQ1* fueron significativamente diferentes al inicio de la dieta entre los pacientes que habían sufrido un ictus respecto a los que no habían sufrido ningún accidente cerebrovascular. Al finalizar las 20 semanas de tratamiento, únicamente el sitio CpG 22 de la región de *WT1* se encontraba diferencialmente metilado en los pacientes respecto a los controles. Esto muestra el importante papel de la terapia nutricional en la modulación de estos cambios epigenéticos independientemente de la patología previa al tratamiento [Campion 2009, Milagro 2011, Wang 2013].

La tendencia general en ambos grupos fue la reducción de los niveles de metilación de los sitios CpGs, lo que se observa en todos los sitios CpG de la región de *KCNQ1* analizados. Esto completaría los resultados observados en el capítulo 2 del presente trabajo, en los que los niveles de metilación de los pacientes obesos, son mayores que los pacientes con normopeso y sobrepeso. En un estudio reciente realizado en animales, se observaron resultados semejantes. Tras un periodo de alimentación de los

roedores con dieta HFS, y una posterior restricción calórica fue observada una recuperación de los niveles de metilación previos a la dieta obesogénica [Uriarte 2013]. Este efecto observado en PS y PV, se revierte tras una pérdida de peso. Estos resultados refuerzan los datos y confirman la influencia de la obesidad en los niveles de metilación de este gen.

Por otro lado, se encontraron resultados similares en la región de *WT1*, en la que los niveles de metilación disminuían significativamente en los pacientes que habían sufrido un accidente isquémico respecto a los voluntarios sin patología cerebrovascular previa. Estos datos concuerdan con los presentados también en el capítulo 2, en los que pacientes normopeso con un accidente cerebrovascular previo presentaban unos porcentajes de metilación menores que los pacientes obesos.

Los estudios en animales han demostrado que la metilación del ADN aumenta después de una isquemia modulada por mecanismos inflamatorios y se correlacionan positivamente con la lesión cerebral [Endres 2000, Qureshi 2010]. Por lo tanto, el hecho de que un programa de intervención nutricional disminuyera los niveles de metilación de las regiones CpG analizadas y la relación de estos cambios epigenéticos con las mejoras observadas en las variables antropométricas y bioquímicas es de gran interés. Además, en este capítulo, el análisis de regresión lineal mostró que los cambios en la metilación en varios sitios CpG estaban involucrados en el cambio observado en la circunferencia de la cintura y el contenido de grasa corporal en los controles y los pacientes. Además, los cambios en el índice HOMA-IR y la concentración de PCR estaban relacionados con el cambio en la metilación de varios sitios CpG. Sólo la metilación del sitio CpG 22 de la región analizada del gen *WT1* fue significativamente diferente entre los grupos. El cambio de este sitio CpG se asocia con el cambio registrado en el HOMA-IR sólo en los pacientes que habían sufrido un ictus y se relacionó con el cambio observado en la concentración de PCR. Más sitios CpG del gen *WT1* estaban involucrados en la reducción de la concentración de PCR en pacientes. La relación entre la expresión de *WT1* y la concentración de PCR, ya fue descrita por Hatta y col. en 2005, presentando una asociación entre el incremento de este parámetro en pacientes con mieloma y el aumento de la expresión de *WT1*, proponiendo la expresión del gen como un posible biomarcador pronóstico en pacientes que padecían este tipo de cáncer [Hatta 2005]. En el presente estudio, esta relación encontrada entre estos

dos parámetros, en pacientes obesos podría indicar también el posible uso de los niveles de metilación de una región del gen *WT1* como posible biomarcador. Por lo tanto, los mecanismos epigenéticos podrían estar implicados en la modulación de algunos factores de riesgo cardiovasculares y el estado inflamatorio de pacientes con accidente cerebrovascular. Estudios previos han considerado los cambios de patrón epigenéticos como herramientas de predicción para evaluar la respuesta a la dieta [Bouchard 2010, Barres 2013, Moleres 2013] como se ha descrito a lo largo de este trabajo. Los datos de este estudio se suman a la evidencia de que una intervención nutricional en la que existe una restricción calórica puede modificar el patrón de metilación de un gen específico lo que conduce a cambios metabólicos [Miyamura 1993, Chen 2013].

#### **4. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO**

El hecho de que nuestro estudio incluya pacientes con accidente cerebrovascular y pacientes controles reclutados en el ambiente hospitalario, específicamente, en una unidad de ictus en el momento del ingreso, favorece el estudio de estas dos patologías.

Las principales fortalezas del estudio son:

- a) El tamaño muestral de 203 pacientes distribuidos en 4 poblaciones de estudio garantiza la obtención de resultados sólidos con análisis multivariantes. Hasta el momento no existen estudios similares en población hospitalizada con muestras sanguíneas obtenidas en el momento del ingreso. Además, a todos los pacientes utilizados en este estudio se les midieron parámetros antropométricos y bioquímicos de gran interés en el estudio epigenético.
- b) La utilización de dos técnicas para el análisis de los niveles de metilación en las diferentes poblaciones. En primer lugar el análisis epigenómico mediante un *array* de metilación en el que se analizaron 27.578 sitios CpG, localizados en 14.495 genes. En segundo lugar, la posterior validación de las 15 regiones seleccionadas como posibles genes candidatos a biomarcadores del ictus y la obesidad mediante

el uso de *Sequenom MassArray® EpiTyper™*, en la cual se analizan los niveles de metilación de los diferentes sitios CpG de regiones concretas.

- c) Tras obtener los resultados de KCNQ1, la validación de estos mediante una tercera técnica para determinar los niveles de metilación. La técnica MT-HRM, aporta una evidencia mayor, a los datos, identificando los valores de metilación es esta región como un potencial biomarcador agudo en pacientes con ictus y obesidad.
- d) La inclusión de estudios de expresión de los genes, así como de secreción en sangre de KCNQ1, dan una nueva dimensión a los resultados, ya que potencian los resultados relacionándolos con una posible implicación a nivel de regulación molecular.
- e) La medición de las 4 regiones validadas técnica y biológicamente en el primer estudio con la PS en una población de 115 pacientes con características similares.
- f) La realización de un estudio de intervención dietética con una duración de 20 semanas. Generalmente, los estudios de intervención con seguimiento por parte de un nutricionista no alcanzan más de 8 o 10 semanas. Además es la primera vez que se realiza un programa de pérdida de peso de esta duración a pacientes obesos que habían sufrido un ictus previamente.
- g) Todas las mediciones y validaciones de los biomarcadores validados se realizó mediante muestras de células blancas sanguíneas, lo que implica técnicas poco invasivas y viables en la práctica clínica.

En cuanto a las principales debilidades del estudio:

- a) La obtención de los datos y de las muestras para el caso de los pacientes con ictus se realizaba en el momento del ingreso, por lo que aunque los pacientes controles están estandarizados, en los pacientes que sufrían un accidente cerebrovascular, en las poblaciones PI, PS y PV la homogeneidad en la toma de las muestras y en los parámetros bioquímicos no estaba asegurada. A pesar de esto, la selección de los pacientes se realizó con unos criterios de inclusión estrictos para poder solventar esta heterogeneidad.
- b) Los datos obtenidos respecto a los cambios epigenéticos que se ha llegado en este trabajo pueden ser concluyentes respecto a los efectos agudos del ictus y de la obesidad. Cualquier cambio epigenético que fuera diferente antes del accidente

isquémico no está contemplado en los análisis, ya que no se poseen los datos previos de los pacientes.

- c) Los valores de metilación de las regiones de *CALD1*, *PM20D1* y *WT1* obtenidos en la población constituida por los 115 pacientes de la PV no se corroboran con los obtenidos en la primera validación en PS. Este hecho puede ser debido al aumento en el número de pacientes y por lo tanto al aumento en la variabilidad, ya que los cambios epigenéticos son dependientes del tipo celular y, al estar influidos por factores ambientales, también son dependientes de cada individuo. Por otro lado, esta variabilidad puede ser debida por el número reducido de pacientes en PS (n=24) lo que explicaría, en parte, la divergencia de resultados entre las dos poblaciones en los genes *CALD1*, *PM20D1* y *WT1*. Esto puede ser una fortaleza en el caso del gen *KCNQ1*, ya que a pesar de esta heterogeneidad, los resultados son lo suficientemente robustos estadísticamente como para poder solventar estos cambios interpersonales.
- d) Los datos diferentes expuestos en el punto c) podrían ser debidos a un mayor tiempo de almacenaje de las muestras desde su extracción hasta su posterior análisis entre las muestras de PS y las muestras de PV, y una posible degradación que podría afectar a la medición del porcentaje de metilación.
- e) Sería de gran interés realizar un seguimiento a estos pacientes con el fin de analizar la evolución de los síntomas producidos por el ictus isquémico, y la recurrencia de un accidente cerebrovascular, con el fin de identificar otros biomarcadores diagnósticos que ayudaran a evitar episodios de repetición.
- f) Parte de los cambios en la metilación del DNA podrían ser debidos a cambios en los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares de la sangre periférica. Sería interesante realizar estudios similares a los realizados en el presente trabajo, en los distintos tipos celulares para evitar los factores de confusión producidos por la variabilidad intercelular de los patrones de metilación.

En resumen, el presente estudio ha confirmado por primera vez la influencia de un accidente cerebrovascular y la obesidad en la metilación del DNA de las células blancas sanguíneas. Además, estos cambios se produjeron en genes relacionados con la

inflamación (*TNF- $\alpha$* ) y la composición corporal (*PON*). Los cambios epigenéticos a su vez fueron correlacionados con índices de calidad de la dieta.

En un estudio epigenómico masivo, se identificaron genes con una posible implicación en el desarrollo del ictus isquémico y la obesidad (*CALD1*, *PM20D1*, *WT1* y *KCNQ1*). Tras identificar 4 regiones que fueron validadas por dos técnicas de estudio epigenético, una de ellas (situada en el gen *KCNQ1*), se muestra como un posible biomarcador en el ictus y la obesidad, ya que los cambios en la metilación del DNA sugieren una regulación de la expresión génica, dando lugar a cambios en la secreción a nivel plasmático de *KCNQ1*.

Finalmente, se ha confirmado que un programa de intervención nutricional fue capaz de modificar el patrón de metilación de dos genes relacionados con el accidente cerebrovascular (*KCNQ1* y *WT1*) y también fue eficaz a la hora de mejorar las variables antropométricas, de composición corporal y metabólicas, tales como la concentración de PCR en pacientes con accidente cerebrovascular. Algunos de estos cambios podrían tener relación con las modificaciones en la metilación obtenidos en ambos grupos.

## **5. BIBLIOGRAFÍA**

### **A**

Adalsteinsson BT, Gudnason H, Aspelund T, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, et al. Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. *PLoS One* 2012; 7: e46705.

Ali MS, Starke RM, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. TNF-alpha induces phenotypic modulation in cerebral vascular smooth muscle cells: implications for cerebral aneurysm pathology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33: 1564-1573.

Allport LE, Baird TA, Davis SM. Hyperglycaemia and the ischaemic brain: continuous glucose monitoring and implications for therapy. *Curr Diabetes Rev* 2008; 4: 245-257.

Andersen KK, Olsen TS. Body Mass Index and Stroke: Overweight and Obesity Less Often Associated with Stroke Recurrence. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013; 22: e576-e581.

### **B**

Baccarelli A, Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology* 2010; 21: 819-828.

Barone-Rochette G, Vanzetto G, Detante O, Benhamou PY, Halimi S, Hommel M, et al. Metabolic disturbances after acute vascular events: a comparative study of acute coronary syndrome and ischaemic atherothrombotic stroke. *Diabetes Metab* 2012; 38: 544-549.

Barrachina M, Ferrer I. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68: 880-891.

Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, Mora S, Pedersen TR, Larosa JC, et al. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation* 2013; 128: 1504-1512.

Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Perusse L, et al. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 309-320.

Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, Monpetit A, St-Pierre J, et al. Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care* 2010; 33: 2436-2441.

Bremer AA, Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *J Obes* 2013; 2013: 393192.

Bruzzone CM, Tawadros PS, Boardman LA, Steer CJ. Enhanced primer selection and synthetic amplicon templates optimize high-resolution melting analysis of single-nucleotide polymorphisms in a large population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17: 675-680.

Bultmann I, Conradi A, Kretschmer C, Sterner-Kock A. Latent transforming growth factor beta-binding protein 4 is downregulated in esophageal cancer via promoter methylation. *PLoS One* 2013; 8: e65614.

## **C**

Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Gomez-Choco M, et al. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2007; 252: 29-35.



Chiquete E, Ruiz-Sandoval JL, Murillo-Bonilla L, Leon-Jimenez C, Ruiz-Madrigal B, Martinez-Lopez E, et al. Central adiposity and mortality after first-ever acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2013; 70: 117-123.

Civera M, Urios A, Garcia-Torres ML, Ortega J, Martinez-Valls J, Cassinello N, et al. Relationship between insulin resistance, inflammation and liver cell apoptosis in patients with severe obesity. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26: 187-192.

Cordero P, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Dietary supplementation with methyl donor groups could prevent nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2011; 53: 2151-2152.

Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 337-348.

Cote N, Mahmut A, Fournier D, Boulanger MC, Couture C, Despres JP, et al. Angiotensin Receptor Blockers Are Associated with Reduced Fibrosis and Interleukin-6 Expression in Calcific Aortic Valve Disease. *Pathobiology* 2013; 81: 15-24.

## **D**

D'Addario C, Dell'Osso B, Galimberti D, Palazzo MC, Benatti B, Di Francesco A, et al. Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 2013; 73: e6-e7.

Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P, Almgren P, Ronn T, Ling C. Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia* 2013; 56: 1036-1046.

Dewi FR, Fatchiyah F. Methylation impact analysis of erythropoietin (EPO) Gene to hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) activity. *Bioinformation* 2013; 9: 782-787.

Du X, Tang Y, Xu H, Lit L, Walker W, Ashwood P, et al. Genomic profiles for human peripheral blood T cells, B cells, natural killer cells, monocytes, and

polymorphonuclear cells: comparisons to ischemic stroke, migraine, and Tourette syndrome. *Genomics* 2006; 87: 693-703.

## **E**

Easton AS. Neutrophils and stroke- Can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? *Int Immunopharmacol* 2013; 17: 1218-1225.

Egg M, Koblitz L, Hirayama J, Schwerte T, Folterbauer C, Kurz A, et al. Linking oxygen to time: the bidirectional interaction between the hypoxic signaling pathway and the circadian clock. *Chronobiol Int* 2013; 30: 510-529.

El Gazzar M, Yoza BK, Chen X, Hu J, Hawkins GA, McCall CE. G9a and HP1 couple histone and DNA methylation to TNF $\alpha$  transcription silencing during endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2008; 283: 32198-32208.

Endres M, Meisel A, Biniszkiwicz D, Namura S, Prass K, Ruscher K, et al. DNA methyltransferase contributes to delayed ischemic brain injury. *J Neurosci* 2000; 20: 3175-3181.

Engdahl R, Monroy MA, Daly JM. 15-Deoxy-Delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) mediates repression of TNF- $\alpha$  by decreasing levels of acetylated histone H3 and H4 at its promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 88-93.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159.

## **F**

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011; 377: 557-567.

Fisher AG, Brockdorff N. Epigenetic memory and parliamentary privilege combine to evoke discussions on inheritance. *Development* 2012; 139: 3891-3896.

Fu L, Chen L, Yang J, Ye T, Chen Y, Fang J. HIF-1alpha-induced histone demethylase JMJD2B contributes to the malignant phenotype of colorectal cancer cells via an epigenetic mechanism. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1664-1673.

Fujimoto Y, Nakagawa Y, Satoh A, Okuda K, Shingyouchi A, Naka A, et al. TFE3 controls lipid metabolism in adipose tissue of male mice by suppressing lipolysis and thermogenesis. *Endocrinology* 2013; 154: 3577-3588.

## **G**

Geeganage C, Beavan J, Ellender S, Bath PM. Interventions for dysphagia and nutritional support in acute and subacute stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 10: CD000323.

Gong W, Zhang T, Shan L. Cortical lateralization in stroke patients measured by event-related potentials during motor imagery. *Mol Med Rep* 2013; 8: 1701-1707.

Gonzalez-Serrano AF, Pirro V, Ferreira CR, Oliveri P, Eberlin LS, Heinzmann J, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. *PLoS One* 2013; 8: e74981.

Goyenechea E, Parra D, Crujeiras AB, Abete I, Martinez JA. A nutrigenomic inflammation-related PBMC-based approach to predict the weight-loss regain in obese subjects. *Ann Nutr Metab* 2009;54: 43-51.

Gukovsky I, Li N, Todoric J, Gukovskaya A, Karin M. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013; 144: 1199-1209.

Guyomard V, Jamieson EI, Myint PK. Glucose blood levels as a therapeutic target in acute ischaemic stroke setting. *Curr Top Med Chem* 2009; 9: 1261-1277.

Gyparaki MT, Basdra EK, Papavassiliou AG. DNA methylation biomarkers as diagnostic and prognostic tools in colorectal cancer. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91: 1249-1256.

## H

Hashimoto K, Otero M, Imagawa K, de Andres MC, Coico JM, Roach HI, et al. Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1beta (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites. *J Biol Chem* 2013; 288: 10061-10072.

Heinis M, Simon MT, Ilc K, Mazure NM, Pouyssegur J, Scharfmann R, et al. Oxygen tension regulates pancreatic beta-cell differentiation through hypoxia-inducible factor 1alpha. *Diabetes* 2010; 59: 662-669.

Hermsdorff HH, Zulet MA, Abete I, Martinez JA. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *Eur J Nutr* 2011; 50: 61-69.

Hernandez HG, Mahecha MF, Mejia A, Arboleda H, Forero DA. Global Long Interspersed Nuclear Element 1 DNA Methylation in a Colombian Sample of Patients With Late-Onset Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2014; 29: 50-53.

Horiuchi A, Hayashi T, Kikuchi N, Hayashi A, Fuseya C, Shiozawa T, et al. Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1alpha to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene. *Int J Cancer* 2012; 131: 1755-1767.

## **J**

Ji Y, Qin Y, Shu H, Li X. Methylation analyses on promoters of mPer1, mPer2, and mCry1 during perinatal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1742-1747.

## **K**

50) Kadowaki T, Yamauchi T, Waki H, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Nakamura M. Adiponectin, adiponectin receptors, and epigenetic regulation of adipogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 76: 257-265.

Karcher HS, Holzwarth R, Mueller HP, Ludolph AC, Huber R, Kassubek J, et al. Body fat distribution as a risk factor for cerebrovascular disease: an MRI-based body fat quantification study. *Cerebrovasc Dis* 2013; 35: 341-348.

Karuppagounder SS, Ratan RR. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics? *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 1347-1361.

Kim AS. Who Best to Create a Sense of Urgency for Acute Stroke Treatment? Commentary on "Neurohospitalists Improve Door-to-Needle Times for Patients With Ischemic Stroke Receiving Intravenous tPA". *Neurohospitalist* 2012; 2: 117-118.

Krupinski J, Slevin M. Emerging molecular targets for brain repair after stroke. *Stroke Res Treat* 2013; 2013: 473416.

Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Hotowy K, Czapinska E, Majda J, Kustrzeba-Wojcicka I, et al. Paraoxonase (PON)-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22: 229-236.

## **L**

Leow MK. Basal insulin and cardiovascular and other outcomes. *N Engl J Med* 2012; 367:1763-1764.

Lim J, Iyer A, Liu L, Suen JY, Lohman RJ, Seow V, et al. Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. *FASEB J* 2013; 27: 4757-4767.

## **M**

Masters RK, Reither EN, Powers DA, Yang YC, Burger AE, Link BG. The Impact of Obesity on US Mortality Levels: The Importance of Age and Cohort Factors in Population Estimates. *Am J Public Health* 2013; 103: 1895-1901.

Meerson A, Traurig M, Ossowski V, Fleming JM, Mullins M, Baier LJ. Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF-alpha. *Diabetologia* 2013; 56: 1971-1979.

Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I, et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J* 2011; 25: 1378-1389.

Minami Y, Ode KL, Ueda HR. Mammalian circadian clock: the roles of transcriptional repression and delay. *Handb Exp Pharmacol* 2013; 217: 359-377.

Moleres A, Campion J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, et al. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. *FASEB J* 2013; 27: 2504-2512.

Mosselman MJ, Kruitwagen CL, Schuurmans MJ, Hafsteinsdottir TB. Malnutrition and risk of malnutrition in patients with stroke: prevalence during hospital stay. *J Neurosci Nurs* 2013; 45: 194-204.

Murphy DM, Buckley PG, Bryan K, Das S, Alcock L, Foley NH, et al. Global MYCN transcription factor binding analysis in neuroblastoma reveals association with distinct E-box motifs and regions of DNA hypermethylation. *PLoS One* 2009; 4: e8154.

## **N**

Nguyen MP, Lee S, Lee YM. Epigenetic regulation of hypoxia inducible factor in diseases and therapeutics. *Arch Pharm Res* 2013; 36: 252-263.

## **O**

Overvad TF, Rasmussen LH, Skjoth F, Overvad K, Lip GY, Larsen TB. Body mass index and adverse events in patients with incident atrial fibrillation. *Am J Med* 2011; 126: 640.e9-640.e17.

## **P**

Paciaroni M, Agnelli G, Floridi P, Alberti A, Acciarresi M, Venti M, et al. Hyperdense middle cerebral and/or internal carotid arteries in acute ischemic stroke: rate, predictive factors and influence on clinical outcome. *Cerebrovasc Dis* 2011; 32: 239-245.

Pereira MG, Gitai DL, Paco-Larson ML, Pesquero JB, Garcia-Cairasco N, Costa-Neto CM. Modulation of B1 and B2 kinin receptors expression levels in the hippocampus of rats after audiogenic kindling and with limbic recruitment, a model of temporal lobe epilepsy. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 200-205.

Peters SA, Huxley RR, Woodward M. Comparison of the Sex-Specific Associations Between Systolic Blood Pressure and the Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic

Review and Meta-analysis of 124 Cohort Studies, Including 1.2 Million Individuals. *Stroke* 2013; 44: 2394-2401.

Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, Giossi A, Volonghi I, Costa P, et al. Complications of acute stroke and the occurrence of early seizures. *Cerebrovasc Dis* 2013; 35: 444-450.

Precourt LP, Marcil V, Ntimbane T, Taha R, Lavoie JC, Delvin E, et al. Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303:623-634.

Preiss D, Giles TD, Thomas LE, Sun JL, Haffner SM, Holman RR, et al. Predictors of stroke in patients with impaired glucose tolerance: results from the Nateglinide and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research trial. *Stroke* 2013; 44: 2590-2593.

## Q

Qureshi A, Odongo E, McWilliams ET. An unusual cause of stroke in an older patient. *BMJ Case Rep* 2010; 11;2011:10.1136/bcr.11.2009.2476.

## R

Rajeshwar K, Kaul S, Al-Hazzani A, Babu MS, Balakrishna N, Sharma V, et al. C-reactive protein and nitric oxide levels in ischemic stroke and its subtypes: correlation with clinical outcome. *Inflammation* 2012; 35: 978-984.

Ratan RR, Siddiq A, Smirnova N, Karpisheva K, Haskew-Layton R, McConoughey S, et al. Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85: 1331-1338.

Rincon F, Sacco RL. Secondary stroke prevention. *J Cardiovasc Nurs* 2008; 23: 34-41.



Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, Nilsson E, Tornberg A, Dekker Nitert M, Eriksson KF, Jones HA, Groop L, Ling C. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003572.

Rowat A. Malnutrition and dehydration after stroke. *Nurs Stand* 2011; 26: 42-46.

## **S**

Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009; 41: 1303-1307.

Schweizer S, Meisel A, Marschenz S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33: 1335-1346.

Segers H, van den Heuvel-Eibrink MM, de Krijger RR, Pieters R, Wagner A, Dinjens WN. Defects in the DNA mismatch repair system do not contribute to the development of childhood wilms tumors. *Pediatr Dev Pathol* 2013; 16: 14-19.

Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 993-998.

Shin JY, Kim SY, Jeung MJ, Eun SH, Woo CW, Yoon SY, et al. Serum adiponectin, C-reactive protein and TNF-alpha levels in obese Korean children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008; 21: 23-29.

Southerland AM, Meschia JF, Worrall BB. Shared associations of nonatherosclerotic, large-vessel, cerebrovascular arteriopathies: considering intracranial aneurysms, cervical artery dissection, moyamoya disease and fibromuscular dysplasia. *Curr Opin Neurol* 2013; 26: 13-28.

Steege A, Fahling M, Paliege A, Bondke A, Kirschner KM, Martinka P, et al. Wilms' tumor protein (-KTS) modulates renin gene transcription. *Kidney Int* 2008; 74: 458-466.

Stefanska B, Bouzelmat A, Huang J, Suderman M, Hallett M, Han ZG, et al. Discovery and validation of DNA hypomethylation biomarkers for liver cancer using HRM-specific probes. *PLoS One* 2013; 8: e68439.

Strazzullo P, D'Elia L, Cairella G, Garbagnati F, Cappuccio FP, Scalfi L. Excess body weight and incidence of stroke: meta-analysis of prospective studies with 2 million participants. *Stroke* 2010; 41: e418-e426.

Sun Q, Song K, Shen X, Cai Y. The association between KCNQ1 gene polymorphism and type 2 diabetes risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7: e48578.

Swarnalatha M, Singh AK, Kumar V. The epigenetic control of E-box and Myc-dependent chromatin modifications regulate the licensing of lamin B2 origin during cell cycle. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 9021-9035.

Symonds ME, Sebert S, Budge H. The obesity epidemic: from the environment to epigenetics - not simply a response to dietary manipulation in a thermoneutral environment. *Front Genet* 2011; 2: 24.

## **T**

Tang Y, Xu H, Du X, Lit L, Walker W, Lu A, et al. Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a *microarray* study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1089-1102.

Torekov SS, Iepsen E, Christiansen M, Linneberg A, Pedersen O, Holst JJ, et al. KCNQ1 Long QT syndrome patients have hyperinsulinemia and symptomatic hypoglycemia. *Diabetes*. 2013. (en prensa).

Toubal A, Treuter E, Clement K, Venteclef N. Genomic and epigenomic regulation of adipose tissue inflammation in obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24: 625-634

## U

Udali S, Guarini P, Moruzzi S, Choi SW, Friso S. Cardiovascular epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 883-901.

Urduingio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 2009; 8: 1056-1072.

## V

Vauthey C, de Freitas GR, van Melle G, Devuyst G, Bogousslavsky J. Better outcome after stroke with higher serum cholesterol levels. *Neurology* 2000; 54: 1944-1949.

## W

Wachsman JT. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 375: 1-8.

Wang X, Cheng S, Brophy VH, Erlich HA, Mannhalter C, Berger K, et al. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients. *Stroke* 2009; 40: 683-695.

WHO. Obesity and Overweight. Fact Sheet Number. Fact Sheet Number 2011; 311.

World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. 2011; Available at: <https://apps.who.int/infobase/>. Accessed Septiembre, 2013.

## **Y**

Yadav S, Cotlarciuc I, Munroe PB, Khan MS, Nalls MA, Bevan S, et al. Genome-Wide Analysis of Blood Pressure Variability and Ischemic Stroke. *Stroke* 2013; 44: 2703-2709.

Yu W, Ma RC, Hu C, So WY, Zhang R, Wang C, et al. Association between KCNQ1 genetic variants and obesity in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2012; 55: 2655-2659.

## **Z**

Zhang H, Chaudhury A, Wu X. Imprinting in plants and its underlying mechanisms. *J Genet Genomics* 2013; 40: 239-247.

Zhang Q, Zhang S, Wang C, Gao X, Zhou Y, Zhou H, et al. Ideal cardiovascular health metrics on the prevalence of asymptomatic intracranial artery stenosis: a cross-sectional study. *PLoS One* 2013; 8: e58923.

Zheng H, Yue W, Zhu Y. Advances in serum tumor markers of lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2009; 12: 935-938.

## **V. Conclusiones**



## 1 CONCLUSIONES

1. En la primera población (PI), los niveles de metilación de *TNF- $\alpha$*  en el momento del accidente cerebrovascular fueron menores en los pacientes que sufrieron un ictus respecto a los pacientes sin ictus, sin presentar interacción con la obesidad.

2. En esta misma población, la metilación de distintos sitios CpG tanto de *TNF- $\alpha$*  como de *PON* se correlacionan con diferentes índices de calidad de dieta y medidas antropométricas.

3. Se confirma en esta población inicial que *TNF- $\alpha$*  no se regula en esta región con cambios en las histonas H3K9ac y H3K4me3 pero existe una asociación entre las modificaciones de histonas y los niveles circulantes de *TNF- $\alpha$* .

4. En un estudio masivo epigenómico (analizando 27.000 sitios CpGs) realizado en una segunda población (PS), se encontraron diferencialmente metilados 80 sitios CpGs en los pacientes que sufrieron un ictus frente a los que no lo sufrieron, 96 sitios CpGs en obesos respecto a normopeso, y 59 sitios CpGs presentaron una interacción entre el ictus y la obesidad.

5. Tras estudiar en profundidad las regiones pertenecientes a 15 genes candidatos seleccionados del estudio epigenómico anterior, en 4 de estas regiones se confirmaron cambios epigenéticos. Una región del gen *PM20D1* estaba hipermetilada en los pacientes con ictus, *WT1* y *KCNQ1* presentaban cambios en los niveles de metilación en los pacientes obesos, y en dos sitios CpG del gen *CALD1* se observó una interacción entre el ictus y la obesidad.

6. Al realizar estudios de expresión génica, tanto *PM20D1* como *KCNQ1* presentaron cambios a nivel de ARNm al comparar los grupos experimentales. Para el

caso del gen *PM20D1*, además, estos cambios mostraron una asociación negativa. *WT1* no se expresa en células blancas en nuestra población.

7. En la población de validación (PV), se encontraron diferencias en los niveles de metilación de los sitios CpGs de la región analizada dentro del gene *KCNQ1*. Se observaron diferencias entre pacientes obesos y no obesos, y entre individuos ictus frente a los no ictus, sin interacción entre ambas patologías. En esta misma población, los niveles de metilación de la región analizada dentro de los genes *PM20D1*, *WT1* y *CALD1* no mostraron cambios significativos en ninguno de los CpGs analizados.

8. Los niveles de metilación de *KCNQ1* fueron corroborados por una tercera técnica, MS-HRM, en la que se obtuvieron resultados similares a los encontrados en la población de selección y la población de validación, reforzando, que los niveles de metilación de la región estudiada de *KCNQ1* podrían ser un posibles biomarcador en un futuro.

9. Los cambios encontrados en el patrón de metilación de *KCNQ1*, se reflejan en modificaciones en los niveles de esta proteína a nivel circulante, siendo menores en los pacientes obesos.

10. Los pacientes obesos sometidos a una intervención de 20 semanas mostraron cambios en las medidas antropométricas y bioquímicas, aunque estas modificaciones no fueron diferentes entre pacientes que habían sufrido previamente un accidente cerebrovascular de tipo isquémico.

11. Los pacientes obesos sometidos a dicha intervención mostraron cambios en los niveles de metilación de los sitios CpGs analizados en los genes *WT1* y *KCNQ1*, a lo largo de estas 20 semanas, aunque estas modificaciones no fueron diferentes en los pacientes que habían sufrido previamente un accidente cerebrovascular de tipo isquémico.



12. Los cambios en los niveles de metilación de varios sitios CpGs de las regiones estudiadas de los genes *WT1* y *KCNQ1* observados en la población de intervención, explicaron en parte la variabilidad observada en la circunferencia de la cintura, la grasa corporal, la concentración de PCR y el índice HOMA-IR tras las 20 semanas de la intervención nutricional.

## **2. CONCLUSIÓN GENERAL**

Se puede concluir de manera general a partir de este trabajo que el sufrir un ictus isquémico modifica el patrón epigenético de genes involucrados en enfermedades cerebrovasculares y metabólicas, siendo estas modificaciones diferentes si se sufre previamente obesidad o no. En particular, *KCNQ1*, tanto a nivel epigenético como a nivel de secreción, se revela como un prometedor biomarcador de ictus y obesidad.



## **VII. Anexos**

