



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES TEMPRANOS DE ALTERACIONES METABÓLICAS RELACIONADAS CON LA OBESIDAD Y LA OBESIDAD NORMOPESO COMO BASE PARA DESARROLLAR ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DE SALUD

Maria Antònia Adrover Adrover

Grado de Biología

Facultad de Ciencias

Año Académico 2019-20

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES TEMPRANOS DE ALTERACIONES METABÓLICAS RELACIONADAS CON LA OBESIDAD Y LA OBESIDAD NORMOPESO COMO BASE PARA DESARROLLAR ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DE SALUD

Maria Antònia Adrover Adrover

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Biomarcadores tempranos, obesidad, obesidad normopeso, falsos delgados, PBMC, PBC

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Paula Oliver Vara

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

Una parte creciente de la población a nivel mundial sufre de sobrepeso u obesidad debido a la ingesta de una dieta inadecuada siendo el desencadenante de multitud de problemas de salud. Sin embargo, el problema es mayor por la existencia del fenotipo falso delgado u obesidad normopeso. Los individuos que presentan este fenotipo no tienen sobrepeso ni obesidad, pero sí grasa visceral incrementada, pudiendo presentar las mismas alteraciones y riesgo de patologías que los obesos sin estar identificados al no presentar signos evidentes de adiposidad. Por ello es de vital importancia identificar de manera temprana a los individuos en riesgo, para poder poner en marcha estrategias de prevención adecuadas. La identificación de biomarcadores tempranos de alteraciones relacionadas con la dieta inadecuada y la adiposidad es un campo científico en auge. En este trabajo de revisión bibliográfica se presentan los tipos y posibles fuentes de biomarcadores tempranos, con especial atención al gran potencial que presentan las células sanguíneas como fuente de biomarcadores relacionados con la nutrición.

Índice

1. Introducción.....	7
2. Objetivos	8
3. Metodología.....	8
4. Obesidad normopeso: fenotipo falso delgado	9
4.1. <i>Nomenclaturas utilizadas y evolución del estudio del fenotipo falso delgado</i>	9
4.2. <i>Criterios de clasificación del fenotipo falso delgado</i>	10
4.3. <i>Prevalencia del fenotipo falso delgado</i>	11
5. Biomarcadores, características, tipos y utilidad en medicina de prevención.....	11
5.1. <i>Biomarcadores en el ámbito de la nutrición y la salud</i>	13
5.2. <i>Fuentes biológicas de biomarcadores</i>	14
5.3. <i>Aplicación de las técnicas ómicas a la obtención de biomarcadores</i>	14
6. Células sanguíneas como fuente de biomarcadores tempranos.....	17
6.1. <i>Fracción total PBC vs PBMC</i>	19
7. Biomarcadores tempranos en PBMC de patologías asociadas a dietas inadecuadas y adiposidad excesiva.....	21
7.1. <i>Biomarcadores de dieta desequilibrada, obesidad y obesidad normopeso</i>	21
7.2. <i>Biomarcadores hígado graso</i>	22
7.3. <i>Biomarcadores diabetes y resistencia a la insulina</i>	23
7.4. <i>Biomarcadores de alteración cognitiva</i>	23
7.5. <i>Otros biomarcadores moleculares de interés en PBMC</i>	24
Conclusión	26
ANEXO	34

1. Introducción

Uno de los principales problemas de salud en la sociedad actual es el gran aumento de enfermedades crónicas causadas por la dieta y los hábitos de vida inadecuados. Una dieta desequilibrada es aquella que proporciona una combinación inadecuada tanto de energía como de nutrientes, esta induce deterioro metabólico y un mayor riesgo de desarrollar diferentes tipos de enfermedades (2). Desde 1975, la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo y cada año mueren, como mínimo, 2,8 millones de personas a causa de la obesidad o sobrepeso. En 2016, 41 millones de niños menores de 5 años y 340 millones de niños/adolescentes tenían sobrepeso u obesidad, 1900 millones de personas mayores de 18 años tenían sobrepeso y 650 millones tenían obesidad (5). La obesidad está íntimamente relacionada con el síndrome metabólico. Se considera que una persona presenta síndrome metabólico cuando tiene tres de los siguientes 5 criterios: circunferencia de cintura ≥ 90 cm en hombres y 80 cm en mujeres, presión arterial $\geq 130/85$ mmHg o antecedentes de hipertensión, glucosa plasmática circulante en ayunas $\geq 5,6$ mmol/L o antecedentes de diabetes mellitus, triglicéridos $\geq 1,7$ mmol/L y HDL $< 1,03$ mmol/L en hombres y $< 1,29$ mmol/l en mujeres (11). El síndrome metabólico aumenta el riesgo de padecer diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares, principal causa de muerte a nivel mundial en los últimos 15 años según la OMS.

El sistema tradicionalmente utilizado para clasificar el peso corporal de la población es el índice de masa corporal (IMC), que se calcula dividiendo el peso (en Kg) por la altura (en m^2), considerándose que una persona es normopeso si el IMC está entre 18,5 y 24,9 Kg/m^2 , sobrepeso si es mayor a 25 Kg/m^2 y obeso si es mayor a 30 Kg/m^2 (126). Sin embargo, el síndrome metabólico no está vinculado al IMC, por lo que ser normopeso u obeso no es sinónimo salud o riesgo metabólico. Así, teniendo en cuenta el IMC y, además, el estado metabólico, se puede dividir la población general en 4 grupos: obeso metabólicamente anormal (MAO –*metabolically abnormal obese*–), obeso metabólicamente saludable (MHO –*metabolically healthy obese*–), normopeso metabólicamente saludable (MHNW –*metabolically healthy normal-weight*–) y normopeso metabólicamente obeso (MONW –*metabolically obese normal-weight*–). Se estima de que un 30% de la población mundial presenta el fenotipo MONW (8), al que nos referiremos en el presente trabajo como fenotipo “falso delgado”, aunque se ha observado una prevalencia muy heterogénea estadísticamente significativa entre los diferentes estudios. Este hecho indica que los criterios de identificación de falsos delgados no están claros (110). Todo ello implica un grave problema de salud ya que una parte importante de la población puede presentar un mayor riesgo metabólico no diagnosticado debido a la ausencia de sobrepeso u obesidad o incluso debido a la falta de alteraciones en los biomarcadores clásicos de la enfermedad. Por ello es fundamental la búsqueda de biomarcadores tempranos predictivos del fenotipo MONW (1).

Aunque los mecanismos que aumentan el riesgo cardiovascular en personas metabólicamente obesas aún no están claros, la inflamación y el aumento del estrés oxidativo son dos mecanismos potenciales que pueden tener un papel importante en el aumento de morbilidad asociada a personas con dietas inadecuadas (4). Además de las complicaciones médicas relacionadas con el síndrome metabólico es conocida la relación entre la ingesta de dietas altas en grasas y la obesidad con un aumento del riesgo de cáncer (6, 36, 69). Más recientemente, también se ha establecido una conexión con alteraciones cognitivas (96) y, por tanto, las dietas hiperlipídicas y la obesidad también podrían tener un papel importante en la creciente incidencia de enfermedades neurodegenerativas en las sociedades occidentales. Debido a la ineficacia de las terapias actuales para tratar enfermedades neurológicas y la dificultad de obtener muestras cerebrales la identificación

de biomarcadores de deterioro cognitivo leve constituye un reto futuro de la investigación en nutrición molecular y clínica (1).

2. Objetivos

- Definir el fenotipo falso delgado, características, criterios de diagnóstico, y patologías asociadas.
- Analizar el concepto de biomarcador y tipos de biomarcadores existentes.
- Analizar específicamente la utilidad de las células sanguíneas (células de sangre total y de sangre periférica) como fuente de biomarcadores tempranos predictivos de obesidad y obesidad normopeso.
- Identificar el estado del estado actual de investigación científica de biomarcadores tempranos de obesidad, obesidad normopeso y patologías asociadas

3. Metodología

Este trabajo se basa en una búsqueda bibliográfica para identificar la problemática del exceso de grasa corporal en la salud e identificar acciones científicas para buscar biomarcadores tempranos para poder establecer estrategias de prevención. Se ha realizado búsquedas generales para diseñar un índice de trabajo y posteriormente se han realizado búsquedas sistemáticas de literatura más específicas para cada apartado de interés a través de bases electrónicas que incluyen *Web of Science*, *PubMed* y Google académico. Solo se recuperaron artículos en inglés. Los artículos utilizados están en el apartado de bibliografía.

4. Obesidad normopeso: fenotipo falso delgado

Las personas con peso normal metabólicamente obesas (MONW), también conocidas de manera más común como falsos delgados o *skinny fat* en inglés, son personas con un peso corporal normal según el IMC (entre 18 y 25 Kg/m²) pero que presentan características metabólicas relacionadas con la obesidad y el síndrome metabólico. El fenotipo falso delgado está relacionado con la ingesta de dietas desequilibradas, dietas ricas en grasa o carbohidratos simples, pero sin una mayor ingesta de energía (11). Las personas con MONW presentan niveles más altos de grasa visceral, masa grasa, grasa hepática y triglicéridos circulantes. Además, presentan menor masa corporal magra y resistencia a la insulina (10). Una de las características más problemáticas de este fenotipo es la deposición de grasa en el hígado, ya que el hígado graso tiene un papel importante en la aparición de resistencia a la insulina y síndrome metabólico (12). En definitiva, la composición corporal y las anomalías en la distribución de la grasa corporal (deposición de grasa visceral) pueden jugar un papel importante en el desarrollo de complicaciones metabólicas en estos individuos (11).

4.1. Nomenclaturas utilizadas y evolución del estudio del fenotipo falso delgado

En la bibliografía científica, este fenotipo recibe también otros nombres como obesos metabólicamente no saludables (MUHNO o MUNO – *metabollically unhealthy non obese* –) o individuos con peso normal metabólicamente no saludables (MUNW – *metabollically unhealthy normal weight* –). En este trabajo se ha optado por usar MONW ya que es uno de los términos más utilizados y que parece que se está imponiendo en la bibliografía científica. Sin embargo, es de destacar que esta diversidad de nomenclatura dificulta la identificación del fenotipo al hacer búsquedas bibliográficas. En la *Figura 1a* se representa el número de artículos que utilizan cada nomenclatura. Se puede observar que los primeros artículos sobre fenotipo falso delgado utilizan MONW; sin embargo, en los últimos años (a partir de 2013) empezaron a aparecer nuevas nomenclaturas. Además, se puede observar cómo ha ido creciendo el interés por el estudio de este fenotipo, con un máximo de publicaciones en 2016, continuando el interés por el fenotipo hasta la actualidad (*Figura 1b*).

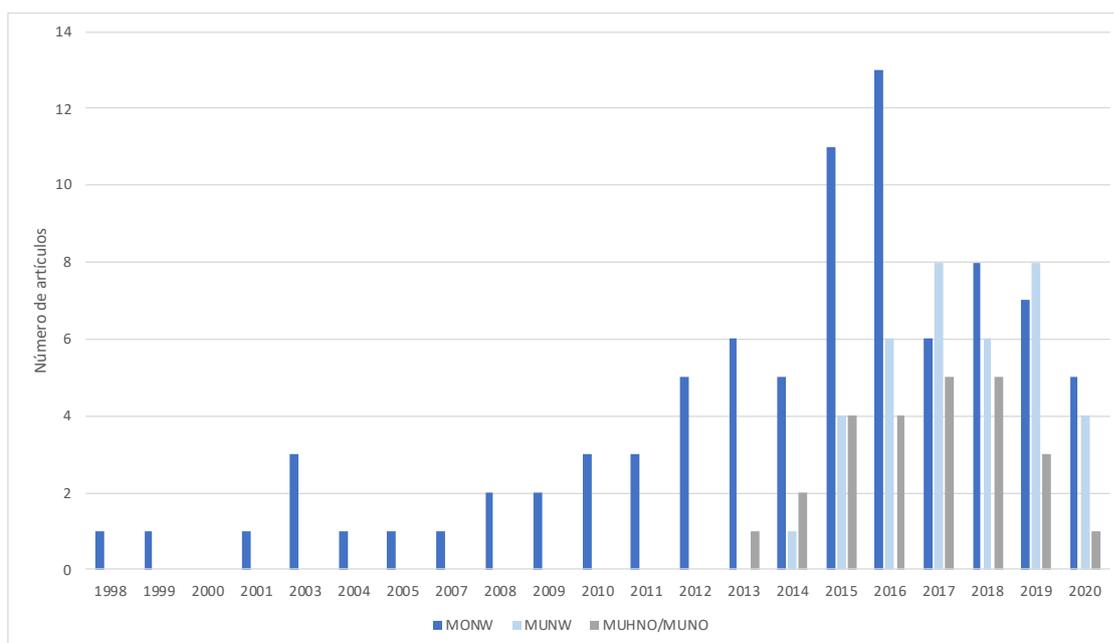


Figura 1a. Representación de las publicaciones registradas en PubMed en el período temporal de 1998 a 2019 de las búsquedas *metabollically unhealthy non-obese* (MUHNO o MUNO),

metabolically unhealthy normal weight (MUNW) y *metabolically obese normal weight (MONW)*, respectivamente.

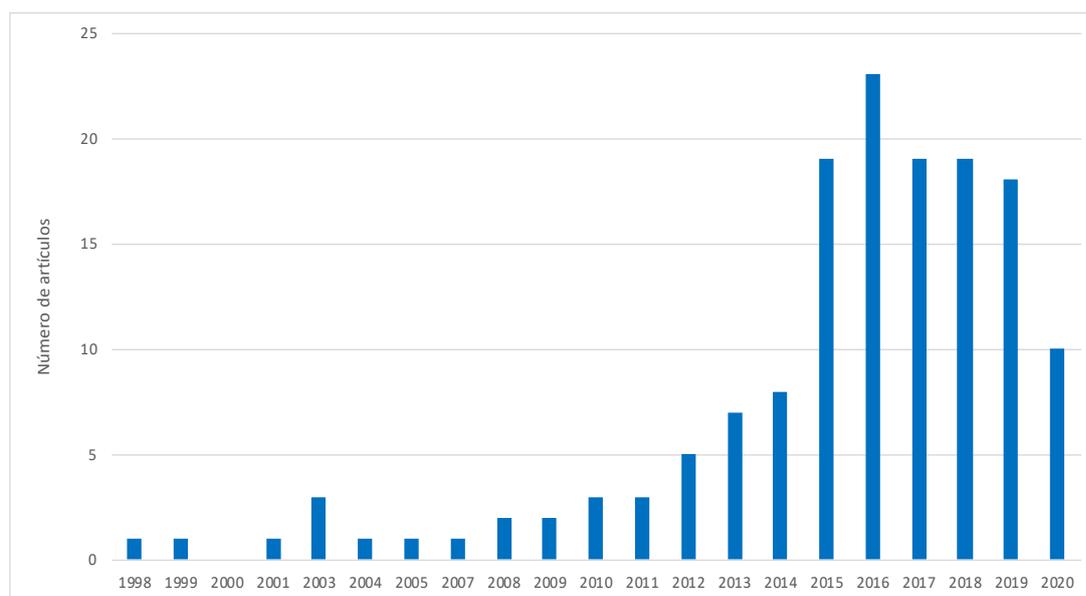


Figura 1b. Representación del número total de publicaciones registradas en PubMed en el período temporal de 1998 a 2019 relacionadas con los falsos delgados con las búsquedas *metabolically unhealthy non-obese (MUHNO o MUNO)*, *metabolically unhealthy normal weight (MUNW)* y *metabolically obese normal weight (MONW)*.

4.2. Criterios de clasificación del fenotipo falso delgado

Ruderman, en 1981 fue el primero en describir el fenotipo MONW (102). Posteriormente, en 2006, De Lorenzo et al. (103) introdujo el concepto de obesidad normopeso (NWO – *normal weight obesity* –). Los individuos con NWO se definen como personas con un IMC normal pero con aumento de grasa corporal y reducción de masa magra. Este concepto es más inclusivo que MONW ya que podrían incluir personas metabólicamente sanas y de peso normal que cumpla con los criterios de exceso de grasa corporal (103). Además de este término han surgido otros como TOFI (*thin outside fat inside*) para indicar a personas delgadas con grasa acumulada (100).

A la hora de definir a un falso delgado, es relevante tener una buena cuantificación de la cantidad de grasa corporal. Los valores de corte utilizados para el porcentaje de grasa corporal dependen del origen étnico y el sexo de la población estudiada (99). Hay diferentes métodos utilizados para cuantificar la grasa corporal. La medición directa del tejido adiposo utilizando métodos estándar como la pletismografía de desplazamiento de agua o la resonancia magnética es demasiado costosa y poco práctica para el uso diario en la práctica clínica. Sin embargo, están emergiendo métodos válidos y rentables como la pletismografía de desplazamiento de aire, la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) o la impedancia bioeléctrica (99). Entre estos, DXA se está imponiendo como una de las herramientas más eficientes, precisas y valiosas para estimar la grasa corporal, en gran parte debido a su capacidad adicional para estimar el tejido adiposo visceral (101).

Como se ha comentado anteriormente, los individuos falsos delgados presentan un mayor riesgo metabólico. Sin embargo, los criterios para identificar este fenotipo todavía no están bien definidos. Comparando diferentes estudios se puede observar claramente la falta de consenso en los criterios exactos que establecen la definición del fenotipo. Lee et al. (103) definió a los falsos delgados como personas con un IMC inferior a 25 kg/m² y 2 o más factores de riesgo metabólico (hipertensión, alta concentración de triglicéridos, glucemia

alta en ayunas, baja concentración de HDL y evaluación del modelo de homeóstasis de la resistencia a la insulina, HOMA-IR, igual o mayor al percentil 90). Eckel y col. (104) lo definieron como aquellas personas con un IMC inferior a 25 kg/m² que desarrollaron diabetes mellitus de tipo 2 durante el período de seguimiento de un estudio de cohorte prospectivo. Eckel y col (105) definieron el fenotipo como personas con un IMC normal (18.5–24.9 Kg/m²) con problemas de salud metabólica evaluados utilizando las pautas del Panel III de Tratamiento para Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (circunferencia de la cintura, triglicéridos altos, colesterol HDL bajo, hipertensión y glucosa alta en ayunas). En el mismo periodo, Lee et al. (106) definió el fenotipo como personas con un IMC normal y con síndrome metabólico, valor anormal del índice de glucosa triglicérida (TyG) o puntaje HOMA-IR en el cuartil más alto.

4.3. Prevalencia del fenotipo falso delgado

En varias ocasiones se ha intentado estimar la prevalencia del fenotipo MONW en la población general. Un meta-análisis en el que se evaluaron 31 artículos estima una prevalencia global del fenotipo MONW del 30% (intervalo de confianza del 95% [26-36%]) (8), mientras que otros informan que la prevalencia entre las personas delgadas es de alrededor del 10-37% (108) y del 5 al 45% (109). En dicho meta-análisis los autores observaron una heterogeneidad de prevalencia estadísticamente significativa entre los diferentes estudios y la presencia de varios factores que afectan a dicha prevalencia. El género, los hombres presentan mayor prevalencia del fenotipo MONW posiblemente debido a que tienden a acumular grasa visceral (obesidad androide); la región, poblaciones europeas presentan mayor prevalencia del fenotipo MONW; la edad, a mayor edad mayor prevalencia del fenotipo MONW y algunos factores relacionados con un estilo de vida insalubre como el tabaquismo y el consumo de alcohol incrementan la incidencia de dicho fenotipo (8). Además, estos datos podrían estar infravalorados, ya que la mayoría de la población desconoce si presenta grasa visceral incrementada y, por tanto, un mayor riesgo metabólico.

En la literatura se presentan diferentes nomenclaturas y diferentes definiciones del fenotipo, lo que conlleva diferentes criterios de admisión en trabajos epidemiológicos o experimentales afectando a los resultados obtenidos. El hecho de que no estén claros los criterios para clasificar a un individuo como falso delgado también podría contribuir a que la prevalencia sea diferente. Sería importante que todos los investigadores utilicen los mismos criterios para definir a los falsos delgados, lo que facilitaría la comparación de diferentes trabajos y la obtención de conclusiones.

Los falsos delgados pueden mostrar signos prematuros de resistencia a la insulina (hiperinsulinemia) y dislipidemia que puede aumentar su riesgo de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares, entre otras (10). Sin embargo, este riesgo que puede pasar desapercibido desde una perspectiva clínica si el individuo es de corta edad y con un peso corporal normal (10). Esto es un problema, ya que una parte importante de la población podría estar en mayor riesgo metabólico sin ningún signo evidente de alarma. Por lo cual es fundamental llegar a un **diagnóstico temprano** de pacientes con el fenotipo MONW mediante biomarcadores predictivos de este fenotipo y de la deposición de grasa hepática (1). Estos biomarcadores de riesgo permitirían poner en marcha acciones de preventivas para así normalizar el perfil cardiometabólico anormal y reducir el riesgo de mortalidad (9).

5. Biomarcadores, características, tipos y utilidad en medicina de prevención

El término biomarcador, acrónimo de “marcador biológico”, inicialmente hacía referencia a una subcategoría de los signos médicos. Es decir, aportaban una indicación objetiva del

estado médico de un paciente que puede ser reproducida y medida con precisión (3). Hay que diferenciar claramente el concepto de **biomarcador clínico** del de un síntoma, que se limita a una percepción de salud o enfermedad subjetiva del paciente. En cambio, un biomarcador puede, pero no necesariamente se correlaciona, con la sensación del paciente. The *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* definió un biomarcador con más precisión como “una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de los procesos biológicos normales, los procesos patógenos o las respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica” (13). La OMS declaró que el término biomarcador en sentido amplio incluye “casi cualquier medición que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente ambiental, que puede ser químico, físico o biológico” (14).

Las variables clínicas primarias (punto final clínico o verdadero) ofrecen datos claros e inequívocos que pueden mostrar definitivamente si las intervenciones son eficaces o ineficaces (3). Estas variables clínicas primarias son, por ejemplo, la supervivencia, accidente cerebrovascular o infarto de miocardio. Las variables clínicas primarias pueden ocurrir con poca frecuencia en ensayos clínicos de manera que son poco prácticas, además de poco éticas. Los biomarcadores, cuando son utilizados como resultados en ensayos clínicos actúan como puntos finales sustitutos. Para ser considerado una variable sustituta, debe haber pruebas científicas sólidas (por ejemplo, epidemiológicas, terapéuticas y/o fisiopatológicas) de que un biomarcador predice de manera consistente y precisa un resultado clínico, ya sea un beneficio o un daño. Los biomarcadores como puntos finales sustitutivos presentan muchas ventajas entre ellas permiten detener intervenciones potencialmente dañinas para los sujetos antes de presentar variables clínicas (3). Por otra parte, los biomarcadores suelen ser más baratos y fáciles de medir que los puntos finales verdaderos. Por ejemplo, la presión arterial se puede medir al momento, mientras que lleva varios años recopilar datos de mortalidad (15).

Desde la patogénesis de una enfermedad a sus manifestaciones clínicas hay una cadena de eventos, los biomarcadores se pueden usar en cualquier punto de la cadena ya que cualquier medición por debajo del resultado real puede considerarse un biomarcador de punto final sustituto (15). Austin Bradford Hill estableció unos criterios para decidir si un biomarcador es un buen candidato como punto final sustituto (ver Tabla 1). Aunque un biomarcador cumpla con las pautas no implica explícitamente que sea útil, pero presenta una mayor probabilidad de serlo (16).

Tabla 1. Pautas propuestas por Austin Bradford Hill para seleccionar biomarcadores.

Directriz	Características de un biomarcador útil
<i>Fuerza</i>	La asociación entre el marcador y el resultado es fuerte.
<i>Consistencia</i>	La asociación persiste en diferentes: individuos, lugares y circunstancias.
<i>Especificidad</i>	El biomarcador está asociado con una enfermedad específica.
<i>Temporalidad</i>	Los cambios en el marcador y el resultado ocurren en paralelo temporalmente.
<i>Gradiente biológico</i>	El aumento de la exposición a una intervención produce efectos crecientes sobre el marcador y la enfermedad (dosis-respuesta).
<i>Plausibilidad</i>	Hay mecanismos que conectan el marcador, la patogénesis de la enfermedad y el modo de acción de la intervención.

<i>Coherencia</i>	La asociación es consistente con la historia natural de la enfermedad y el marcador.
<i>Evidencia experimental</i>	Una intervención da resultados consistentes con la asociación.
<i>Analogía</i>	Hay un resultado similar al que podemos añadir una relación

Recuperado de Hill, A. B. (1965). The environment and disease: association or causation?. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 295-300.

Se consideran dos tipos básicos de análisis de laboratorio, que se pueden aplicar al concepto de biomarcador analizado. Las pruebas estáticas son aquellas que miden la concentración actual de nutrientes, bioactivos o biomarcadores en una muestra biológica. En cambio, las pruebas funcionales miden una respuesta que permiten una evaluación dinámica con la que se relaciona un biomarcador. El análisis funcional permite la cuantificación de la flexibilidad fenotípica y refleja el grado de robustez homeostática que presenta el individuo (23).

5.1. Biomarcadores en el ámbito de la nutrición y la salud

En el ámbito de la nutrición y la salud, interesan no solo los biomarcadores clínicos, sino también los biomarcadores nutricionales. Para realizar una evaluación dietética y del estado nutricional de un individuo tradicionalmente se recogen datos de ingesta dietética (recopilación de 24 horas, cuestionarios de frecuencia alimentaria y registros dietéticos) (17). Sin embargo, estos métodos basados en la ingesta de alimentos presentan algunas limitaciones. Se trata de unos datos subjetivos ya que el individuo en muchas ocasiones no recuerda con precisión lo que ha consumido o el tamaño de las proporciones (18). Además, algunos nutrientes no están bien caracterizados en las tablas de composición de alimentos, por lo tanto, el estado nutricional no se puede evaluar correctamente en función de la ingesta de alimentos (19). No hay que olvidar que el contenido nutricional de los alimentos no es uniforme y que hay muchos factores que influyen en la absorción de nutrientes, como el estado nutricional, la combinación de alimentos, el grado de cocción y el grado de procesamiento. Todos estos factores generalmente no se consideran ya que los cuestionarios dietéticos no los registran (7).

Las limitaciones del uso de datos de ingesta dietética para determinar una evaluación dietética y del estado nutricional indican la gran necesidad de determinantes analíticos que puedan cuantificar de manera objetiva y precisa el estado nutricional de un individuo. En términos generales, “un **biomarcador nutricional** es una característica que puede medirse objetivamente en diferentes muestras biológicas y puede usarse como un indicador del estado nutricional con respecto a la ingesta o el metabolismo de los componentes de la dieta” (20).

Los biomarcadores clínicos se centran en el diagnóstico de un estado de enfermedad, sin embargo, para comprender las complejas relaciones entre nutrición y salud se están utilizando diferentes tipos de biomarcadores en estudios nutricionales (21):

- **Biomarcadores de exposición:** son aquellos utilizados para evaluar la ingesta dietética de nutrientes, componentes alimenticios no nutritivos o patrones dietéticos. Por ejemplo, la concentración plasmática de alquilresorcinol se considera un biomarcador de la ingesta de granos enteros (22).

- **Biomarcadores de efecto (o función):** estos biomarcadores están relacionados con una función objetivo o respuesta biológica, de manera que no solo reflejan el consumo sino

también el metabolismo de nutrientes y pueden llegar a informar de efectos sobre los procesos fisiológicos o de la enfermedad (7).

- Biomarcadores de estado de salud/enfermedad: estos biomarcadores indican un punto final relacionados con un estado de salud y/o riesgo de enfermedad. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas están asociados con la sensibilidad a la insulina o la diabetes (7).

El desarrollo de estos biomarcadores de salud/enfermedad son muy relevantes a nivel clínico, principalmente para identificar y cuantificar el estado o progresión de una enfermedad. Sin embargo, se requiere una manera de evaluar y cuantificar el estado de salud de un individuo. Por lo tanto, es fundamental la búsqueda de “**marcadores de prevención**” o “**biomarcadores tempranos**” que serían biomarcadores de alteraciones en etapas muy tempranas que podrían progresar a la enfermedad detectables incluso antes del inicio de la enfermedad. Es probable que estas alteraciones fisiológicas previas a la enfermedad están asociadas a alteraciones en el equilibrio homeostático (23) ya que con buena salud los mecanismos que mantienen la homeostasis pueden amortiguar de manera efectiva diferentes desafíos a los que está sujeto un individuo (infecciones, temperatura, ejercicio, dieta, etc.) (24). El camino hacia la enfermedad empieza cuando fallan estos procesos adaptativos y redes reguladoras. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar biomarcadores moleculares de los efectos de la dieta, tanto para comprender los mecanismos moleculares y las vías metabólicas afectadas, como para poder predecir alteraciones homeostáticas (biomarcadores tempranos) y otras que puedan derivar en patología. Estos "biomarcadores tempranos", "biomarcadores de riesgo" o "biomarcadores de enfermedades" son de interés para ser utilizados en la prevención, diagnóstico y monitoreo, y deberían obtenerse idealmente de material biológico no invasivo, como la sangre (2).

5.2. Fuentes biológicas de biomarcadores

La fuente de biomarcadores, y particularmente de biomarcadores tempranos debe ser idealmente a partir de un material biológico fácilmente accesible y obtenible utilizando técnicas mínimamente invasivas. Los biomarcadores deben determinarse por métodos sólidos, sensibles y reproducibles, que deben ser altamente específicos y económicamente viables. Además, su concentración en la muestra biológica debe ser lo suficientemente sensible como para reflejar posibles cambios (25). Las muestras biológicas más utilizadas como fuente de biomarcadores en estudios nutricionales son la sangre (plasma, suero, células sanguíneas), productos de excreción (orina, heces) o muestras fácilmente obtenibles (uñas, saliva, cabello), aunque en ciertos casos puede ser relevante tener biopsias o muestras de tejido sólido (músculo, tejido adiposo, piel) (7).

En este trabajo se analizará en detalles la utilidad de las células sanguíneas como fuente biológica en estudios de nutrición, obesidad y salud (ver apartado 6).

5.3. Aplicación de las técnicas ómicas a la obtención de biomarcadores

En el ámbito de la medicina e investigación, y en relación a las enfermedades ligadas a la dieta, se han ido utilizando de manera tradicional biomarcadores biológicos clásicos como son los niveles circulantes de glucosa, triglicéridos, colesterol, etc. que informan del estado metabólico del paciente. Sin embargo, dichos metabolitos normalmente ya se encuentran

alterados cuando el metabolismo está afectado (marcadores de punto final), no siendo especialmente útiles para ser usados como biomarcadores de prevención.

En este sentido son muy relevantes las técnicas de análisis global, tecnologías “ómicas”. Estas técnicas han abierto nuevas vías de investigación al permitir obtener información de miles de parámetros y, en definitiva, poder conocer el “perfil nutrigenómico” de cada individuo, permitiendo detectar alteraciones del estado de homeostasis de forma temprana (124). Estas tecnologías, sin embargo, presentan algunas limitaciones, ya que para extraer información biológica útil de una gran cantidad de datos, generalmente se comparan dos situaciones (ejemplo, enfermos en comparación con sanos) de manera que la mayor parte de datos recogidos no son tratados. Una manera de optimizar toda la información disponible es mediante la biología de sistemas (26), es decir, describiendo el sistema biológico en su totalidad para poder describir completamente cada sistema homeostático y percibir desplazamientos de este sistema. Encontramos diferentes técnicas de genómica funcional usadas en el análisis de etapas implicadas en la expresión génica que dan lugar a diferentes tipos de biomarcadores:

- Biomarcadores genéticos

El genoma es el conjunto completo de genes de un organismo. Los biomarcadores genéticos se basan principalmente en la determinación de polimorfismos genéticos, particularmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Este tipo de biomarcadores tienen una serie de requerimientos y de ventajas: se requiere cualquier muestra biológica que contenga células nucleadas, son biomarcadores estáticos, su determinación es rápida, relativamente económica y las muestras utilizadas pueden almacenarse y transportarse fácilmente, especialmente una vez que el ADN ha sido aislado (27). Este tipo de biomarcadores son particularmente interesantes cuando la variación interindividual se ha asociado con la presencia de ciertas variantes genéticas, la determinación de polimorfismos genéticos más relevantes asociados a fenotipos de interés pueden establecer una asociación fiable entre la dieta y la enfermedad. Actualmente hay cientos de SNPs asociados con diferentes fenotipos de enfermedades relacionadas con la nutrición (28,29).

- Biomarcadores transcriptómicos

El transcriptoma es el conjunto de todas las moléculas de ARN (también llamadas transcritos) presentes en una célula o grupo de células en un momento determinado. El transcriptoma engloba tanto el ARN mensajero (puede traducirse en una proteína) como el ARN no codificante (no se traduce en una proteína). Cada tipo celular posee un transcriptoma único y distinto ya que diferentes células expresan diferentes genes que varían dependiendo del tejido y el tiempo de vida. La exposición a diferentes dietas, alimentos específicos o componentes de la dieta afecta a la expresión de genes específicos o al transcriptoma completo. Además, el análisis global de transcriptomas ha permitido comprender mecanismos moleculares de la enfermedad, las vías metabólicas, las redes reguladoras y ayudar en gran medida con la búsqueda e identificación de biomarcadores de la salud para el diagnóstico y pronóstico, así como objetivos potenciales para intervención nutricional. Permitiendo así comprender mejor la compleja interacción entre factores genéticos y ambientales (30, 31). Una fuente de biomarcadores transcriptómicos muy interesante son las células sanguíneas, ya sea células totales (PBC) o la fracción de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) ya que su perfil de expresión génica refleja en parte el perfil de expresión que se produce en otros tejidos, particularmente el hígado, el músculo y el tejido adiposo sin necesidad de utilizar una técnica invasiva como las biopsias de estos tejidos (32, 33, 34, 35). Los biomarcadores transcriptómicos, aunque son prometedores, deben validarse integrando los estudios de transcriptoma con estudios de

genómica y, principalmente epigenética, ya que la maquinaria epigenómica es muy sensible a señales metabólicas (36).

Por otra parte, también deben considerarse como posibles biomarcadores los ARN no codificantes. En particular, los microRNA (miRNA), que son pequeños ARN de 18-25 nucleótidos de longitud que regulan la expresión de sus respectivos ARNm objetivo después de la transcripción. Algunos miRNA han surgido como reguladores epigenéticos cruciales de muchos procesos relacionados con la nutrición (37). Se ha demostrado que la modulación dietética de la expresión de miRNA influye en diversas enfermedades, como la diabetes tipo 2 o la esteatosis hepática (38) y que los componentes alimentarios modulan la expresión de los miRNAs (39). Por lo tanto, los miRNAs específicos tienen potencial como biomarcadores de efecto, exposición e ingesta.

- Biomarcadores proteómicos

El proteoma es el conjunto de proteínas que es o puede ser expresada por un genoma, en una célula, tejido u organismo en un momento determinado. El proteoma celular es la totalidad de las proteínas expresadas por una célula bajo condiciones ambientales y según su ciclo celular específico, ya que las proteínas se elaboran en cantidades y tiempos diferentes según su funcionamiento, necesidad y su interacción con otras proteínas. Generalmente, los fluidos corporales de fácil acceso (sangre, saliva o lágrimas) contienen proteínas de importancia fisiológica y diagnóstica. Son ampliamente utilizados en pruebas clínicas para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades y para seguir sus evoluciones (40). La mayoría de las enfermedades humanas implican cambios en la expresión de proteínas normales o la creación de proteínas anormales, que perturban la fisiología. En muchos casos, estas proteínas pueden aparecer en la sangre u otros fluidos biológicos, lo que proporciona un biomarcador de fácil acceso que puede ofrecer información sobre el proceso de la enfermedad. La proteómica también permite la identificación de cambios que ocurren en respuesta a la dieta. El uso de técnicas proteómicas para la identificación de nuevos biomarcadores ha sido generalmente limitado por las características de las proteínas y la disponibilidad de técnicas adecuadas. Sin embargo, se está progresando gradualmente y la recopilación de información sobre proteínas y péptidos, sus ubicaciones y funciones celulares, junto con sus patrones de expresión en diferentes tejidos y células, proporciona material poderoso para definir hipótesis sobre biomarcadores potenciales en suero / plasma, antes de la validación con pruebas específicas (41). Se espera que la creación de bases de datos de proteínas presentes en la sangre ayude a identificar nuevos biomarcadores (42).

- Biomarcadores metabólicos

La metabolómica o el perfilado de metabolitos se trata del análisis o cribado de pequeños metabolitos presentes en muestras biológicas (43). En la metabolómica se pueden llevar a cabo dos enfoques. La metabolómica dirigida, que permite el análisis de un conjunto definido de metabolitos conocidos con estructuras similares (por ejemplo, aminoácidos, ácidos grasos, fitoquímicos, etc.), generalmente es una herramienta cuantitativa que pretende responder a una hipótesis o pregunta bioquímica específica (44). Por otra parte, la metabolómica no dirigida consiste en el cribado imparcial de metabolitos en muestras biológicas. Generalmente se utiliza para la elaboración de perfiles de metabolitos globales con la intención de comparar patrones de metabolitos entre diferentes grupos (45). Los estudios metabolómicos no dirigidos generalmente no son impulsados por hipótesis, sino que generan hipótesis (44). Las estrategias metabolómicas, tanto dirigidas como no dirigidas, han contribuido claramente al descubrimiento de biomarcadores en los últimos años convirtiéndose en una herramienta clave para la investigación nutricional (45). Los perfiles completos de metabolitos pueden proporcionar una visión general del metabolismo,

da información genética y refleja más de cerca el fenotipo final, ayudando así a conectar el genotipo con el fenotipo a nivel molecular (44). Los metabolitos presentes en las muestras biológicas no sólo reflejan la exposición a la dieta, sino también los procesos metabólicos, incluyendo los efectos modificadores de la variación genética y la microbiota intestinal (45).

Cabe destacar la microbiota intestinal, cuya composición puede variar en función de la dieta, influyendo en su actividad biológica y en posibles resultados fisiológicos y de salud (46). Por ejemplo, se demostró que la dieta mediterránea modifica la microbiota intestinal con consecuencias funcionales tanto en el microbioma como en el metaboloma del huésped, asociada con la reducción del riesgo de enfermedad (46). De manera que la dieta modula la microbiota y la composición de la microbiota modula los efectos de la dieta. Por ese motivo, el análisis del microbioma de los individuos es prometedor para la búsqueda de biomarcadores que permitan predecir la capacidad de respuesta individual a la dieta (47).

- Biomarcadores epigenéticos

La epigenética es el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de los genes sin modificaciones en la secuencia de ADN, sino que se refieren a otras modificaciones químicas que pueden resultar en la expresión diferencial de genes. Los principales mecanismos epigenéticos incluyen la metilación de ADN y la modificación de histonas, principalmente metilaciones y acetilaciones (48). Se conoce como metiloma a los patrones de metilación de ADN de un genoma, estos son característicos de cada tipo celular y etapa del desarrollo. La metilación del ADN es una modificación epigenética, que ocurre en un dinucleótido de citosina-fosfato-guanina (CpG) e implica la adición de un grupo metilo en la posición 5 de los residuos de citosina en las islas CpG. Esta modificación proporciona marcas en el genoma que establecen si los genes se activan transcripcionalmente o se silencian. La hipometilación o hipermetilación de islas específicas se ha asociado con varios fenotipos de enfermedades como el cáncer, la obesidad o la diabetes tipo 2, entre otros (49) o con la protección contra algunas enfermedades (50). La dieta puede afectar la metilación de ciertos sitios de ADN y que estos cambios en la metilación son dinámicos (48). A pesar de los rápidos avances, la epigenética nutricional todavía está en sus etapas iniciales y se necesitan muchos más estudios para establecer marcadores epigenéticos como nuevos biomarcadores de la ingesta o de la salud/enfermedad relacionada con la nutrición. Aunque la atención se ha centrado inicialmente en la metilación del ADN, las modificaciones de la histona están surgiendo actualmente como modificaciones epigenéticas relevantes para la nutrición.

6. Células sanguíneas como fuente de biomarcadores tempranos

Las células sanguíneas ofrecen la posibilidad de ser utilizadas en estudios humanos con mínima invasión para la búsqueda de biomarcadores nutrigenómicos ya que se ha observado que muchas adaptaciones transcripcionales homeostáticas de las dietas y estados fisiológicos se reflejan en dichas células (52, 53, 54, 55). Esta fuente de biomarcadores es de gran utilidad ya que una de las limitaciones que presentan los estudios en humanos es la dificultad de obtener biopsias de tejidos relevantes de voluntarios sanos. Las células sanguíneas periféricas (PBC *–peripheral blood cells–*) comprenden todos los tipos de células sanguíneas e incluye la fracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC *–peripheral blood mononuclear cells–*) compuesta principalmente por linfocitos y monocitos.

La sangre es un tejido conjuntivo especializado formado por PBC, fragmentos de células y plasma. Las PBC se componen principalmente de plaquetas, glóbulos rojos y glóbulos

blancos. Las plaquetas son fragmentos celulares formados a partir de la fragmentación citoplasmática de megacariocitos cuya principal función es la hemostasia, es decir, la coagulación de la sangre y representan un bajo porcentaje del ARNm de una muestra de sangre, por lo que esta población celular no es recomendable para realizar análisis transcriptivos (56). Los glóbulos rojos o eritrocitos son las células más abundantes de la sangre. Estas células anucleares tienen como función el transporte de oxígeno y dióxido de carbono, más del 70% del ARNm total de los eritrocitos es ARNm globina, para evitar interferencias en el análisis transcripcional utilizando PBC se recomienda reducir las transcripciones de globina (57). Finalmente, los glóbulos blancos o leucocitos, que participan en la respuesta del sistema inmunitario, están compuestos por granulocitos y agranulocitos. Los granulocitos incluyen neutrófilos, basófilos y eosinófilos, con un papel clave durante las primeras respuestas inmunitarias inflamatorias en las enfermedades por infección (58, 59). Por último, la fracción PBMC o agranulocitos está compuesta por linfocitos T (70%), linfocitos B (15%), linfocitos asesinos naturales (NK) (10%) y monocitos (5%) (60). Los PBMC están involucrados en la respuesta inmune adaptativa, que reconoce patógenos específicos y activa mecanismos para eliminarlos (61).

Las PBC son interesantes en estudios de expresión génica para la búsqueda de biomarcadores (biomarcadores transcriptómicos) relacionados con la dieta ya que las células sanguíneas circulan por el cuerpo infiltrando varios tejidos e interactuando con todas las células proporcionando funciones de transporte y defensa (62). Sorprendentemente, además de estar expuestas a los tejidos, capturan información metabólica y pueden responder, a nivel de expresión génica, a las moléculas derivadas de los tejidos, como las hormonas (63). En base a esto, Liew et al. propuso el llamado "Principio Centinela" en el cual las células sanguíneas podrían actuar como "centinelas" en respuesta a los cambios macro o microambientales que ocurren en los órganos (64). Con este principio se considera que las células sanguíneas al estar en circulación están en contacto con diferentes señales ya sean internas (como las hormonas) o externas (como nutrientes, medicamentos y otros) y como resultado de esta interacción se generan patrones de expresión génica específicos y detectables en la sangre debido a la estrecha interacción fisiológica de la sangre con las células, los tejidos y los órganos. Las células sanguíneas pueden reaccionar a estos estímulos a nivel transcripcional porque poseen receptores de membrana y nucleares específicos (52).

Además, específicamente las PBMC expresan la mayoría de los genes codificados por el genoma humano, por lo que coexpresan una gran cantidad de genes de diferentes tejidos, incluidas las transcripciones específicas de tejidos (33, 64).

Este tipo de fuente de biomarcadores tiene varias ventajas: (a) supone una mínima invasividad; (b) se puede realizar repetidamente en diferentes puntos de tiempo y (c) permite la recolección de suficiente material biológico para realizar análisis de expresión génica. El desarrollo de tecnologías ómicas ha favorecido el uso de PBC en estudios nutricionales para identificar biomarcadores transcriptómicos (33, 66). Además, las PBC también se utiliza cada vez más como fuente de biomarcadores epigenéticos y de microARN con buenos resultados (67, 68).

Los PBC de humanos sanos muestran un patrón de expresión génica estable con variaciones individuales, lo que permite el establecimiento de un perfil de expresión génica saludable (69). Las alteraciones en niveles transcriptómicos de PBC se han asociado con varias patologías (52, 70), de manera que se usan ampliamente para el diagnóstico clínico y para predecir respuesta a tratamientos, así como enfermedad cardiovascular y diabetes tipo II (71, 72).

6.1. Fracción total PBC vs PBMC

La mayor parte de la investigación de la expresión génica de las células sanguíneas se ha realizado con PBMC porque estas células constituyen una muestra consistente y homogénea para el análisis transcripcional (52). Sin embargo, los procedimientos técnicos para el aislamiento de esta fracción celular deben realizarse inmediatamente después de la extracción de sangre, de lo contrario pueden alterar el perfil de expresión génica haciendo la recolección de muestras más lenta y menos reproducible (73). Como alternativa ha surgido el estudio del perfil de expresión génica de PBC como fuente de biomarcadores nutricionales, especialmente en estudios en humanos (54, 72) ya que ofrece facilidad en la recogida, almacenamiento y transporte de muestras, así como la reducción del tiempo de manipulación de la muestra y un riesgo reducido de exposición a la sangre por el personal (75, 76) facilitando la estandarización y reproducibilidad. El uso de PBC también presenta ciertas desventajas, ya que los perfiles de expresión de PBC, en comparación con el de PBMC, muestran un mayor ruido y una menor capacidad de respuesta a diferentes estímulos / enfermedades, junto con una mayor variabilidad en los resultados (77).

La metodología de aislamiento es una de las diferencias más destacadas entre el uso de PBMC o PBC como fuente de biomarcadores. Por una parte, las PBMC pueden aislarse fácilmente de la sangre completa heparinizada por métodos de centrifugación en gradiente de densidad, aunque, como hemos comentado, debe llevarse a cabo inmediatamente después de la extracción de sangre para evitar cambios *ex vivo* en el perfil de expresión génica (73). Por otra parte, en lo que respecta a la obtención de PBC, el sistema PAXgeneTN (de PreAnalytiX, Hombrechtikon, Suiza) permite la extracción y estabilización del ARN de la sangre completa inmediatamente después del muestreo de sangre sin necesidad de manipulaciones adicionales (54, 72, 74).

Ambos sistemas son interesantes en la búsqueda de biomarcadores tempranos, presentando ventajas y desventajas (resumidas en la Tabla 2) que deberían ser consideradas según el objetivo y tipo de investigación.

Como parte de la experiencia de este trabajo, la autora tuvo la posibilidad de realizar prácticas de laboratorio aprendiendo a aislar la fracción PBMC mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll (protocolo en el Anexo). De esta manera se tuvo de la oportunidad de comprobar de manera directa que el aislamiento de PBMC se trata de una metodología fácil, aunque con muchas muestras no es viable debido a la necesidad de que la extracción se produzca inmediatamente después de la obtención de la muestra.

Tabla 2. Resumen de las ventajas y desventajas de la utilización, para estudios transcripcionales, de una subpoblación de células sanguíneas periféricas, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en comparación con el uso de células sanguíneas periféricas totales (PBC).

	<i>PBMC</i>	<i>PBC</i>
<i>Ventajas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra consistente y homogénea para el análisis del transcriptoma. • Bajo coste relativo de la recolección de muestras 	<ul style="list-style-type: none"> • Permite la recolección y estabilización del ARN inmediatamente después de la recolección de sangre sin la necesidad de manipulaciones adicionales. • Previene la degradación del ARN y las modificaciones de la expresión génica <i>ex vivo</i>. • Método fácilmente estandarizado y altamente reproducible.
<i>Desventajas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Los procedimientos técnicos para el aislamiento de estas células requieren un período prolongado de tiempo y pueden alterar el perfil de expresión génica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor ruido y menor capacidad de respuesta en los perfiles de expresión génica. • Gran abundancia de transcripciones de globina procedentes de eritrocitos, que conducen a mayor variabilidad de resultados. • Costo relativamente alto de la colección de muestras (por ejemplo, PAXgene™ tubos, PreAnalytiX).

Recuperado de Reynés, B. (2018). Peripheral blood cells, a transcriptomic tool in nutrigenomic and obesity studies: Current state of the art. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 1006-1020.

Haciendo una búsqueda en PubMed con los términos *PBC biomarker* o *PBMC biomarker*, desde 1989 hasta 2019 se observa un incremento notable de este tipo de estudios en los últimos años (*Figura 3*) con un total de 540 publicaciones para biomarcadores en PBC y 3.733 publicaciones para biomarcadores en PBMC, siendo por tanto las PBMC más utilizadas que las PBC como fuente de biomarcadores a lo largo de los años.

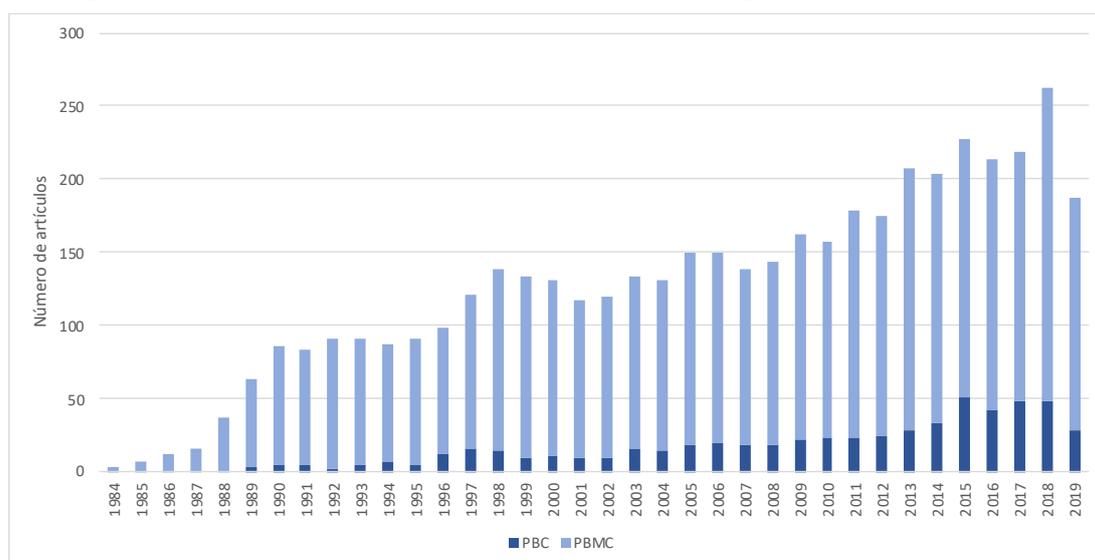


Figura 3. Representación de barras apiladas de las publicaciones registradas en PubMed en el período temporal de 1984 a 2019 de las búsquedas *PBC/biomarker* y *PBMC/biomarker*.

7. Biomarcadores tempranos en PBMC de patologías asociadas a dietas inadecuadas y adiposidad excesiva

La identificación de biomarcadores que permitan reconocer alteraciones metabólicas relacionadas con la dieta antes de la aparición de cualquier signo clínico es fundamental para poder ayudar a crear estrategias nutricionales adecuadas para prevenir el desarrollo de patologías futuras mejorando así la salud pública y la calidad de vida. Los primeros biomarcadores predictivos de riesgo deben servir para controlar una desviación progresiva de la homeostasis (estado saludable) debido a la ingesta de dietas o hábitos dietéticos poco saludables. El desarrollo de estos biomarcadores predictivos facilitará la orientación de futuros consejos dietéticos hacia la salud individualizada para prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas (1).

La nutrigenómica es el estudio del impacto de la dieta en la expresión génica con el objetivo final de alcanzar una nutrición personalizada útil para la prevención de enfermedades. Las principales dianas de los estudios nutrigenómicos son aquellos tejidos involucrados en la homeostasis energética y el metabolismo (hígado, músculo, tejido adiposo) aunque la invasividad que suponen las biopsias implican una gran limitación. Por ello, un enfoque menos invasivo como el uso de biomarcadores tempranos en células sanguíneas de fácil obtención es una gran alternativa (2).

Se exponen a continuación algunos ejemplos del estado actual de la investigación sobre la utilidad de las células sanguíneas para la obtención de biomarcadores, en la medida de lo posible, tempranos, de utilidad para prevenir la obesidad y la obesidad normopeso, así como algunas de sus complicaciones asociadas, como hígado graso, alteración cognitiva o diabetes. Los ejemplos seleccionados hacen referencia a biomarcadores transcriptómicos, ya que como vimos, las células sanguíneas, especialmente las PBMC, por sus características, son idóneas para la identificación de este tipo de biomarcadores.

7.1. Biomarcadores de dieta desequilibrada, obesidad y obesidad normopeso

Una dieta desequilibrada, tanto por alteraciones en la composición adecuada de macronutrientes como por alteraciones en la ingesta calórica, induce deterioro metabólico y un mayor riesgo de desarrollar diferentes tipos de enfermedades. Mediante el análisis del transcriptoma de PBMC en roedores se ha observado que los genes *Fasn*, *Srebp1*, *Pparg*, *Cpt1a* y *Npy* tienen un papel clave en el metabolismo energético y reflejan las adaptaciones metabólicas esperadas del organismo a los cambios agudos en condiciones de alimentación (111). La expresión de *Fasn* (codifica para la ácido graso sintasa, enzima clave en la síntesis de ácidos grasos), *Srebp1* (codifica para el factor de transcripción *SREBP1* requerido para la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (113)) y *Pparg* (codifica para el factor de transcripción *PPARg* que regula la adipogénesis promoviendo la expresión de marcadores específicos de adipocitos, además de un papel importante en la absorción de ácidos grasos y almacenamiento en triacilglicéridos (114)) disminuye con el ayuno y aumenta con la realimentación debido a la disminución de la lipogénesis en una situación de falta de sustratos energéticos e insulina (113). Por otra parte, la expresión génica de *Cpt1a* (codifica para la carnitina palmitoiltransferasa 1a que tiene un papel importante en la beta-oxidación de ácidos grasos) y *Npy* (péptido orexigénico) aumenta con el ayuno y disminuye con la realimentación lo que permite movilizar las reservas de energía grasa. El análisis de la respuesta al ayuno de estos genes permiten proporcionar una visión representativa del estado homeostático del organismo tratándose de una herramienta muy interesante para obtener biomarcadores para estudios nutricionales y peso corporal.

La obesidad se asocia con una insensibilidad en la respuesta a las condiciones de alimentación (115, 116, 117). En ratas obesas por la ingesta de una dieta de cafetería en diferentes etapas del desarrollo de la obesidad se ha observado una falta general de respuesta al ayuno agudo y la realimentación, en comparación con animales control. Más específicamente, durante el desarrollo de la obesidad, las PBMC reflejarían, de forma temprana, problemas en la homeostasis de los lípidos (movilización y almacenamiento) por el hígado y el tejido adiposo en períodos agudos de ayuno y realimentación (111). Esta insensibilidad se detectaría por una falta de respuesta adecuada al ayuno (a nivel transcriptómico) de los genes anteriormente comentados, en PBMC (111).

Por lo tanto, durante el proceso de desarrollo de obesidad inducida por la dieta se han observado que los PBMC son una fuente de biomarcadores de desequilibrio homeostático temprano que refleja adecuadamente las adaptaciones metabólicas a los cambios agudos en el ayuno y la realimentación que tienen lugar en el hígado o el tejido adiposo, así como la insensibilidad al ayuno que se produce con el progresivo incremento de peso. De manera que pueden usarse como predictores tempranos de alteraciones metabólicas que conducen a la obesidad. Se trata de una fuente fácilmente obtenible de biomarcadores potencialmente útil para prevenir la obesidad (111).

En otros estudios (79, 80, 81, 52), se ha observado en PBMC humanas altos niveles de expresión génica de los genes inflamatorios *IL-6*, *IL-18*, *MIF*, *MMP-9*, *NAMPT*, *OPN* y *TNF- α* en sujetos obesos en comparación con sujetos de peso normal. Esto es interesante, ya que la obesidad va asociada a un estado inflamatorio (127, 92), por lo que el análisis de la expresión aumentada de genes inflamatorios en PBMC puede utilizarse como biomarcador de desarrollo de obesidad.

La ingesta sostenida de dietas altas en grasas pero sin excedente calórico está claramente relacionado con la aparición de individuos metabólicamente obesos de peso normal (MONW). En un estudio con roedores, se observó un incremento de los niveles de ARNm de *Cpt1a* en animales con fenotipo falso delgado al haber sido alimentados isocalóricamente con dietas hiperlipídicas. Además, el aumento se observó tras un mes de tratamiento dietético, cuando los animales aún no habían desarrollado cambios en el peso corporal, si bien, la expresión de *Cpt1a* correlacionó con parámetros relacionados con síndrome metabólico tales como resistencia a la insulina, lípidos en sangre y deposición de grasa en el hígado. Por tanto, la expresión de *Cpt1a* en PBMC ha sido propuesta como un biomarcador temprano de alteraciones metabólicas relacionadas con el fenotipo falso delgado y podría tratarse de un biomarcador temprano muy interesante para detectar desequilibrios en la dieta y prevenir complicaciones futuras (52).

7.2. Biomarcadores hígado graso

Una de las principales características de los individuos con fenotipo falso delgado es la acumulación de grasa visceral. La estrecha asociación entre la obesidad visceral y las alteraciones metabólicas (diabetes, dislipidemia e hipertensión asociada con enfermedades cardiovasculares) implica que sea de gran importancia la búsqueda de biomarcadores de acumulación de grasa visceral (84, 85). En este sentido, se ha descrito una asociación entre la grasa visceral y la regulación transcripcional de genes específicos en PBC o PBMC humanos (86). Además, se han observado altos niveles de expresión génica de *ICAM1*, *IL-1R1* e *IL-6* (genes proinflamatorios), y niveles disminuidos de expresión génica de *SIRT1* (relacionado con regulación celular y longevidad) y *PER1* (un gen relacionado con los ritmos circadianos) en humanos con mayor acumulación de grasa visceral (87, 88, 86).

Otro gen expresado en PBMC que se ha propuesto como biomarcador temprano de hígado graso es *Cpt1a*. En un experimento con roedores alimentados con una dieta isocalórica hiperlipídica (fenotipo MONW) se encontraron correlaciones positivas entre el ARNm de *Cpt1a* en PBMC y HOMA-IR, los triacilglicéridos hepáticos y el contenido total de lípidos hepáticos. Estos datos indican que el aumento de la expresión de *Cpt1a* no solo es consecuencia de una mayor adiposidad en los animales (pues los animales del estudio tenían fenotipo MONW), sino que se trata de un biomarcador de riesgo de acumular grasa en el hígado y desarrollar resistencia a la insulina (52).

7.3. Biomarcadores diabetes y resistencia a la insulina

Las células sanguíneas también son una fuente potencial de biomarcadores transcripcionales para trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo II. En un estudio (82) se examinaron los niveles de ARNm en PBC en niños: hombres y mujeres, con peso normal y sobrepeso, y pertenecientes a ocho países europeos. Específicamente, se examinaron los niveles de ARNm de algunos genes relacionados con el equilibrio energético y se observaron asociaciones significativas entre los niveles de expresión de *LEPR* (receptor de leptina), *INSR* (receptor de insulina), *CPT1a* (enzima importante en la beta-oxidación de ácidos grasos), *SLC27A2* (enzima encargada de la esterificación de ácidos grasos), *FASN* (enzima ácido graso sintasa) y *PPAR* (factor de transcripción importante en la regulación de genes metabólicos) con parámetros como el índice de masa corporal, el índice de evaluación del modelo de homeostasis y los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma.

Estas asociaciones mostraron que altos niveles de expresión de *CPT1a*, *SLC27A2*, *INSR*, *FASN* o *PPAR* en PBC pueden ser indicativos de un menor riesgo de resistencia a la insulina y dislipidemia. Mientras que niveles bajos del ARNm de *LEPR* aparecen como marcador de altos niveles de LDL, independientemente del índice de masa corporal. Estos resultados apuntan a que los niveles de expresión de estos genes en células sanguíneas son marcadores del estado metabólico corporal y pueden ser potenciales biomarcadores tempranos de alteraciones futuras (82).

7.4. Biomarcadores de alteración cognitiva

De manera más reciente se ha establecido una conexión entre dietas desequilibradas y la obesidad, especialmente dietas ricas en grasa, con el riesgo de deterioro cognitivo y demencia (88). La demencia es un término general que se utiliza para definir los trastornos cognitivos asociados con el envejecimiento e incluye enfermedades como el Alzheimer (89). Además, existe una fase de transición denominada deterioro cognitivo leve (DCL) en el que los individuos aún no cumplen los criterios para la demencia, pero tienen un mayor riesgo de desarrollarla (90). Por tanto, el aumento de la ingesta de dietas desequilibradas también podrían tener un papel importante en la creciente incidencia de enfermedades neurodegenerativas en las sociedades occidentales. Debido a la ineficacia de las terapias actuales para tratar enfermedades neurológicas y la dificultad de obtener muestras cerebrales, la identificación de biomarcadores de deterioro cognitivo leve es de vital importancia.

Estudios recientes indican que las PBMC podrían ser una fuente adecuada de biomarcadores de enfermedad neurodegenerativa inducida por la grasa ya que estas células están expuestas a diferentes metabolitos secretados por el sistema nervioso central (98).

La forma en que la ingesta de una dieta alta en grasas afecta la fisiología y la función del cerebro sigue siendo poco conocida, pero se sabe que estas afecciones tienen un gran

impacto en el hipocampo (91). Aunque se ha sugerido que la inflamación sistémica y central, característica del síndrome metabólico, es uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes ya que puede desencadenar una serie de procesos biológicos como lesión neuronal, apoptosis neuronal, estrés oxidativo excesivo y atrofia cerebral (92, 118). La resistencia a la insulina, un sello distintivo de la obesidad y de la ingesta de dietas desequilibradas, parece jugar un papel importante en la modulación de la expresión génica observada en el hipocampo. De hecho, la resistencia periférica a la insulina se ha relacionado con déficits cognitivos en humanos (97).

La asociación entre la alteración cognitiva y la obesidad es clara, sin embargo, en los últimos años parece que también el fenotipo falso delgado se asociaría con un mayor riesgo de alteración cognitiva (96, 119). En este sentido, por ejemplo, se ha observado que la ingesta de una dieta con un 60% de kcal de grasas administrada en cantidades isocalóricas a una dieta control induce un perfil claro de MONW en ratas macho Wistar, con alteración conductual y también de expresión de genes clave en hipocampo (96). Interesantemente, las PBMC de estos animales reflejaron los cambios de expresión génica identificados en hipocampo, como una disminución de la expresión de los genes *Sor11* y *Syn1*. *Sor11* es un receptor neuronal de apolipoproteína E cuya ausencia se considera un factor patogénico para Alzheimer (120) y *Syn1* participa en la sinaptogénesis y la liberación de neurotransmisores, lo que sugiere un papel importante en muchas enfermedades neuropsiquiátricas (121). Ambos se revelaron como posibles biomarcadores tempranos de deterioro cognitivo, ya que sus niveles de ARNm en PBMC se mantuvieron significativamente bajos con la ingesta de las dietas ricas en grasa. Por otra parte, *Syn1* podría ser un biomarcador particularmente interesante del deterioro cognitivo asociado con la ingesta de dietas ricas en grasas en PBMC, ya que su expresión en estas células tiene una fuerte correlación negativa con los parámetros relacionados con la resistencia a la insulina (96).

Recientemente, se ha realizado un estudio con humanos (119) donde se encontró que los pacientes con DCL tenían aproximadamente un 200% más de probabilidades que los controles de ser clasificados como MONW. Aunque en dicho estudio no se pudo concluir si el fenotipo MONW aumenta el riesgo de DCL. Además de la expresión en PBMC de ARNm de *Sor11* y *Syn1* también se estudió la expresión de *App* y *Creb*. *App* es el precursor de amiloide- β , que es un componente del cambio patológico principal en Alzheimer (122). Por otra parte, *Creb* es un factor de transcripción celular involucrado en diversas actividades neurobiológicas, bajos niveles de expresión están relacionados con el desarrollo de Alzheimer (123). Los resultados mostraron que la expresión de *App* aumentó significativamente y la expresión de *Creb*, *Sor11* y *Syn1* disminuyó notablemente en los pacientes con DCL en comparación con los controles, lo que indica en parte un aumento en la generación de β -amiloide, disfunción de la regulación transcripcional y transducción de señal sináptica (119). Además, el nivel de expresión de cada gen estaba correlacionado con las puntuaciones neuropsicológicas en los pacientes con DCL y los cambios anormales en la expresión génica fueron más significativos en pacientes con síndrome metabólico (119). De manera que, aunque se requiere más investigación, el estudio de la expresión génica en PBMC podría ser una fuente de biomarcadores prometedores para detectar el DCL en humanos.

7.5. Otros biomarcadores moleculares de interés en PBMC

Nos hemos centrado en los marcadores moleculares transcriptómicos, pero las PBMC también se están utilizando en estudios de obesidad y nutrición mediante otros tipos de

biomarcadores ómicos. En la actualidad, se están realizando estudios de obesidad y patologías como la diabetes tipo 2 (T2D), trastorno metabólico crónico que se desarrolla debido a una interacción de factores genéticos, de estilo de vida y ambientales, y claramente relacionada con la obesidad. Las modificaciones epigenéticas representan vínculos importantes entre señales genéticas, ambientales y de estilo de vida. Además, el inicio biológico de la enfermedad T2D ocurre mucho antes de que se desarrollen los síntomas clínicos. Por todo ello, ha aumentado la búsqueda de biomarcadores tempranos epigenéticos de T2D en PBMC. En un artículo de revisión (65) se identificaron 37 publicaciones sobre marcadores de metilación del ADN para la detección de T2D. Se ha propuesto la metilación diferencial de genes implicados en procesos biológicos críticos que se desregulan durante el desarrollo de T2D como: ingesta y gasto de energía (*FTO*), lipogénesis y glucólisis (*SREBF1*), homeostasis de glucosa y metabolismo de carbohidratos (*TXNIP*, *TCF7L2*), transporte de lípidos (*ABCG1*), secreción de insulina pancreática (*SLC30A8*, *KCNQ1*) y función cardiovascular (*PHOSPHO1*). Por lo tanto, estos marcadores epigenéticos reflejan tejidos con función metabólica deteriorada y son muy interesantes como potenciales biomarcadores epigenéticos tempranos de T2D (65).

Por otro lado, las PBC también se usa cada vez más como fuente de biomarcadores epigenéticos y de microARN con buenos resultados (66,67). Estos permiten observar cambios epigenéticos como consecuencia de la ingesta de diferentes patrones de alimentación. Por ejemplo, se han descrito cambios epigenéticos en al menos 50 genes relacionados con la inflamación, pero con diferentes funciones sobre adipogénesis, metabolismo, angiogénesis, diabetes, entre otros modulados por la dieta mediterránea (66). Por otra parte, se han propuesto cambios en la expresión de *mir-935* y *mir-4772* como biomarcadores pronósticos de pérdida de peso asociados con dietas bajas en calorías (67).

Conclusión

La ingesta de dietas desequilibradas cada vez está más extendida en la sociedad actual siendo el desencadenante de multitud de problemas de salud. Esta situación ha provocado una creciente incidencia de patologías crónicas relacionadas con la obesidad y, a su vez, con el fenotipo falso delgado. Esto supone un problema, ya que los individuos con fenotipo falso delgado no presentan sobrepeso u obesidad, pero sí los mismos riesgos. Además, los criterios para definir al fenotipo falso delgado aún no están claros, lo que dificulta la comparación entre diferentes trabajos y la obtención de conclusiones. Sin embargo, la identificación temprana de estos individuos en riesgo metabólico es un campo científico en auge. La absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) se está imponiendo como una herramienta eficiente y precisa para estimar la grasa corporal, con un valor añadido al ser capaz de estimar el tejido adiposo visceral. Aunque el verdadero auge se encuentra en la búsqueda de biomarcadores tempranos de patologías relacionadas con la dieta en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Esta fuente de biomarcadores es capaz de reflejar, a nivel transcriptómico y de forma temprana, las adaptaciones metabólicas de los tejidos clave a los cambios en el estado nutricional, el deterioro metabólico relacionado con el desequilibrio de la homeostasis, la obesidad y sus complicaciones médicas. Además, se trata de una fuente de biomarcadores poco invasiva y obtenible con bajo coste. En los últimos años, la investigación ha ido avanzando y se están empezando a definir biomarcadores tempranos relacionados con patologías asociadas a dietas inadecuadas y adiposidad excesiva, no solo obesidad, sino también obesidad normopeso/fenotipo falso delgado. Se trata de una línea de investigación prometedora para proteger la salud de la población general que permitirá poner en marcha estrategias de prevención adecuadas para no desarrollar enfermedades crónicas y llegar a la vejez con un mejor estado de salud.

Bibliografía

1. Oliver, P. (2017). Identification of Early Molecular Biomarkers of Diet-Related Pathologies for the Development of Health Preventive Nutritional Strategies. *Annals of Nutrition & Food Science, 1*, 1002.
2. Reynés, B., Priego, T., Cifre, M., Oliver, P., & Palou, A. (2018). Peripheral blood cells, a transcriptomic tool in nutrigenomic and obesity studies: Current state of the art. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17*(4), 1006- 1020.
3. Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers?. *Current Opinion in HIV and AIDS, 5*(6), 463.
4. MUSAAD, S., & Haynes, E. N. (2007). Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events. *Epidemiologic reviews, 29*(1), 98-114.
5. Página oficial de la OMS. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> visitado el 23/07/19 a las 18.04
6. Roobol, M. J., Haese, A., & Bjartell, A. (2011). Tumour markers in prostate cancer III: biomarkers in urine. *Acta oncologica, 50*(sup1), 85-89.
7. Picó, C., Serra, F., Rodríguez, A. M., Keijer, J., & Palou, A. (2019). Biomarkers of Nutrition and Health: New Tools for New Approaches. *Nutrients, 11*(5), 1092.
8. Wang, B., Zhuang, R., Luo, X., Yin, L., Pang, C., Feng, T., ... & Li, L. (2015). Prevalence of metabolically healthy obese and metabolically obese but normal weight in adults worldwide: a meta-analysis. *Hormone and Metabolic Research, 47*(11), 839-845.
9. Lopez-Miranda, J., & Perez-Martinez, P. (2013). It is time to define metabolically obese but normal-weight (MONW) individuals. *Clinical endocrinology, 79*(3), 314-315.
10. Karelis, A. D., St-Pierre, D. H., Conus, F., Rabasa-Lhoret, R., & Poehlman, E. T. (2004). Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know?. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89*(6), 2569- 2575.
11. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S 1998 The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes 47*:699–713
12. Misra, V. L., Khashab, M., & Chalasani, N. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Current gastroenterology reports, 11*(1), 50.
13. Biomarkers Definitions Working Group, Atkinson Jr, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., ... & Spilker, B. A. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology & therapeutics, 69*(3), 89-95.
14. World Health Organization (WHO). (1993). International Programme on Chemical Safety (IPCS) Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. *World Health Organization: Geneva, Switzerland, 57*.
15. Aronson, J. K. (2005). Biomarkers and surrogate endpoints. *British journal of clinical pharmacology, 59*(5), 491-494.
16. Hill, A. B. (1965). The environment and disease: association or causation?.
17. Thompson, F.E.; Subar, A.F.; Loria, C.M.; Reedy, J.L.; Baranowski, T. Need for technological innovation in dietary assessment. *J. Am. Diet. Assoc.* 2010, 110, 48–51.
18. Frobisher, C. M. S. M., & Maxwell, S. M. (2003). The estimation of food portion sizes: a comparison between using descriptions of portion sizes and a photographic food atlas by children and adults. *Journal of Human Nutrition and Dietetics, 16*(3), 181-188.
19. Elmadfa, I., & Meyer, A. L. (2010). Importance of food composition data to nutrition and public health. *European journal of clinical nutrition, 64*(3), S4-S7.
20. Potischman, N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J. Nutr.* 2003, 133 (Suppl. 3), 875S–880S.
21. Corella, D., & Ordovás, J. M. (2015). Biomarkers: background, classification and guidelines for applications in nutritional epidemiology. *Nutricion hospitalaria, 31*(3), 177-188.
22. Ross, A. B., Bourgeois, A., Macharia, H. N. U., Kochhar, S., Jebb, S. A., Brownlee, I. A., & Seal, C. J. (2012). Plasma alkylresorcinols as a biomarker of whole-grain food consumption

- in a large population: results from the WHOLEheart Intervention Study. *The American journal of clinical nutrition*, 95(1), 204-211.
23. van Ommen, B., Keijer, J., Heil, S. G., & Kaput, J. (2009). Challenging homeostasis to define biomarkers for nutrition related health. *Molecular nutrition & food research*, 53(7), 795-804.
 24. van Ommen, B., van der Greef, J., Ordovas, J. M., & Daniel, H. (2014). Phenotypic flexibility as key factor in the human nutrition and health relationship. *Genes & nutrition*, 9(5), 423.
 25. de Vries, J., Antoine, J. M., Burzykowski, T., Chiodini, A., Gibney, M., Kuhnle, G., ... & Rowland, I. (2013). Markers for nutrition studies: review of criteria for the evaluation of markers. *European journal of nutrition*, 52(7), 1685-1699.
 26. GENOMICS, N. D. (2004). Nutrigenomics: Exploiting Systems Biology in the Nutrition and Health Arenas. *Nutrition*, 20, 4-8.
 27. Ordovas, J. M. (2008). Genotype–phenotype associations: modulation by diet and obesity. *Obesity*, 16(S3), S40-S46.
 28. Peña-Romero, A. C., Navas-Carrillo, D., Marín, F., & Orenes-Piñero, E. (2018). The future of nutrition: nutrigenomics and nutrigenetics in obesity and cardiovascular diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(17), 3030-3041.
 29. Kussmann, M., Raymond, F., & Affolter, M. (2006). OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *Journal of biotechnology*, 124(4), 758-787.
 30. Corella, D., Coltell, O., Macian, F., & Ordovás, J. M. (2018). Advances in understanding the molecular basis of the mediterranean diet effect. *Annual review of food science and technology*, 9, 227-249.
 31. Caimari, A., Oliver, P., Rodenburg, W., Keijer, J., & Palou, A. (2010). Feeding conditions control the expression of genes involved in sterol metabolism in peripheral blood mononuclear cells of normoweight and diet-induced (cafeteria) obese rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(11), 1127-1133.
 32. Konieczna, J., Sánchez, J., Van Schothorst, E. M., Torrens, J. M., Bunschoten, A., Palou, M., ... & Palou, A. (2014). Identification of early transcriptome-based biomarkers related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells of rats nutritionally programmed for improved metabolic health. *Genes & nutrition*, 9(1), 366.
 33. Díaz-Rúa, R., Keijer, J., Caimari, A., van Schothorst, E. M., Palou, A., & Oliver, P. (2015). Peripheral blood mononuclear cells as a source to detect markers of homeostatic alterations caused by the intake of diets with an unbalanced macronutrient composition. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26(4), 398- 407.
 34. Reynés, B., Klein Hazebroek, M., García-Ruiz, E., Keijer, J., Oliver, P., & Palou, A. (2017). Specific features of the hypothalamic leptin signaling response to cold exposure are reflected in peripheral blood mononuclear cells in rats and ferrets. *Frontiers in physiology*, 8, 581.
 35. Sharma, U., & Rando, O. J. (2017). Metabolic inputs into the epigenome. *Cell metabolism*, 25(3), 544-558.
 36. del Carmen Martínez-Jiménez, V., Méndez-Mancilla, A., & Patricia Portales-Pérez, D. (2018). miRNAs in nutrition, obesity, and cancer: The biology of miRNAs in metabolic disorders and its relationship with cancer development. *Molecular nutrition & food research*, 62(1), 1600994.
 37. Ross, S. A., & Davis, C. D. (2014). The emerging role of microRNAs and nutrition in modulating health and disease. *Annual review of nutrition*, 34, 305- 336.
 38. Cui, J., Zhou, B., Ross, S. A., & Zempleni, J. (2017). Nutrition, microRNAs, and human health. *Advances in Nutrition*, 8(1), 105-112.
 39. Barderas, M. G., Vivanco, F., & Alvarez-Llamas, G. (2013). Vascular proteomics. In *Vascular Proteomics* (pp. 1-20). Humana Press, Totowa, NJ.
 40. Sénéchal, S., & Kussmann, M. (2011). Nutriproteomics: technologies and applications for identification and quantification of biomarkers and ingredients. *Proceedings of the nutrition society*, 70(3), 351-364.
 41. Marshall, J., Bowden, P., Schmit, J. C., & Betsou, F. (2014). Creation of a federated database of blood proteins: a powerful new tool for finding and characterizing biomarkers in serum. *Clinical proteomics*, 11(1), 3.

42. Newgard, C. B. (2017). Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand?. *Cell metabolism*, 25(1), 43-56.
43. Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 263-269.
44. Astarita, G., & Langridge, J. (2013). An emerging role for metabolomics in nutrition science. *Lifestyle Genomics*, 6(4-5), 181-200.
45. Bashiardes, S., Godneva, A., Elinav, E., & Segal, E. (2018). Towards utilization of the human genome and microbiome for personalized nutrition. *Current opinion in biotechnology*, 51, 57-63.
46. Mills, S., Stanton, C., Lane, J. A., Smith, G. J., & Ross, R. P. (2019). Precision nutrition and the microbiome, Part I: Current state of the science. *Nutrients*, 11(4), 923.
47. Portha, B., Fournier, A., Kioon, M. A., Mezger, V., & Movassat, J. (2014). Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie*, 97, 1-15.
48. de Mello, V. D. F., Pulkkinen, L., Lalli, M., Kolehmainen, M., Pihlajamäki, J., & Uusitupa, M. (2014). DNA methylation in obesity and type 2 diabetes. *Annals of medicine*, 46(3), 103-113.
49. Palou, M., Picó, C., McKay, J. A., Sánchez, J., Priego, T., Mathers, J. C., & Palou, A. (2011). Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *British journal of nutrition*, 106(5), 769-778.
50. Joehanes, R., Johnson, A. D., Barb, J. J., Raghavachari, N., Liu, P., Woodhouse, K. A., ... & Levy, D. (2012). Gene expression analysis of whole blood, peripheral blood mononuclear cells, and lymphoblastoid cell lines from the Framingham Heart Study. *Physiological genomics*, 44(1), 59-75.
51. de Mello, V. D. F., Kolehmainen, M., Schwab, U., Pulkkinen, L., & Uusitupa, M. (2012). Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: what do we know so far?. *Molecular nutrition & food research*, 56(7), 1160-1172.
52. Díaz-Rúa, R., Palou, A., & Oliver, P. (2016). Cpt1a gene expression in peripheral blood mononuclear cells as an early biomarker of diet-related metabolic alterations. *Food & nutrition research*, 60(1), 33554.
53. Priego, T., Sanchez, J., Pico, C., Ahrens, W., De Henauw, S., Kourides, Y., ... & Siani, A. (2015). TAS1R3 and UCN2 transcript levels in blood cells are associated with sugary and fatty food consumption in children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(9), 3556-3564.
54. Reynés, B., García-Ruiz, E., Palou, A., & Oliver, P. (2016). The intake of high- fat diets induces an obesogenic-like gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells, which is reverted by dieting. *British journal of nutrition*, 115(11), 1887-1895.
55. Rox, J. M., Bugert, P., Müller, J., Schorr, A., Hanfland, P., Madlener, K., ... & Pötsch, B. (2004). Gene expression analysis in platelets from a single donor: evaluation of a PCR-based amplification technique. *Clinical chemistry*, 50(12), 2271-2278.
56. Raghavachari, N., Xu, X., Munson, P. J., & Gladwin, M. T. (2009). Characterization of whole blood gene expression profiles as a sequel to globin mRNA reduction in patients with sickle cell disease. *PloS one*, 4(8).
57. Berry, M. P., Graham, C. M., McNab, F. W., Xu, Z., Bloch, S. A., Oni, T., ... & Quinn, C. (2010). An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*, 466(7309), 973-977.
58. Chen, M., Liu, X., Huan, L., Sun, M., Liu, L., Chen, X., ... & Li, L. (2017). Genome-wide analysis of Dof family genes and their expression during bud dormancy in peach (*Prunus persica*). *Scientia horticulturae*, 214, 18-26.
59. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (1994). *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Health Sciences.
60. Parihar, P. (2009). *Microbiology and immunology*. Delhi: Published by Swastik Pub.

61. Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (2000). Definition of human blood monocytes. *Journal of leukocyte biology*, 67(5), 603-606.
62. Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867.
63. Liew, C. C., Ma, J., Tang, H. C., Zheng, R., & Dempsey, A. A. (2006). The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: A potential diagnostic tool. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 147(3), 126-132.
64. Caimari, A., Oliver, P., Keijer, J., & Palou, A. (2010a). Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *OMICS*, 14(2), 129-141.
65. Willmer, T., Johnson, R., Louw, J., & Pheiffer, C. (2018). Blood-based DNA methylation biomarkers for type 2 diabetes: potential for clinical applications. *Frontiers in endocrinology*, 9, 744.
66. Arpon, A., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., Marti, A., Razquin, C., Martínez- González, M. A., ... & Ros, E. (2016). Adherence to Mediterranean diet is associated with methylation changes in inflammation-related genes in peripheral blood cells. *Journal of physiology and biochemistry*, 73(3), 445-455.
67. Milagro, F. I., Miranda, J., Portillo, M. P., Fernandez-Quintela, A., Campio n, J., & Mart ínez, J. A. (2013). High-throughput sequencing of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells: Identification of potential weight loss biomarkers. *PLoS One*, 8(1), e54319.
68. Whitney, A. R., Diehn, M., Popper, S. J., Alizadeh, A. A., Boldrick, J. C., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2003). Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1896-1901.
69. Nichita, C., Ciarloni, L., Monnier-Benoit, S., Hosseinian, S., Dorta, G., & Ru gg, C. (2014). A novel gene expression signature in peripheral blood mononuclear cells for early detection of colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 39(5), 507-517.
70. Aziz, H., Zaas, A., & Ginsburg, G. S. (2007). Peripheral blood gene expression profiling for cardiovascular disease assessment. *Genomic Medicine*, 1(3-4), 105- 112.
71. Sanchez, J., Pico, C., Ahrens, W., Foraita, R., Fraterman, A., Moreno, L. A., ... & Palou, A. (2017). Transcriptome analysis in blood cells from children reveals potential early biomarkers of metabolic alterations. *International Journal of Obesity*, 41(10), 1481-1488.
72. Pahl, A., & Brune, K. (2002). Gene expression changes in blood after phlebotomy: Implications for gene expression profiling. *Blood*, 100(3), 1094-1095.
73. Thach, D. C., Lin, B., Walter, E., Kruzlock, R., Rowley, R. K., Tibbetts, C., & Stenger, D. A. (2003). Assessment of two methods for handling blood in collection tubes with RNA stabilizing agent for surveillance of gene expression profiles with high density microarrays. *Journal of Immunological Methods*, 283(1-2), 269-279.
74. Debey-Pascher, S., Hofmann, A., Kreuzsch, F., Schuler, G., Schuler-Thurner, B., Schultze, J. L., & Staratschek-Jox, A. (2011). RNA-stabilized whole blood samples but not peripheral blood mononuclear cells can be stored for prolonged time periods prior to transcriptome analysis. *Journal of Molecular Diagnostics*, 13(4), 452-460.
75. Feezor, R. J., Baker, H. V., Mindrinos, M., Hayden, D., Tannahill, C. L., Brownstein, B. H., . . . Tompkins, R. G. (2004). Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiological Genomics*, 19(3), 247-254.
76. Rainen, L., Oelmueller, U., Jurgensen, S., Wyrich, R., Ballas, C., Schram, J., . . . Tryon, V. (2002). Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clinical Chemistry*, 48(11), 1883-1890.
77. Min, J. L., Barrett, A., Watts, T., Pettersson, F. H., Lockstone, H. E., Lindgren, C. M., . . . McCarthy, M. I. (2010). Variability of gene expression profiles in human blood and lymphoblastoid cell lines. *BMC Genomics*, 11, 96.
78. Ahmad, R., Al-Mass, A., Al-Ghawas, D., Shareif, N., Zghoul, N., Melhem, M., . . . Behbehani, K. (2013). Interaction of osteopontin with IL-18 in obese individuals: Implications for insulin resistance. *PLoS One*, 8(5), e63944.

79. Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J., Rodriguez, A., Ramirez, B., Silva, C., Rotellar, F., ... & Frühbeck, G. (2011). Association of increased Visfatin/PBEF/NAMPT circulating concentrations and gene expression levels in peripheral blood cells with lipid metabolism and fatty liver in human morbid obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(4), 245-253.
80. Challier, J. C., Basu, S., Bintein, T., Minium, J., Hotmire, K., Catalano, P. M., & Hauguel-de Mouzon, S. (2008). Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*, 29(3), 274–281
81. Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeyer, D., Syed, T., Mohanty, P., & Dandona, P. (2004). Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*, 110(12), 1564–1571.
82. Sanchez, J., Priego, T., Pico, C., Ahrens, W., De Henauw, S., Fraterman, A., ... & Russo, P. (2012). Blood cells as a source of transcriptional biomarkers of childhood obesity and its related metabolic alterations: results of the IDEFICS study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(4), E648-E652.
83. Kim, S., Lee, H. S., Park, H. K., Linton, J. A., Lee, J. W., & Lee, H. (2017). Visceral adiposity and expression of clock genes in peripheral blood mononuclear cells: A pilot study. *Chronobiology International*, 34(8), 1057–1066.
84. Matsuzawa, Y., Funahashi, T., & Nakamura, T. (2011). The concept of metabolic syndrome: Contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(8), 629–639.
85. Yamaoka, M., Maeda, N., Nakamura, S., Kashine, S., Nakagawa, Y., Hiuge- Shimizu, A., . . . Shimomura, I. (2012). A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells. *PLoS One*, 7(10), e47377.
86. Hermsdorff, H. H., Puchau, B., Zulet, M. A., & Martínez, J. A. (2010). Association of body fat distribution with proinflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells from young adult subjects. *OMICS*, 14(3), 297–307.
87. Lee, H., Chu, S. H., Park, J. Y., Park, H. K., Im, J. A., & Lee, J. W. (2013). Visceral adiposity is associated with SIRT1 expression in peripheral blood mononuclear cells: A pilot study. *Endocrine Journal*, 60(11), 1269–1273.
88. Ozawa, M., Shipley, M., Kivimaki, M., Singh-Manoux, A., & Brunner, E. J. (2017). Dietary pattern, inflammation and cognitive decline: the Whitehall II prospective cohort study. *Clinical Nutrition*, 36(2), 506-512.
89. Edition, F. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. *Am Psychiatric Assoc.*
90. Langa, K. M., & Levine, D. A. (2014). The diagnosis and management of mild cognitive impairment: a clinical review. *Jama*, 312(23), 2551-2561.
91. Mueller, K., Sacher, J., Arelin, K., Holiga, Š., Kratzsch, J., Villringer, A., & Schroeter, M. L. (2012). Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study. *Translational psychiatry*, 2(12), e200-e200.
92. Miller AA, Obesity SSJ. Neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2014;42:10–2
93. Wan, Y., Xu, J., Meng, F., Bao, Y., Ge, Y., Lobo, N., ... & Ma, D. (2010). Cognitive decline following major surgery is associated with gliosis, β -amyloid accumulation, and τ phosphorylation in old mice. *Critical care medicine*, 38(11), 2190-2198.
94. Schmidt, V., Sporbert, A., Rohe, M., Reimer, T., Rehm, A., Andersen, O. M., & Willnow, T. E. (2007). SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32956-32964.
95. Mayeux, R., & Hyslop, P. S. (2008). Alzheimer's disease: advances in trafficking. *The Lancet. Neurology*, 7(1), 2-3.
96. Cifre, M., Palou, A., & Oliver, P. (2018). Cognitive impairment in metabolically- obese, normal-weight rats: identification of early biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular neurodegeneration*, 13(1), 14.

97. Baker, L. D., Cross, D. J., Minoshima, S., Belongia, D., Watson, G. S., & Craft, S. (2011). Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Archives of neurology*, 68(1), 51-57.
98. Hye, A., Lynham, S., Thambisetty, M., Causevic, M., Campbell, J., Byers, H. L.,... & Shaw, C. E. (2006). Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain*, 129(11), 3042-3050.
99. Kapoor, N., Furler, J., Paul, T. V., Thomas, N., & Oldenburg, B. (2019). Normal weight obesity: an underrecognized problem in individuals of South Asian descent. *Clinical therapeutics*, 41(8), 1638-1642.
100. Zdrojewicz, Z., Popowicz, E., Szyca, M., Michalik, T., & Śmieszniak, B. (2017). TOFI phenotype-its effect on the occurrence of diabetes. *Pediatric Endocrinology, Diabetes & Metabolism*, 23(2).
101. LaForgia, J., Dollman, J., Dale, M. J., Withers, R. T., & Hill, A. M. (2009). Validation of DXA body composition estimates in obese men and women. *Obesity*, 17(4), 821-826.
102. Ruderman, N. B., Schneider, S. H., & Berchtold, P. (1981). The "metabolically-obese," normal-weight individual. *The American journal of clinical nutrition*, 34(8), 1617-1621.
103. De Lorenzo, A., Martinoli, R., Vaia, F., & Di Renzo, L. (2006). Normal weight obese (NWO) women: an evaluation of a candidate new syndrome. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(8), 513-523.
104. Lee, M. K., Rhee, E. J., Kim, M. C., Moon, B. S., Lee, J. I., Song, Y. S., ... & Park, C. Y. (2015). Metabolic health is more important than obesity in the development of nonalcoholic fatty liver disease: a 4-year retrospective study. *Endocrinology and Metabolism*, 30(4), 522-530.
105. Eckel, N., Mühlenbruch, K., Meidtnr, K., Boeing, H., Stefan, N., & Schulze, M. B. (2015). Characterization of metabolically unhealthy normal-weight individuals: risk factors and their associations with type 2 diabetes. *Metabolism*, 64(8), 862-871.
106. Goday, A., Calvo, E., Vázquez, L. A., Caveda, E., Margallo, T., Catalina-Romero, C., & Reviriego, J. (2016). Prevalence and clinical characteristics of metabolically healthy obese individuals and other obese/non-obese metabolic phenotypes in a working population: results from the Icaria study. *BMC Public Health*, 16(1), 248.
107. Lee, S. H., Han, K., Yang, H. K., Kim, H. S., Cho, J. H., Kwon, H. S., ... & Yoon, K. H. (2015). A novel criterion for identifying metabolically obese but normal weight individuals using the product of triglycerides and glucose. *Nutrition & diabetes*, 5(4), e149-e149.
108. Badoud, F., Perreault, M., Zulyniak, M. A., & Mutch, D. M. (2015). Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals. *The FASEB Journal*, 29(3), 748-758.
109. Conus, F., Rabasa-Lhoret, R., & Peronnet, F. (2007). Characteristics of metabolically obese normal-weight (MONW) subjects. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 32(1), 4-12.
110. Ding, C., Chan, Z., & Magkos, F. (2016). Lean, but not healthy: the 'metabolically obese, normal-weight' phenotype. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 19(6), 408-417.
111. Oliver, P., Reynés, B., Caimari, A., & Palou, A. (2013). Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 465(4), 459-468.
112. Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Cifre, M., Oliver, P., & Palou, A. (2015). Peripheral blood mononuclear cells as a potential source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies. *Obesity*, 23(1), 28-31.
113. Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), 1125-1131.
114. Tontonoz, P., Hu, E., & Spiegelman, B. M. (1995). Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor γ . *Current opinion in genetics & development*, 5(5), 571-576.

115. Caimari, A., Oliver, P., & Palou, A. (2008). Impairment of nutritional regulation of adipose triglyceride lipase expression with age. *International journal of obesity*, 32(8), 1193-1200.
116. Caimari, A., Oliver, P., & Palou, A. (2007). Regulation of adiponutrin expression by feeding conditions in rats is altered in the obese state. *Obesity*, 15(3), 591-599.
117. Picó, C., Sánchez, J., Oliver, P., & Palou, A. (2002). Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obesity research*, 10(9), 932-938.
118. Rivera, P., Pérez-Martín, M., Pavón, F. J., Serrano, A., Crespillo, A., Cifuentes, M., ... & de Fonseca, F. R. (2013). Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PLoS One*, 8(5), e64750.
119. Zhang, S., Zhao, M., Wang, F., Liu, J., Zheng, H., & Lei, P. (2020). Relationship between normal weight obesity and mild cognitive impairment is reflected in cognitive-related genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Psychogeriatrics*, 20(1), 35-43.
120. Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., ... & Bales, K. R. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13461-13466.
121. Qin, S., Hu, X. Y., Xu, H., & Zhou, J. N. (2004). Regional alteration of synapsin I in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Acta neuropathologica*, 107(3), 209-215.
122. Hunter, S., & Brayne, C. (2018). Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *Molecular Psychiatry*, 23(1), 81-93.
123. Satoh, J. I., Tabunoki, H., & Arima, K. (2009). Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus. *Disease markers*, 27(5), 239-252.
124. Palou, A., & Segura, C. P. (2011). Nutrigenómica y nutrigenética. In *Nutrición, salud y alimentos funcionales*, 357-375. UNED, Universidad Nacional de Educación a Distancia.
125. Seeligmüller, Nicole. Aislamiento más rápido de PBMC usando Ficoll-Paque® Plus en las centrifugas de sobremesa multiusos 5920 R y 5910 R Eppendorf. *Eppendorf, nota de aplicación*, 372, 1-6.
126. Weir, C. B., & Jan, A. (2019). BMI classification percentile and cut off points.
127. de Heredia, F. P., Gómez-Martínez, S., & Marcos, A. (2012). Obesity, inflammation and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(2), 332-338.

ANEXO

Protocolo aislamiento PBMC usando gradiente de Ficoll (125)

- Centrifugación gradiente de densidad Ficoll-Paque PLUS
 1. Poner Ficoll-Paque PLUS y la memoria tampón a temperatura ambiente.
 2. Invertir Ficoll-Paque PLUS varias veces.
 3. Frotar la bolsa de sangre con etanol 70 %, cortar el tubo inferior y transferir la sangre a un matraz con la boca ancha de manera estéril.
 4. Diluir la sangre 1:1 en PBS, cerrar la botella y mezclar invirtiéndola con cuidado.
 5. Poner 15 mL de Ficoll-Paque en cada uno de los tubos cónicos de 50 mL Eppendorf
 6. Cubrir el Ficoll-Paque con la mezcla de sangre/PBS usando una pipeta serológica a la velocidad más baja. CONSEJO: Para evitar comprometer la pureza de las PBMC, hay que evitar por todos los medios mezclar el Ficoll-Paque y la sangre. Por eso es mejor sujetar el tubo en ángulo y para conseguir un buen recubrimiento, la mezcla de sangre debe salir de la pipeta lentamente y tocando la pared del tubo.
 7. Centrifugar la muestra en el rotor basculante que desee a $400 \times g$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min, seleccionando tasas de aceleración/ deceleración de 9/0 o 9/3*, respectivamente, en el ajuste «at set rpm». CONSEJO: Normalmente los frenos del rotor tienen que estar totalmente desactivados para evitar, eficazmente, la mezcla de fases. También es muy importante cumplir estrictamente las temperaturas especificadas porque las diferencias de temperatura cambiarán las tasas de densidad de los líquidos y podrán tener un impacto negativo en los resultados de la separación.
 8. Después de completar la centrifugación, retirar las muestras de la centrífuga para evitar mezclar las fases.

- Purificación de la fracción PBMC
 1. Con mucho cuidado aspirar 2/3 de la capa superior (contiene el plasma y las plaquetas) usando una pipeta serológica esterilizada hasta que la interfase (contiene las células mononucleares) esté al alcance.
 2. Usando una pipeta Eppendorf, aspirar toda la capa de linfocitos y al mismo tiempo mantener el volumen mínimo y transferir a un tubo limpio. CONSEJO: Durante este paso hay que tratar de transferir tan poco Ficoll-Paque PLUS y sobrenadante como sea posible.
 3. Añadir al menos 3 volúmenes de PBS a la capa de linfocitos y mezclar con mucho cuidado pipeteando arriba y abajo.
 4. Centrifugar a $100 \times g$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. y eliminar el sobrenadante.
 5. Repetir pasos 3 y 4.
 6. Resuspender el sedimento celular en un medio apto para aplicaciones descendientes.