

ARTÍCULO

Estudio de asociación epigenómica en la pérdida de peso tras una intervención nutricional: Estudio RESMENA

María Luisa Mansego, Marian Zulet, Javier Campión J, Fermín Milagro F, José Alfredo Martínez*

CIBER CB06/03 Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, (CIBEROBN), Instituto de salud Carlos III, Madrid, España y Centro de Investigación en Nutrición y Departamento de Ciencias de la Alimentación y Fisiología, Universidad de Navarra. C/ Irunlarrea 1, Pamplona, Navarra 31008, España

*e-mail: jalfmtz@unav.es

Recibido el 8 de abril de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag.614-623

RESUMEN

Mediante una aproximación epigenómica, se analizaron las posibles asociaciones entre los niveles basales en la metilación del ADN y una mejor respuesta a la pérdida de peso después de un programa de intervención nutricional en la población obesa del estudio RESMENA. Esta investigación ha identificado 3 regiones de ADN (genes *RGS6*, *A2BP1* y *RASGRF1*) que se encuentran diferencialmente metiladas entre sujetos con alta y baja respuesta a la pérdida de peso. Además, estos genes están implicados en la misma ruta metabólica y habían sido previamente significativamente asociados con la obesidad.

Palabras clave: Metilación del ADN; intervención nutricional; pérdida de peso.

ABSTRACT

Epigenomic association study in weight loss after a nutritional intervention: RESMENA Study

Through an epigenomics approach, the possible association between baseline levels in DNA methylation and a better weight loss response after a multidisciplinary intervention program were analyzed in obese population from RESMENA-S study. Three DNA regions that are differentially methylated (*RGS6*, *A2BP1* and *RASGRF1* genes) showed differential methylation levels at baseline between high and low responders to the multidisciplinary weight loss intervention. Moreover, these genes were implicated in the same metabolic pathway and have been previously significantly associated with obesity.

Keywords: DNA methylation; nutritional intervention; weight loss.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad está considerada como uno de los principales problemas de salud en la mayoría de los países por su creciente incidencia en la población y por los trastornos fisiopatológicos asociados (7). La obesidad común es el resultado de la interacción entre factores ambientales y de comportamiento, como la dieta y el ejercicio, con componentes genéticos específicos de cada individuo (17). Así, la predisposición genética es un elemento importante en el desarrollo de obesidad, por lo que las variaciones genotípicas en determinados nucleótidos (SNPs) relacionados con la obesidad son, sin duda, de gran relevancia en dicha susceptibilidad (5). Por otra parte, los procesos epigenéticos tienen un papel clave en la regulación de la expresión génica, modulando así la predisposición génica dependiente de la secuencia de nucleótidos. En este sentido, diversas investigaciones han revelado que diversos mecanismos epigenéticos durante las etapas perinatales (intrauterina, lactancia,...), como el estrés o la dieta materna, están implicados en el desarrollo posterior de obesidad y que, asimismo, la dieta y otros factores ambientales que tienen lugar durante la etapa adulta también pueden influir en la acumulación de grasa a través de mecanismos epigenéticos (3). Incluso, algunas de dichas modificaciones epigenéticas parecen ser transmitidas a la siguiente generación a través de los gametos, por lo que son un serio candidato a explicar una parte del imparable incremento de la prevalencia de obesidad entre niños y adolescentes (21). De hecho, diversos estudios apuntan hacia la importancia de las diferencias epigenéticas entre los diferentes individuos con mayor o menor susceptibilidad al desarrollo de obesidad y otras comorbilidades asociadas o a la facilidad para la pérdida de peso o su mantenimiento posterior (2, 18).

Los principales procesos epigenéticos que podrían influir en el desarrollo de obesidad, debido a su papel en la regulación de la expresión de genes relacionados con ella, son la metilación del ADN en las islas CpG, las modificaciones covalentes en las colas de las histonas por metilación, acetilación o ubiquitinación, y las proteínas reguladoras que mantienen la cromatina en un estado activo (trithorax) o silencioso (polycombs) (6). Algunos autores incluyen también los microRNAs (miRNA) como elementos de regulación epigenética, bien por controlar la expresión de importantes genes reguladores de la epigenética como las acetilasas de histonas o las DNA metiltransferasas, como por el control epigenético de la expresión de ciertos miRNAs(23).

Algunas alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad, como la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, así como la presencia de factores prometilantes en la dieta, como el ácido fólico o la metionina, parecen influir de manera decisiva sobre los procesos epigenéticos que afectan a genes relacionados con la obesidad (4). Además, estos mecanismos epigenéticos están influenciados

por otros factores habitualmente asociados a la obesidad, incluyendo la inflamación, a través de la acción de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-6 (27), el estrés oxidativo (9) y las condiciones de hipoxia que se desarrollan en el tejido adiposo obeso (26). Todas estas modificaciones pueden ser afectadas por diversos fenómenos ambientales, incluyendo numerosos factores dietéticos, y se ha sugerido que se podrían transmitir por un tipo de herencia epigenética transgeneracional (20). En este sentido, un estudio preliminar (19) ha vinculado la obesidad en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa durante la edad adulta con una mayor metilación del promotor de la leptina. Asimismo, se ha comprobado que dicha dieta es capaz de alterar la metilación de genes tan importantes como la ácido graso sintasa (FAS) o el gen mitocondrial NDUF6(15).

Por lo tanto, nuestro objetivo fue investigar los posibles cambios en los patrones de metilación de ADN entre los individuos que mostraron una alta o baja respuesta a un programa integral de pérdida de peso en obesos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio y diseño experimental

El estudio de la reducción del síndrome metabólico en Navarra-España (RESMENA-S) es una estrategia multidisciplinar basada en la crononutrición y la educación nutricional, junto con control dietético y psicológico, que consistió en un ensayo aleatorizado de diseño paralelo y prospectivo en el que participaron un total de 100 individuos. (28). El grupo RESMENA-S (n = 50) siguió una dieta personalizada de pérdida de peso (restricción energética 30%), con una distribución en macronutrientes (hidratos de carbono/grasas/ proteínas) de 40/30/30, elevada frecuencia de ingestas (7/día), bajo índice/ carga glucémica y elevada capacidad antioxidante y adherencia a la dieta Mediterránea (28). El grupo control (n = 50) siguió una dieta con la misma restricción energética y basada en la Asociación Americana del Corazón (AHA). El estudio tuvo una duración de 8 semanas bajo control dietético y psicológico en ambos grupos. Durante un periodo adicional de 16 semanas de auto-control, los voluntarios siguieron el mismo patrón dietético pero sin ningún asesoramiento específico.

El estudio de los niveles de metilación se llevó a cabo en una submuestra de 46 sujetos obesos (50% varones). Estos participantes fueron seleccionados de la muestra de población general y eran los que tuvieron una mejor o peor respuesta a la intervención de pérdida de peso. Se les consideró como "alta respuesta" (perder más de un 5% de su peso inicial al cabo de 24 semanas de intervención; n=26) y "baja respuesta" (aquellos que no lograron una pérdida de su peso del 5%; n=17), respectivamente.

Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito (<http://www.clinicaltrials.gov>; NCT01087086), el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Navarra (065/2009) y estuvo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (revisada en Corea del Sur en 2008).

Evaluaciones antropométricas y bioquímicas

Las medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia de cintura y cadera) se llevaron a cabo con los sujetos en ropa interior. El peso corporal se midió con una precisión de 0,1 kg con una Tanita SC-330, (Tanita Corp, Japón). La talla se estimó con un tallímetro (Seca 713 modelo, Postfach, Alemania) con una precisión de 1 mm. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso corporal dividido por la altura al cuadrado (kg/m^2). Las circunferencias de la cintura y la cadera se midieron siguiendo protocolos validados (28). La grasa corporal total se midió por impedancia bioeléctrica Tanita SC-330 (TanitaCorp, Japón) y por absorciometría con rayos X de doble energía (DXA) (Prodigy, versión de software 6,0, Madison, WI) como se describió previamente(28).

Las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad-colesterol (HDL-c) y triglicéridos se midieron en un autoanalizador Pentra C-200 (HORIBA ABX, Madrid, España) con los kits específicos. Las concentraciones de insulina se determinaron mediante un kit de ensayo inmunoenzimático (Mercodia, Uppsala, Suecia) en un autoanalizador Triturus (Grifols SA, Barcelona, España).

Extracción de ADN

Muestras de sangre venosa se recogieron al inicio del estudio para la obtención de ADN. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit de purificación de ADN *Master Purefor Blood Version II* (Biotecnologías Epicenter, Madison, WI, EE.UU.) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Determinación de patrones de metilación de ADN

El perfil epigenético del ADN genómico fue analizado en 48 individuos seleccionados del estudio RESMENA-S utilizando el ensayo de metilación Human Methylation 450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA) conteniendo más de 485.000 sitios CpGs individuales. Brevemente, 500 ng de ADN genómico tratado con bisulfito sódico (EZ DNA Methylation™ Kit; Epiect, Qiagen) fue amplificado, marcado, hibridado con sondas metiladas y no metiladas y escaneado de los microarrays en la plataforma HiScanSQ de Illumina, Inc. El análisis de imagen y determinación de la señal de las sondas se realizó usando el software Genome Studio, Módulo de metilación (Illumina, Inc).

Los datos de metilación en un sitio CpG concreto se obtuvieron a partir de las intensidades de señal para la sonda metilada (M) y la no metilada (U) para ADN genómico en esa posición. Así, los nivel de metilación (β) fueron calculados como la

proporción de metilado respecto al total de la señal [i.e., $\beta = M/(M + U)$], donde el rango β oscila desde 0 (no metilado) a 1 (metilado).

El análisis de las rutas metabólicas se realizó con el uso de Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA, EE.UU.; <http://www.ingenuity.com>), que incluye datos de forma manual precisos y trazables totalmente derivados de fuentes bibliográficas.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). La prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks se utilizaron para determinar la normalidad en la distribución variable.

Las diferencias en los parámetros clínicos y antropométricos tras la intervención entre respondedores altos y bajos a la dieta fueron evaluadas con la prueba t-Student o la U de Mann Whitney. El gráfico de volcán y la diferencia entre los distintos sitios CpGs fueron evaluados por ANOVA de una vía (respuesta al efecto de la dieta ajustado por edad y efecto del uso de distintos microarrays) gracias al programa Array Studio 5.0 (Omicsoft, Cary, NC, USA). Se aplicó la tasa de falso descubrimiento (False DiscoverRate; FDR) en los ajustes por comparaciones múltiples.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente proyecto se ha centrado en la selección de los individuos que participaron en el estudio RESMENA-S hasta el final del mismo. Las características generales de los participantes agrupados en función de su respuesta a la intervención dietética, no difirieron significativamente entre los sujetos del grupo control y RESMENA-S en variables antropométricas, presión arterial y perfil lipídico (Tabla 1). Sin embargo, los individuos con una alta respuesta a la dieta mostraron una reducción significativa en la mayoría de los parámetros antropométricos con respecto a sus valores iniciales de los mismos.

Con respecto a los resultados obtenidos en el microarray Human Methylation450 BeadChip, tras analizar los controles de calidad de dicho array se redujo la muestra a 46 sujetos analizados. El gráfico de volcán mostró la distribución de los 485512 sitios CpG analizados con respecto a la respuesta frente a la pérdida de peso debida a la dieta (Figura 1). El estudio de microarray mostró 90 sitios CpG diferencialmente metilados (P-valor <0,01) entre sujetos con alta respuesta a la dieta frente a los que presentaron una baja respuesta a la intervención nutricional. Ninguno de estos CpG fue estadísticamente significativo tras los ajustes por comparaciones múltiples aplicando FDR. Cuarenta de estos sitios se encontraron hipometilados y cincuenta hipermetilados en el grupo de los sujetos con baja respuesta comparado con los que mostraron alta respuesta a la

perdida de peso. Las características de los 10 principales genes asociados independientemente con la respuesta a la dieta (Tabla 2).

Tabla 1.- Características clínicas de 46 obesos en situación basal y tras 24 semanas de intervención dietética de la población RESMENA-S.

Variables	Alta respuesta (N=28)		Baja respuesta (N=20)	
	Basal	Después de 24 semanas	Basal	Después de 24 semanas
Sexo (N mujeres, %)	14 (48,9)		9 (47,9)	
Edad (años)	49,9 (10,6)		45,6 (8,2)	
Tipo de dieta (N control(%))	11 (41,4)		9 (47,9)	
Peso (kg)	100,9 (17,6)	90,0 (18,6) *	105,2 (18,2)	108,0 (17,5)
IMC (kg/m ²)	35,9 (4,8)	31,9 (4,9) **	36,9 (1,9)	35,9 (2,0)
Cintura (cm)	110,9 (13,3)	101,3 (14,9) *	114,8 (11,9)	114,9 (9,2)
Cadera (cm)	116,2 (9,3)	109,1 (9,4) **	118,9 (7,1)	116,7 (7,9)
Índice CC	1,0 (0,1)	0,9 (0,1)	1,0 (0,1)	1,0 (0,1)
PAS (mmHg)	151,3 (18,1)	131,2 (13,6)**	145,9 (16,2)	140,3 (14,3)
PAD (mmHg)	85,3 (9,8)	75,8 (10,0) **	85,6 (6,4)	81,9 (11,4)
Masa grasa (%)	38,1 (8,1)	33,2 (8,0) *	41,2 (5,5)	37,1 (6,2)
Glucosa (mg/dl)	117,2 (28,1)	104,0 (16,2) *	133,4 (43,7)	128,3 (34,0)
CT (mg/dl)	221,2 (51,1)	213,1 (41,1)	216,3 (50,3)	215,2 (52,7)
HDLc (mg/dl)	44,2 (10,1)	47,6 (11,2)	41,2 (11,5)	47,3 (15,5)
TG (mg/dl)	178,5 (86,5)	123,4 (41,9)*	220,6 (142,3)	229,3 (163,3)
Insulina (mUI)	13,1 (7,5)	6,3 (3,8) **	18,9 (11,3)	16,0 (10,6)

Media (Desviación estándar). IMC: Índice de Masa Corporal; Índice CC: Índice cintura/cadera; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; CT: Colesterol total; HDLc: lipoproteínas de alta densidad-colesterol; TG: Triglicéridos. *P-valor <0.05, **P-valor <0,001 frente a los valores basales.

Con respecto a los resultados de IPA sobre rutas metabólicas implicadas para estos 90 sitios CpGs diferencialmente metilados entre los sujetos con alta y baja respuesta tras la intervención, se identificaron redes relacionadas con el cáncer, las enfermedades del sistema reproductivo y la respuesta inflamatoria, ciclo celular, lesiones organismo, y las anomalías y cáncer, y el movimiento celular,

el tráfico de célula inmune, desarrollo y función del sistema hematológico que participan en la respuesta de la pérdida de peso (Figura 2).

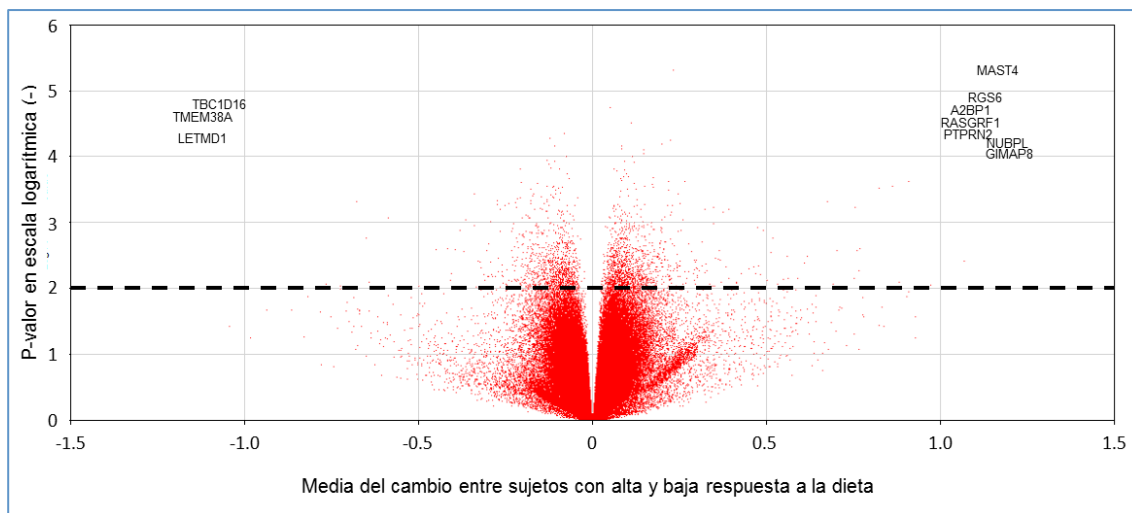


Figura 1.- Gráfico tipo volcán de la asociación de metilación ajustado por edad y sexo (N=43) La línea discontinua muestra los genes con niveles de metilación significativamente diferenciados entre sujetos con alta y baja respuesta a la dieta (p-valor < 0.01).

Tabla 2.-Características genéticas de los 10 CpGs con mayor asociación a la respuesta dietética ajustados por edad y sexo en 43 individuos.

Gen	ID Illumina	Cr	Posición CpG	Media de cambio	P-valor
MAST4	cg01933079	5	65929713	1.174	5.02E-06
RGS6	cg10741333	14	72400168	1.0797	3.07E-05
TBC1D16	cg16775460	17	77984481	-1.0581	4.41E-05
TMEM38A	cg04172000	19	16771088	-1.0879	5.34E-05
A2BP1	cg01050225	16	7703947	1.1481	6.34E-05
RASGRF1	cg15156078	15	79383413	1.0601	6.86E-05
LETMD1	cg01016169	12	51441443	-1.0777	6.93E-05
PTPRN2	cg25029446	7	157495282	1.0594	7.70E-05
NUBPL	cg22905571	14	32269554	1.1076	7.90E-05
GIMAP8	cg01364581	7	150175800	1.108	8.80E-05

ID:Identificador, Cr: cromosoma. Version 37.

El reciente concepto "nutrición personalizada" asociado a los campos de la genómica, la proteómica y la metabolómica está surgiendo con fuerza en los últimos tiempos (16). En ese sentido, los estudios genómicos se están dirigiendo hacia la prevención de la obesidad basándose en dietas personalizadas (22). En consecuencia, los marcadores genéticos y epigenéticos han sido considerados como herramientas de predicción para evaluar las diferencias individuales en la capacidad de respuesta después de una intervención nutricional (12). Nuestro análisis reveló que el patrón de la metilación epigenética diferencial entre sujetos con alta y baja respuesta a un programa de pérdida de peso multidisciplinario podría ayudar a predecir la disminución de peso en obesos adultos.

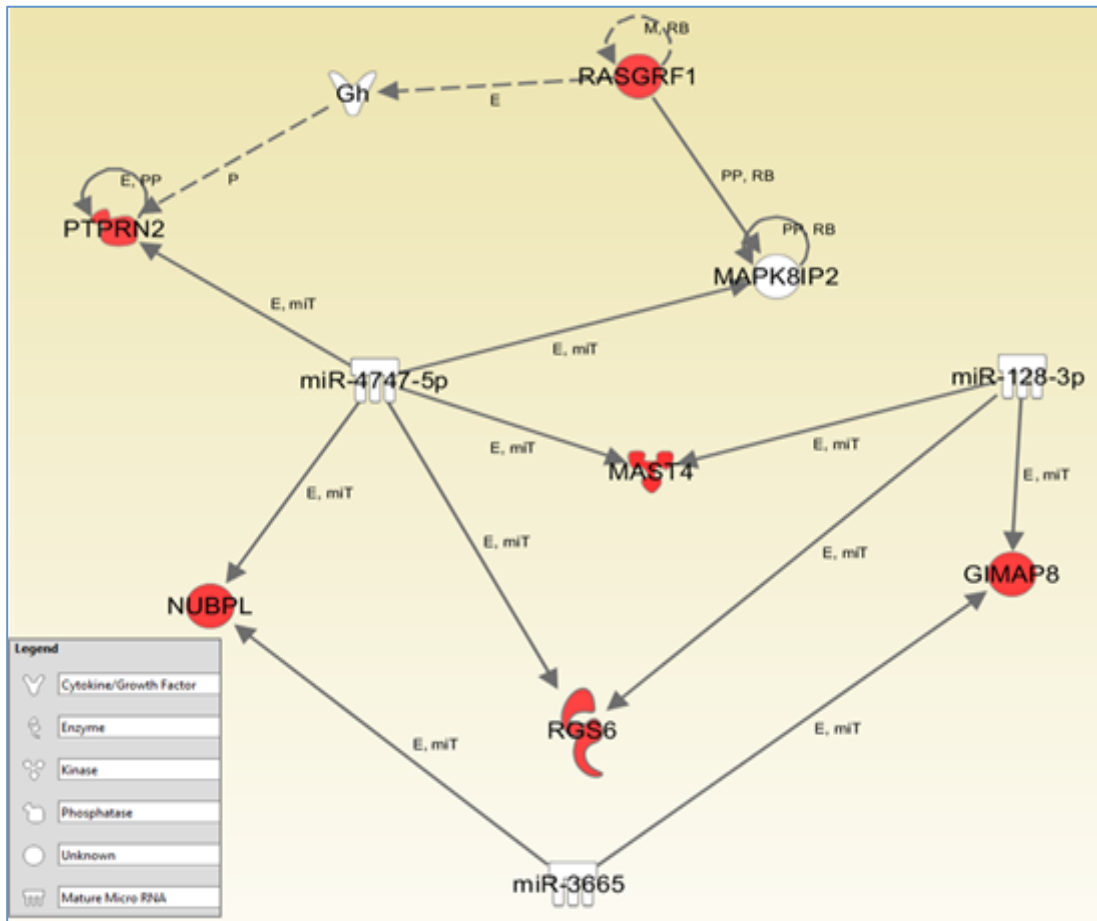


Figura 2.- Ruta metabólica cuyas funciones principales son la señalización y morfología celular y compuesta por 6 de los genes con mayor asociación a la respuesta de la dieta (*RGS6*, *PTPRN2*, *MAST4*, *RASGRF1*, *GIMAP8*, *NUBPL*).

P: Fosforilación / desfosforilación, E: Expresión (incluye metabolismo / síntesis de productos químicos); M: Modificación bioquímica; miT: Transcripción microARN; PP: unión de proteína-proteína; RB: Regulación de la unión. ----- Interacción indirecta, —————> Actúa sobre la molécula.

Adicionalmente, se han identificado algunos genes con una clara influencia sobre la obesidad como es el caso del gen *A2BP1* (cg01050225), que codifica para la proteína 1 de unión a ataxina-2 (también conocido como Fox-1) y puede estar implicado en transcripción alternativa de tejidos específicos (11). Además, este gen contiene motivos de unión a ARN, *A2BP1* también interactúa con la ataxina-2 (*ATXN2*) (24), una proteína que parece ser que participan en el metabolismo de ARN (14). *ATXN2* ha sido relacionada en la enfermedad neurodegenerativa, ataxia espinocerebelosa tipo 2 (*SCA2*) (14), y la hiperfagia y la obesidad son dos características clínicas principales en *SCA2* (1). Consistente con esta observación, se ha descrito como ratones knockout para *ATXN2* (*Sca-/-*) presentan mayores valores de IMC que ratón tipo salvaje para este gen cuando ambos son alimentados con una dieta alta en grasas (10, 13).

Otro de los genes asociados a la respuesta dietética es el *RGS6* que a su vez se ha descrito como gen candidato para el estudio de la adiposidad, ya que pueden

estar asociados con una tendencia conductual hacia el consumo de alimentos cargado de grasa (25).

Por último, una asociación entre la metilación génica del gen *RASGRF1* al inicio del estudio y los cambios antropométricos después de la intervención. Los sujetos que respondieron eficazmente al tratamiento mostraron porcentajes de metilación significativamente más altos después del tratamiento. *RASGRF1* está implicado en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa mediante la regulación de las células beta pancreáticas (8). Ratones knock-out para el gen *RASGRF1* muestran un fenotipo similar a las manifestaciones de tipo 2 de diabetes preclínica (8).

En resumen, este trabajo describe un patrón epigenético diferencial en sujetos de la población RESMENAS que podría ser aplicado para predecir cambios de peso corporal. También se ha identificado 90 regiones de ADN diferencialmente metiladas, dependiendo de la respuesta de la pérdida de peso. Estos cambios epigenéticos pueden ayudar a entender y predecir mejor la respuesta para perder peso.

4. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por Línea Especial sobre Nutrición, Obesidad y Salud (Universidad de Navarra LE/97), la fundación Mapfre y CIBER CB06/03 Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, (CIBEROBN), Instituto de salud Carlos III. A M.L.M. se le fue concedida una beca Juan de la Cierva del Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno de España.

5. REFERENCIAS

1. Abdel-Aleem, A; Zaki, MS. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) in an Egyptian family presenting with polyphagia and marked CAG expansion in infancy. *J Neurol* 255, 413-419(2008).
2. Bouchard, L; Rabasa-Lhoret, R; Faraj, M; Lavoie, ME; Mill, J; Perusse, L; Vohl, MC. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 91, 309-320(2010).
3. Champion, J; Milagro, F; Martinez, JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 94, 291-347(2010).
4. Champion, J; Milagro, FI; Martinez, JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 10, 383-392(2009).
5. Chagnon, YC; Rankinen, T; Snyder, EE; Weisnagel, SJ; Perusse, L; Bouchard, C. The human obesity gene map: the 2002 update. *Obes Res* 11, 313-367(2003).
6. Dolinoy, DC; Jirtle, RL. Environmental epigenomics in human health and disease. *Environ Mol Mutagen* 49, 4-8(2008).
7. Finucane, MM; Stevens, GA; Cowan, MJ; Danaei, G; Lin, JK; Paciorek, CJ; Singh, GM; Gutierrez, HR; Lu, Y; Bahalim, AN; Farzadfar, F; Riley, LM; Ezzati, M. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377, 557-567(2011).

8. Font de Mora, J; Esteban, LM; Burks, DJ; Nunez, A; Garces, C; Garcia-Barrado, MJ; Iglesias-Osma, MC; Moratinos, J; Ward, JM; Santos, E. Ras-GRF1 signaling is required for normal beta-cell development and glucose homeostasis. *EMBO J* 22, 3039-3049(2003).
9. Hitchler, MJ; Domann, FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 43; 1023-1036(2007).
10. Kiehl, TR; Nechiporuk, A; Figueroa, KP; Keating, MT; Huynh, DP; Pulst, SM. Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 17-24(2006).
11. Kuroyanagi, H. Fox-1 family of RNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 66, 3895-3907(2009).
12. Kussmann, M; Krause, L; Siffert, W. Nutrigenomics: where are we with genetic and epigenetic markers for disposition and susceptibility? *Nutr Rev* 68 Suppl 1, S38-47(2010).
13. Lastres-Becker, I; Brodessa, S; Lutjohann, D; Azizov, M; Buchmann, J; Hintermann, E; Sandhoff, K; Schurmann, A; Nowock, J; Auburger, G. Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Genet* 17, 1465-1481(2008).
14. Lastres-Becker, I; Rub, U; Auburger, G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum* 7, 115-124 (2008).
15. Lomba, A; Martinez, JA; Garcia-Diaz, DF; Paternain, L; Marti, A; Campion, J; Milagro, FI. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters. *Mol Genet Metab* 101, 273-278(2010).
16. Marti, A; Goyenechea, E; Martinez, JA. Nutrigenetics: a tool to provide personalized nutritional therapy to the obese. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 3, 157-169 (2010).
17. Martinez, JA; Parra, MD; Santos, JL; Moreno-Aliaga, MJ; Marti, A; Martinez-Gonzalez, MA. Genotype-dependent response to energy-restricted diets in obese subjects: towards personalized nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 17 Suppl 1, 119-122(2008).
18. Milagro, FI; Campion, J; Cordero, P; Goyenechea, E; Gomez-Uriz, AM; Abete, I; Zulet, MA; Martinez, JA. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J* 25, 1378-1389 (2011).
19. Milagro, FI; Campion, J; Garcia-Diaz, DF; Goyenechea, E; Paternain, L; Martinez, JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 65, 1-9(2009).
20. Ng, SF; Lin, RC; Laybutt, DR; Barres, R; Owens, JA; Morris, MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963-966 (2010).
21. Orsi, CM; Hale, DE; Lynch, JL. Pediatric obesity epidemiology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18, 14-22 (2011).
22. Razquin, C; Marti, A; Martinez, JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res* 55, 136-149(2011).
23. Sato, F; Tsuchiya, S; Meltzer, SJ; Shimizu, K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 278, 1598-1609 (2011).
24. Shibata, H; Huynh, DP; Pulst, SM. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Hum Mol Genet* 9, 1303-1313 (2000).
25. Sibbel, SP; Talbert, ME; Bowden, DW; Haffner, SM; Taylor, KD; Chen, YD; Wagenknecht, LE; Langefeld, CD; Norris, JM. RGS6 variants are associated with dietary fat intake in Hispanics: the IRAS Family Study. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1433-1438(2011).
26. Watson, JA; Watson, CJ; McCann, A; Baugh, J. Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response. *Epigenetics* 5, 293-296 (2010).
27. Wierda, RJ; Geutskens, SB; Jukema, JW; Quax, PH; van den Elsen, PJ. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *J Cell Mol Med* 14, 1225-1240(2010).
28. Zulet, MA; Bondia-Pons, I; Abete, I; de la Iglesia, R; Lopez-Legarrea, P; Forga, L; Navas-Carretero, S; Martinez, JA. The reduction of the metabolic syndrome in Navarra-Spain (RESMENA-S) study: a multidisciplinary strategy based on chrononutrition and nutritional education, together with dietetic and psychological control. *Nutr Hosp* 26, 16-26 (2011).