



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**METILACIÓN DEL DNA EN TEJIDO ADIPOSO DE PACIENTES OBESOS Y SU  
CORRELACIÓN CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
FRANCISCO MARTÍN BARAJAS OLMOS**

**DIRECTOR DE TESIS:  
  
DRA. LORENA OROZCO  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Primeramente quiero agradecer a la Dra. Lorena Orozco por siempre brindarme su apoyo, guía y consejo. Y sobre todo por enseñarme el valor del conocimiento, no existen palabras suficientes para expresar todo mi agradecimiento y respeto.

Al Dr. Federico Centeno por retarme día a día para ser mejor. Gracias por ayudarme a encontrar la fuerza.

A mis compañeros del INMEGEN por todos sus consejos, apoyo en los momentos difíciles y sobre todo por su amistad.

A mi familia por su infinito amor, que me ayudó a seguir adelante, ¡siempre listos para servir!.

Y de una forma muy especial a Kenia por ser mi pilar, juntos la vida es mejor. Gracias por cada momento juntos y que aunque no fue fácil lo hemos logrado.

Por ultimo quiero agradecer al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM y al proyecto CONACYT 223019 por el financiamiento del proyecto.

Este trabajo esta dedicado a Maru

## ÍNDICE

Índice de tablas.....	4
Índice de figuras.....	6
Lista de Abreviaturas.....	7
<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
<b>Diabetes Mellitus Tipo 2.....</b>	<b>10</b>
<b>Metabolismo de la glucosa.....</b>	<b>10</b>
<b>Historia natural de la DM2.....</b>	<b>13</b>
<b>Factores de riesgo de la DM2 .....</b>	<b>14</b>
<b>La participación de la obesidad en la DM2.....</b>	<b>15</b>
<b>Mecanismos de resistencia a la insulina asociados a la obesidad.....</b>	<b>16</b>
<b>Aspectos genéticos .....</b>	<b>18</b>
<b>Epigenética.....</b>	<b>19</b>
<b>Metilación del DNA .....</b>	<b>20</b>
<b>Metilación del DNA y obesidad.....</b>	<b>22</b>
<b>Metilación del DNA y DM2.....</b>	<b>23</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>24</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>25</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>25</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>26</b>
<b>Estrategia experimental .....</b>	<b>26</b>

<b>Reclutamiento de pacientes .....</b>	<b>26</b>
Criterios de inclusión.....	27
Criterios de no inclusión .....	27
<b>Recolección y almacenamiento de las muestras .....</b>	<b>27</b>
<b>Estudios bioquímicos .....</b>	<b>28</b>
<b>Extracción de ácidos nucleicos.....</b>	<b>28</b>
Extracción de DNA .....	28
Extracción de RNA .....	28
<b>Integridad de ácidos nucleicos.....</b>	<b>28</b>
<b>Valoración de la metilación del DNA .....</b>	<b>28</b>
<b>Obtención del transcriptoma.....</b>	<b>29</b>
<b>Pre-procesamiento de los datos genómicos y análisis estadísticos .....</b>	<b>29</b>
<b>Análisis diferencial genómico .....</b>	<b>30</b>
<b>Análisis de enriquecimiento genómico .....</b>	<b>30</b>
<b>Análisis de agrupamiento del panorama epigenético.....</b>	<b>31</b>
<b>Correlación de las alteraciones en metilación y expresión.....</b>	<b>31</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
Expresión genética diferencial.....	40
Correlación de alteraciones en metilación y expresión genética.....	41
<b>Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>55</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>56</b>

<b>Anexos .....</b>	<b>66</b>
<b>Autorización de los comités de investigación .....</b>	<b>66</b>
<b>Carta de consentimiento informado.....</b>	<b>68</b>
<b>Hoja de recolección de datos .....</b>	<b>69</b>
<b>Derivados del trabajo .....</b>	<b>71</b>
<b>Presentación de avances en congresos y sesiones .....</b>	<b>71</b>
<b>Publicación.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo de tablas.....</b>	<b>80</b>

## ***Índice de tablas***

Tabla 1. Datos antropométricos de individuos con obesidad, sin diabetes y con diabetes.....	32
Tabla 2. Lista de CDMs presentes en ST en la comparación de los grupos DO y OND .....	80
Tabla 3. Lista de CDMs presentes en TAS en la comparación de los grupos de OD y OND .....	81
Tabla 4. Lista de CDMs presentes en TAV en la comparación de los grupos de OD y OND .....	83
Tabla 5. Lista de CDMs presentes en TH en la comparación de los grupos de OD y OND.....	92
Tabla 6. Términos enriquecidos en TAS en el análisis ontológico de genes de los procesos biológicos.....	97
Tabla 7. Términos enriquecidos en TAV en el análisis ontológico de genes de los procesos biológicos.....	98
Tabla 8. Términos enriquecidos en TH en el análisis ontológico de genes de los procesos biológicos.....	99
Tabla 9. Genes diferencialmente expresados en ST en la comparación OND y OD.....	100
Tabla 10. Genes diferencialmente expresados en TAS en la comparación OND y OD.....	101
Tabla 11. Genes diferencialmente expresados en TAV en la comparación OND y OD.....	102
Tabla 12. Genes diferencialmente expresados en TH en la comparación OND y OD.....	103
Tabla 13. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en ST.....	103

Tabla 14. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en TAS.....	104
Tabla 15. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en TAV.....	106
Tabla 16. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en LT.....	107
Tabla 17. Análisis de enriquecimiento de los genes con correlación en la alteración de la expresión genética y metilación. ....	108

## ***Índice de figuras***

Figura 1. Transducción de señales de la insulina .....	12
Figura 2 Procesos de desmetilación.....	22
Figura 3. Estrategia experimental.....	26
Figura 4. Agrupamiento de los datos de metilación de los tejidos de pacientes con obesidad.	33
Figura 5 . Comparación de la metilación promedio de los tejidos.....	34
Figura 6. Distribución de los cambios significativos.....	35
Figura 7. Perfiles de metilación diferencial en individuos obesos con diabetes.....	37
Figura 8. Comparación de los diferentes CDMs en los tejidos.....	38
Figura 9 Metilación diferencial en TAS de pacientes OND, OBD y NP.....	39
Figura 10. Expresión diferencial en los tejidos analizados.....	41
Figura 11. Panoramas globales de expresión y metilación.....	42
Figura 12. Gráficas de la comparación del agrupamiento de datos en obesos diabéticos y no diabéticos.....	44
Figura 13. Comparación de las alteraciones en la expresión y metilación. ....	46

## ***Lista de Abreviaturas***

BER	Reparación por escisión de bases (Base Excision repair)
CDMs	Sitios CpG diferencialmente metilados
CpG	Dinucleótido citosina fosfato guanina
dL	Decilitros
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	metiltransferasa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Hb1Ac	Hemoglobina glucosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (High density lipoprotein)
HOMA-B	Modelo de Determinación de Homeostasis (Del inglés homeostasis model assessment)
IMC	Índice de masa corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
Kg	Kilogramos
Mclust	Modelos Gaussianos mixtos para el agrupamiento basado en la agrupación, clasificación y estimación de la densidad (Gaussian Mixture Modelling for Model-Based Clustering, Classification, and Density Estimation).
mg	Miligramos
OBD	Pacientes con Obesidad y Diabetes
OND	Pacientes con Obesidad sin Diabetes
NP	Normopeso
RI	Resistencia a la insulina
RIN	Valor de la integridad del RNA (RNA Integrity Number)
RNA	Ácido ribonucleico
ST	Sangre total
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
TH	Tejido hepático
UTR	Regiones no traducidas (untranslated region)

## **Resumen**

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (DM2), sin embargo, los mecanismos moleculares precisos que subyacen a la relación entre ambas enfermedades siguen siendo tema de interés científico. En fechas recientes, se ha propuesto que los mecanismos epigenéticos pueden jugar un papel importante en el desarrollo de estas comorbilidades. Este estudio tuvo como objetivo identificar las marcas epigenéticas diferenciales en individuos con obesidad y DM2 de los individuos obesos que no desarrollan DM2. De estos, se obtuvieron tejidos hepáticos, adiposo visceral y subcutáneo, así como de sangre periférica. Se analizaron los perfiles de metilación del DNA utilizando microarreglos Illumina Infinium y perfiles de expresión génica utilizando microarreglos BeadChip HumanHT-12.

El análisis de los perfiles de metilación del DNA reveló varios loci con metilación diferencial entre individuos con y sin DM2, en todos los tejidos. Los cambios en la metilación del DNA (tanto hipometilación como hipometilación) se encontraron en mayor cantidad y grado de alteración en el hígado y el tejido adiposo visceral. El análisis de la ontología genética de los genes con metilación alterada del DNA reveló términos enriquecidos relacionados con el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, la regulación del ciclo celular y la respuesta a las heridas. Se encontraron 143 genes con una correlación significativa entre la metilación alterada y la expresión génica, en los cuatro tejidos. Dentro de estos genes se encuentran varios relacionados con la resistencia a la insulina, la adipogénesis, el almacenamiento de grasa e inflamación, por ejemplo *LEP*, *IRS1* y *ADIPOQ*.

Nuestros hallazgos proporcionan evidencias adicionales de que los cambios en la metilación del DNA pueden ser un mecanismo asociado a la obesidad y que junto con otros mecanismos como la secreción de las adipocinas, la inflamación crónica de bajo grado participan en la patogénesis de la diabetes.

## ***Abstract***

Obesity is a well-recognized risk factor for insulin resistance and type 2 diabetes, although the precise molecular mechanisms underlying the relationship remain unknown. Recently, it has been proposed that epigenetic mechanisms could provide new knowledge for the understanding of these comorbidities. In this study, altered epigenetic marks were identified in individuals with obesity and DM2 undergoing bariatric surgery. From these patients, we obtained samples of liver tissue, visceral and subcutaneous adipose tissues, and peripheral blood. We analyzed DNA methylation using Illumina Infinium Human Methylation arrays, and gene expression profiles using HumanHT-12 Expression BeadChip Arrays.

Analysis of DNA methylation profiles revealed several loci with differential methylation between individuals with and without T2D, in all tissues. Aberrant DNA methylation was mainly found in the liver and visceral adipose tissue. Gene ontology analysis of genes with altered DNA methylation revealed enriched terms related to glucose metabolism, lipid metabolism, cell cycle regulation, and response to wounding. A correlation between altered DNA methylation and gene expression was found in a subset of genes in the four tissues, which were related to insulin resistance, adipogenesis, fat storage, and inflammation. Our findings provide additional evidence that changes in DNA methylation can be a mechanism associated with obesity that, along with other mechanisms such as adipokine secretion, are involved in the pathogenesis of obesity.

## ***Introducción***

### ***Diabetes Mellitus Tipo 2***

En las últimas décadas se ha reportado un incremento alarmante del número de pacientes con diabetes a nivel mundial. México no es la excepción a estos problemas de salud, en donde se calcula que la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en México es del 18% en población adulta[1]. La DM2 comprende a un grupo de patologías sistémicas y crónicas que afectan el metabolismo y se caracterizan por la presencia de niveles altos de glucosa en sangre que se relacionan con la deficiencia en la secreción o acción de la insulina, y se diagnostica en la presencia de cualquiera de los siguientes parámetros: glucosa en ayuno  $\geq 126$ mg/dL, glucosa  $\geq 200$  mg/dL después de 2 horas en una prueba de tolerancia de glucosa oral, Hb1Ac  $\geq 6.5\%$ , una glucosa en plasma aleatoria  $\geq 200$  mg/dL [2]. Este tipo de diabetes representa el 90% de los casos de diabetes. Es así que la importancia de la DM2 radica en la predisposición que presentan los individuos que la padecen para desarrollar diversas complicaciones que incluyen: hipertensión, retinopatía, enfermedad renal, neuropatía, enfermedad vascular periférica, desequilibrio electrolítico, supresión inmune, disfunción eréctil y complicaciones del embarazo, por lo que los individuos con diabetes no sólo tiene una menor calidad de vida también tienen una mayor probabilidad de presentar muerte prematura[3]. Las causas específicas para el desarrollo de DM2 son desconocidas pero se sabe que la combinación de factores ambientales y genéticos influyen, la interacción entre genes y ambientes en fechas recientes se ha intentado explicar por medio de mecanismos epigenéticos [4].

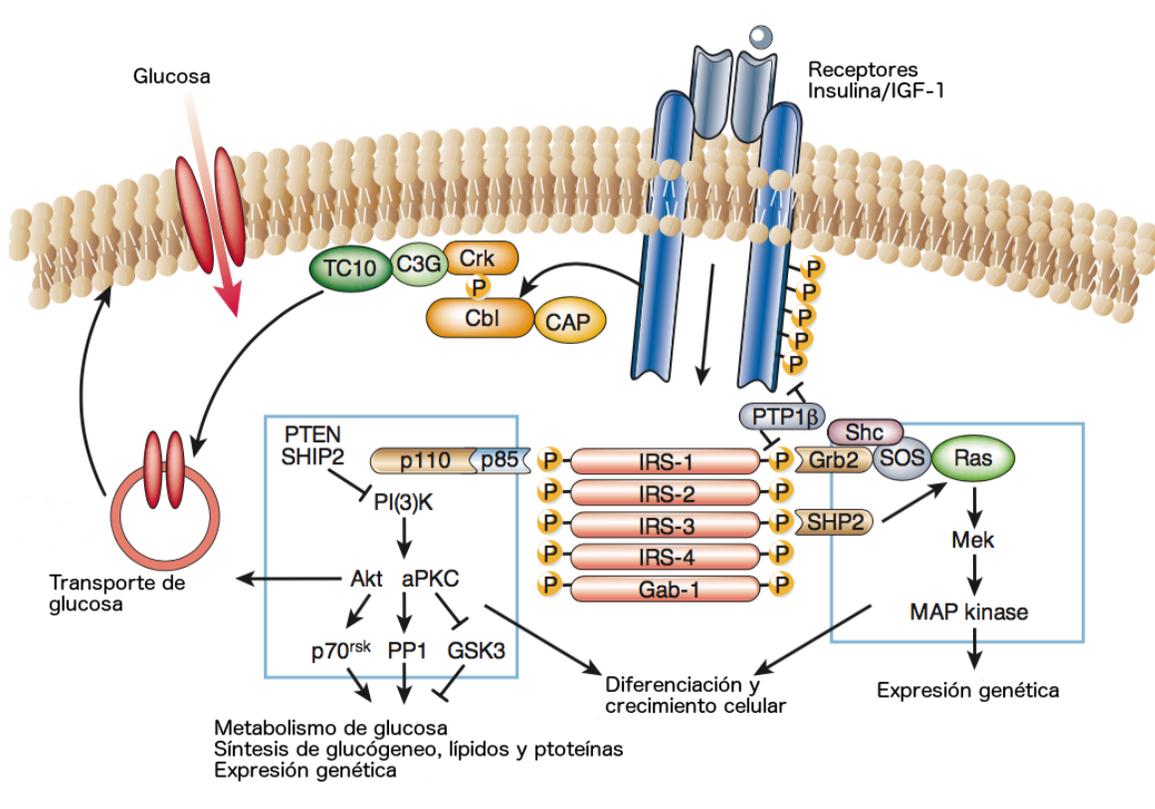
### ***Metabolismo de la glucosa***

La glucosa es la fuente principal de obtención de energía en muchos de los órganos, por ejemplo en el cerebro la glucosa es la fuente primordial de energía, y sólo en estados de ayuno prolongado los cuerpos cetónicos serán la fuente de energía. La adaptación a las diferentes condiciones de ayuno y alimentación requiere de mecanismos finos de regulación de la glucosa producida, absorbida y la consumida por los diferentes tejidos [5,6].

Durante el ayuno, en el hígado se origina el 80% de la glucosa del torrente sanguíneo por glucogenólisis. El 20% restante de la glucosa es producida por de riñón a partir de la gluconeogénesis [7]. Una vez que el individuo se alimenta, la asimilación de carbohidratos en un estado de salud normal se debería de completar en las siguientes cuatro horas, la velocidad

de absorción variará dependiendo de la composición del alimento. De manera muy general el proceso la asimilación de los carbohidratos se divide en: vaciado gástrico, digestión en el lumen del intestino delgado, absorción en la vena porta que le da paso al hígado y por último el almacenamiento o utilización en los órganos dependiendo del balance energético. Todos estos procesos son regulados por varias hormonas que mantienen la homeostasis metabólica[8].

De las diferentes hormonas, la insulina es la principal hormona anabólica. En un estado de salud normal, cuando los niveles de glucosa son elevados esta hormona es liberada por las células beta pancreáticas. Una vez liberada la insulina señala a los receptores (IRA/IRB) que se encuentran distribuidos en una gran variedad de tejidos en el organismo[9]. El receptor es un complejo formado por dos subunidades, que una vez que la insulina se une a su dominio extracelular se auto-fosforilan en su dominio intracelular, lo que permite la fosforilación de otras proteínas, como IRS1-4, Shc y STAT, que desencadenan diversas vías metabólicas, por ejemplo: en el hígado se estimula la captación de glucosa, activando la gluconogénesis, e inhibe la gluconeogénesis. En músculo la insulina estimula la entrada de aminoácidos, la síntesis del transportador de glucosa GLUT4 y el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno.



**Figura 1. Transducción de señales de la insulina**

La insulina activa diferentes vías que regulan la expresión de genes que estimulan el crecimiento, la diferenciación celular, el metabolismo y transporte de glucosa, así como la síntesis de lípidos y proteínas. El receptor una vez autofosforilado fosforila proteínas miembros de la familia IRS, Shc y Cbl. Posteriormente estas proteínas interactúan por medio de su dominio SH2. Figura modificada de [6].

Por otra parte, en el tejido adiposo estimula la entrada de glucosa al tejido, el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos y disminuye la lipólisis. La señalización de la insulina en estos y otros órganos se presenta en la Fig. 1. Se han identificado al menos 6 ligandos de los receptores de la insulina, estas proteínas son un nodo fundamental en esta vía de señalización[10].

Otra de las hormonas importantes para la regulación del metabolismo de glucosa es el glucagón, dentro de sus funciones se encuentra el estimular la gluconeogénesis, la liberación de glucosa, inhibición de la glucólisis y la síntesis de ácidos grasos. Su liberación en el páncreas es estimulada por bajas concentraciones de glucosa e inhibida por la presencia de insulina. Por otro lado la somatostatina, que es liberada por la células delta pancreáticas, se libera bajo los mismos efectos de la insulina y previene que los niveles de esta se incrementen con rapidez.

Además de las hormonas secretadas por el páncreas existen otras hormonas reguladoras del metabolismo de glucosa, entre las que se encuentran las incretinas, que han llamado la atención en los últimos años por su capacidad de regular la secreción de hormonas del páncreas. Entre las más estudiadas se encuentran el GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa) y el GLP-1 (péptido tipo glucagón-1), dichas hormonas son secretadas por las células L y K del intestino, respectivamente. Ambas incretinas estimulan la secreción de insulina por activación de las proteínas G acopladas en presencia de altas concentraciones de glucosa[11]. Otra de las hormonas reguladoras que se activan cuando existe un alto requerimiento energético es la epinefrina que es liberada por las glándulas suprarrenales, la cual previene la hipoglucemia causada por el alto consumo de glucosa en el músculo en situaciones de estrés. El metabolismo de la glucosa es un proceso altamente controlado en el que las alteraciones desencadenan enfermedades como la DM2[12,13].

### ***Historia natural de la DM2***

La DM2 es un desorden progresivo, que aparece una vez que las células beta pancreáticas pierden la capacidad de contener a la resistencia a la insulina (RI). Los autores sugieren que los cambios en el metabolismo de la glucosa anteceden al diagnóstico de DM2 varias décadas y que la RI es una de las primeras alteraciones en ocurrir, la mayoría de las veces en presencia de obesidad[14,15]. Otro de los procesos que se alteran durante la DM2 es el efecto de las incretinas, el cual en estado normal se calcula que es responsable del 70% de la respuesta postprandial de la liberación de la insulina, sin embargo en los individuos con diabetes este se encuentra disminuido. En muchos de los pacientes con diabetes, inclusive en aquellos con un adecuado control se presentan complicaciones, dentro de las que se encuentran: la retinopatía diabética, daño renal, problemas vasculares por la aterosclerosis, accidente cerebrovascular, neuropatía y pie diabético. Estas complicaciones están relacionadas con los productos finales de glicación, que se producen cuando las proteínas se encuentran en presencia de altas concentraciones de glucosa y estos productos pueden activar procesos inflamatorios que son el inicio de varias de las complicaciones que se presentan en la DM2 [14]. Según datos del INEGI en México el 14% de los descensos totales en el 2013 fueron atribuibles a las complicaciones de la diabetes y sólo un cuarto de los pacientes con diabetes se encuentran en buen control por lo que en años futuros el porcentaje de defunciones podría incrementar[16].

## **Factores de riesgo de la DM2**

Sin duda la DM2 es una enfermedad altamente heterogénea y compleja, en la que su aparición depende de la interacción de múltiples factores de riesgo. El desenlace de estos factores tiene como resultado cambios metabólicos que estimulan la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática, la aparición de resistencia a la insulina y disminución de la secreción de la insulina[5,6,17].

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) categoriza a los factores de riesgo como factores modificables y no modificables[18]. Dentro de los factores no modificables se encuentra la edad, se ha observado un incremento de la prevalencia conforme incrementa la edad, teniendo un máximo en el grupo de 60 a 69 años en México[19]. Otro de los factores de riesgo no modificables es etnicidad, en estudios epidemiológicos se han demostrado que los individuos afroamericanos, amerindios, nativos de las islas del Pacífico y los estadounidenses de origen asiático, presentan un riesgo incrementado en comparación a individuos de origen diferente [20].

Se ha establecido que la DM2 tiene un componente familiar importante y se estima que en los individuos con ambos padres diabéticos tienen una heredabilidad del 70%, la heredabilidad es la proporción de la varianza propia de una enfermedad en una población que es atribuible a las diferencias en los genotipos. Por otro lado, la concordancia para DM2 en gemelos monocigotos es aproximadamente 70% y en gemelos dicigotos se encuentra entre el 20% al 30% [21,22]. Se ha establecido que los factores ambientales a los cuales se están expuestas las familias en las que se realizó estos estudios pueden modificar los valores de concordancia y heredabilidad, además de que muchos de estos factores (genéticos y ambientales) aún no están bien caracterizados, por lo que existe una heredabilidad faltante, que se define como la cantidad de la heredabilidad de las enfermedades que no se explica por las variaciones genéticas individuales [23].

Por otro lado, dentro de los factores modificables se incluye a la falta de actividad física. Se tiene conocimiento que durante y posterior a la actividad física se incrementa la captación de glucosa por el músculo esquelético, acompañado de un aumento en el recambio de glucógeno, todo esto contribuye al adecuado control de peso corporal. En cambio actividades sedentarias confieren un incremento al riesgo a desarrollo de DM2[24].

Otro de los factores modificables es la dieta, este factor juega un papel trascendente en el desarrollo de DM2, en estudios observacionales se ha logrado identificar que los alimentos bajos en fibra y altos en grasa saturada confieren mayor riesgo para el desarrollo de DM2. En cambio grasas insaturadas podrían prevenir la aparición de diabetes[25–27]. Sin embargo los resultados de estudios sobre dietas son controversiales, una de las explicaciones que los autores sugieren para explicar las inconsistencias es la calidad de los datos recolectados, ya que siempre va a depender de la habilidad del individuo encuestado para recordar la cantidad y periodicidad de los consumos. Además de la cantidad de la dieta, el impacto de la urbanización en la vida diaria ha promovido el estableciendo de nuevos usos y costumbres occidentales, incluyendo a la dieta alimentos con alto índice glucémico. Es así como estos nuevos hábitos impactan directamente en la salud del individuo[27,28].

Muchos de los factores de riesgo están relacionados directamente con la obesidad, misma que juega un papel primordial en la resistencia a la insulina y se encuentra relacionada con alteración del metabolismo de ácidos grasos. Existe una cantidad importante de estudios donde se demuestra que la obesidad está implicada en el desarrollo de DM2 y como la disminución de peso impacta de manera sustancial en el riesgo a desarrollar esta enfermedad. En particular los estudios longitudinales como “Nurses Health Study”, demostraron que existe un incremento en paralelo entre el riesgo de desarrollo de DM2 y el índice de masa corporal (IMC) [29–32].

### ***La participación de la obesidad en la DM2***

La obesidad al igual que la diabetes se han convertido en un problema de salud mundial. La organización mundial de salud calcula que el 39% de los adultos se encuentran en sobrepeso u obesidad[33]. En México tanto la obesidad como la DM2 experimentado un incremento en los últimos años, lo cual ha impactado directamente en los costos de atención de la población[19,34]. Ambos son factores de riesgo independientes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, el cual puede verse disminuido a partir de un buen control del peso, por lo que se ha catalogado como una meta para el tratamiento de la diabetes[18].

El depósito y mantenimiento de la grasa corporal se encuentran regulados por efectos parácrinos y autócrinos de las “moléculas de adiposidad”, estas moléculas transmiten información acerca del estatus de la grasa corporal desde la periferia hacia el hipotálamo en el cerebro que controla la homeostasis energética. Muchas de estas señales se originan en el

tejido adiposo (por ejemplo leptina e interleucina 6) y tienen como blanco otros órganos relevantes en el metabolismo de la glucosa como el hígado, músculo y cerebro [35–37]. Durante la obesidad el tejido adiposo pasa por un estado de hipertrofia e hiperplasia con remodelación de la matriz extracelular de los adipocitos, fenómeno que genera inflamación crónica de bajo grado que, junto con otros mecanismos como la alteración de la producción de adipocinas, impactan en la RI[17,38].

### ***Mecanismos de resistencia a la insulina asociados a la obesidad***

La comorbilidad entre obesidad y diabetes está ampliamente demostrada, sin embargo los mecanismos que conducen a la diabetes en presencia de obesidad no están bien dilucidados. Existen varios mecanismos propuestos para explicar la resistencia a la insulina en presencia de obesidad.

#### **Adipocinas y la RI**

La obesidad está asociada con alteraciones en los niveles circulantes de moléculas secretadas por la adipocitos, mismas que pueden modular la señalización de la insulina. Por ejemplo durante la obesidad la secreción de la proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4) se ve incrementada, este aumento induce resistencia a la insulina a través de la reducción de la señalización de fosfoinositol 3-quinasa en músculo y estimula la expresión de las enzimas que participan en la gluconeogénesis en hígado[39].

Otra de las moléculas que es ampliamente estudiada por su relación con el control de la energía es la leptina. Los receptores para leptina están presentes en órganos relevantes para el metabolismo de glucosa como: páncreas, músculo esquelético, hígado y tejido adiposo[36]. Se ha reportado que leptina puede inhibir la síntesis de la insulina en el páncreas, por medio de la proteína supresora de la señalización por citocinas-3 (SOCS-3) que inhibe la transcripción de la proinsulina[13]. Los estudios en los otros tejidos diferentes al páncreas son controversiales, se ha reportado que la leptina pudiera alterar los niveles de fosforilación del sustrato de los receptores de insulina IRS1 e IRS2 en músculo e hígado, alterando la activación de PI3K [40].

Por el contrario existen otras moléculas que disminuyen durante la obesidad, por ejemplo la adiponectina que estimulan la sensibilidad a la insulina. La deficiencia de este gen en un modelo animal sometido una dieta alta en glucosa incrementa la resistencia a la insulina y los

niveles de ácidos grasos en suero. En músculo se tiene evidencia que la adiponectina estimula la oxidación de ácidos grasos vía proteína cinasa activada por AMP[41].

### **Procesos inflamatorios y RI**

La inflamación crónica de bajo grado que ocurre durante la obesidad se ha considerado como parte fundamental de la resistencia a la insulina. Entre las moléculas secretadas por los macrófagos presentes en el tejido adiposo obeso se encuentran: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) y la proteína C reactiva, estas moléculas participan en múltiples vías a las que se les ha atribuido la relación entre resistencia a la insulina y, al igual que los ácidos grasos, los procesos inflamatorios alteran la fosforilación de los IRSs[13,42].

### **Acumulación ectópica de lípidos y la RI**

En la mayoría de los pacientes con obesidad los niveles de ácidos grasos se encuentran elevados, esta alteración se relaciona con la expansión del tejido adiposo. Se propone que la relación de los ácidos grasos y la resistencia a la insulina se debe a que los ácidos grasos y sus metabolitos, como la acil coenzima A, ceramidas y el diacilglicerol, señalizan la activación de cinasas como la proteína cinasa K (PKC), cinasa del extremo N-terminal de c-Jun (JNK) e inhibidores de NF- $\kappa$ B; estas cinasas disminuyen la sensibilidad de la insulina mediante la inhibición de la fosforilación de los IRS y de esta manera la insulina no lleva a cabo el efecto en el órgano blanco[43].

Los pacientes con obesidad y alto riesgo cardiovascular no sólo presentan niveles sanguíneos altos también presentan acumulación de grasa en músculo esquelético, hígado, inclusive en páncreas; característica que ocasiona estrés oxidativo relacionado a la disminución de la oxidación mitocondrial y la síntesis de ATP[32]. El decremento de la actividad y número de mitocondrias se ha relacionado con un incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno, este ambiente estimula la actividad de JNK y IKK-beta[44].

Otra de las consecuencias de la acumulación ectópica de lípidos y que también activa a JNK e IKK-beta es la aparición de estrés del retículo endoplasmático, que activa la respuesta a proteínas desplegadas, como la enzima que requiere inositol 1 (IRE1), la quinasa pancreática del retículo endoplasmático (PERK) y activador del factor de transcripción 6 (ATF6), y la proteína ligadora 1 de la caja X (XBP1)[13].

Los mecanismos de resistencia a la insulina son complejos y pareciera que esta condición es el elemento primordial para el desarrollo de DM2, sin embargo aunque la mayoría de los obesos tienen resistencia a la insulina no todos desarrollan DM2. Es así que la obesidad juega un papel primordial en el desarrollo de DM2, sin embargo el impacto de un excesivo IMC no es el mismo en todos los individuos, por lo que en las últimas décadas se ha hecho un esfuerzo para conocer otros factores, que incluyen a las variantes tanto genéticas como epigenéticas, relacionados al riesgo para DM2[23,45].

### **Aspectos genéticos**

Desde hace un par de décadas con el uso de los estudios de gen candidato y de ligamiento se identificaron genes de susceptibilidad para diabetes como: la calpaina 10 (*CAPN10*), el factor de transcripción 7 tipo 2 (*TCF7L2*) y *IRS1-2*, el factor nuclear de hepatocitos 1 alfa (*HNF1A*), canal de potasio de rectificación interna de la subfamilia J miembro 11 (*KCNJ11*), entre otros [46]. Además, en los últimos 8 años el número de variantes de riesgo ha incrementado gracias al uso de tecnologías de análisis amplio del genoma y secuenciación de genoma completo. A la fecha se han reportado más de 90 loci que cuya relación con DM2 se ha confirmado en diferentes poblaciones, incluyendo los previamente descritos por gene candidato y estudios de ligamiento[47].

Años atrás, los estudios genómicos incluían principalmente población de origen caucásico, actualmente se ha hecho un gran esfuerzo para incluir otro tipo de poblaciones como la mexicana. Es así que ahora se tiene reporte de variantes que se encuentran en alta frecuencia en población mexicana y baja en otras poblaciones, un ejemplo de esto es el haplotipo de riesgo del transportador de solutos *SLC16A11*. El haplotipo está formado por 5 variantes que se encuentran fuertemente asociados con DM2[48]. Además, se han encontrado otras variantes en genes que previamente se han descrito que participan en la enfermedad como *IGF2*[49].

Aún con estos grandes esfuerzos las variables conocidas sólo explican una parte de la heredabilidad. Se ha estimado que para la obesidad utilizando 40 variantes validadas en diferentes poblaciones sólo explicaría el 5% y para diabetes usando un número similar de variantes sólo se explica de 5 a un 10%, dependiendo del estudio [22,50]. Además, se ha observado que las variantes comunes en poblaciones tienen un efecto modesto en la enfermedad. Para explicar esta “heredabilidad faltante” se ha propuesto que existen variables

privadas que no se han descrito y que junto a otros mecanismos como los epigenéticos podrían completar el total de la heredabilidad de la DM2[51].

## **Epigenética**

La epigenética es el estudio de los mecanismos reversibles y heredables que determinan, regulan y mantienen la estructura de la cromatina sin alterar la secuencia de DNA, entre los que se encuentra la metilación del DNA, modificación de histonas, variantes de histonas, posicionamiento de los nucleosomas y la arquitectura nuclear[52]. Estos procesos regulan la expresión genética en las etapas del desarrollo y en los diferentes tipos celulares, los mecanismos epigenéticos regulan la compactación de la cromatina y el reclutamiento de complejos activadores o represores.[53]

En 1942 Conrad Waddington acuñó el término epifenotipo para referirse a todos aquellos cambios que sufría el organismo durante su desarrollo sin alterar su genotipo, fue así que surgió la idea de que otros mecanismos diferentes a la secuencia pudieran regular la expresión. Fue hasta 1975, con los trabajos de Arthur Riggs sobre la inactivación del cromosoma X, cuando se propuso a la metilación del DNA como un mecanismo de regulación de la expresión génica diferente a la secuencia[54]. En la actualidad la epigenética es un campo de la ciencia que aporta nueva evidencia de las interacciones de los genes con contaminantes, nutrimentos y actividad física [55].

Uno de los ejemplos más relevantes sobre el efecto de la exposición a un medio ambiente desfavorable se presentó en los individuos que fueron concebidos durante la hambruna de Holanda al final de la segunda guerra mundial. Las madres de estos individuos estuvieron bajo una dieta hipocalórica (400-800 kcal), resultando en individuos con bajo peso al nacer y con problemas metabólicos en la edad adulta[56]. Posteriormente, Heijmans identificó que en estos individuos el estado de metilación del gen *IGF2* se encontraba alterado en relación a sus hermanos que no estuvieron expuestos a la hambruna. Esta hormona está relacionada con el crecimiento fetal y adiposidad por lo que podría explicar la relación gen-ambiente por medio de la alteración de la metilación[57].

Otro de los mecanismos epigenéticos que se ha relacionado con diabetes es la modificación de histonas, en las que se ha visto que existe un incremento de la metilación de las histonas en la región del promotor de RELA (NFκB-p65), en células del epitelio vascular en un modelo *in vivo* de hiperglicemia, donde se ha comprobado que la expresión de NFκB-p65 promueve las complicaciones vasculares propias de la diabetes[58]. Ha sido complicado extrapolar, estos hallazgos, en parte debido a la dificultad de obtener muestras de pacientes con diabetes de tejidos relevantes para la diabetes, y debido a que la regulación epigenética es tejido específica los hallazgos en sangre pocas veces reflejan el estado del tejido relevante para la enfermedad.

### **Metilación del DNA**

Hasta la fecha la metilación del DNA ha sido el mecanismo epigenético mejor descrito y las evidencias recientes sugieren que tienen una participación importante en el desarrollo de enfermedades complejas como diabetes. La metilación en los mamíferos ocurre primordialmente en la posición 5 de la citosina, en los dinucleótidos CpG, dando como resultado la 5 metil-citosina[52]. La regulación de la expresión por metilación, incluye el reclutamiento de proteínas activadoras o represoras, la inhibición de la unión de proteínas como los factores de transcripción o el reclutamiento de los remodeladores de cromatina. Durante la diferenciación celular se desarrollan patrones únicos de metilación de DNA que dan lugar a los diferentes tipos celulares, permitiendo la expresión genética de cada una de las vías de los diferentes tejidos celulares [59].

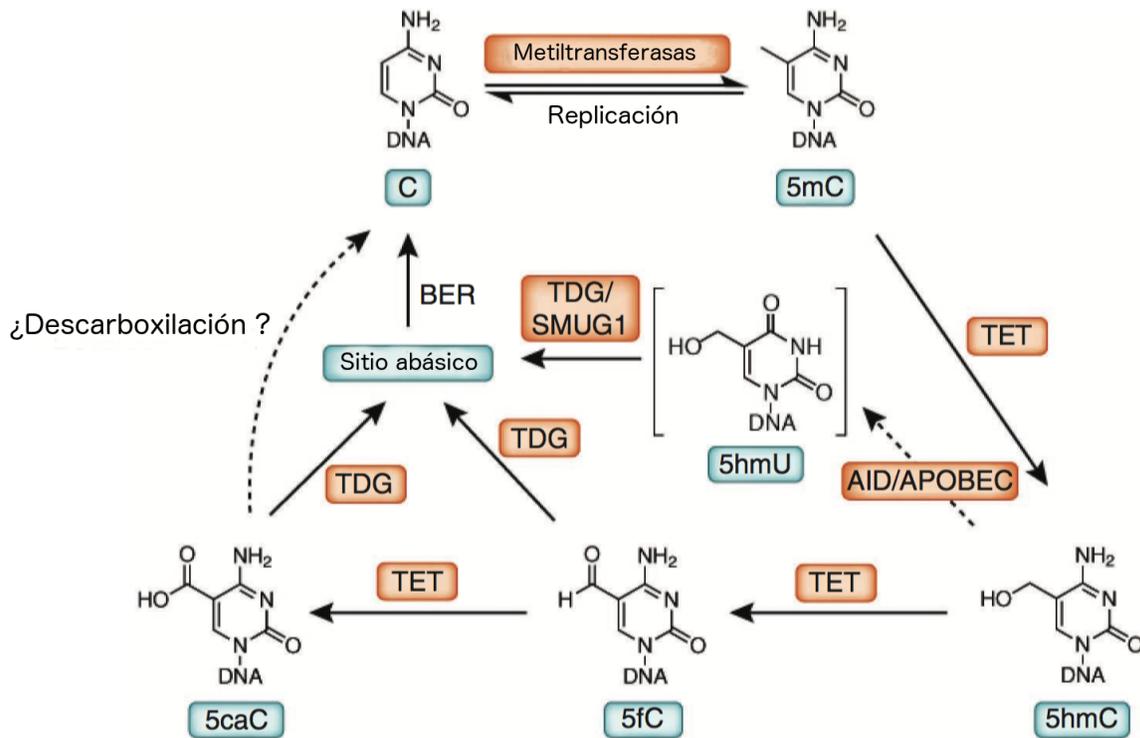
La metilación es catalizada por las enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs) que transfieren un grupo metilo de la S-adenosil metionina al carbono 5 de la citosina. En mamíferos, existen tres DNMTs, las DNMTs 3a y 3b establecen nuevos patrones de metilación en un DNA no metilado (metilasas *de novo*), mientras que la DNMT1 se encarga de metilar la hebra recién sintetizada durante la replicación[60].

La función de la metilación en un gen depende de la posición del sitio CpG dentro de la estructura del gen (promotor, intrónica, exónica). Con respecto a la metilación en la región promotora (la región más estudiada), se calcula que el 70% de los promotores presentan una isla CpG, que es definida como una región discreta de 300 a 1500 pares de bases constituida por una alta concentración de sitios CpG (al menos 60%)[61]. Se ha propuesto que las islas en regiones promotoras tienen importancia funcional debido a su alta conservación entre

mamíferos. La metilación en esta región se correlaciona con apagado/encendido constitutivo del gen, promoviendo o impidiendo el reclutamiento de proteínas de unión a DNA metilado que activa el reclutamiento de modificadoras de histonas y complejos remodeladores, por ejemplo MeCP-1 reconoce regiones con sitios CpGs metilados, posicionándose en la región e impidiendo que factores de transcripción o la Pol II puedan unirse a la región [62]. Se le llama cuerpo del gen a la región comprendida desde el final del primer exón hasta la región 3' UTR y se ha observado que en esta región la metilación está presente en genes activos. Se ha demostrado que la metilación en esta zona inhibe el posicionamiento de proteínas lo cual no permitiría el libre paso de la RNA polimerasa, impidiendo el inicio espurio de la transcripción en el cuerpo del gen.

La metilación también se ha relacionado con el empalme alternativo de RNA mensajero (alternative splicing en inglés), ya que el sitio donador tiene un alto contenido de CpGs con bajos niveles de metilación, mientras que en el sitio aceptor presenta un estado inverso. La metilación forma parte de los mecanismos de inactivación de regiones repetidas, que cuando llegan a desmetilarse y expresarse, los elementos transponibles pueden causar mutaciones por inserción o delección[52,63,64].

La desmetilación puede llevarse a cabo de manera activa o pasiva, esta última ocurre durante la división celular, cuando la metiltransferasa de mantenimiento (DNMT1) no es funcional o es inhibida y por lo tanto la nueva hebra se mantiene sin un grupo metilo, disminuyendo de manera progresiva la metilación. Por otro lado, la desmetilación activa no es dependiente de la replicación en esta participan varias enzimas que llevan acabo la desmetilación de la citosina, ocurriendo después de una serie de modificaciones químicas (desaminación u oxidación), teniendo como resultado una base modificada que posteriormente es reconocida por el sistema de reparación por escisión de base y es remplazada por una citosina desmetilada. Los mecanismos precisos de la desmetilación y las funciones de la modificaciones del DNA se encuentran en debate [65]. Los procesos de desmetilación propuestos son resumidos en la Fig. 2.



**Figura 2 Procesos de desmetilación.**

Las DNA metiltransferasas mantienen las marcas de metilación del DNA en el carbono 5 de la citosina (5mC), estas marcas pueden perderse de manera pasiva durante la replicación o de manera activa por medio de procesos oxidativos. En los procesos activos de desmetilación interfieren proteínas de la familia TET (proteína de translocación) que oxidan la 5mC a intermediarios 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5 formilcitosina (5fC) y 5 carboximetilcitosina (5caC), posteriormente la ADN-glicosilasa (TDG) genera un sitio sin base que es reparado por BER (Base Excision Repair). Alternativamente la 5hmC es desaminada por AID/APOBEC y removida por TDG, para posteriormente ser reparada por BER. Modificado de [66].

### **Metilación del DNA y obesidad**

Aunque son muchos los trabajos que asocian los cambios en la metilación con la obesidad, son pocos los estudios que relacionan estos cambios a nivel de genoma completo en tejidos como en tejido adiposo o hígado. En el tejido adiposo se han reportado genes que participan en vías asociadas a la glucosa como *IRS1*, también se han reportado genes con variantes previamente asociados a obesidad como *FTO*. Uno de los hallazgos epigenéticos en hígado de pacientes obesos es el incremento de las marcas de metilación de envejecimiento en este tejido. Además, se han encontrado que genes alterados a obesidad en otros tejidos también se encuentran presentes en este tejido como *IRS1*[67,68].

Por otro lado en uno de los estudios con mayor número de muestras de DNA extraído de sangre, alrededor 4 mil muestras de la cohorte Framingham Heart Study, encontraron que 83 CpGs

asociados al incremento de IMC, uno de estos sitios (cg11024682) también se asocia a enfermedad arterial coronaria y a diferentes parámetros de adiposidad. Además se han analizado los cambios de metilación asociados a las intervenciones como ejercicio, cirugía bariátrica y restricción calórica, encontrando que genes que se asocian al incremento de peso o DM2 son remodelados[69].

### **Metilación del DNA y DM2**

En estudios recientes se ha reportado que la alteración de la metilación del DNA pudiera ser el vínculo entre muchos de los factores de riesgo para DM2 y la regulación de los genes[52]. Por ejemplo se sabe que con la edad se incrementa el riesgo de DM2 y como la metilación del DNA también cambia a lo largo de la vida, se propone que están relacionados. Bajo esta premisa Rönn y cols. analizaron la metilación del gen *COX7A1* (citocromo C oxidasa subunidad VIIa) componente de la cadena respiratoria, que se sabe que presenta una expresión disminuida en el músculo, en la diabetes y la vejez. Los hallazgos de este reporte señalan que durante edades avanzadas se presenta una mayor metilación y menor expresión, y se propuso que estas alteraciones disminuyen la actividad de la mitocondria y la captación de la glucosa en el músculo. Sin embargo, son pocos los estudios en los que se han utilizado órganos metabólicamente relevantes para la diabetes en estudios longitudinales[70].

En los estudios comparativos de metilación que contrastan pacientes con y sin diabetes, se han documentan genes de los que previamente se ha mostrado su relevancia en la diabetes, por ejemplo: el gen de la insulina (*INS*), *IRS1*, Leptina (*LEP*), *FTO*, *PPARG*, *TCF7L2* y *KCNQ1* [71–73]. Por otra parte, en varios tejidos donde se ha reportado un estado alterado de metilación en pacientes con diabetes, por ejemplo en páncreas, donde se encontró que genes que participan en la diferenciación del órgano están hipermetilados. En tejido adiposo y músculo de gemelos monocigotos discordantes para DM2, se han mostrado alteraciones en genes relevantes para la DM2 como *KCNQ1*, *IRS1* y *PPARGC1a*[74]. En fechas recientes, en hígado se encontraron alteraciones en la metilación de genes que participan en la lipólisis. Además, en nuevas relaciones entre genes y la salud metabólica como sucede con *NCOR2*, se ha visto que el ejercicio incrementa la metilación de este gen y disminuye su expresión en tejido adiposo [75]. Es así que se propone que entender los procesos de regulación de la expresión por mecanismos epigenéticos, como la metilación, ayudarán a entender las alteraciones que conllevan a diabetes en presencia de obesidad en tejidos altamente relevantes para la enfermedad.

## ***Justificación***

Actualmente la prevalencia de la obesidad y DM2 muestran un incremento en paralelo a nivel mundial, posicionándolas como problemas de salud pública. Debido a que la comorbilidad entre estas dos enfermedades está ampliamente demostrada es necesario dilucidar los factores que conducen a la DM2 en pacientes con obesidad, ya que estas enfermedades pueden aparecer conjuntas o de forma aislada.

Aunque existen factores comunes entre estas dos enfermedades aun se están realizando investigaciones para entender los mecanismos moleculares comunes en estas interacciones. Una de las estrategias que se han utilizado en los últimos años ha sido los estudios de asociación genética. No obstante a los grandes esfuerzos en este campo sólo una pequeña parte de la etiología de la DM2 y de la obesidad son explicados por factores genéticos. Estudios recientes sugieren que alteraciones epigenéticas podrían desempeñar un papel importante en la susceptibilidad y las complicaciones de las enfermedades metabólicas. De hecho se ha reportado que existen alteraciones en los patrones de metilación de genes de adiposidad que podrían estar involucrados en el desarrollo de la DM2 y obesidad.

Por lo que encontrar las alteraciones en los patrones de metilación en el genoma de tejidos relevantes para la DM2 durante la obesidad, ayudará entender los mecanismos epigenéticos que subyacen en estas patologías.

## ***Hipótesis***

Si la regulación de la expresión por metilación del DNA presenta una alteración incrementada en pacientes obesos con DM2, entonces es posible encontrar genes con metilación diferencial en tejidos blanco de la insulina entre obesos con y sin diabetes.

## ***Objetivo general***

Determinar si existe metilación diferencial de DNA en tejidos de pacientes obesos, relevantes para el metabolismo de la glucosa que se relacione con la etiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 2.

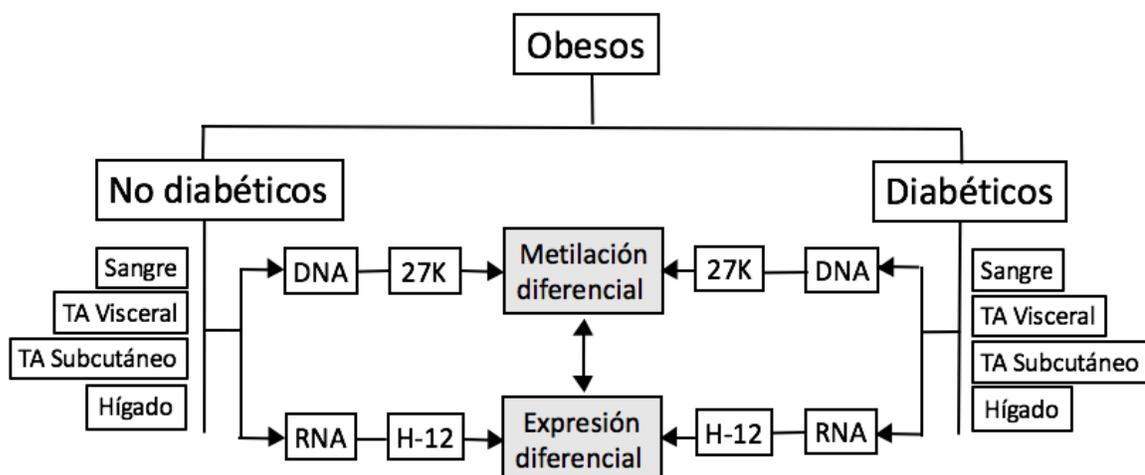
## ***Objetivos específicos***

1. Identificar si existen patrones diferenciales de metilación en tejido adiposo (subcutáneo y visceral) y hepático de pacientes obesos con y sin DM2.
2. Identificar si existen patrones diferenciales de metilación en sangre periférica de pacientes obesos con y sin DM2.
3. Determinar si existe correlación entre las alteraciones de los patrones de metilación y los patrones de expresión.
4. Identificar cuales son las vías de señalización cuya regulación epigenética se encuentra alterada en la DM2 obesidad.

## Material y Métodos

### Estrategia experimental

Este es un estudio observacional transversal de tipo correlacional con un muestreo no probabilístico a conveniencia, para cumplir con los objetivos se diseñó la estrategia experimental que se muestra en la Fig. 3. De manera general consistió en comparar la metilación del DNA y expresión de tejidos de pacientes obesos con diabetes (grupo de casos) con los valores de obesos sin diabetes (grupo de controles) pareados por edad e índice de masa corporal. Los tejidos analizados fueron la sangre total (ST), tejido hepático (TH), tejido adiposo subcutáneo (TAS) y tejido adiposo visceral (TAV).



**Figura 3. Estrategia experimental**

Estrategia para el análisis de metilación y expresión diferenciales, 27k se refiere al uso del microarreglo 27k de Illumina y H-12 el microarreglo HumanHT-12 v4 ambos de Illumina

### Reclutamiento de pacientes

Las muestras fueron obtenidas de individuos con obesidad I ó II sometidos a cirugía bariátrica, atendidos en las Clínicas de Atención Integral para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas del Gobierno de la Ciudad de México (unidad Tláhuac y unidad Rubén Leñero). Los pacientes fueron seleccionados para la cirugía bariátrica después de 6 meses de una intervención en estilo de vida para reducción de peso. Además para un análisis piloto se incluyeron 3 muestras de TAS de pacientes con normopeso (NP) sin DM2 sometidos a

liposucción del Hospital Ángeles del Pedregal. Cada individuo fue invitado a participar en el estudio, después de firmar el consentimiento informado se le realizó una encuesta el día previo a la cirugía, el consentimiento informado y la hoja de recolección de datos se muestran en la sección de anexos. El proyecto fue avalado por los comité de ética correspondientes.

### ***Criterios de inclusión***

Se incluyeron pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de diabetes y obesidad grave o pacientes con obesidad sin diabetes, de acuerdo a las siguientes definiciones operacionales:

- Diabéticos: glucosa en ayuno  $\geq 126$ mg/dL o Hb1Ac  $\geq 6.5\%$ .
- No diabéticos: glucosa en ayuno  $\leq 100$  mg/dL y Hb1Ac  $\leq 6.5\%$ .
- Con obesidad grave: IMC  $\geq 35$  Kg/m<sup>2</sup>
- Pacientes con normo peso: IMC  $\geq 20$  y  $< 25$  Kg/m<sup>2</sup>

### ***Criterios de no inclusión.***

Que cursen con obesidad o diabetes causada por algún síndrome genético o disfunción endocrinológica reportada en su expediente médico, o que no deseen participar en el estudio.

### ***Recolección y almacenamiento de las muestras***

Las muestras de la sangre fueron recolectadas una hora antes de la cirugía de una vena del brazo en dos tubo con EDTA (para extracción de DNA y RNA ) y en tubo sin anticoagulante (para análisis bioquímicos). Las muestras de tejido adiposo e hígado se obtuvieron al comienzo de la cirugía con bisturí armónico en todos los casos de la siguiente manera: la grasa visceral se obtuvo del epiplón mayor en el centro de la curvatura mayor del estómago. La biopsia hepática se obtuvo en el extremo distal del lóbulo hepático izquierdo, justo por encima del bazo. Para preservar la integridad de los ácidos nucleicos, las muestras de hígado y tejido adiposo fueron colectadas en RNAlater®, en tubos identificados con un número único por paciente para ser congelados a -70 °C. Todas las muestras fueron obtenidas por personal calificado, con todos los requisitos de bioseguridad, con el uso de material estéril nuevo.

El almacenamiento, extracción de ácidos nucleicos, análisis de expresión y metilación se realizó en el laboratorio de Inmunogenómica y enfermedades complejas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), las muestras de tejido y de sueros sanguíneos se encuentran a resguardo a -70°C.

### ***Estudios bioquímicos***

Se realizaron determinaciones bioquímicas en suero (glucosa, insulina, colesterol total, triglicéridos y HDL) y el %Hb1Ac del tubo con EDTA como aditivo, estos estudios fueron realizados en el Centro Medico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social .

### ***Extracción de ácidos nucleicos***

#### ***Extracción de DNA***

La extracción del DNA a partir de SP, se realizó con el kit Gentra y para el tejido adiposo e hígado se utilizó el QIAamp DNA Mini Kit. En ambos casos se utilizaron los protocolos establecidos por el proveedor (QIAGEN).

#### ***Extracción de RNA***

La extracción de RNA a partir de SP y tejido hepático se realizó por el método de Trizol (Life Technologies, INC). En el caso de los tejidos adiposos se utilizó el kit Rneasy Lipid Tissue Midi Kit de Qiagen. El RNA obtenido se hidrató en agua libre de RNAsas. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó en un NanoDrop® ND-1000 v 3.5.2. (NanoDrop Technologies Inc.)

### ***Integridad de ácidos nucleicos***

La integridad del DNA se comprobó por electroforesis de gel de agarosa al 1%. Por otro lado la integridad el RNA se analizó mediante la tecnología electroforesis digital en un Bioanalizador 2100 (Agilent) que permite control de calidad y cuantificación de RNA. La calidad es estimada en unidades RIN (RNA Integrity Number), en una escala de 1 a 10, 1 indica totalmente degradado y 10 integro. Se incluyeron muestras con un RIN superior a 8.

### ***Valoración de la metilación del DNA***

El DNA genómico fue convertido con bisulfito mediante el kit EZ DNA methylation (Zymo Research), los perfiles de metilación fueron cuantificados mediante el chip Illumina Infinium Human Methylation27 Beadchip de Illumina (27K). El arreglo contiene 27,578 loci CpG cubriendo 14,000 genes humanos a una resolución de un nucleótido. Los CpGs en cromosomas X y Y fueron eliminados para este estudios. El procesamiento de los chips y el análisis de datos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición y

procesamiento de imágenes se llevó en un lector Illumina iScan de Illumina. Los datos sin procesamiento se extrajeron usando el software Bead Studio v3.0. Los valores de metilación para cada locus CpG se expresan como un valor beta, representando una continua medición de 0 (completamente desmetilado) a 1 (completamente metilado).

### ***Obtención del transcriptoma***

Para identificar los perfiles de expresión se utilizó el microarreglo HumanHT-12 v4 Expression BeadChip, este arreglo contiene 47 mil sondas que analiza el transcriptoma completo anotado en el 2009. Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo estándar del fabricante (Illumina).

### ***Pre-procesamiento de los datos genómicos y análisis estadísticos***

Las comparaciones de medias se realizaron mediante pruebas que se ajustan a datos no paramétricos (U de Mann-Whitney). Todos los análisis estadísticos y graficas fueron realizadas en ambiente R CRAN Project .

El pre-procesamiento de los datos genómicos se realizó con las bibliotecas de Bioconductor y se realizaron los siguientes pasos para comprobar la calidad de los microarreglos de metilación y expresión :

- 1) Corrección de ruido de fondo de la fluorescencia para eliminar las señales no específicas.
- 2) Normalización entre los valores de fluorescencia de los distintos microarreglos para eliminar diferencias técnicas (no debidas a factores biológicos). En ambos casos se normalizó con el algoritmo de promedio robusto de multiarreglos (RMA por sus siglas en inglés). Este es un método rápido y eficiente que permite analizar múltiples microarreglos asumiendo la misma distribución.
- 3) En particular, para los datos de metilación obtenidos a partir del DNA de sangre periférica, se utilizó corrección por lote, con el algoritmo Combat (Combating Batch Effects When Combining Batches of Gene Expression Microarray Data)[76]. En estas muestras se utilizó este algoritmo para corregir el error sistemático que pudiera existir debido a que estos microarreglos se realizaron en dos corridas diferentes. Aunque este algoritmo fue creado para microarreglos de expresión en la actualidad es

ampliamente usado para metilación. Además para sangre se realizó ajuste por heterogeneidad celular[63].

- 4) Por último se estimaron los niveles de expresión y metilación, calculando la media de la fluorescencia de las distintas repeticiones de las sondas que se encuentran en el microarreglo.

### ***Análisis diferencial genómico***

Para identificar las sondas en las que existe alguna alteración en la metilación o expresión, se contrastaron los perfiles de expresión y de metilación de los grupos de obesos con DM2 y obesos no diabéticos.

Estos contrastes fueron analizados por el paquete Limma, el cual está diseñado para trabajar en el programa R obtenido de Bioconductor (<http://www.R-project.org>). Limma es una herramienta validada para el análisis masivo de diversos microarreglos, trabaja de forma eficiente con un número considerable de muestras, asimismo integra funciones de pre-procesamiento y análisis estadístico frecuentista y bayesiano[77]. Limma modela la expresión génica a través de modelos lineales generales y evalúa el contraste deseado entre dos o más grupos. En general, realiza una prueba de diferencia de medias con ajuste para múltiples comparaciones. Estas pruebas han sido ajustadas para lidiar con alto nivel de ruido y varianzas en experimentos con pocas muestras e incluyen en el análisis aproximaciones bayesianas.

### ***Análisis de enriquecimiento genómico***

Además de conocer los genes que se encuentran diferencialmente alterados, también se identificaron en que vías en las que participan dichos genes, para lo cual se utilizó la estrategia de enriquecimiento genómico. Esta estrategia consiste básicamente en contrastar los genes diferenciales con bases de datos de vías metabólicas, procesos biológicos o enfermedades. Por medio de algoritmos de agrupamiento se identifican patrones con significancia estadística. Para este trabajo los análisis de análisis de procesos biológicos se realizaron en la herramienta DAVID V6.7, en el modulo de proceso biológico con una significancia  $p < 0.05$  [78].

### ***Análisis de agrupamiento del panorama epigenético***

Para entender la correlación entre los patrones de metilación y los patrones de expresión, primeramente se diseñó la siguiente estrategia: se obtuvo la mediana para cada sitio CpG y sonda de expresión, esto se realizó primero en el grupo control en cada uno de los tejidos. Posteriormente, se relacionaron las bases de metilación y expresión, para obtener una perspectiva gráfica de la relación metilación-expresión, utilizando el nombre del gene como dato en común. Posteriormente, con la biblioteca MCLUST (Gaussian Mixture Modelling for Model-Based Clustering, Classification, and Density Estimation), se llevó a cabo un análisis de agrupamiento de datos, basado en la densidad de los mismo en la gráfica de metilación vs expresión. Esto nos permite hacer una clasificación de los genes basados en sus niveles de metilación y expresión. La herramienta MCLUST nos permite obtener el número de grupos más probable ( $k$ ), utilizando en el criterio de información bayesiana (BIC), que se forma por el agrupamiento de datos, que en este caso fue  $k=6$ . De esta forma se identificó el grupo al que pertenece cada gene (en la relación metilación-expresión), en el grupo control (obesos sin DM2, OND). La clasificación obtenida en el grupo control se usó como base para el análisis de datos en el grupo casos (obesos con diabetes, OBD), y de esta manera conocer los genes que se desvían del comportamiento que presenta el grupo control [79,80]. Esta estrategia bioinformática fue diseñada para identificar genes que al disminuir su valor de metilación aumentaban su expresión.

### ***Correlación de las alteraciones en metilación y expresión***

Además, para evaluar la correlación entre la alteración de la metilación del DNA y la expresión génica diferencial, seguimos una estrategia publicada previamente por Noushmehr en el 2010[81], que consiste en graficar los valores de  $p$  de los cambios en metilación vs expresión. Al graficar estos valores se asigna un signo, según sea el sentido del cambio (positivo para sobreexpresión o hipermetilación y negativo para subexpresión o hipometilación). En el presente trabajo se resaltan las sondas que se mostraron significativamente alteradas en la expresión de manera negativa y significativamente hipermetiladas, y en las sondas que estaban significativamente sobreexpresadas y significativamente hipometiladas.

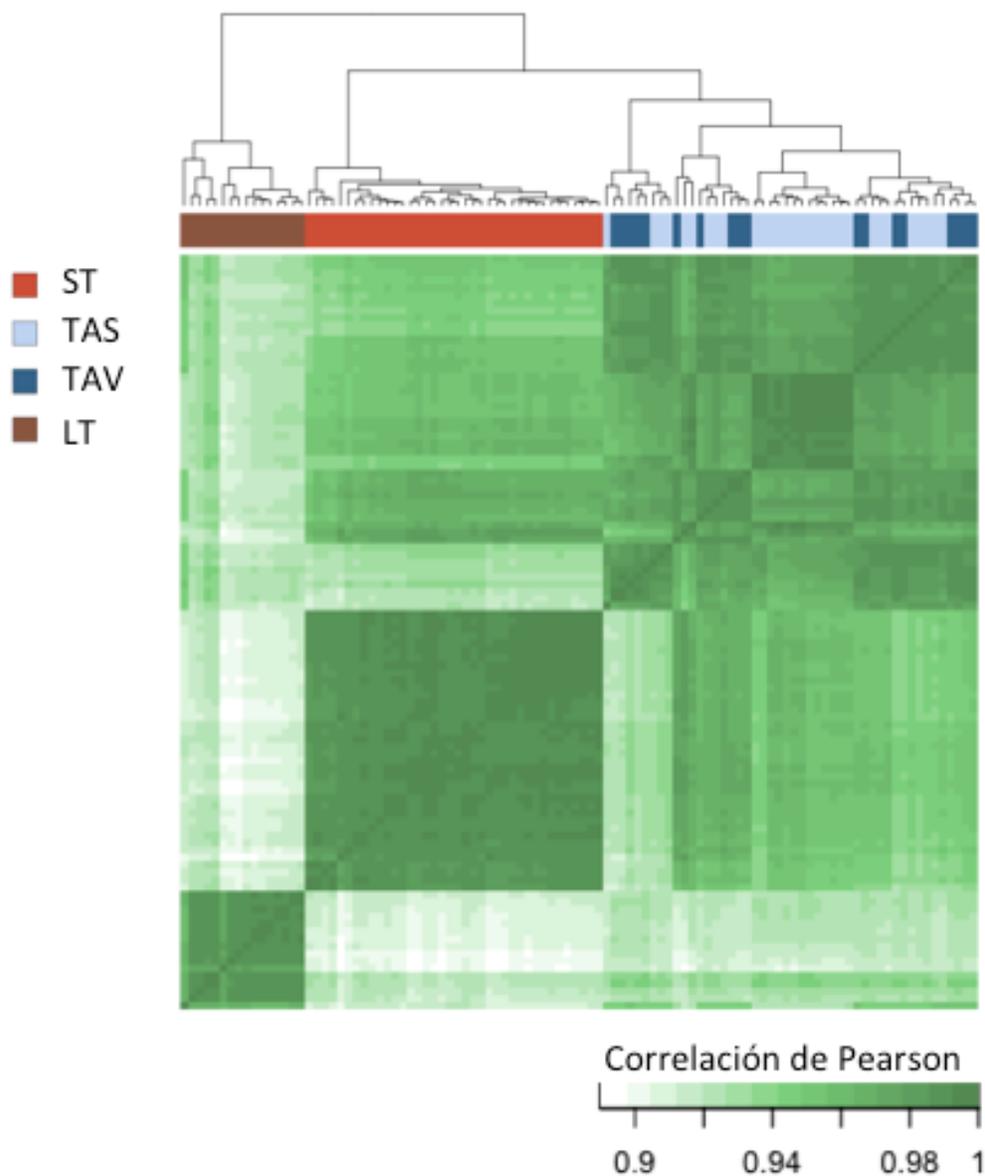
## Resultados

Se formó un banco de tejidos en el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del INMEGEN, del cual se eligieron los pacientes que cumplieran con las características requeridas para el estudio. Los dos grupos de pacientes fueron pareados por IMC, género y edad. Las características clínicas de los individuos analizados se muestran en la Tabla 1. Los individuos de ambos grupos presentaron parámetros bioquímicos similares, con excepción de los relacionados a índices glucémicos (glucosa, %Hb1Ac y HOMA-B, significativamente diferentes entre los grupos). Además, los individuos con diabetes y obesidad mostraron valores altos en colesterol y triglicéridos aunque no alcanzaron la significancia estadística. A partir de ST, TAS, TAV y TH, se aisló el DNA, se cuantificó y se verificó que contara con la calidad necesaria para ser analizado por microarreglos. Después de la conversión por bisulfito, los perfiles de metilación se realizaron con el microarreglo 27K de Illumina. Los valores beta se calcularon a partir de los datos filtrados por calidad, después de ser normalizados.

**Tabla 1. Datos antropométricos de individuos con obesidad, sin diabetes y con diabetes.**

Parámetro	Individuos no diabéticos con obesidad	Individuos diabéticos con obesidad	Valor p
n (Mujer/hombre)	16/7	16/7	-
Edad (años)	40.96 ± 6.19	41.75 ± 9.93	0.71
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	42.95 ± 6.06	41.19 ± 5.51	0.39
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	75.6 ± 7.28	72.67 ± 9.38	0.48
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	124.7 ± 15.11	120.33 ± 15.63	0.68
Colesterol total (mg/dL)	170.11 ± 33.73	205.11 ± 51.58	0.18
Triglicéridos (mg/dL)	148.28 ± 62.6	193.44 ± 98.61	0.14
Colesterol-HDL (mg/dL)	33.37 ± 11.28	37.03 ± 11.37	0.33
Glucosa en ayuno (mg/dL)	84.35 ± 8.68	123.1 ± 28.52	2.63x10 <sup>-07</sup>
%Hb1Ac	5.35 ± 0.19	6.93 ± 0.94	1.03x10 <sup>-06</sup>
Insulina UI	12.99 ± 6.59	18.23 ± 19.01	0.38
HOMA %B	155.92 ± 61.21	83.06 ± 39.54	2.37x10 <sup>-05</sup>

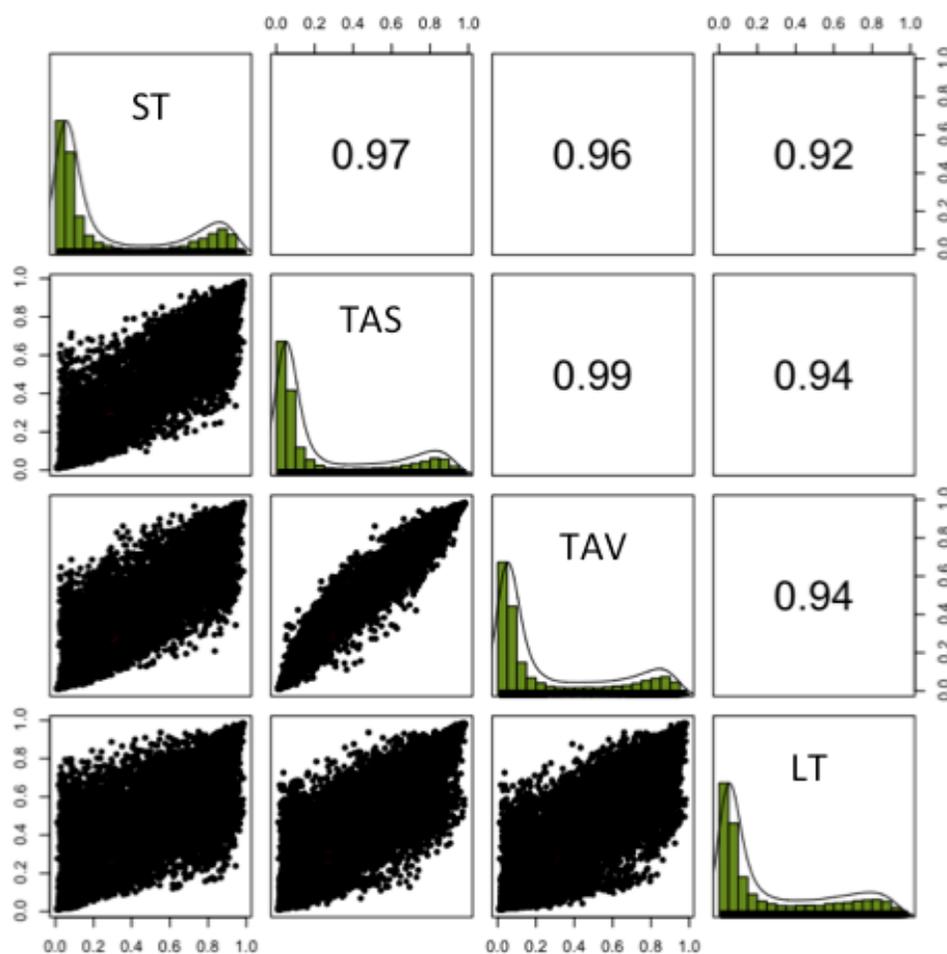
Después de excluir a los sitios CpG que se encuentran en cromosomas sexuales, como control de calidad se evaluó primeramente la concordancia entre los patrones globales de metilación en 26,486 sitios CpG de los cuatro tejidos. Se obtuvo la matriz de correlación de Pearson con el total de las sondas y se realizó un agrupamiento jerárquico en las muestras (Fig. 4).



**Figura 4. Agrupamiento de los datos de metilación de los tejidos de pacientes con obesidad.**

El mapa de calor representa el coeficiente de correlación de Pearson del estado de metilación de los sitios CpG autosómicos entre diferentes tejidos de todos los individuos. La barra de colores superior indica el tipo de tejido. La escala de color verde indica el valor de la correlación de Pearson.

Los patrones de metilación mostraron una mayor correlación entre las muestras del mismo tejido de diferentes pacientes que entre las diferentes muestras de tejido del mismo paciente. Podemos observar que todos los tejidos se agrupan de acuerdo al tipo de tejido. Al comparar la metilación con el total de sitios analizados, no observamos un agrupamiento que nos permitiera diferenciar los individuos con diabetes de los que no la presentan. Además, al contrastar los valores promedio de cada uno de los sitios entre los distintos tejidos, se encontró que los diferentes depósitos de grasa (TAS y TAV) mostraron la más alta correlación (0.99) entre ellos en los valores de metilación, mientras que la correlación más baja fue entre el ST y TH (0.97) (Fig. 5).

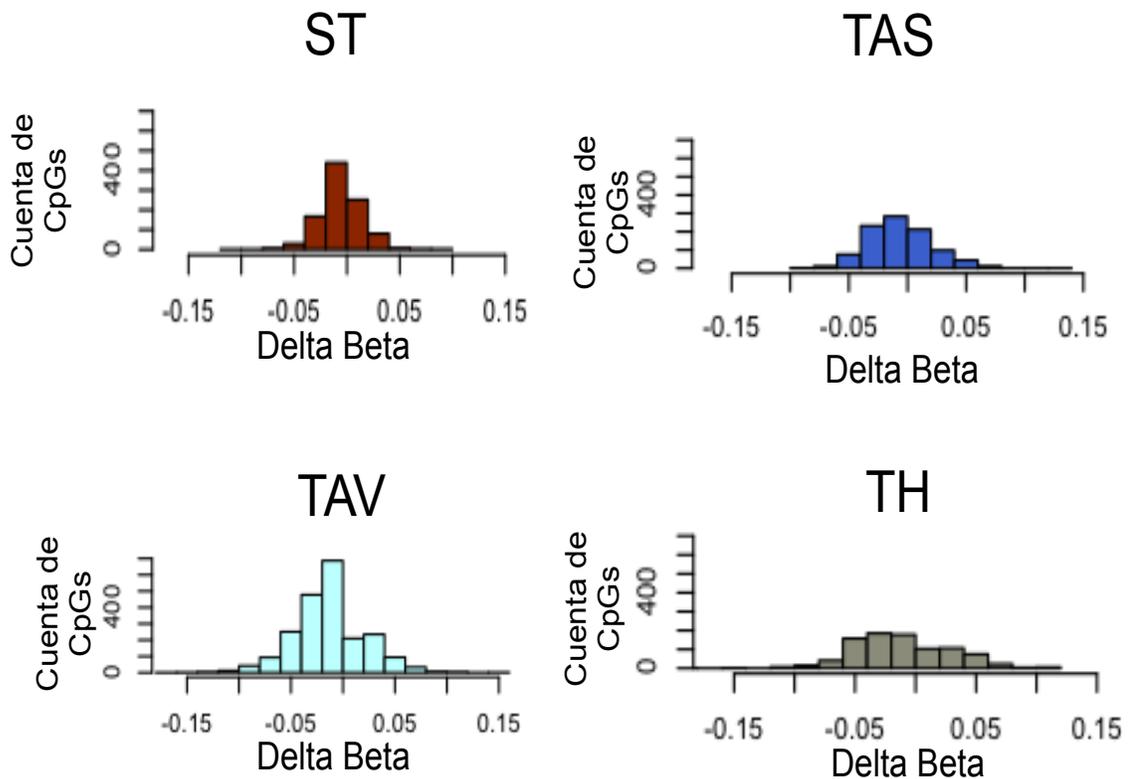


**Figura 5 . Comparación de la metilación promedio de los tejidos.**

Los recuadros de la diagonal central muestran la distribución de los valores promedio para cada uno de los tejidos. Los recuadros superiores muestran la r de Pearson global para la comparación entre tejidos. El panel inferior muestra las gráficas de puntos de la dispersión de las comparaciones.

## Metilación del DNA diferencial entre individuos con obesidad con y sin diabetes

Para identificar las alteraciones en la metilación en pacientes diabéticos obesos, se compararon los perfiles de metilación del DNA de TAV, TAS, TH y ST, entre los individuos OBD y los OND. Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, aunque estas son sutiles (muchas de ellas cercanas al 1%). En la Fig. 6 se muestra la distribución de los cambios en los diferentes tejidos, siendo el TAV el tejido con mayor número de cambios.

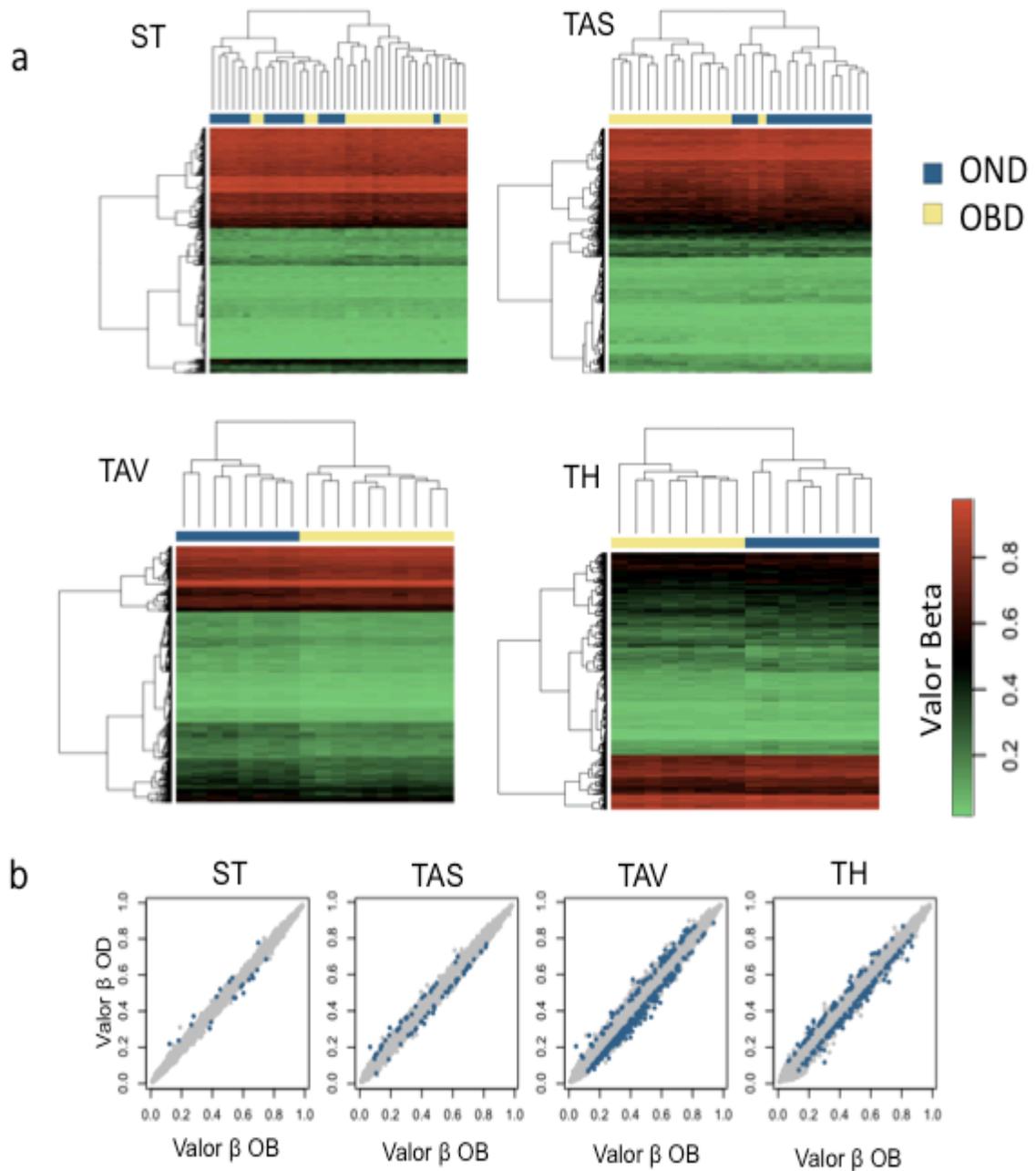


**Figura 6. Distribución de los cambios significativos.**

En las gráficas de barras se muestra la distribución del total de los sitios CpGs que resultaron con una  $p < 0.05$  en los cuatro tejidos. El valor beta es la diferencia de la metilación promedio del los pacientes obesos con diabetes y los pacientes obesos sin diabetes.

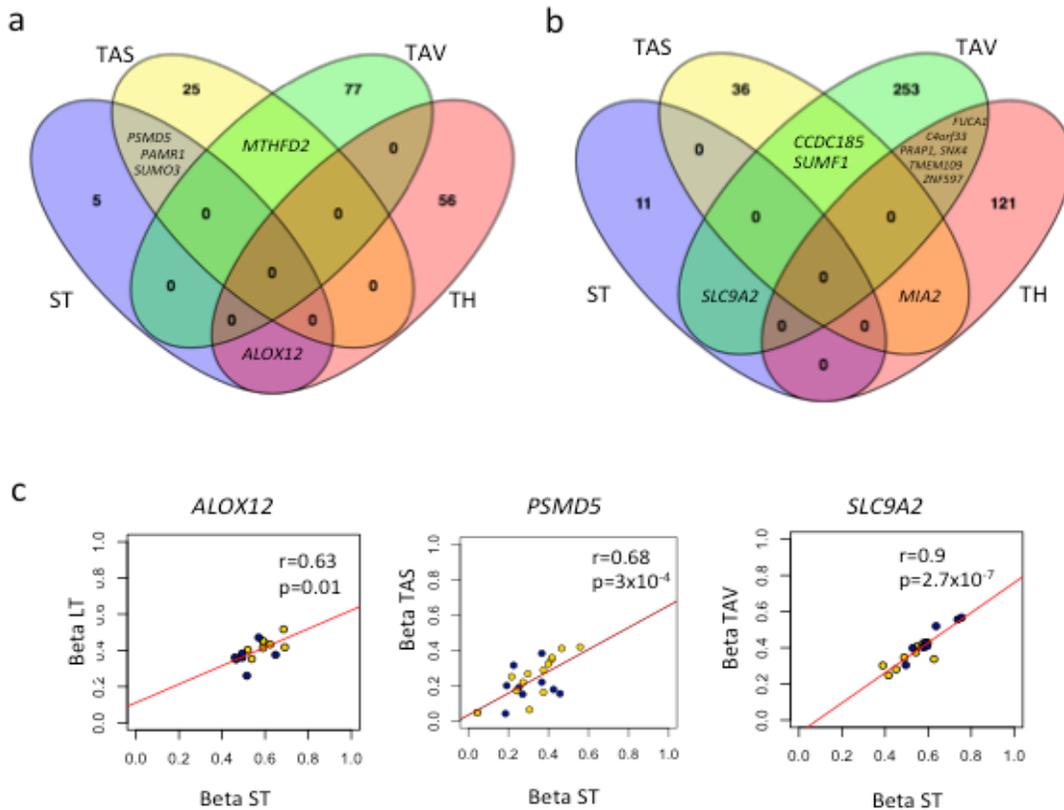
El análisis de agrupamiento jerárquico con los primeros 500 sitios CpG (ordenados por significancia) identificó 2 grupos principales en los cuatro tejidos que corresponde a los grupos OBD y OND. En el TAV y TH todas las muestras de OD se agruparon juntas, en el TAS una muestra de OD agrupa con muestras OND, mientras que en ST más de una muestra de OD se intercalaron entre el grupo OND (Fig. 7A ).

A continuación se realizó un filtro para determinar sitios CpG diferencialmente metilados (CDMs), que se definieron como aquellos que alcanzaron al menos el 5% (corte estándar en la diferencias de la metilación) en la diferencia de la metilación ( $\Delta\beta$ ) entre los grupos de OND y OBD, para cada uno de los tejidos y un cambio significativo con valor  $p < 0.05$ . Todos los tejidos mostraron CDMs, sin embargo, TAV muestra el mayor número de CDMs (340 positivos=78 y negativos=262), seguido de TH (185, positivos =57 y negativos=128), TAS (68, positivos=29 y negativos=39) y ST (12, positivos=9 y negativos=12) (Fig. 7B). La lista completa de los CDMs se muestran en las Tablas 2-5 para cada uno de los tejidos. Dicha lista incluye genes con CDMs relacionados con DM2 o la obesidad, tales como: *IRS1*, *LEP*, *ADIPOQ* en TAS, *LCAT*, *FOXA-2*, *KCNQ1* y *GCKR* en TAV, *PKD4*, *HNF4A*, y *PON1* en TH.



**Figura 7. Perfiles de metilación diferencial en individuos obesos con diabetes.**

A) Mapas de calor de los primeros 500 sitios CpG diferencialmente metilados. La barra superior indica el estado médico de los individuos obesos, en azul se muestran los individuos sin diabetes y de amarillo los individuos con diabetes. B) Gráfica de las comparaciones entre OBD y OND en los diferentes tejidos, los puntos azules indican los CDMs.



**Figura 8. Comparación de los diferentes CDMs en los tejidos.**

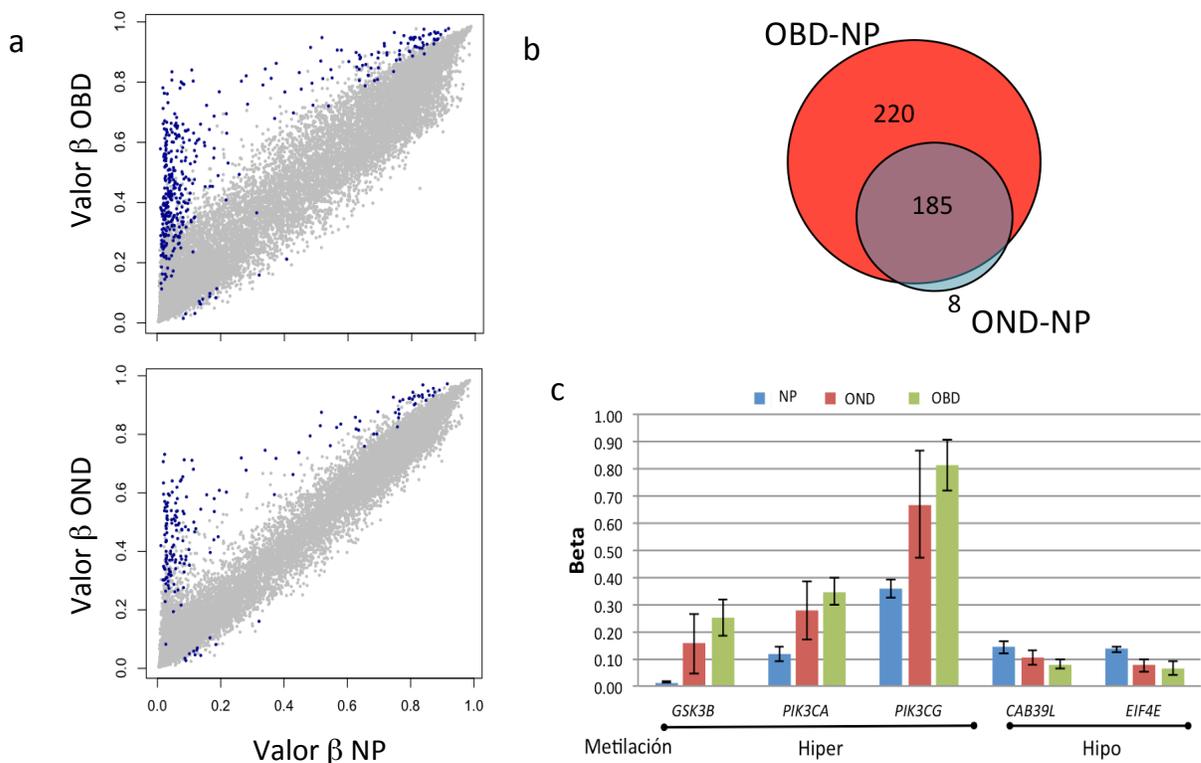
A) Diagrama de Venn de los sitios hipermetilados en los OBD. B) Diagrama de Venn de los sitios diferencialmente metilados negativamente. C) Sitios con correlación con sangre y otros tejidos: *ALOX12* (cg03760483), *PSMD5* (cg09419670) y *SLC9A2* (cg20050113).

Interesantemente algunos CDMs alterados se presentan en más de un tejido, en ST y TAS: *PSDM5*, *PARMR1* y *SUMO3*, entre ST y el TAV: *SLC9A2*, el ST y TH: *ALOX12*, entre TAS y TAV: *MTHFD2*, *CCDC185* y *SUMF1*, además entre TAV y TH: *FUCA1*, *C4orf33*, *PRAPP1*, *SNX4*, *TMEM109* Y *ZNF597*, mientras que TAS y TH solo mostró *MIA2* (Fig. 8B). *ALOX12*, *PSMD5* y *SLC9A2* mostraron una correlación significativa entre el ST y otros tejidos. Este resultado proporciona genes con el potencial de ser empleados como biomarcadores para DM2 en la muestra de ST (Fig 8C).

Para conocer los procesos biológicos en los que participan los genes donde se encontraron CDMs, se realizó un análisis de enriquecimiento de genes, las vías identificadas significativamente se muestran en las Tablas 6-8. En donde encontramos vías como regulación del metabolismo de lípidos, regulación del metabolismo de glucosa y respuesta a estímulo de glucosa en TAS, regulación de apoptosis y ciclo celular en TAV, homeostasis y

ciclo celular en TH. La ST no mostró ningún enriquecimiento significativo, probablemente por la reducida cantidad de sitios CpG.

Con el objetivo de conocer la aportación de la obesidad a los cambios en la metilación se realizó un análisis preliminar de metilación diferencial en TAS en dos contrastes: OBD vs NP y OND vs NP. La Fig. 9A muestra los individuos OBD presentan un mayor número de CDMs (n=405) en comparación con los obtenidos en OND (n=193), al comparar los sitios ambos grupos presentan prácticamente las mismas alteraciones Fig. 9B. Algunos de los sitios que muestran los mayores cambios se les ha relacionado previamente a diabetes, por ejemplo *GSK3B*, *PI3KCA* y *EIF4E*. En la Fig. 9C se muestran algunos genes que mostraron metilación diferencial en ambos contrastes y se resalta que los pacientes OBD presentan un mayor grado de alteración.



**Figura 9 Metilación diferencial en TAS de pacientes OND, OBD y NP.**

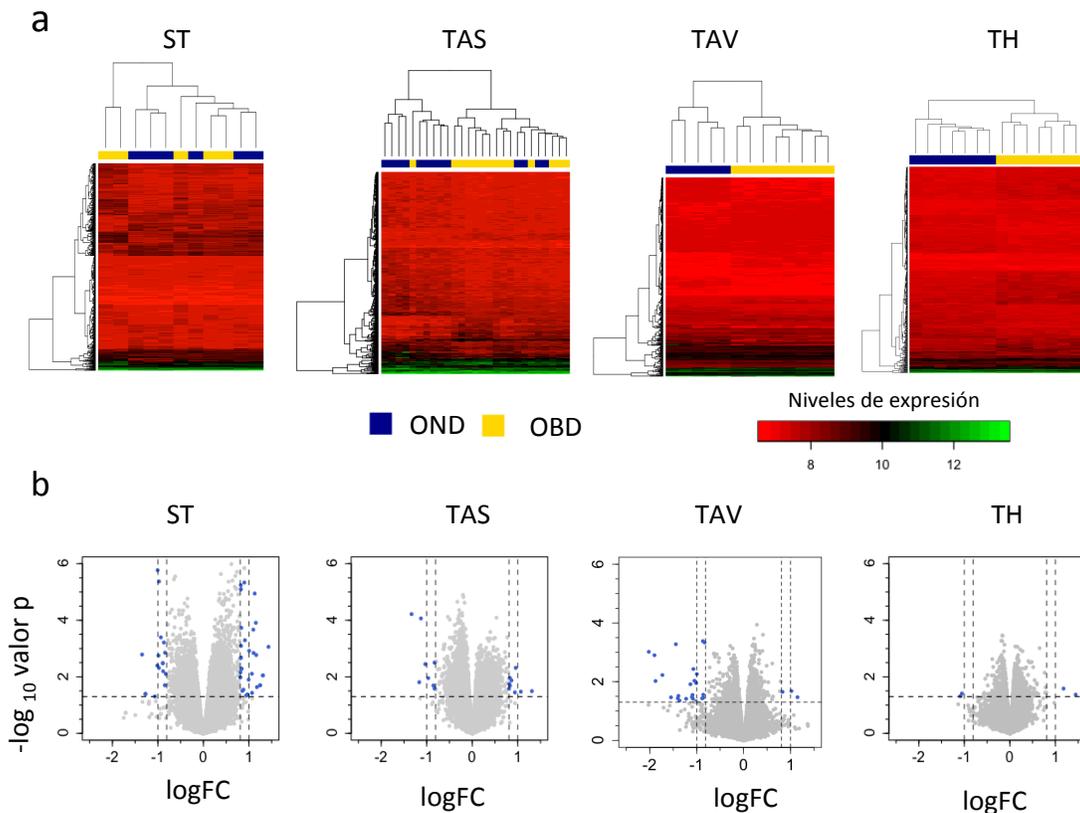
A) Gráfica de las comparaciones de la metilación entre OBD vs NP (figura superior) y OND vs NP (figura inferior). B) Diagrama de Venn de los sitios diferencialmente metilados compartidos entre los dos contrastes en TAS. C) Valor de metilación en genes con metilación diferencial en los grupos analizados.

### **Expresión genética diferencial**

La metilación forma parte de los procesos de regulación de expresión genética, para conocer cómo las alteraciones en la metilación pueden repercutir en la expresión se realizó un análisis de expresión global con microarreglos. Los resultados mostraron cambios sutiles en la expresión en los obesos con diabetes en los 4 tejidos.

Utilizando las primeras 500 sondas diferencialmente expresadas (ordenadas de acuerdo a su significancia), se realizó el agrupamiento jerárquico que se muestra en la Fig. 10A. Se muestra que los TH y TAV lograron agrupar a los individuos de acuerdo a su estatus de la enfermedad, mientras que en TAS se muestra una tendencia a la formación de los grupos, con varias muestras intercaladas y en ST no hay un patrón de agrupamiento.

Por otra parte, se observó que únicamente 36 sondas presentaron un cambio mayor a un  $|\log \text{fold-change}| > 1$  en los tejidos de diabéticos obesos, distribuidos de la siguiente manera: 17 en ST, 6 en TAS, 9 en TAV y 4 en TH. Empleando un análisis con un punto de corte de ( $|\log \text{fold-change}| > 0.8$ ), identificamos 43 sondas. Estos resultados se presentan en la tablas 9-12 (Fig. 10B). En la lista se incluye genes que se les ha relacionado previamente con la fisiopatología de la diabetes o enfermedades metabólicas, por ejemplo: *ACSL6*, *AMFR*, *PCLB1*, *SOCS-1*, *UTS2* y *USF1* en sangre; *AMFR*, *CCL20*, *EDN1*, *LIPG*, *PTX3*, *SLAMF1* y *TNC* en TAS ; *ALOX15*, *G3BP2*, *FOSB* y *WISP2* en TAV and *HLA-DRB1* and *PLA2G2A* en TH. La sonda para el gene *AMFR* se encontró sobre expresada en ST, TAS y TAV, además la expresión encontrada en ST para el gene *AMFR* correlaciona de manera significativa con la expresión en TAS ( $r=0.71$ ,  $p=0.01$ ).

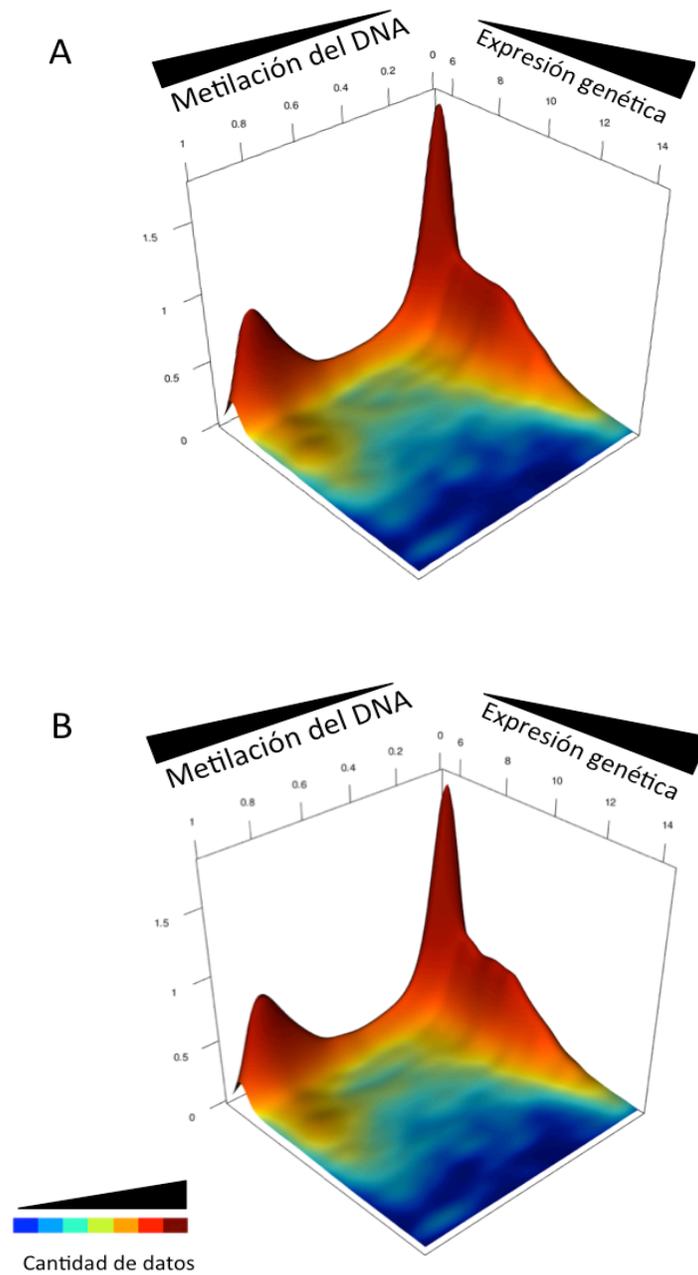


**Figura 10. Expresión diferencial en los tejidos analizados.**

A) Mapa de calor de los primeros 500 transcritos diferencialmente expresados entre OBD y ODN la barras de color en la parte superior del mapa de calor indican pacientes sin diabetes en amarillo y pacientes con diabetes en azul. B) Gráficas de volcán de la comparación de la proporción de cambio ( $\log_{2}FC$ ) y la significancia expresada como el logaritmo de base 2 del valor p. La línea punteada horizontal indica un valor de  $p=0.05$ , las líneas verticales indican  $|1|$  y  $|0.8|$  del  $\log_{2}FC$ . Los puntos que con expresión diferencial son resaltados en azul.

### ***Correlación de alteraciones en metilación y expresión genética***

Con el objetivo de identificar las posibles repercusiones de la alteración en la metilación sobre la expresión genética, se siguieron dos abordajes: primeramente se buscó la correlación global de metilación con la expresión, para así conocer el panorama de la relación metilación-expresión. En la figura 11 se observa un ejemplo que los panoramas generales en TAS, de manera global. Se puede observar que no existe diferencias en el comportamiento global de la relación metilación-expresión, en los individuos obesos con diabetes comparados con aquellos que no tienen diabetes. La conservación de la distribución de estos panoramas epigenéticos se conserva en los otros tejidos.



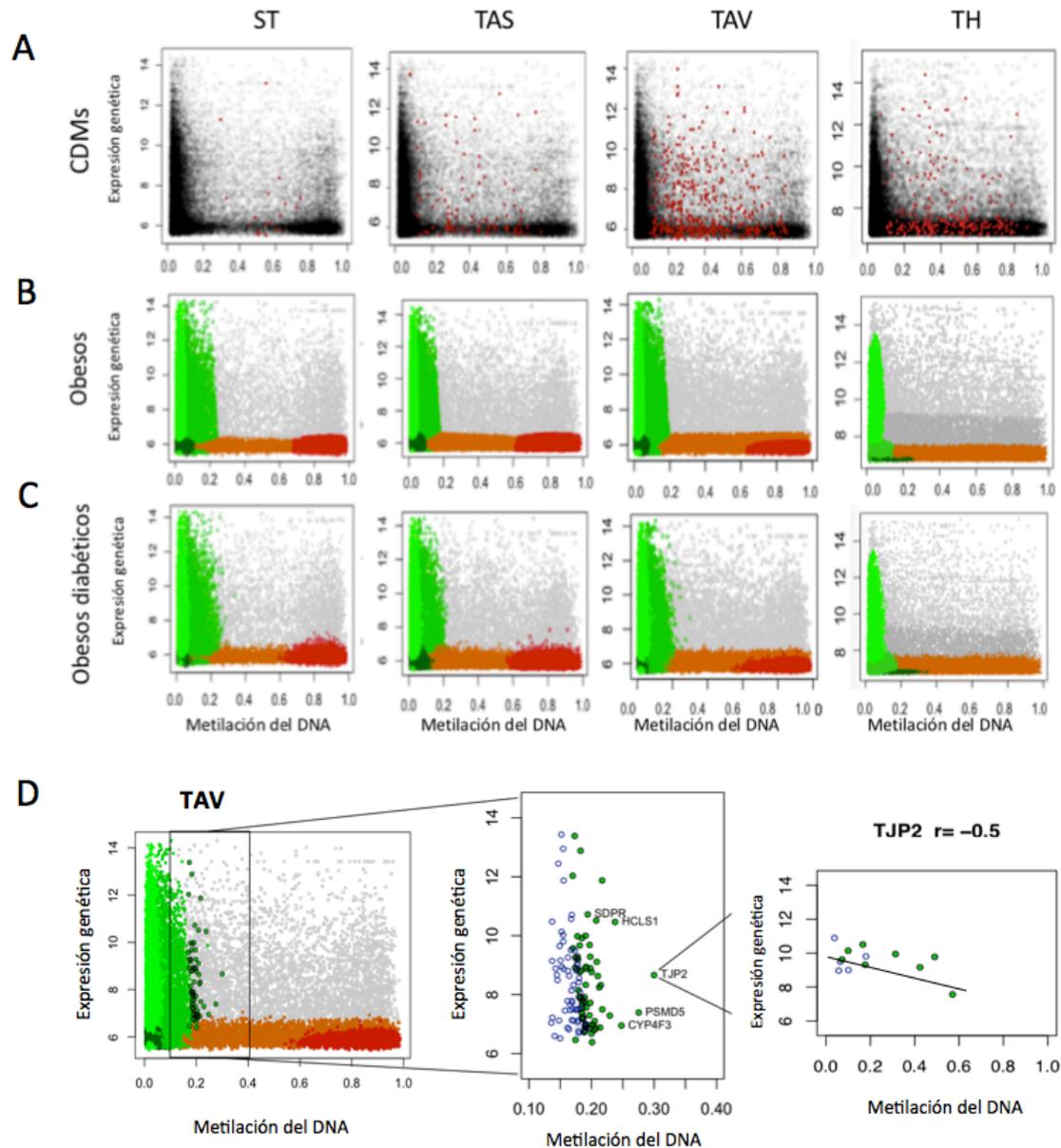
**Figura 11. Panoramas globales de expresión y metilación.**

Gráfica de densidad bidimensional de la comparación metilación (rango de valores beta de 0 a 1) y en expresión genética (rango de valor de fluorescencia absoluta de 5.5 a 15). La escala de color indica la densidad de valores (de azul a rojo). A. Gráfica de metilación y expresión en TAS de individuos con obesidad. B. Gráfica en individuos con obesidad y con diabetes.

Cuando se localizan los CDMs en una gráfica de comparación de la expresión genética y metilación de DNA, se puede observar que se encuentran en regiones limitada a valores beta mayores a 0.1 y menores de 0.8, en todos los tejidos (Fig. 12A). Para identificar si existen cambios en el comportamiento de genes individuales, en el panorama de metilación-expresión, se siguió la estrategia de agrupamiento diseñada para este estudio y descrita en la sección de métodos.

Los resultados de agrupamiento de los datos, muestran que los grupos que se forman tienen concordancia con categorías bien definidas en expresión y metilación. Por una parte, se pueden distinguir un límite entre los grupos que corresponden a genes expresados y genes apagados, a pesar de que los genes activos se distribuyen en un rango amplio según los niveles de expresión (expresión baja y alta, Fig. 12B). Por otra parte, los datos de metilación mostraron que en TAV, TAS y ST existen tres regiones de metilación (metilación baja, intermedia en color naranja y alta de color rojo) y dos grupos con alta expresión con metilación baja (tonos claro de color verde). En el caso del TH el grupo de metilación alta y expresión bajas (grupo rojo) y uno de los dos grupos de expresión alta no se lograron identificar por el algoritmo de agrupamiento.

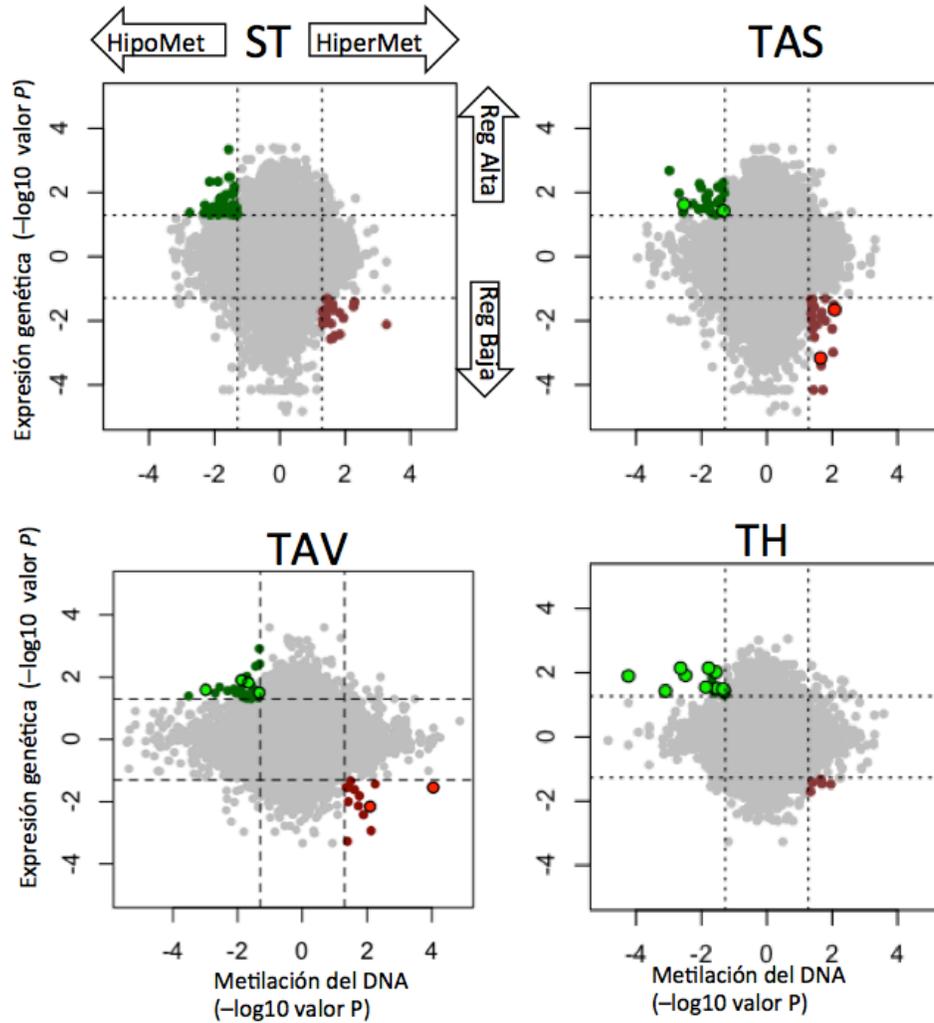
Una vez establecido el agrupamiento de los genes en el panorama epigenético, en el grupo control, contrastamos si este agrupamiento se conserva en los individuos con diabetes. Se puede observar que globalmente, el agrupamiento se conserva en todos los tejidos, aunque se presentan cambios sutiles en los agrupamientos (Fig. 12C). Por ejemplo, en TAV se presentó la mayor alteración en el gen *TPJ2* (del inglés tight junction protein 2,  $r = -0.5$ , Fig. 12D).



**Figura 12. Gráficas de la comparación del agrupamiento de datos en obesos diabéticos y no diabéticos.**

A. Gráficas de la comparación de expresión y metilación de DNA sin clasificar, los puntos negros representan los sitios CpG con el valor de expresión correspondiente al gen donde se encuentran. Los puntos resaltados en rojo en este panel representan CDMs en el tejido. B. Clasificación de los valores en los obesos sin diabetes, cada uno de los grupos clasificados en el tejido es representado por diferentes colores. C. Agrupamiento de los valores en los individuos con diabetes y obesidad utilizando la clasificación de los obesos sin diabetes. D. Análisis en TAV con énfasis en el gene *TJP2* donde se muestra una correlación de Pearson de -0.5 entre la expresión y la metilación en pacientes obesos. Los puntos con borde azul muestran el promedio del valor en obesos los puntos verdes con borde negro muestran los valores de pacientes obesos diabéticos.

Por otra parte, se utilizó una estrategia publicada por Noushmehr en el 2010[81], para identificar los genes que significativamente se encontraron alterados en expresión y metilación, donde se filtraron aquellos sitios que presentaran un valor  $p$  menor a 0.05 para las comparación de OND y OBD, en los cuatro tejidos, graficando los valores de la significancia de los cambios en metilación y expresión. Los sitios que cumplieron este requisito se muestran en la Fig.13. Varios de estos genes fueron previamente identificados como CDMs en este trabajo: *PSMD5* in ST; *DST*, *MGAT4C*, *LEP*, and *ZNF3* en TAS; *BRDT*, *PSG6*, *SLITRK1*, *AUH*, *CRISPLD1* y *PIB5PA* en TAV, y *SYT7*, *LTBR*, *CATSPER2*, *LPAL2*, *NCALD*, *ZDHHC11*, *LGTN*, *OXT* y *PRSS21* en TH. La listas completas por tejido de los genes que cumplen con el filtro menor a 0.05 son mostradas en las Tablas 13-16. El análisis de enriquecimiento de estos genes, siguiendo la estrategia descrita en los métodos, mostró que las vías relacionadas a regulación positiva de la función molecular en ST, organización mitocondrial en TAS, osificación en TAV y secreción en TH se encuentran alteradas. Las listas de enriquecimiento se muestran en la Tabla 17. Además, identificamos genes que se les ha atribuido un papel en fisiología de la enfermedad por ejemplo en inflamación encontramos genes como *CCL27* y *PSMD5* en ST; *TNFS11*, *CYP2J2* y *ALOX15* en TAV y en *LTRB* en TH, y en relación a la resistencia a la insulina o diabetes: *LEP* y *SCT* en TAS; *IGF2* en TAV; *NRG4*, *PLA2G2A* en TH.



**Figura 13. Comparación de las alteraciones en la expresión y metilación.**

Gráfica radial de puntos de la comparación de la metilación del DNA y la expresión génica significativa. Las líneas discontinuas indican un valor  $p$  de 0.05. Los puntos rojos indican genes que están significativamente regulados a la baja (RegBaja) e hipermetilados (HiperMet). Los puntos verdes indican genes que están significativamente regulados al alza (RegAlta) e hipometilados (HipoMet). Los CDMs identificados en el presente trabajo se destacan con un contorno negro y un tono mas claro.

## ***Discusión***

La obesidad y la diabetes son enfermedades complejas, con un origen multifactorial. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la vinculación entre DM2 y obesidad, entre los que destacan la inflamación crónica del tejido adiposo y la inducción de estrés en retículo endoplásmico [13,84]. Las evidencias actuales señalan que los mecanismos epigenéticos pueden tener un papel relevante en las enfermedades metabólicas, como la diabetes y obesidad, además que la epigenética está aportando nuevo conocimiento para entender la interacción gene-ambiente, por lo que entender este proceso es fundamental para dilucidar el riesgo incrementado a padecer diabetes en individuos con obesidad. En este estudio analizamos las alteraciones en la metilación del DNA en sangre, hígado y tejidos adiposo de pacientes obesos con diabetes comparado con un grupo de pacientes con obesidad sin diabetes, además documentamos la implicación de estas alteraciones sobre la expresión.

Al analizar la correlación de los perfiles globales de metilación del DNA, las muestras se agrupan por tipo de tejido, y no por individuo o por la presencia de DM2 (Fig. 4). Esto refuerza la idea de que las huellas epigenéticas son claves en la diferenciación celular y en el establecimiento de fenotipos especializados[85]. La correlación más alta entre los perfiles de metilación del DNA se presentó en tejidos adiposo subcutáneo y visceral, indicando el alto nivel de similitud funcional entre ellos. Además, se muestra que los cambios epigenéticos en DM2 no son alteraciones globales y permite agrupar por el tipo celular y no por la enfermedad (Fig. 4), a diferencia de lo que ocurre en otras enfermedades como cáncer, esto robustece la idea de que en enfermedades metabólicas las alteraciones se presentan en genes particulares y no en todo el epigenoma [86].

Por otra parte, una vez analizada la metilación diferencial observamos que los primeros 500 CpGs significativamente alterados en LT y los tejidos adiposos, son suficientes para distinguir los perfiles de metilación de los grupos con diabetes de los controles. Resultados similares se han reportado en páncreas, donde las alteraciones epigenéticas hace una clara discriminación de los pacientes con DM2[87]. Esta distinción también se ha reportado durante la resistencia a la insulina en el tejido adiposo visceral [88]. El tejido adiposo visceral mostró el número más grande de CDMs, así como los mayores niveles de cambio (Delta beta) de todos los tejidos analizados. Las menores alteraciones se encontraron en sangre, señalando la limitada utilidad de este tipo muestra en los estudios epigenéticos, como algunos autores

han puesto de manifiesto previamente [89]. El número limitado de CpGs en sangre se mantiene, inclusive después de la corrección por heterogeneidad celular probablemente por la participación secundaria en las alteraciones metabólicas de la sangre periférica. Además, se observó que, una mayor proporción de cambios hacia hipometilación, lo que previamente ha reportado [90,91]. Algunos, autores han propuesto que alteraciones en el metabolismo del ácido fólico en los individuos con diabetes pudieran estar relacionados con la reducción en los niveles de metilación en el DNA [92].

En este trabajo se identificaron nuevas alteraciones epigenéticas en genes que anteriormente se han relacionado con DM2 o sus complicaciones como: *LCAT* y *FOXA-2* ambos alterados en TAV. *LCAT* es una enzima clave para el metabolismo de HDL que su disminución correlaciona negativamente con los niveles de %Hb1Ac. Por otro lado *FOXA-2* participa en la diferenciación del adipocito por medio de la inducción de genes importantes para este proceso como *GLUT-4*, además se han encontrado variantes genéticas asociadas al riesgo en el gen y su expresión se asocia a la diferenciación de células beta pancreáticas [93–96] también en TH: *FGF21* y *PKD4*, que se han relacionado con la homeostasis de la glucosa hepática, funcionando como sensores del estado energético y participando en vías lipogénicas por medio de la regulación de miembros de la familia PPAR (gamma y alfa) [97–99]. Además, es importante resaltar que varios de los CDMs identificados están localizados en genes previamente reportados con metilación alterada del DNA en diabetes, como *IRS1*, *LEP*, *KCNQ1*, *PON1* y *ADIPOQ* [72,100,101]. Este resultado sugiere que ciertas marcas epigenéticas están presentes sin importar la etnicidad, ya que la mayoría de los estudios epigenómicos han sido realizados en población caucásica y este trabajo representaría una de las primeras evidencias para poblaciones latinoamericanas.

A pesar de que en su mayoría los CDMs que encontramos son específicos para cada tejido, inclusive entre los tejidos adiposos, varios CDMs fueron compartidos entre los tejidos, sobre todo entre el TAV y TH. Entre estos genes con los CDMs compartidos, encontramos a *SNX4*, proteína que participa en el tráfico intercelular, se ha reportado que interactúa con los receptores de insulina y leptina [102]; *ALOX12* que se ha propuesto como vínculo entre la DM2, obesidad e inflamación, se han reportado que los metabolitos de esta lipooxigenasa de ácido araquidónico tiene un papel relevante durante la diabetes y sus complicaciones en los diferentes tejidos como páncreas, riñón y tejido adiposo. En este último tejido se ha demostrado que metabolitos de las lipooxigenasas forman parte de los ligandos de PPAR-

gamma pieza fundamental en la adipogénesis [103]; además de *MIA2*, que se ha planteado como marcador de daño y regulador del metabolismo del colesterol en el hígado, regulando el tráfico de proteínas en retículo endoplasmático, este resultado pudiera estar relacionado a la dislipidemia presente en el grupo de los diabético de este estudio que presentan valores promedio superiores [104].

Interesantemente, los valores en unos pocos de estos genes muestran una correlación significativa entre el valor de metilación entre los tejidos y la sangre, en los genes *ALOX12*, *PSMD5* y *SLC9A2* (NHE2). La expresión y actividad de NHE2, que codifica para un intercambiador apical de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  con localización membranal, se ven disminuidas durante un estado inflamatorio esto podría relacionarse al estado general de inflamación de la obesidad y diabetes. Los sitios CpG con correlación podrían ser de utilidad como biomarcadores para conocer el estado de metilación de dichos órganos a partir de una muestra de sangre periférica. Una de las propuestas que se manejan para explicar esta alteración en espejo entre tejidos, es que las células son expuestas al mismo ambiente adverso que altera la metilación del DNA en los diferentes tejidos, aunque estas marcas sólo tiene un efecto en los tejidos donde le gen se encuentra activo y tiene una participación en las funciones del mismo[105,106]. En este estudio logramos identificar algunas marcas de este tipo y, dada su relevancia, se necesitan profundizar más en su estudio, para delimitar las regiones y los sitios CpG que en la sangre puedan reflejan el estado de metilación del DNA en otros tejidos.

En este trabajo se realizó un estudio preliminar comparando el estado de metilación de TAS en individuos normopeso e individuos OBD y OND. El mayor número de cambios fue mostrado en los pacientes con diabetes y obesidad, es de resaltar que los cambios en los pacientes OBD incluyen casi la totalidad de los cambios encontrados en los pacientes OND. Kirchner en el 2016 comparó estos mismos contrastes de pacientes en hígado y encontró que aproximadamente la mitad de las diferencias se compartían entre los dos contrastes [91], esto aunque en otro tejido fortalece la idea de que los cambios en la metilación por la obesidad pudieran ser un paso previo en la alteración de las metilación de la DM2. Varios de los genes hipermetilados previamente se encuentran reportados asociados al metabolismo de glucosa ó diferenciación del tejido adiposo como *PI3KCA* y *GSK3B*, como se muestra en la Fig. 9C [107,108].

Los resultados de la comparación con los pacientes NP nos sugieren que los cambios en la metilación asociados a la obesidad son un paso progresivo hacia la diabetes como

previamente se ha sugerido [68], una limitante del estudio es el bajo número de TAS en NP y la falta de los otros tejidos por lo que estos resultados en este contraste deben ser tomados con cautela. De igual manera, para comprender de una forma más completa el papel de los cambios epigenéticos sobre el metabolismo y el desarrollo de la diabetes en pacientes obesos serán necesarios estudios funcionales para conocer el posible impacto fisiológico de las alteraciones epigenéticas encontradas en este estudio.

Son pocos los datos publicados donde analizan la expresión alterada en tejidos relevantes para la resistencia a la insulina de pacientes con DM2. Una de las principales vías que se han encontrado alteradas a nivel de expresión genética son los procesos inflamatorios, en este trabajo también encontramos alteraciones en genes relacionados a estos procesos, en todos los tejidos analizados, *SOCS1* en ST; *CCL20* y *SLAMF1* en TAS; *ALOX15* en TAV y *PLA2G2A* en TH. Es así que, este trabajo aporta mayor evidencia de que la inflamación crónica y sistémica parece ser una característica de la diabetes, como otros han sugerido previamente [92,109,110]. Otras vías importantes, como adipogénesis, puede estar también alterada, ya que encontramos genes que participan en este proceso en TAS (*AMFR*) y en TAV (*AMFR*, *ALOX15* y *FOSB*). De hecho, la sobreexpresión de *AMFR* se encontró en 3 tejidos (ST, TAS y TAV) y se encontró una correlación entre los valores de expresión de TAS y ST, por lo que es un biomarcador factible de expresión, para el estado metabólico del tejido adiposo subcutáneo. En ratones “knockout” para el receptor *AMFR*, se ha visto que están protegidos de las alteraciones, en el metabolismo de lípidos y resistencia a la insulina, inducidas por una dieta obesogénica, la inhibición *in vitro* *AMFR* mostró que disminuía la expresión del factor de transcripción C/EBP-alfa que junto con PPAR-gamma son pieza fundamental de la diferenciación del adipocito [111].

La consecuencia directa de las alteraciones en metilación del DNA, es que pueden conducir a desregulación en la transcripción y, a la fecha, no existe un catálogo de sitios CpG donde la alteración en la metilación induzca una desregulación de la expresión en cada gen, en cada tejido en particular, además que es un campo con gran interés. En este trabajo, primeramente se describió el comportamiento general de la relación metilación-expresión (Fig. 11). Se observó que los mayores cambios en la metilación ocurren en regiones con metilación intermedia, esto podría estar indicando que los sitios con valores extremos en la metilación (cerca de 0 ó 1) están protegidos de la alteración (Fig. 12A) por lo que nos podría sugerir que los niveles extremos están protegidos de cambios.

Al realizar el análisis de agrupamiento nosotros describimos, por primera vez, una estrategia bioinformática que permite identificar de manera estadística los grupos a los que pertenece cada gene en relación a los niveles de metilación (hipometilado, metilación intermedia o hipermetilado) y de expresión (sobrexpresado o subexpresado) (Figura 12B). Previamente se han establecido puntos de corte arbitrarios, para delimitar los grupos a los que pertenecen los genes según sus niveles de metilación o expresión [112,113], por lo que la nueva estrategia que se propone en este trabajo eliminaría el sesgo, al usar grupos formados por densidad de datos, cuyos límites se establecen por el propio comportamiento de los mismos.

El definir los patrones generales de metilación ha ayudado a entender posibles interacciones con otras marcas epigenéticas, por ejemplo con las modificaciones de las histonas, lo que podría relacionarse con la organización de la cromatina. En la región de genes hipometilados, se encontraron varios tipo de comportamientos en relación a su expresión, ya que encontramos genes altamente expresados y otros apagados o de baja expresión, lo que refleja que un estado de desmetilación, es una condición necesaria pero no es suficiente para que un gene se exprese, además de que entre los genes desmetilados se encuentran genes que son activables bajos ciertas condiciones celulares y no pueden apagarse de manera constitutiva.

De manera general, observamos que la estructura de los grupos en los datos de los pacientes con DM2 (Fig. 12C) se conserva al comparar la estructura encontrada en los obesos sin diabetes (Fig.12B). Los cambios que se presentan cambios en todos los tejidos de los pacientes con DM2, que si bien suceden en niveles moderados, se observan en varios genes con relevancia en la DM2, lo que apoya la hipótesis que durante las enfermedades complejas, participan múltiples genes que contribuyen con en el fenotipo final.

Bajo la estrategia de identificar genes cuyo cambio los alejara de sus grupos respectivos, se identificaron genes entre los que se encuentra *TJP2* en TAV. La inhibición de la expresión de este gene, también conocido como *ZO-2*, se ha asociado a una incremento en la función de GSK3-beta, por medio de disminución de la fosforilación de la cinasa, en otro estudio se comprobó que la inhibición selectiva de GSK3-beta disminuye la resistencia a la insulina en músculo[82,83]. En este trabajo *TJP2* se encontró hipermetilado y apagado durante la DM2 lo que podría estar incrementando la función de GSK3-beta y asociarse a la RI de los individuos con DM2. Esta estrategia bioinformática de agrupamiento de genes se ha comenzado a

emplear en un modelo de cáncer, donde se ha logrado identificar un número mayor de cambios con correlaciones funcionales importantes (datos no publicados).

Por otra parte, al correlacionar los cambios significativos en metilación y expresión se identificaron varios genes que participan en adipogénesis, inflamación y resistencia a la insulina. Estas vías han sido estudiadas y propuestas como vínculos entre obesidad y la DM2. Dentro de estos genes nosotros encontramos genes como *LEP*, *KCNQ1* y *IGF2*. También encontramos uno de los genes más reportados con alteración en metilación, *KCNQ1* [75,114–117]. Es importante resaltar que al estar analizando pacientes obesos las diferencias epigenéticas podrían señalar alteraciones fisiológicas propias de la diabetes en presencia de la obesidad, por lo que son necesarios más estudios en individuos en pacientes con normopeso con presencia y ausencia de diabetes.

Otro grupo de genes que identificamos como alterados fueron aquellos que participan en el almacenamiento de grasa. Se ha propuesto que una característica de individuos con alto riesgo a enfermedades metabólicas es la acumulación ectópica de grasa independiente del IMC [118]. En fechas recientes, se reportó que en el hígado de pacientes diabéticos existe una alteración en metilación del DNA en genes que participan en lipogénesis [91]. De los genes que encontramos alterados en metilación del DNA y expresión génica se encuentran *ALOX15*, *OPRM1*, *NRG4* y *SCT*. Estos genes tienen un demostrado papel en el mantenimiento del tejido adiposo, pero no hay informes previos a este donde se reporte la alteración epigenética de estos genes en DM2.

Además nosotros también documentamos genes que participan en la inflamación como *SOCS1* en ST; *CCL20* y *SLAMF1* en TAS; *ACP5*, *FOS* y *JUN* en TAV; y *PLA2G2A* en TH, proceso que ha sido ampliamente relacionado con la RI. Lo que nos haría suponer que los obesos que desarrollan diabetes no lograron contener con la inflamación crónica y que posiblemente los genes que encontramos como alterados podrían estar programados desde etapas anteriores, aunque faltarían estudios longitudinales para corroborar esta hipótesis.

Al comparar las dos estrategias seguidas para encontrar los genes alterados en metilación y expresión encontramos que en ambas estrategias podemos identificar genes con participación en la DM2, la estrategia de Noushmehry cols. se enfoca principalmente en la identificación de los sitios con alteración significativa, y nuestra estrategia se enfoca en el grado del cambio. Además con la estrategia de agrupamiento podemos identificar genes que

podrían estar participando en la DM2 y no han sido tan ampliamente estudiados (*TJP2* y *PSMD5*), caso contrario de la estrategia de Noushmehry donde encontramos genes altamente reportados como *IGF2*, *KCNQ1* y *LEP*. Es así que la herramienta bioinformática diseñada en este estudio podrá a encontrar nuevas asociaciones de cambios epigenéticos en las enfermedades.

## ***Conclusiones***

El presente trabajo aporta un catalogo de genes afectados con metilación DNA alterada en sangre, hígado y tejido adiposo (subcutáneo y visceral). Nuestros resultados demuestran que la metilación alterada del DNA puede impactar directamente en la transcripción, alterando consecuentemente varias vías relacionadas con los procesos metabólicos involucrados en la etiopatogénesis DM2. Este trabajo presenta nuevas evidencias de que la alteración de la metilación del DNA es un mecanismo que afecta estos procesos en individuos con obesidad que desarrollan DM2. Es así que los datos disponibles sugieren que la metilación alterada de los genes implicados en el metabolismo celular podría ser una parte crucial de los mecanismos detrás de la comorbilidad de las enfermedades metabólicas. Se necesitan más estudios para integrar los datos genéticos y epigenéticos disponibles para mejorar nuestra comprensión de la interacción entre los mecanismos genéticos y ambientales en relación con el desarrollo de rasgos complejos, como DM2.

## ***Perspectivas***

1. Validar los posibles biomarcadores encontrados en sangre que reflejan alteración en los tejidos en una muestra independiente de individuos, utilizando otro tipo de tecnología puntual como la secuenciación de siguiente generación acoplada a conversión por bisulfito.
2. Comprobar si la alteración en la metilación y expresión tiene una repercusión a nivel funcional, por medio del cambio de los niveles de metilación con la edición genética como CRISPR/Cas9 y así comprobar si las alteraciones en metilación tiene un reflejo a nivel de vías metabólicas .
3. Debido a que los cambios epigenéticos son reversibles es interesante pensar que estas alteraciones son reversibles por lo que es necesario un estudio donde se compruebe esta remodelación.

## Referencias

1. International Diabetes Federation. 8th Report. Int. Diabetes Fed. 2017.
2. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36:67-74.
3. Billeter AT, Scheurlen KM, Probst P, Eichel S, Nickel F, Kopf S, et al. Meta-analysis of metabolic surgery versus medical treatment for microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Br. J. Surg. England*; 2018;105:168-81.
4. Sterns JD, Smith CB, Steele JR, Stevenson KL, Gallicano GI. Epigenetics and type II diabetes mellitus: underlying mechanisms of prenatal predisposition. *Front. cell Dev. Biol.* [Internet]. 2014;2:15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4207047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-Specific Insulin Signaling, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* [Internet]. 2012;32:2052-9. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.111.241919>
6. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.
7. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, Schönfels W von, Ahrens M, et al. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2014;201412759. Available from: <http://www.pnas.org/content/early/2014/10/10/1412759111%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313081>
8. Shamim I. Ahmad, BSe, MSe P. *Diabetes An Old Disease, a New Insight* Edited. 2013.
9. Shetty GK, Barb D, Mantzoros CS. Nutrients and Peripherally Secreted Molecules in Regulation of Energy Homeostasis. *Contemp. Diabetes Obes. Diabetes*.
10. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature. England*; 2001;414:799-806.
11. Mulvihill EE. Dipeptidyl peptidase inhibitor therapy in type 2 diabetes: Control of the incretin axis and regulation of postprandial glucose and lipid metabolism. *Peptides. United States*; 2018;100:158-64.
12. Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. *Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon*. *Diabetes Spectr.* 2004;17:183-90.
13. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;148:852-71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412002176>

14. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: A 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;2:56–64. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70112-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70112-8)
15. Duque-Guimarães DE, Ozanne SE. Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences. *Trends Endocrinol. Metab.* [Internet]. Elsevier; 2018;24:525–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.006>
16. Jiménez Corona A, Rojas Martínez R, Villalpando S, Barquera S, Aguilar Salinas C. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. *Insp* [Internet]. 2012;1–4. Available from: <http://ensanut.insp.mx/doctos/seminario/M0302.pdf>
17. Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;125:259–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.024>
18. American Diabetes Association (ADA). Standard of medical care in diabetes - 2017. *Diabetes Care.* 2017;40 (sup 1):s4–128.
19. Jiménez Corona A, Rojas Martínez R, Villalpando S, Barquera S, Aguilar Salinas C. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. *Insp.* 2012;1–4.
20. No Title [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/media/dpk/diseases-and-conditions/native-americans-diabetes/native-americans-diabetes.html>
21. Poulsen P, Ohm Kyvik K, Vaag a., Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance - A population-based twin study. *Diabetologia.* 1999;42:139–45.
22. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;461:747–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08494>
23. Böttcher Y, Kovacs P, Tönjes a, Stumvoll M. Genetics of type 2 diabetes. *Internist (Berl).* [Internet]. 2005;46:741–2, 744–6, 748–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3746083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Nielsen J, Holmberg H-C, Schrøder HD, Saltin B, Ørtenblad N. Human skeletal muscle glycogen utilization in exhaustive exercise: role of subcellular localization and fibre type. *J. Physiol.* [Internet]. Blackwell Science Inc; 2011;589:2871–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3112561/>
25. Vares G, Wang B, Ishii-ohba H, Nenoï M, Nakajima T. Diet-Induced Obesity Modulates Epigenetic Responses to Ionizing Radiation in Mice. 2014;9.
26. Zuberi AR, Townsend L, Patterson L, Zheng H, Berthoud H-R. Increased adiposity on normal diet, but decreased susceptibility to diet-induced obesity in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* [Internet]. 2008;585:14–23. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2430069&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

27. Mattei J, Malik V, Wedick NM, Hu FB, Spiegelman D, Willett WC, et al. Reducing the global burden of type 2 diabetes by improving the quality of staple foods: The Global Nutrition and Epidemiologic Transition Initiative. *Global. Health [Internet]. Globalization and Health*; 2015;11:23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4489001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

28. Casagrande SS, Sotres-Alvarez D, Aviles-Santa L, O'Brien MJ, Palacios C, Perez CM, et al. Variations of dietary intake by glycemic status and Hispanic/Latino heritage in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL). *BMJ open diabetes Res. care. England*; 2018;6:e000486.

29. Ley SH, Ardisson Korat A V., Sun Q, Tobias DK, Zhang C, Qi L, et al. Contribution of the Nurses' Health Studies to Uncovering Risk Factors for Type 2 Diabetes: Diet, Lifestyle, Biomarkers, and Genetics. *Am. J. Public Health [Internet]*. 2016;106:1624–30. Available from: <http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.2016.303314>

30. Girard J, Lafontan M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes Metab. [Internet]*. 2008;34:439–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1262363608000943>

31. Despres J-P. Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease: An Update. *Circulation [Internet]*. 2012;126:1301–13. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067264>

32. Sattar N, Gill JM. Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Med. [Internet]*. 2014;12:123. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/12/123>

33. James WPT. WHO recognition of the global obesity epidemic. *Int. J. Obes. (Lond). England*; 2008;32 Suppl 7:S120-6.

34. Alcalde-Rabanal JE, Orozco-Núñez E, Espinosa-Henao OE, Arredondo-López A, Alcaide-Barranco L. The complex scenario of obesity, diabetes and hypertension in the area of influence of primary healthcare facilities in Mexico. *PLoS One [Internet]*. 2018;13:e0187028. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0187028>

35. Al-Hamodi Z, Al-Habori M, Al-Meerri A, Saif-Ali R. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetol. Metab. Syndr. [Internet]*. 2014;6:99. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4177707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

36. Coppari R, Bjørnbæk C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov. [Internet]*. 2012;11:692–708. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3757>

37. Seoane-Collazo P, Ferno J, Gonzalez F, Dieguez C, Leis R, Nogueiras R, et al.

Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*. United States; 2015;50:276–91.

38. Buechler C, Krautbauer S, Eisinger K. Adipose tissue fibrosis. *World J. Diabetes* [Internet]. 2015;6:548–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25987952>

39. Domingos MAM, Queiroz M, Lotufo PA, Bensenor IJ, Titan SM de O. Serum RBP4 and CKD: Association with insulin resistance and lipids. *J. Diabetes Complications*. United States; 2017;31:1132–8.

40. Hojlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan. Med. J. Denmark*; 2014;61:B4890.

41. Frankenberg AD von, Reis AF, Gerchman F. Relationships between adiponectin levels, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes: a literature review. *Arch. Endocrinol. Metab. Brazil*; 2017;61:614–22.

42. Soronen J, Laurila P-P, Naukkarinen J, Surakka I, Ripatti S, Jauhiainen M, et al. Adipose tissue gene expression analysis reveals changes in inflammatory, mitochondrial respiratory and lipid metabolic pathways in obese insulin-resistant subjects. *BMC Med. Genomics* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012;5:9. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1755-8794/5/9>

43. Shulman GI. Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 2014;371:1131–41. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1011035>

44. Seki E, Brenner DA, Karin M. A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology* [Internet]. 2012;143:307–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508512008207>

45. Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The Genetic and Epigenetic Basis of Type 2 Diabetes and Obesity. *Clin. Pharmacol. Ther.* [Internet]. 2012;92:707–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/clpt.2012.149>

46. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton KJ, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* [Internet]. 2016;536:41–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature18642>

47. Grotz AK, Gloyn AL, Thomsen SK. Prioritising Causal Genes at Type 2 Diabetes Risk Loci. *Curr. Diab. Rep.* United States; 2017;17:76.

48. Williams AL, Jacobs SBR, Moreno-Macias H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C, Marquez-Luna C, et al. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*. England; 2014;506:97–101.

49. Mercader JM, Liao RG, Bell AD, Dymek Z, Estrada K, Tukiainen T, et al. A Loss-of-Function Splice Acceptor Variant in IGF2 Is Protective for Type 2 Diabetes. *Diabetes*. United States; 2017;66:2903–14.

50. Loos RJF, Janssens ACJW. Predicting Polygenic Obesity Using Genetic Information. *Cell Metab.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;25:535–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.013>
51. Yokoi N. Epigenetic dysregulation in pancreatic islets and pathogenesis of type 2 diabetes. *J. Diabetes Investig. Japan*; 2017;
52. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;28:1057–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944598>
53. Lim DHK, Maher ER. DNA methylation : A form of epigenetic control of gene expression. *Obstet. Gynaecol.* 2010;12:37–42.
54. Felsenfeld G. A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* [Internet]. 2014;6:a018200–a018200. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a018200>
55. De Rosa S, Arcidiacono B, Chiefari E, Brunetti A, Indolfi C, Foti DP. Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. [Internet]. 2018;9:2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00002/full>
56. Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod. Toxicol. United States*; 2005;20:345–52.
57. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:17046–9.
58. Siebel AL, Fernandez AZ, El-Osta A. Glycemic memory associated epigenetic changes. *Biochem. Pharmacol.* [Internet]. 2010;80:1853–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295210004399>
59. Gillette TG, Hill JA. Readers, Writers, and Erasers. *Circ. Res.* 2015;116:1245–53.
60. Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat. Publ. Gr.* [Internet]. Nature Publishing Group; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.83>
61. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2013;38:23–38. Available from: <http://www.nature.com/articles/npp2012112>
62. Gillette TG, Hill JA. Readers, Writers, and Erasers. *Circ. Res.* [Internet]. 2015;116:1245–53. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1249098>
63. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, et al. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinformatics* [Internet]. 2014;30:428–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt684>

64. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* [Internet]. 2015;517:321–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14192>
65. Song CX, Yi C, He C. Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group; 2012;30:1107–16.
66. Song CX, Yi C, He C. Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nat. Biotechnol.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;30:1107–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2398>
67. Ronn T, Volkov P, Gillberg L, Kokosar M, Perfilyev A, Jacobsen AL, et al. Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum. Mol. Genet. England*; 2015;24:3792–813.
68. Brennan K, Mi J, Haile RW, Hitchins MP. A systematic review of studies of DNA methylation in the context of a weight loss intervention. 2017;9:769–87.
69. Mendelson MM, Marioni RE, Joehanes R, Liu C, Hedman ÅK, Aslibekyan S, et al. Association of Body Mass Index with DNA Methylation and Gene Expression in Blood Cells and Relations to Cardiometabolic Disease: A Mendelian Randomization Approach. Lewis C, editor. *PLoS Med.* San Francisco, CA USA: Public Library of Science; 2017;14:e1002215.
70. Rönn T, Poulsen P, Hansson O, Holmkvist J, Almgren P, Nilsson P, et al. Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 2008;51:1159–68.
71. Nilsson E, Jansson PA, Perfilyev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2014;63:1–927. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812430>
72. Houde A-A, Légaré C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, et al. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med. Genet.* [Internet]. ???; 2015;16:29. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/16/29>
73. Canivell S, Ruano EG, Sis??-Almirall A, Kostov B, Gonz??lez-De Paz L, Fernandez-Rebollo E, et al. Differential Methylation of TCF7L2 promoter in peripheral blood DNA in newly diagnosed, drug-na??ve patients with type 2 diabetes. *PLoS One.* 2014;9.
74. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, et al. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Differences in Muscle and Fat from Monozygotic Twins Discordant for Type 2 Diabetes. *PLoS One* [Internet]. 2012;7:e51302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051302><http://www.plosone.org/article/attachment.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0051302&representation=PDF>
75. Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, et al. A Six Months Exercise

Intervention Influences the Genome-wide DNA Methylation Pattern in Human Adipose Tissue. *PLoS Genet.* 2013;9.

76. Chen C, Grennan K, Badner J, Zhang D, Gershon E, Jin L, et al. Removing Batch Effects in Analysis of Expression Microarray Data: An Evaluation of Six Batch Adjustment Methods. Kliebenstein D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011;6:e17238. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0017238>

77. Du P, Kibbe WA, Lin SM. lumi: A pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics.* 2008;24:1547–8.

78. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008;4:44–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

79. Fraley C, Raftery AE. MCLUST Version 3 for R : Normal Mixture Modeling and. Tech. Rep. No. 504. 2006;Department:1–57.

80. Scrucca L, Fop M, Murphy TB, Raftery AE. mclust 5: Clustering, Classification and Density Estimation Using Gaussian Finite Mixture Models. *R J.* [Internet]. 2016;8:289–317. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5096736/>

81. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;17:510–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>

82. Walsh T, Pierce SB, Lenz DR, Brownstein Z, Dagan-Rosenfeld O, Shahin H, et al. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *Am. J. Hum. Genet.* [Internet]. The American Society of Human Genetics; 2010;87:101–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.05.011>

83. Henriksen EJ, Dokken BB. Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr. Drug Targets.* United Arab Emirates; 2006;7:1435–41.

84. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* [Internet]. 2006;444:840–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature05482>

85. Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* [Internet]. 2015;518:317–30. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature14248>

86. Fermín I MY, J Alfredo MH. Epigenética en obesidad y diabetes tipo 2: papel de la nutrición, limitaciones y futuras aplicaciones. *Rev. Chil. endocrinol. diabetes.* 2013;6:108–14.

87. Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J.* [Internet]. 2012;31:1405–26. Available from: <http://emboj.embopress.org/content/31/6/1405.abstract>

88. Arner P, Sahlqvist AS, Sinha I, Xu H, Yao X, Waterworth D, et al. The epigenetic signature of systemic insulin resistance in obese women. *Diabetologia* [Internet]. *Diabetologia*; 2016;1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-016-4074-5>
89. Huang Y-T, Chu S, Loucks EB, Lin C-L, Eaton CB, Buka SL, et al. Epigenome-wide profiling of DNA methylation in paired samples of adipose tissue and blood. *Epigenetics* [Internet]. 2016;11:227–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2016.1146853>
90. Zhao R, Zhang R, Li W, Liao Y, Tang J, Miao Q, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in discordant sib pairs with alcohol dependence. *Asia-Pacific Psychiatry*. 2013;5:39–50.
91. Kirchner H, Sinha I, Gao H, Ruby MA, Schönke M, Lindvall JM, et al. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Mol. Metab.* [Internet]. Elsevier GmbH; 2016;5:171–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2015.12.004>
92. Kirchner H, Sinha I, Gao H, Ruby MA, Schönke M, Lindvall JM, et al. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Mol. Metab.* [Internet]. Elsevier GmbH; 2016;5:171–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877815002343>
93. Koren-Gluzer M, Aviram M, Meilin E, Hayek T. The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates  $\beta$ -cell insulin release. *Atherosclerosis* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2011;219:510–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.119>
94. Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH. *Foxa2* regulates multiple pathways of insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 2004;114:512–20.
95. Nakhjavani M, Morteza A, Karimi R, Banihashmi Z, Esteghamati A. Diabetes induces gender gap on LCAT levels and activity. *Life Sci.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;92:51–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.10.026>
96. Wolfrum C, Shih DQ, Kuwajima S, Norris AW, Kahn CR, Stoffel M. Role of *Foxa-2* in adipocyte metabolism and differentiation. *J. Clin. Invest.* 2003;112:345–56.
97. Tao R, Xiong X, Harris RA, White MF, Dong XC. Genetic inactivation of pyruvate dehydrogenase kinases improves hepatic insulin resistance induced diabetes. *PLoS One* [Internet]. 2013;8:e71997. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3733847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
98. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KSL. Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: Clinical perspectives. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2013;78:489–96.
99. Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr. Metab.* [Internet]. *Nutrition & Metabolism*; 2014;11:1–9. Available from: *Nutrition & Metabolism*

100. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea R a, et al. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol.* [Internet]. 2015;16:8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651499><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4301800>
101. Dayeh T, Volkov P, Salö S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Human Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Donors Identifies Candidate Genes That Influence Insulin Secretion. *PLoS Genet.* 2014;10.
102. Haft CR, de la Luz Sierra M, Barr V a, Haft DH, Taylor SI. Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:7278–87.
103. Lieb DC, Brotman JJ, Hatcher M a, Aye MS, Cole BK, Haynes B a, et al. Adipose Tissue 12/15 Lipoxygenase Pathway in Human Obesity and Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* [Internet]. 2014;99:jc20134461. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jc.2013-4461>
104. Pitman JL, Bonnet DJ, Curtiss LK, Gekakis N. Reduced cholesterol and triglycerides in mice with a mutation in Mia2, a liver protein that localizes to ER exit sites. *J. Lipid Res.* [Internet]. 2011;52:1775–86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3173003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
105. Gillberg L, Ling C. The potential use of DNA methylation biomarkers to identify risk and progression of type 2 diabetes. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* [Internet]. 2015;6:43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4378313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
106. Martínez JA, Milagro FI, Claycombe KJ, Schallinske KL. Epigenetics in Adipose Tissue , Obesity , Weight Loss , and Diabetes 1 , 2. *Diabetes.* 2014;71–81.
107. Nelson VLB, Jiang Y-P, Dickman KG, Ballou LM, Lin RZ. Adipose tissue insulin resistance due to loss of PI3K p110 $\alpha$  leads to decreased energy expenditure and obesity. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* Bethesda, MD: American Physiological Society; 2014;306:E1205–16.
108. Leng S, Zhang W, Zheng Y, Liberman Z, Rhodes CJ, Eldar-Finkelman H, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta mediates high glucose-induced ubiquitination and proteasome degradation of insulin receptor substrate 1. *J. Endocrinol. England;* 2010;206:171–81.
109. Baranova A, Collantes R, Gowder SJ, Elariny H, Schlauch K, Younoszai A, et al. Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obes. Surg.* 2005;15:758–65.
110. Das SK. Global Gene Expression Profiles of Subcutaneous Adipose and Muscle From Glucose-Tolerant, Insulin-Sensitive, and Insulin-Resistant Individuals Matched for BMI. 2011;60:1–11.

111. Liu TF, Tang JJ, Li PS, Shen Y, Li JG, Miao HH, et al. Ablation of gp78 in liver improves hyperlipidemia and insulin resistance by inhibiting SREBP to decrease lipid biosynthesis. *Cell Metab.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;16:213–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.014>
112. Smith ZD, Chan MM, Humm KC, Karnik R, Mekhoubad S, Regev A, et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature.* 2014;511:611–5.
113. Nobeyama Y, Nakagawa H. Aberrant DNA Methylation in Keratoacanthoma. *PLoS One* [Internet]. 2016;11:e0165370. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0165370>
114. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, et al. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol.* [Internet]. 2015;16:8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4301800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
115. Nilsson E, Matte A, Perfilyev A, de Mello VD, Käkälä P, Pihlajamäki J, et al. Epigenetic alterations in human liver from subjects with type 2 diabetes in parallel with reduced folate levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* [Internet]. 2015;jc.2015-3204. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jc.2015-3204>
116. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, et al. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Differences in Muscle and Fat from Monozygotic Twins Discordant for Type 2 Diabetes. *PLoS One.* 2012;7.
117. Travers ME, Mackay DJG, Nitert MD, Morris AP, Lindgren CM, Berry A, et al. Insights into the molecular mechanism for type 2 diabetes susceptibility at the KCNQ1 locus from temporal changes in imprinting status in human islets. *Diabetes.* 2013;62:987–92.
118. Stefan N, Häring HU, Hu FB, Schulze MB. Metabolically healthy obesity: Epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013;1:152–62.

# Anexos

## Autorización de los comités de investigación

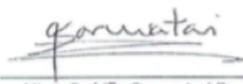
		
<b>EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA</b>		
<p>Con fundamento en lo dispuesto por los artículos 41 Bis, 98 y 100 de la Ley General de Salud; 14 fracción VII, 98-112 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud; 37 del Estatuto Orgánico del INMEGEN y de conformidad a su propio Manual de Funcionamiento, emite el presente dictamen:</p>		
<i>Título del Proyecto:</i>	IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD PARA DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OBESIDAD, MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE PERFILES DE EXPRESIÓN, EPIGENÓMICOS Y METABOLÓMICOS.	
<i>Dirigido al Investigador Responsable:</i>	-DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO -DRA. ANGÉLICA GRACIELA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ	
<i>Objetivo del Proyecto:</i>	Identificar de biomarcadores de susceptibilidad y gravedad para diabetes mellitus tipo 2 y obesidad	
<i>Documentos sometidos a Revisión:</i>	• Solicitud del investigador responsable para renovación de dictamen CE 2011/20	
<i>No. de Dictamen:</i>	CEI 2016/30	
<i>Fecha de elaboración del dictamen:</i>	12 de septiembre de 2016	
<i>Tipo de Documento:</i>	Renovación de Dictamen Aprobatorio	

**CONSIDERACIONES DE LOS INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN (CEI-INMEGEN)**

El Investigador Responsable solicitó la prórroga del Dictamen CE 2011/20 del 22 de septiembre de 2011, por lo que el CEI-INMEGEN, enterado de que no ha habido ninguna eventualidad que modifique el objetivo y justificación del Proyecto, acuerda emitir la presente **Renovación del Dictamen**, la cual tendrá validez de un año a partir de la presente fecha, debiéndose solicitar una prórroga un mes antes de su vencimiento.

El CEI-INMEGEN se reserva el derecho de hacer revisiones periódicas cuando así lo estime pertinente, para salvaguardar los derechos de los participantes.

**Atentamente,**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INMEGEN**

  
Mtra. Garbiñe Saruwatari Zavala


C.c.p.: -Dr. Juan Enrique Morett Sánchez – Presidente del Comité de Investigación del INMEGEN. Presente.  
-Lic. Teresa García de la Torre – Secretaria Técnica del Comité de Investigación del INMEGEN. Presente.

Perifoneo Sur No. 4809, Col. Arenal Tepicpan, Delegación Tlalpan, México, D.F., C.P. 14610.  
T.E. - 57 7051 4143 1990 T.Fax - 57 7051 4140 1940 www.inmegen.mx



CDMX  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
190 años

México, D. F. 15 de septiembre de 2015  
Oficio No. SSDF/DGPCS/DEI/SECI/JUDI/1720/15  
ASUNTO: Dictamen de protocolo de investigación.

DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO  
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN MÉDICA  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA  
Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan  
Delegación Tlalpan, C.P. 14610

En relación con el proyecto de investigación titulado **"IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD Y GRAVEDAD PARA DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OBESIDAD, MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE PERFILES DE EXPRESIÓN, EPIGENÓMICOS Y METABOLÓMICOS"**, que remite para evaluación de procedencia, le comunico que la decisión del Comité de Ética en Investigación de la Secretaría de Salud del Distrito Federal, lo considera de información relevante y de riesgo mayor al mínimo (por la toma de biopsia de hígado). Por lo que se considera: **aceptada con modificaciones y para su realización debe realizarse previamente los cambios solicitados en la Nota Técnica, asignándole el número de registro: 212-010-14-15.**

En ese sentido y con el propósito de brindar un mejor apoyo a sus actividades, debo señalarles que los apoyos que solicite para su proyecto, deben ser gestionados directamente en la Unidad de Atención que se requiera, ante el titular que corresponda, quién decidirá libremente la participación de su unidad, de la misma manera que el personal operativo que deseé involucrarse, considerando como prioridad el servicio y la atención a los usuarios.

ATENTAMENTE,



DR. IGNACIO CARRANZA ORTÍZ.  
PRESIDENTE. DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
c.c.p. Dr. Francisco de Jesús Moreno Rodríguez.- Director del Hospital General Tlalpuac - presente.  
c.c.p. Dra. Raquel Gómez Guerrero.- Jefa de Enseñanza e Investigación del Hospital General Tlalpuac - presente.  
c.c.p.- Archivo  
FLRRMM.



SECRETARÍA DE SALUD  
Dirección General de Planeación y Coordinación Estratégica  
Dirección de Educación e Investigación  
Subdirección de Educación Continua e Investigación  
Jefatura de Unidad Departamental de Investigación  
Atlixco No. 22, 2º. Piso, Col. Xicoatlaco, 06716  
Bando Juárez, Tel.: 51 32 12 09 Ext. 12132 y 12135  
www.salud.gob.mx

## Carta de consentimiento informado



### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



México D. F., a

Día	Mes	Año

A quien corresponda:

Yo \_\_\_\_\_ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio de "Identificación de biomarcadores de susceptibilidad y gravedad para diabetes mellitus tipo 2 y obesidad, mediante la caracterización de perfiles de expresión, epigenómicos y metabólicos", que se realiza en esta institución y cuyos objetivos consisten en: caracterizar los mecanismos moleculares comunes y específicos de la DM2 y la obesidad, para así identificar aquellos biomarcadores que propician o protegen a su desarrollo.

Estoy consciente de que los procedimientos, pruebas y tratamientos para lograr los objetivos mencionados consisten en que:

1. En la toma de 3 mL sangre venosa del brazo la cual \_\_\_\_\_, los riesgos son la posible parición de un hematoma.
2. Durante la cirugía se tomará 1 gr de tejido adiposo visceral la cual \_\_\_\_\_, 1 gr de tejido adiposo subcuáneo la cual \_\_\_\_\_ y 0.5 gramos de hígado la cual \_\_\_\_\_, mismos que serán tomados por el cirujano.

También se que entre los posibles riesgos y efectos para mi persona pueden estar:

1. La posibilidad de presentarse sangrados mismos serán atendidos por los cirujanos en el momento de la cirugía

Entiendo que del presente estudio no se derivarán beneficios directos, debido a que los resultados obtenidos serán manejados siempre como grupo de pacientes. Únicamente en el caso de que se encontrara alguna alteración que éticamente requiriera informarse o que la ciencia médica descubra con esta investigación se le contactará al participante para informarle.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de esta investigación en el momento que yo así lo desee. También que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio.

**Entiendo que mi información personal será manejada con las reservas que establece la normatividad vigente en materia de protección de datos personales.**

Así mismo, cualquier trastorno temporalmente relacionado con esta investigación podré consultarlo con Dr. Carlos Zerweck López Av. La Turba 655, Col. Villa Centro Americana y del Caribe Tláhuac, C.P. 13278 Distrito Federal, quien comunicará el evento a la Dirección de Educación e Investigación de la SSDF, en donde se decidirá la necesidad de convocar al investigador principal y al Cuerpo Colegiado competente para su resolución.

En caso de que decidiera retirarme, la atención que como paciente recibo en esta institución no se verá afectada.

Nombre.	Firma:
(En caso necesario, datos del padre, tutor o representante legal)	
Domicilio.	Teléfono

Nombre y firma del testigo.	Firma:
Domicilio.	Teléfono

Nombre y firma del testigo.	Firma.
Domicilio.	Teléfono

Nombre y firma del Investigador responsable.	Firma.
Domicilio.	Teléfono

c. c. p. Paciente o familiar  
c. c. p. Investigador (conservar en el expediente de la investigación).

## Hoja de recolección de datos



### HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS (OD-01) PROYECTO DE INVESTIGACIÓN OBESIDAD Y DIABETES

Instituto de referencia : Clínica de Obesidad	Fecha: / / (dd/mm/aa/)
Tipo de muestra: Sangre periférica, Tejido adiposo subcutáneo y Visceral	Código de muestra:

1: Datos Generales del paciente		
Nombre del Paciente :	Sexo: M <input type="radio"/> F <input type="radio"/>	Fecha de nacimiento:
	Edad:	
Lugar de nacimiento:		
Domicilio :		
Teléfono:	Edo. Civil:	

2: Lugar de nacimiento de Familiares	
Padre	
Madre	
Abuelo Paterno	
Abuela Paterna	
Abuelo Materno	
Abuela Materna	

3: Antropometría	
Peso(Kg)	
Talla(cm)	
IMC	
C. Cintura (cm)	
C. Cadera (cm)	
Índice Cintura/cadera	
Presión Diástole	
Presión Sístole	

4: Antecedentes personales	Si	No
Tabaquismo		
No. Cigarros por día: _____ edad de inicio : _____		
Alcoholismo:		
No. copas por semana: _____ Edad de inicio: _____		
Tx anticonceptivo oral (solo mujeres)		
Tipo: _____		
Cirugía(s)		
Cual(es):		
Pancreatitis		
Cardiopatía isquémica		
Tx:		
Enfermedad cerebral vascular		
Enfermedad vascular periférica		
Problemas tiroideos		
Especifique:		
Acantosis nigricans		
Xantomas tendinosos		
Diabetes		
¿Alguna otra enfermedad?		
Cual:		

5: Sección de datos para pacientes diabéticos				
Diabético: Si <input type="radio"/> No <input type="radio"/>	Diagnóstico previo: Si <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>			
Tipo de diabetes:	Edad al Dx:	Glucemia promedio en el último año:		
		Hemoglobina Glucosilada:		
Tx actual: NO <input type="radio"/> SI <input type="radio"/>	Fármaco y Dosis:			
Usa Insulina: NO <input type="radio"/> SI <input type="radio"/>	Hospitalizaciones relacionadas con diabetes : NO <input type="radio"/> SI <input type="radio"/> Especificar:			
Peso habitual: antes _____ y después ____ del Dx (Kg).				
Complicaciones	SI	NO	Edad al Dx	Tratamiento
Neuropatía				
Retinopatía				
Pie diabético				
Nefropatía				
Hipertensión arterial				
Dislipidemias (Especifique)				

**6. Evaluación de la actividad física**

Ejercicio: NO <input type="radio"/> SI <input type="radio"/>	Tipo:
Veces por semana:	Tiempo que duran la rutina:

**7. Antecedentes Familiares**

	Vive		Causa de muerte	Edad de muerte	Obeso Tipo		Diabetes		HTA		Cardiopatía Isquémica		EVC		Dislipidemia		Nefropatía	
	Si	No			Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Padre																		
Madre																		
Abuelo Paterno																		
Abuela Paterna																		
Abuelo Materno																		
Abuela Materna																		
Hermanos (numero)																		
Hijos																		
Otros																		

Algún familiar participa en el estudio : NO  SI

Nombre del familiar	Parentesco

Observaciones :  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Nombre y firma del entrevistador: \_\_\_\_\_

Resultados de Laboratorio	Glucosa		Colesterol	
	Hba1c (diabéticos)		Triglicéridos	
	Insulina		HDL	

## ***Derivados del trabajo***

### ***Presentación de avances en congresos y sesiones***

- Abril 2016. XIV Reunión internacional de ciencias médicas.
  - Alteraciones en la metilación del DNA de tejido adiposo e hígado de pacientes obesos diabéticos.
- Noviembre 2016. . Obesity week 2016/ TOS Annual Meeting & ASMB. The obesity society & american society.
  - The Impact of Bariatric Surgery in the Epigenetics of Patients with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: A Prospective Study of the DNA Methylation Remodeling in Adipose Tissue
- Noviembre 2015. Obesity week 2015/ TOS Annual Meeting & ASMB. The obesity society & american society.
  - Comparative study of epigenetics in adipose tissue and liver from diabetic and non-diabetic obese patients: a differential dna methylation analysis in a mexican.
- Diciembre 2014. 12th Annual Rocky Mountain Bioinformatics Conference.
  - Integrative analysis through bivariate Gaussian mixture models of DNA methylation and gene expression across different cancer types.
- Noviembre 2014. XXX Congreso Nacional de Bioquímica.
  - Chronic low level arsenic exposure induces progressive aberrant DNA methylation that correlates with cell transformation in HaCaT cell line
- Octubre 2014. XIX Encuentro nacional de investigadores.
  - Metilación diferencial en el DNA de tejido adiposo de pacientes obesos y su relación con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2.
- Noviembre 2013. III Congreso Latinoamericano de Genética Humana.
  - Concordancia de los modelos matemáticos PREMM 1,2,6 y MMRPRE en la identificación de pacientes con síndrome de Lynch y cáncer colorectal esporádico.
- Noviembre de 2012. XXIX Congreso Nacional de Bioquímica, Oaxaca
  - Perfiles de transcripción de linfocitos de sangre periférica en individuos con obesidad mórbida. (CARTEL)
- Noviembre de 2012. XXIX Congreso Nacional de Bioquímica, Oaxaca.
  - Alteraciones en metiloma durante el proceso de transformación de células HaCaT por exposición crónica a arsénico .

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Altered DNA methylation in liver and adipose tissues derived from individuals with obesity and type 2 diabetes

Francisco Barajas-Olmos<sup>1</sup>, Federico Centeno-Cruz<sup>1</sup>, Carlos Zerrweck<sup>2</sup>, Iván Imaz-Rosshandler<sup>3</sup>, Angélica Martínez-Hernández<sup>1</sup>, Emilio J. Cordova<sup>1</sup>, Claudia Rangel-Escareño<sup>3</sup>, Faustino Gálvez<sup>4</sup>, Armando Castillo<sup>4</sup>, Hernán Maydón<sup>2</sup>, Francisco Campos<sup>5</sup>, Diana Gabriela Maldonado-Pintado<sup>5</sup> and Lorena Orozco<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** Obesity is a well-recognized risk factor for insulin resistance and type 2 diabetes (T2D), although the precise mechanisms underlying the relationship remain unknown. In this study we identified alterations of DNA methylation influencing T2D pathogenesis, in subcutaneous and visceral adipose tissues, liver, and blood from individuals with obesity.

**Methods:** The study included individuals with obesity, with and without T2D. From these patients, we obtained samples of liver tissue ( $n = 16$ ), visceral and subcutaneous adipose tissues ( $n = 30$ ), and peripheral blood ( $n = 38$ ). We analyzed DNA methylation using Illumina Infinium Human Methylation arrays, and gene expression profiles using HumanHT-12 Expression BeadChip Arrays.

**Results:** Analysis of DNA methylation profiles revealed several loci with differential methylation between individuals with and without T2D, in all tissues. Aberrant DNA methylation was mainly found in the liver and visceral adipose tissue. Gene ontology analysis of genes with altered DNA methylation revealed enriched terms related to glucose metabolism, lipid metabolism, cell cycle regulation, and response to wounding. An inverse correlation between altered methylation and gene expression in the four tissues was found in a subset of genes, which were related to insulin resistance, adipogenesis, fat storage, and inflammation.

**Conclusions:** Our present findings provide additional evidence that aberrant DNA methylation may be a relevant mechanism involved in T2D pathogenesis among individuals with obesity.

**Keywords:** Type 2 diabetes, DNA methylation, Gene expression, Adipose tissue, and liver tissue

## Background

Recent decades have seen an accelerated increase of the worldwide prevalence of overweight and obesity [1]. At this time, the leading causes of adult mortality are co-morbid conditions associated with obesity, such as cardiovascular diseases, T2D, and cancer [2]. Excessive fat accumulation induces metabolic derangements, of which insulin resistance is the most prominent, often leading to T2D [3]. The close link between obesity and altered

insulin signaling is mediated by several mechanisms, including ectopic lipid accumulation, low-grade inflammation, and altered adipokine production [4]. Involvement of insulin resistance in the progression to diabetes is specific in each tissue. In the adipocyte, the production of fatty acids increases, which together with the rise of circulating fatty acids, hepatic glucose release and activation of the immune system synergize the deterioration of pancreatic beta cells [4, 5]. The high levels of circulating fatty acids can result in insulin resistance in skeletal muscle and liver.

However, although epidemiological and pathophysiological studies demonstrate that T2D and obesity are highly interrelated, the severity of insulin resistance

\* Correspondence: [lorozco@inmegen.gob.mx](mailto:lorozco@inmegen.gob.mx)

<sup>1</sup>Inmunogenomics and Metabolic Disease Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS México City, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

varies considerably among individuals with obesity, in fact many of them do not progress to the diabetic state [6]. Both obesity and T2D are associated with many polymorphisms, but they share only a few susceptibility loci [7]. Despite enormous progress, we still lack sufficient understanding of the precise molecular mechanisms underlying T2D pathophysiology, particularly regarding mechanisms involving metabolic pathways in insulin target tissues [8].

Recent evidence suggests that tissue-specific transcriptional gene regulation by epigenetic factors plays a role in the development of insulin resistance and diabetes among individuals with obesity [9–12]. DNA methylation, one of the key epigenetic factors, is involved in the modulation of gene expression, mainly through the modulation of DNA-protein interactions [13, 14]. DNA methylation could provide a link between environmental influences, genetic factors and the development of defects in insulin signaling [15]. Increasing evidence in several populations, have assessed DNA methylation alterations in various tissues of T2D patients. It has been found altered methylation in genes related to beta cell survival in pancreas [16], in several TD2 related genes in subcutaneous adipose tissue [17, 18] and in genes related to glycolytic and lipogenic pathways in liver tissue [19]. To our knowledge, there are few reports of methylation alterations in visceral adipose tissue, although in insulin resistant obese patients the findings highlight genes related to immune response and cell adhesion process [20]. Here, we reported evidences for altered DNA methylation in visceral and subcutaneous adipose tissues, liver and blood from individuals with both obesity and T2D and the effects of these alterations in gene expression patterns.

## Methods

### Subjects and samples

Patients with a body mass index (BMI) of  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> were recruited from the Surgery Integral Clinics for Obesity and Metabolic Diseases at Tláhuac, Ruben Leñero and Ángeles del Pedregal Hospitals in Mexico City. All the patients were clinically evaluated before and during the surgery and no patients with important liver diseases were detected (such as NASH, fibrosis or cirrhosis). If any evidences of macroscopic pathological findings were found, no sample was taken for the study. Participants were classified as controls (non-diabetic individuals with obesity, NDO) or as cases (diabetic individuals with obesity, DO). All T2D patients fulfilled the American Diabetes Association criteria for diagnosis [21]. None of the patients received insulin therapy, although 15 of 23 DO and 5 of 23 NDO were under metformin treatment. Individuals with substance abuse (alcohol, tobacco or drugs) were also excluded from the study.

Cases and controls were matched according to gender, age, and BMI. Table 1 showed the characteristics of the patients at the time of surgery. All tissues were obtained during bariatric surgery procedures. Tissues were obtained from a group of 46 participants of which 23 were DO and 23 NDO. From these patients we obtained 30 visceral and subcutaneous adipose tissue samples and 16 liver biopsies. Blood samples were drawn from 38 patients. The samples were preserved in RNAlater (SIGMA-ALDRICH, St. Louis MO, USA) at  $-70$  °C until nucleic acid extraction.

### DNA extraction and quality control

DNA was extracted from whole blood samples using the GenraPuregene Blood Kit (Qiagen, Valencia CA, USA) and from solid tissues using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia CA, USA). DNA extractions were performed following the manufacturer's instructions.

### RNA extraction

Total RNA was extracted from whole blood and liver tissue using Trizol reagent (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA). RNA was extracted from adipose tissues using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia CA, USA). RNA extractions were performed following the manufacturer's instructions. RNA integrity was assayed using the Agilent 2100 Bioanalyzer system, following the manufacturer's instructions. Only samples with an RNA integrity number (RIN) above 8 were analyzed using microarrays.

**Table 1** Anthropometric data of non-diabetic individuals with obesity and diabetic individuals with obesity

Data	Non-diabetic individuals with obesity	Diabetic individuals with obesity	p-value
n (woman/man)	16/7	16/7	–
Age	40.96 ± 6.19	41.75 ± 9.93	0.71
BMI	42.95 ± 6.06	41.19 ± 5.51	0.39
DBP	75.6 ± 7.28	72.67 ± 9.38	0.48
SBP	124.7 ± 15.11	120.33 ± 15.63	0.68
Total cholesterol	170.11 ± 33.73	205.11 ± 51.58	0.18
Triglycerides	148.28 ± 62.6	193.44 ± 98.61	0.14
HDL-cholesterol	33.37 ± 11.28	37.03 ± 11.37	0.33
Fasting glucose	84.35 ± 8.68	123.1 ± 28.52	2.63 × 10 <sup>-07</sup>
%HB1Ac	5.35 ± 0.19	6.93 ± 0.94	1.03 × 10 <sup>-06</sup>
INS	12.99 ± 6.59	18.23 ± 19.01	0.38
HOMA %B	155.92 ± 61.21	83.06 ± 39.54	2.37 × 10 <sup>-05</sup>

Data are expressed as average value ± SD. Age in years; BMI: body mass index (kg/m<sup>2</sup>); Fasting glucose, Total cholesterol, HDL-cholesterol and Triglycerides, in mg/dl; INS: insulin,  $\mu$ U/ml; DBP: diastolic blood pressure in mmHg; SBP: systolic blood pressure in mmHg; HOMA: homeostatic model assessment, beta cell function (%B). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U test

### Genome-wide methylation assay

We used the HumanMethylation27 BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), which covered 27,578 CpG sites (CpGs) around 14,495 genes throughout the genome. Cases and controls were randomly located among the BeadChips. Arrays were processed following the Illumina Infinium Methylation assay protocol, and were scanned in an Illumina iScan. The array results were visualized using Illumina GenomeStudio software (V2011.1). We only included samples which passed quality control (QC) of internal control probes. CpGs in sex chromosomes were excluded, and the subsequent quality-filtered analyses included 26,486 CpGs. The methylation value was calculated as Beta, ranging from 0 (unmethylated) to 1 (completely methylated). The Beta value represents the ratio of the methylated probe intensity and the sum of methylated and unmethylated probe intensities.

### Genome-wide gene expression analysis

We amplified the extracted RNA (750 ng) into biotinylated cRNA using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Samples were analyzed using Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), which target more than 47,000 probes. Arrays were processed following the standard Illumina protocol. We used GenomeStudio software to verify quality standards for hybridization, labeling, staining, background signal, and basal level of housekeeping gene expression for each chip.

### Statistical analysis

Computation and statistical analyses were performed using the R, version 3.1 (<http://www.r-project.org>). The Lumi package was used to normalize the raw intensities of DNA methylation and gene expression arrays (robust spline normalization) [22]. Then, Beta as well as  $\log_2$  transformed gene expression values were computed and Linear Models for Microarray Data (Limma) from Bioconductor were implemented in order to compare between DO and NDO phenotypes [23]. A differentially methylated CpG site (DMCs) was defined as one that reached at least a 5% of difference (Delta-Beta) in absolute mean methylation, with an unadjusted  $p$  value of  $< 0.05$ . The cell-type heterogeneity adjustment for blood sample was performed using the ChAMP package, this include RefbaseEWAS method that uses a reference-database of DNA methylation from whole blood to detect cell proportion and correct the cell heterogeneity on the data [24]. Expression probes with a  $|\log$  fold-change $|$  of  $> 0.8$  and  $p < 0.05$ , were considered to show altered gene expression. To assess the correlation between alteration of DNA methylation and differential gene expression, we followed the strategy previously published by

Noushmehr (2010) [25], which involves assigning the direction of the change (positive or negative) from delta Beta or log fold-change to the significance of change ( $p$  value), and then graphing it as  $\log_{10}$  was followed. We focused on probes that were significantly down-regulated and significantly hypermethylated, and on probes that were significantly up-regulated and significantly hypomethylated.

### Pathway analyses

To obtain enriched Gene Ontology (Biological Process), we used all gene lists from Additional file 1: Tables S1-S4, Tables S8-S11, and Tables S12-S15. Pathway analysis was performed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID 6.8), only terms with adjusted  $p$ -value  $< 0.05$  are listed [26].

## Results

### Samples

Samples were obtained from the NDO ( $n = 23$ ) and DO ( $n = 23$ ) individuals, gender-, age-, and BMI-matched. As shown in Table 1, fasting glucose, %HbA1c, and HOMA-B were altered among DO patients. DO shown higher average values of total cholesterol and triglycerides, although these did not significantly differ between both groups.

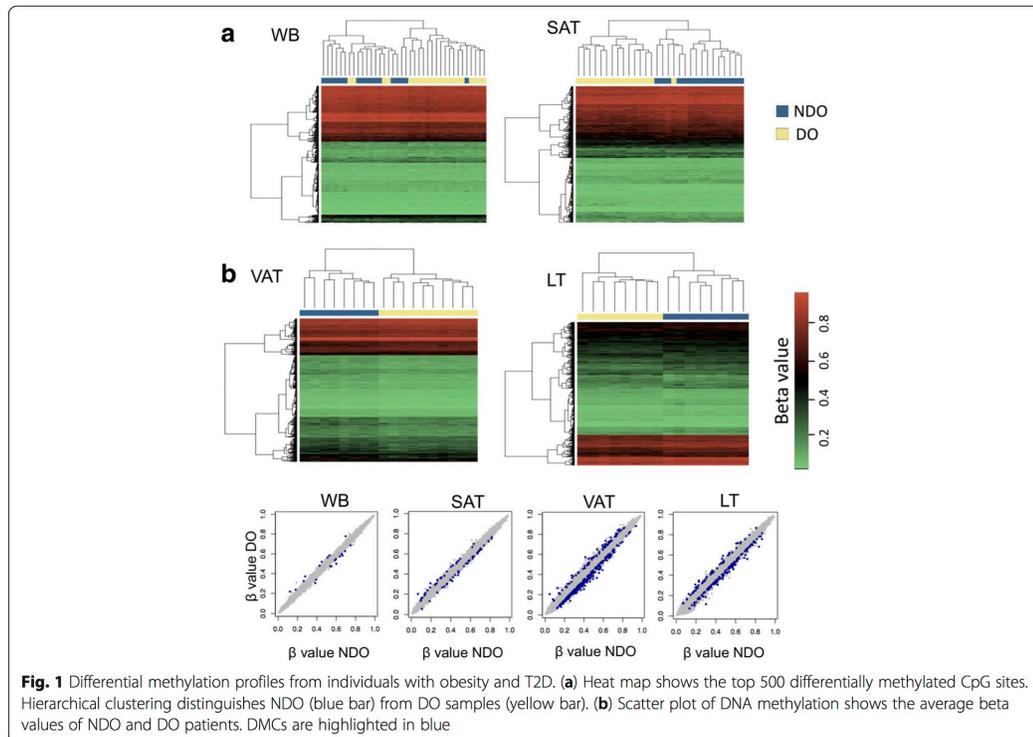
### Global DNA methylation

We analyzed Global DNA methylation in liver tissue (LT), visceral adipose tissue (VAT), subcutaneous adipose tissue (SAT) and whole blood (WB). Global methylation patterns were highly correlated with other samples of the same tissue type from different individuals, independent of their T2D status. In fact, DNA methylation patterns were highly conserved among all analyzed tissue samples (Additional file 1: Figure S1). Comparison of the average methylation levels among tissue types revealed the highest correlation between SAT and VAT samples (0.99) and the lowest correlation between LT and WB samples (0.94) (Additional file 1: Figure S2).

### Differential DNA methylation between DO and NDO patients

WB, SAT, VAT, and LT samples showed differential DNA methylation profiles between DO and NDO individuals. We identified two main clusters in the four analyzed tissues, by applying hierarchical clustering analysis based on the top 500 differentially methylated CpG sites between DO and NDO, regardless of the value of delta beta. However, both groups were fully discriminated only in VAT and LT analysis. In SAT analysis, one DO individual was included with the NDO subjects; and in WB analysis, several DO individuals were included in the NDO control group (Fig. 1a).

We selected the DMCs in each tissue for deeper analysis. We observed the highest amount of DMCs in VAT



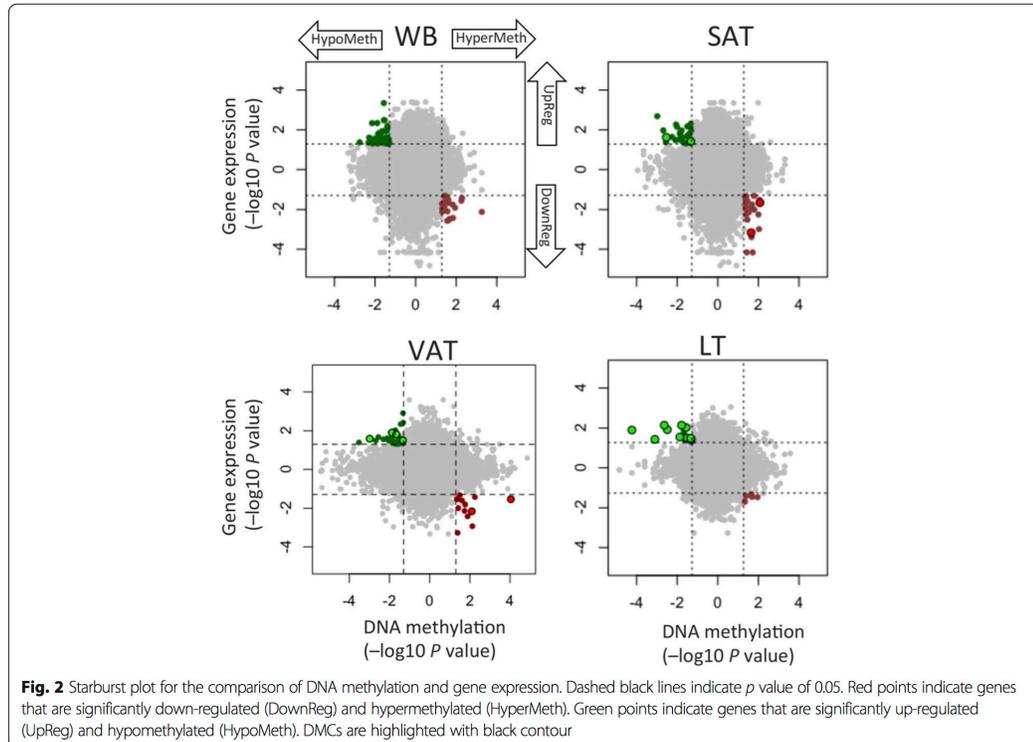
(340 DMCs, including 78 positive and 262 negative) and LT (185 DMCs, including 57 positive, and 128 negative), followed by SAT (68 DMCs, including 29 positive and 39 negative) and WB (21 DMCs, including 9 positive and 12 negative) (Fig. 1b). Several of the observed DMCs were located in genes related to T2D or obesity, such as *ALOX12*, *PAMR1*, and *GNAS* in WB; *IRS1*, *LEP*, and *ADIPOQ* in SAT; *LCAT*, *FOXA2*, *KCNQ1*, and *GCKR* in VAT; and *PKD4*, *HNF4A*, *XBPI*, and *PONI* in LT.

Interestingly, comparison between the DO and NDO groups showed that several DMCs were shared among tissues. DMCs located in *CCDC185*, *MTHFD2*, and *SUMF1* overlapped between SAT and VAT; DMCs located in *FUCA1*, *C4orf33*, *PRAP1*, *SNX4*, *TMEM109*, and *ZNF597* overlapped between VAT and LT; and DMCs in *MIA2* overlapped between SAT and LT. Moreover, WB also showed the DMCs in *PSMD5*, *PAMR1*, and *SUMO3* found in SAT, DMCs in *SLC9A2* found in VAT; and DMCs in *ALOX12* found in LT. DMCs in *PSMD5*, *SLC9A2*, and *ALOX12* showed a significant correlation between WB and the other tissues (Additional file 1: Figure S3). Additional file 1: Tables S1-S4, show the complete list of DMCs.

We performed gene ontology enrichment analysis using the genes with DMCs. The identified significant gene ontology terms in SAT were mainly related to lipid and carbohydrate metabolism and insulin response; those in VAT were mainly related to cell death, apoptosis, and cell cycle; and those in LT were mainly related to wound healing, coagulation, and cell growth (Additional file 1: Tables S5-S7). We found no significantly enriched gene ontology terms in WB.

#### Effects of altered DNA methylation on gene expression

To understand the biological effects of altered methylation, we analyzed gene expression using HumanHT-12 v4 Expression BeadChips. Comparison between the DO and NDO groups revealed subtle differential gene expression in all analyzed tissues (Additional file 1: Tables S8-S11 and Figure S4). To determine whether the DNA methylation differences between DO and NDO led to functional effects in transcription, we investigated the correlation of DNA methylation with gene expression data, using a previously reported strategy [15]. Starburst plots in Fig. 2 show the genes that displayed an inverse correlation between altered DNA methylation and



altered expression. Additional file 1: Tables S12-S15 show the complete list of these genes and the Additional file 1: Table S16 shows the GO enrichment analysis. Noteworthy, genes with the highest altered DNA methylation ( $>|5\%$ ) and altered expression included *DST*, *MGAT4C*, *LEP* and *ZNF3* in SAT; *BRDT*, *C14orf105*, *EDNRB*, *HMP19*, *PSG6* and *SNX4* in VAT; and *SYT7*, *LTBR*, *CATSPER2*, *LPAL2*, *NCALD*, *ZDHHC11*, *LGTN*, *OXT* and *PRSS21* in LT. Most of these genes have not been previously related with T2D.

### Discussion

Multiple studies have highlighted the importance of genetic factors in the etiology of metabolic diseases; however, only a small fraction of susceptibility genes are identified and few of them are reportedly shared among these diseases. Emerging evidence supports the role of epigenetic mechanisms as a crucial interface between genetic and environmental influences [11]. Some studies suggest that altered DNA methylation may be critical in the development of obesity and T2D [12, 27, 28–30]. However, tissue specific mechanisms involved in obesity and T2D are still unclear. To deepen our understanding

of the epigenomic mechanisms underlying T2D development, here we analyzed the methylation and transcription profiles in blood, liver, and subcutaneous and visceral adipose tissue samples from individuals with obesity, with and without T2D.

Comparison of DNA methylation profiles revealed a high correlation among tissue of the same type (Additional file 1: Figure S1), independent of T2D status, showing an epigenetic footprint for each tissue type, supporting the evidence that the developmental origin and tissue environment are the primary determinants of global DNA methylation patterns [31]. According with this conception, our comparison of DNA methylation profiles among different tissues showed the strongest correlation between subcutaneous and visceral adipose tissues (Additional file 1: Figure S2), reflecting the high functional similarity between them. A high correlation between genome wide-DNA methylation of these tissues was previously reported [32]. When we stratified by diabetic status, DNA methylation profiles revealed significant differences in all analyzed tissues. Adjustment for cell-type heterogeneity was performed only in blood sample, since most of the broadly applied methods to

correct for cellular heterogeneity are based on methylation datasets from blood. A limitation is the lack of a reliable method for adjusting the variation in cellular composition in fat and liver tissues. Another limitation could be the relatively reduced number of sample which could impact in the statistical power for identification of altered methylation sites associated to T2D.

In agreement with previous findings, the most of the altered DNA methylation sites showed hypomethylation [16, 18–20]. Altered DNA methylation was mainly observed in LT and in VAT, which enable clustering by T2D status, as previously described [19, 20]. The lack of available data for the accurate diagnosis and staging of NAFLD/NASH involves a risk of stratification within the groups, although in this study we do not identified CpGs reported as altered in the progression of NAFLD/NASH [33, 34]. SAT also showed differential methylation between the DO and NDO groups, although one of DO cases was included among the controls, otherwise, methylation analysis of WB did not cluster patients according to T2D status. These findings, highlight the relevance of insulin target tissues in T2D physiopathology and contributing to the evidence of the importance of the epigenetic role in the pathophysiology of these diseases [16].

As expected, several of the identified DMCs involved genes previously reported with altered methylation profiles in T2D such as *ADIPOQ*, *IRS1*, and *LEP* in SAT and *KCNQ1* in VAT [35]. Remarkably, we found DMCs located in the genes *LCAT* and *FOXA2* in VAT, and *PON1* and *FGF21* in LT, which have been genetically associated with metabolic traits, however, there are not enough evidences of their altered methylation in these entities [36–38]. Some of these genes have been involved in lipid metabolism pathways, and although the DO showed higher cholesterol and triglycerides serum levels, there were not significant differences between both groups, hence it is possible that their epigenetic regulation could be involved in the interplay between the alteration of lipid metabolism and the development of T2D [39, 40].

Although in this study the majority of DMCs were tissue specific, some of them were shared among tissues, perhaps representing common pathway in insulin-target tissues and strengthening the previous suggestion that adverse factors may similarly impact DNA methylation in different tissues [12]. Interestingly, the altered methylation of *ALOX12* (LT), *PSMD5* (SAT), and *SLC9A2* (VAT) was significantly correlated between internal tissues and blood, suggesting that particular DMCs could be useful biomarkers. Further studies are needed to delimitate the regions and CpG sites in blood that mirror DNA methylation in other tissues. In this study 15/23 DO patients and 5/23 NDO patients were under metformin treatment. The effect of metformin on DNA methylation is still unclear and as far as we know, the unique

report on DNA methylation in diabetic patients treated with metformin showed hypomethylation of *SLC22A1*, *SLC22A3* and *SLC47A1* in liver, however, we found none of these genes altered in our patients [41].

On the other hand, tissue-specific alterations in gene expression have been reported in T2D [42–44], although there are few reports involving the epigenomic regulation on gene expression. Interestingly, all tissues of T2D patients showed altered expression of genes involved in the inflammation response—such as *SOCS1* in WB; *CCL20* and *SLAMF1* in SAT; *ACPS5*, *FOS*, and *JUN* in VAT; and *PLA2G2A* in LT, showing the relevance of the systemic chronic inflammation in obesity and T2D [45]. We also found altered expression of genes involved in adipogenesis (*AMFR*, *ACPS5*, and *FOSB*) [46–48], a process that is also widely reported in both diseases [49].

For better understanding of the role of epigenetic dysregulation in T2D, we integrated the methylation and expression data. We found a direct impact of the altered DNA methylation on expression of a subset of genes. The pathways enriched with these genes included several involved in T2D pathogenesis, such as adipogenesis, regulation of apoptosis, mitochondrion organization, oxygen transport, immune response and insulin resistance. In addition, we found DNA methylation and expression altered in genes having important roles in fat storage and that had not previously been reported to show epigenetic alteration in TD2—including *SCT* in WB and SAT, *OPRM1* in SAT, *IRX3* in VAT, and *NRG4* in LT. Our findings are in line with previous reports that have pointed to epigenetic altered glycolytic and lipogenic pathways in T2D patients [19].

## Conclusions

In summary, here we provide a catalog of genes affected by altered methylation in liver, visceral and adipose tissues, and peripheral blood samples from patients with obesity and T2D. Our present results demonstrate tissue-specific epigenetic alterations in individuals with obesity and T2D, and highlight the roles of liver and adipose tissue in metabolic disease development. Altered DNA methylation may directly impact transcription, consequently altering several pathways related to metabolic processes involved in T2D etiopathogenesis. Here we present new evidence that altered DNA methylation is a mechanism that affects these processes in individuals with obesity developing T2D. Overall, the available data suggest that altered methylation of genes involved in cell metabolism could be a crucial part of the mechanisms behind the comorbidity of metabolic diseases. Further studies are needed to integrate the available genetic and epigenetic data to improve our understanding of the intriguing interplay between genetic and environmental mechanisms in relation to the development of complex traits, like T2D.

## Additional file

**Additional file 1** **Figure S1.** Clustering of methylation data from tissue samples from individuals with obesity. **Figure S2.** Comparison of methylation averages among tissue types. **Figure S3.** Comparison of DMCs between different tissues. **Figure S4.** Differential gene expression. **Table S1.** List of DMCs in WB in the comparison between the DO and NDO groups. **Table S2.** List of DMCs in SAT in the comparison between the DO and NDO groups. **Table S3.** List of DMCs in VAT in the comparison between the DO and NDO groups. **Table S4.** List of DMCs in LT in the comparison between the DO and NDO groups. **Table S5.** Gene ontology enrichment analysis using the genes with DMCs in SAT. **Table S6.** Gene ontology enrichment analysis using the genes with DMCs in VAT. **Table S7.** Gene ontology enrichment analysis using the genes with DMCs in LT. **Table S8.** Differential gene expression in WB in the comparison between DO and NDO groups. **Table S9.** Differential gene expression in SAT in the comparison between DO and NDO groups. **Table S10.** Differential gene expression in VAT in the comparison between DO and NDO groups. **Table S11.** Differential gene expression in LT in the comparison between DO and NDO groups. **Table S12.** List of genes with correlation between alteration of DNA methylation and differential gene expression in WB. **Table S13.** List of genes with correlation between alteration of DNA methylation and differential gene expression in SAT. **Table S14.** List of genes with correlation between alteration of DNA methylation and differential gene expression in VAT. **Table S15.** List of genes with correlation between alteration of DNA methylation and differential gene expression in LT. **Table S16.** Gene ontology enrichment analysis using the genes with correlation between alteration of DNA methylation and differential gene expression. (PDF 3440 kb)

## Abbreviations

CpGs: CpG sites; DMCs: Differentially methylated CpG sites; DO: Diabetic individuals with obesity; GO: Gene Ontology; LT: Liver tissue; NDO: non-diabetic individuals with obesity; SAT: Subcutaneous adipose tissue; T2D: Type 2 diabetes; VAT: Visceral adipose tissue; WB: Whole blood

## Acknowledgements

The authors thank Elisa Sepulveda Guerrero, Patricia Priego (Hospital General Tlahuac, CDMX, México), and Rosa María García (Hospital General Rubén Leñero, CDMX, México) for her help in collection of the samples. We are also grateful to M.C. Fabiola Morales Mandujano, M.C. Raúl Mojica Espinosa, and the Microarray Unit from the Instituto Nacional de Medicina Genómica (México). Francisco Barajas-Olmos is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) the data in this work are part of his doctoral dissertation.

## Funding

Francisco Barajas-Olmos received fellowship #324408 (registration number: 262950) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The present project was supported by the CONACYT grant number 223019.

## Availability of data and materials

DNA methylation and Gene expression data are deposited in ArrayExpress Archive of Functional Genomics Data, accession numbers: E-MTAB-5291 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-5291/>) and E-MTAB-5288 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-5288/>), respectively.

## Authors' contributions

FBO was involved in all aspects of the study, and wrote the first draft of the manuscript. LO and FCC contributed to study design, analysis, interpretation of data, and editing of the manuscript. CZ contributed to study design, interpretation of data and sample collection. IIR, AMH, CRE, and EJC contributed to the analysis and interpretation of data. AC, FG, FC, DGMP, and HM contributed to sample collection and data interpretation. All authors approved the manuscript before submission.

## Ethics approval and consent to participate

All participants signed an informed consent form, and the study protocol was approved by the local research and ethical committees (Dirección de educación e Investigación de la Secretaría de Salud de la CDMX/212-010-14-15

and Comité de ética en investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica 2016/CEI-30). This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

## Consent for publication

Written informed consent about the patients for publication was obtained.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Immunogenomics and Metabolic Disease Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS México City, Mexico. <sup>2</sup>Clinica Integral de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas, Hospital General Tlahuac, Secretaría de Salud de la CDMX, México City, Mexico. <sup>3</sup>Computational Genomics Consortium, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS México City, Mexico. <sup>4</sup>Hospital Ángeles Pedregal, México City, Mexico. <sup>5</sup>Clinica Integral de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas, Hospital General Dr. Rubén Leñero, Secretaría de Salud de la CDMX, México City, Mexico.

Received: 10 August 2017 Accepted: 15 February 2018

Published online: 21 February 2018

## References

- Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM, et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr.* 2012;10:22. Available from: <http://www.pophealthmetrics.com/content/10/1/22>
- Mattei J, Malik V, Wedick NM, Hu FB, Spiegelman D, Willett WC, et al. Reducing the global burden of type 2 diabetes by improving the quality of staple foods: the global nutrition and epidemiologic transition initiative. *Glob Health.* 2015;11:23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4489001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36:461–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614715000905>
- Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148:852–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412002176>
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006;444:840–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature05482>.
- Stefan N, Häring HU, Hu FB, Schulze MB. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2013;1:152–62.
- Grarup N, Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome-wide association studies to rare variants and beyond. *Diabetologia.* 2014;57:1528–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-014-3270-4>
- Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32:2052–9. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.111.241919>
- Arner P, Sahlqvist A-S, Sinha I, Xu H, Yao X, Waterworth D, et al. The epigenetic signature of systemic insulin resistance in obese women. *Diabetologia.* 2016;59:2393–405.
- Macartney-coxson D, Benton MC, Blick R, Stubbs RS, Hagan RD, Langston MA. Genome-wide DNA Methylation analysis reveals loci that distinguish different types of adipose tissue in obese individuals. *Clin Epigenetics.* 2017;1–21.
- Guénard F, Tchernof A, Deshaies Y, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, et al. Genetic regulation of differentially methylated genes in visceral adipose tissue of severely obese men discordant for the metabolic syndrome. *Transl Res.* 2017;184:1–11.e2.
- Crujeiras AB, Sandoval J, Millagro FI. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Nat. Publ. Gr.* 2017;1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep41903>

13. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Publ. Gr* 2016;17:487–500. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>.
14. Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat Publ Gr*. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.83>
15. Rönn T, Volkov P, Davegårdh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, et al. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet*. 2013;9(6):e1003572.
16. Volkmar M, Dedeunwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Depluis R, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J*. 2012;31:1405–26. Available from: <http://emboj.embopress.org/content/31/6/1405.abstract>
17. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7:e51302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051302>; <http://www.plosone.org/article/abstract?doi=10.1371/journal.pone.0051302&representation=PDF>.
18. Nilsson E, Jansson PA, Perflyev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2014;63:1–927. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812430>
19. Kirchner H, Sinha I, Gao H, Ruby MA, Schönke M, Lindvall JM, et al. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Mol Metab*. 2016;5:171–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877815002343>
20. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Moreno-Navarrete JM, Sandoval J, Hervas D, Gomez A, et al. Genome-wide DNA methylation pattern in visceral adipose tissue differentiates insulin-resistant from insulin-sensitive obese subjects. *Transl Res*. 2016;178:13–24.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.002>.
21. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36:67–74.
22. Du P, Kibbe WA, Lin SM. lumi: A pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*. 2008;24:1547–8.
23. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.
24. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, et al. ChAMP: 450k Chip analysis methylation pipeline. *Bioinformatics* 2014;30: 428–430. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt684>.
25. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG Island Methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17:510–522. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>.
26. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2008;4: 44–57. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
27. Chambers JC, Loh M, Lehne B, Drong A, Kriebel J, Motta V, et al. Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: a nested case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3:526–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213858715001278>
28. Chen M, Macpherson A, Owens J, Wittert G, Heilbronn LK. Obesity alone or with type 2 diabetes is associated with tissue specific alterations in DNA methylation and gene expression of PPAR $\gamma$ C1A and IGF2. *J Diabetes Res Clin Metab*. 2012;1:16. Available from: <http://www.hoajonline.com/jdr/cm/2050-0866/1/16>
29. Dayeh T, Volkov P, Salö S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004160. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004160>
30. Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, et al. An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol*. 2015; 16:8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651499>; <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4301800>.
31. Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. 2015;518: 317–30. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14248>
32. Løkk K, Modhukur V, Rajashekar B, Märten K, Mägi R, Kolde R, et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol*. 2014;15:r54. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2014-15-4-r54>.
33. Kuramoto J, Arai E, Tian Y, Funahashi N, Hiramoto M, Nammo T, et al. Genome-wide DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2017;38:261–70.
34. de Mello VD, Matte A, Perflyev A, Männistö V, Rönn T, Nilsson E, et al. Human liver epigenetic alterations in non-alcoholic steatohepatitis are related to insulin action. *Epigenetics*. 2017;12:287–95.
35. Sala P, Susana R, De Miranda M, Fonseca DC, Ravacci GR, Waitzberg DL, et al. Tissue - specific methylation profile in obese patients with type 2 diabetes before and after roux - en - Y gastric bypass. *Diabetol Metab Syndr BioMed Central*. 2017:1–15.
36. Nakhjavani M, Morteza A, Karimi R, Banihashmi Z, Esteghamati A. Diabetes induces gender gap on LCAT levels and activity. *Life Sci*. 2013;92:51–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.10.026>.
37. Koren-Gluzer M, Aviram M, Mellin E, Hayek T. The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates  $\beta$ -cell insulin release. *Atherosclerosis* 2011;219:510–518. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.119>.
38. von Holstein-Rathlou S, BonDurant LD, Peltekian L, Naber MC, Yin TC, Clafin KE, et al. FGF21 mediates endocrine control of simple sugar intake and sweet taste preference by the liver. *Cell Metab*. 2016;23:335–343. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.003>.
39. Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 2016;125:259–266. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.024>.
40. Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vasc Pharmacol*. 2012;57:91–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.05.003>.
41. García-Calzón S, Perflyev A, Männistö V, de Mello VD, Nilsson E, Pihlajamäki J, et al. Diabetes medication associates with DNA methylation of meformin transporter genes in the human liver. *Clin Epigenetics*. 2017;9:102. Available from: <http://clinalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-017-0400-0>
42. Baranova A, Collantes R, Gowder SJ, Elariny H, Schlauch K, Younoszai A, et al. Obesity-related differential gene expression in the visceral adipose tissue. *Obes Surg*. 2005;15:758–65.
43. Elbein SC, Kern PA, Rasouli N, Yao-Borengasser A, Sharma NK, Das SK. Global Gene Expression Profiles of Subcutaneous Adipose and Muscle From Glucose-Tolerant, Insulin-Sensitive, and Insulin-Resistant Individuals Matched for BMI. *Diabetes*. 2011;60(3):1019–29. doi:<https://doi.org/10.2337/db10-1270>.
44. Wang M, Wang XC, Zhao L, Zhang Y, Yao LL, Lin Y, et al. Oligonucleotide microarray analysis reveals dysregulation of energy-related metabolism in insulin-sensitive tissues of type 2 diabetes patients. *Genet Mol Res*. 2014;13:4494–504.
45. Domingueti CP, Dusse LMSA, Carvalho MDG, De Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complicat* 2016;30:738–745. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.12.018>.
46. Chen CZ, Zhu YN, Chai ML, Dai LS, Gao Y, Jiang H, et al. AMFR gene silencing inhibits the differentiation of porcine preadipocytes. *Genet Mol Res*. 2016;15:1–11.
47. Patlaka C, Becker H, Norgård M, Paulie S, Nordvall-Bodell A, Lång P, et al. Caveolae-mediated endocytosis of the glucosaminoglycan-interacting adipokine tartrate resistant acid phosphatase 5a in adipocyte progenitor lineage cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843:495–507. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.020>.
48. Sabatakos G, Sims NA, Chen J, Aoki K, Kelz MB, Amling M, et al. Overexpression of  $\Delta$ FosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med* 2000;6:985–990. Available from: <https://doi.org/10.1038/79683>.
49. Ma X, Lee P, Chisholm DJ, James DE. Control of adipocyte differentiation in different fat depots; implications for pathophysiology or therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:1. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=431167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## Anexo de tablas

Tabla 2. Lista de CDMs presentes en ST en la comparación de los grupos DO y OND

CpG	Símbolo	Cromosoma	Isla CpG	Beta DO	Beta OB	Delta Beta	Valor p
cg13105904	<i>KHNYN</i>	14	TRUE	0.22	0.12	0.1	0.009
cg09419670	<i>PSMD5*</i>	9	TRUE	0.37	0.28	0.09	0.008
cg21717724	<i>PSMD5</i>	9	TRUE	0.78	0.7	0.08	0.049
cg03760483	<i>ALOX12</i>	17	TRUE	0.52	0.45	0.07	0.003
cg21053323	<i>SUMO3</i>	21	TRUE	0.33	0.26	0.06	0.001
cg06873352	<i>STRADA</i>	17	TRUE	0.24	0.18	0.06	0.010
cg19728382	<i>STC2</i>	5	TRUE	0.58	0.53	0.05	0.009
cg19592945	<i>P2RXL1</i>	22	FALSE	0.48	0.43	0.05	0.033
cg14642338	<i>PAMR1</i>	11	FALSE	0.56	0.51	0.05	0.044
cg20050113	<i>SLC9A2</i>	2	TRUE	0.55	0.6	-0.05	0.048
cg06906435	<i>C14orf177</i>	14	FALSE	0.53	0.59	-0.05	0.039
cg02588309	<i>TTC33</i>	5	TRUE	0.34	0.39	-0.05	0.010
cg22686523	<i>FLJ25006</i>	17	FALSE	0.6	0.66	-0.06	0.048
cg13982505	<i>KCNJ13*</i>	2	FALSE	0.69	0.75	-0.06	0.019
cg13033054	<i>LINC00846</i>	21	FALSE	0.57	0.64	-0.06	0.026
cg23439277	<i>PLCE1*</i>	10	FALSE	0.63	0.69	-0.06	0.009
cg25853078	<i>OPCML*</i>	11	FALSE	0.47	0.54	-0.06	0.003
cg13383491	<i>GPR85*</i>	7	FALSE	0.47	0.55	-0.08	0.001
cg06771126	<i>HOP*</i>	4	FALSE	0.3	0.38	-0.08	0.012
cg25997474	<i>ADH1C*</i>	4	FALSE	0.58	0.66	-0.08	0.007
cg03606258	<i>GNAS</i>	20	TRUE	0.5	0.6	-0.1	0.038

\* Genes con diferencias significativas después de ajuste por heterogeneidad celular

**Tabla 3. Lista de CDMs presentes en TAS en la comparación de los grupos de OD y OND**

CpG	Símbolo	Cromosoma	Isla CpG	Beta DO	Beta OB	Delta Beta	Valor p
cg17687883	<i>MTHFD2</i>	2	TRUE	0.2	0.07	0.14	0.011
cg09405083	<i>WBP1L</i>	10	FALSE	0.31	0.19	0.12	0.024
cg09419670	<i>PSMD5</i>	9	TRUE	0.27	0.19	0.08	0.024
cg14144305	<i>ALX4</i>	11	TRUE	0.34	0.26	0.08	0.007
cg04317399	<i>HOXA4</i>	7	TRUE	0.34	0.27	0.08	0.018
cg14642338	<i>PAMR1</i>	11	FALSE	0.47	0.4	0.07	0.006
cg00983520	<i>CPT1B</i>	22	TRUE	0.24	0.17	0.07	0.008
cg10190509	<i>CCL16</i>	17	FALSE	0.7	0.63	0.07	0.029
cg19393006	<i>TSC1</i>	9	FALSE	0.49	0.42	0.07	0.005
cg00186701	<i>TSPYL5</i>	8	TRUE	0.43	0.36	0.07	0.026
cg09025324	<i>SART2</i>	6	TRUE	0.2	0.14	0.06	0.03
cg08321346	<i>ANKMY1</i>	2	TRUE	0.21	0.14	0.06	0.034
cg25316898	<i>C18orf21</i>	18	TRUE	0.17	0.1	0.06	0.047
cg00648883	<i>EEF1DP3</i>	13	FALSE	0.36	0.3	0.06	0.028
cg17903316	<i>LOXHD1</i>	18	FALSE	0.36	0.3	0.06	0.047
cg26154999	<i>FAM124B</i>	2	TRUE	0.36	0.31	0.06	0.038
cg10098888	<i>IRS1</i>	2	TRUE	0.17	0.11	0.06	0.017
cg01193293	<i>SIGLEC7</i>	19	FALSE	0.52	0.46	0.06	0.05
cg22062068	<i>HNRNPG-T</i>	11	TRUE	0.55	0.5	0.06	0.043
cg12782180	<i>LEP</i>	7	TRUE	0.3	0.25	0.06	0.008
cg21053323	<i>SUMO3</i>	21	TRUE	0.19	0.13	0.06	0.042
cg00929606	<i>ZNF3</i>	7	TRUE	0.31	0.26	0.05	0.023
cg21019522	<i>SLC22A18</i>	11	FALSE	0.3	0.24	0.05	0.017
cg24664957	<i>VPS37B</i>	12	TRUE	0.51	0.46	0.05	0.003
cg11405695	<i>ATAD3C</i>	1	FALSE	0.53	0.48	0.05	0.028
cg06476606	<i>IFIT2</i>	10	FALSE	0.15	0.09	0.05	0.017
cg03160637	<i>DDB1</i>	11	TRUE	0.15	0.1	0.05	0.031
cg22222251	<i>WBSCR19</i>	7	FALSE	0.67	0.62	0.05	0.008
cg14679202	<i>L3MBTL2</i>	22	TRUE	0.39	0.34	0.05	0.027
cg03811411	<i>SGCD</i>	5	FALSE	0.65	0.7	-0.05	0.018
cg16504670	<i>DEF8</i>	16	TRUE	0.77	0.82	-0.05	0.009
cg05654163	<i>SLC39A2</i>	14	FALSE	0.62	0.67	-0.05	0.011
cg03190825	<i>CYP4F11</i>	19	FALSE	0.43	0.48	-0.05	0.023
cg21011830	<i>RPL18A</i>	19	TRUE	0.06	0.11	-0.05	0.011
cg04452713	<i>DST</i>	6	TRUE	0.26	0.31	-0.05	0.003

cg06563300	<i>SLC17A8</i>	12	FALSE	0.21	0.26	-0.05	0.018
cg07039113	<i>S100A9</i>	1	FALSE	0.73	0.78	-0.05	0.004
cg14290291	<i>MZT2B</i>	2	FALSE	0.43	0.48	-0.05	0.001
cg06112415	<i>CGREF1</i>	2	TRUE	0.37	0.42	-0.05	<0.001
cg24603941	<i>MIA2</i>	14	FALSE	0.68	0.74	-0.05	0.003
cg13980719	<i>TNP1</i>	2	FALSE	0.5	0.55	-0.05	0.022
cg24041453	<i>CCDC11</i>	18	TRUE	0.13	0.19	-0.05	0.024
cg01031251	<i>RPS6KA1</i>	1	TRUE	0.57	0.62	-0.05	0.004
cg05333568	<i>CCDC185</i>	1	TRUE	0.28	0.34	-0.05	0.043
cg04893119	<i>PI15</i>	8	FALSE	0.57	0.63	-0.05	0.031
cg03573747	<i>ADIPOQ</i>	3	FALSE	0.73	0.78	-0.06	0.006
cg00626466	<i>GNS</i>	12	TRUE	0.54	0.59	-0.06	0.022
cg05885720	<i>EMP1</i>	12	FALSE	0.63	0.69	-0.06	0.007
cg20781967	<i>NINJ2</i>	12	FALSE	0.34	0.4	-0.06	0.032
cg24833277	<i>FAM83A</i>	8	TRUE	0.64	0.7	-0.06	0.041
cg21048669	<i>CLEC3A</i>	16	FALSE	0.48	0.53	-0.06	0.026
cg27525902	<i>FGF7</i>	15	FALSE	0.52	0.58	-0.06	0.028
cg21550483	<i>CLEC10A</i>	17	FALSE	0.39	0.44	-0.06	0.043
cg19592945	<i>P2RXL1</i>	22	FALSE	0.34	0.4	-0.06	0.047
cg18847227	<i>SUMF1</i>	3	TRUE	0.42	0.48	-0.06	0.006
cg21686987	<i>CTRB1</i>	16	FALSE	0.75	0.81	-0.06	<0.001
cg03793778	<i>LGALS7</i>	19	FALSE	0.57	0.63	-0.06	0.044
cg18344063	<i>MGAT4C</i>	12	FALSE	0.57	0.64	-0.06	0.047
cg21832243	<i>TTC3</i>	21	FALSE	0.3	0.36	-0.06	0.038
cg00673191	<i>DOPEY2</i>	21	FALSE	0.3	0.36	-0.06	0.038
cg15302379	<i>KAZALD1</i>	10	TRUE	0.56	0.62	-0.07	0.001
cg21126707	<i>MYF5</i>	12	TRUE	0.5	0.57	-0.07	0.001
cg05293216	<i>FANCG</i>	9	TRUE	0.6	0.67	-0.07	0.01
cg26185508	<i>CDCP2</i>	1	TRUE	0.41	0.48	-0.07	0.025
cg07221454	<i>MS4A10</i>	11	FALSE	0.62	0.69	-0.07	0.041
cg15149938	<i>C22orf34</i>	22	FALSE	0.64	0.71	-0.07	0.007
cg02276665	<i>CTNNA1</i>	5	TRUE	0.39	0.47	-0.09	<0.001
cg02288165	<i>SN</i>	20	FALSE	0.33	0.42	-0.09	0.006

**Tabla 4. Lista de CDMs presentes en TAV en la comparación de los grupos de OD y OND .**

CpG	Símbolo del gen	Cromosoma	Isla CpG	Beta DO	Beta OB	Delta Beta	Valor p
cg17687883	<i>MTHFD2</i>	2	TRUE	0.21	0.06	0.16	0.009
cg02964385	<i>STK38</i>	6	FALSE	0.58	0.42	0.16	0.036
cg15235832	<i>ACTR2</i>	2	TRUE	0.27	0.14	0.13	0.002
cg17872476	<i>VT11A</i>	10	FALSE	0.40	0.28	0.12	0.001
cg22438810	<i>LCN2</i>	9	FALSE	0.66	0.54	0.11	0.023
cg01734338	<i>KCNQ1</i>	11	TRUE	0.74	0.63	0.11	0.001
cg04570669	<i>APIN</i>	4	FALSE	0.56	0.46	0.11	<0.001
cg11237738	<i>LINC01587</i>	4	FALSE	0.70	0.59	0.10	0.008
cg14074641	<i>ABCC12</i>	16	FALSE	0.39	0.30	0.09	0.003
cg01120761	<i>CLEC4C</i>	12	FALSE	0.77	0.68	0.09	0.040
cg02719634	<i>SLC22A18AS</i>	11	FALSE	0.84	0.75	0.09	0.032
cg20622019	<i>ADA</i>	20	TRUE	0.37	0.28	0.09	0.039
cg21755709	<i>PDXK</i>	21	TRUE	0.71	0.62	0.09	0.004
cg14732540	<i>BRDT</i>	1	TRUE	0.86	0.77	0.09	0.008
cg13906813	<i>HLA-DPA1</i>	6	FALSE	0.57	0.48	0.09	0.029
cg21781546	<i>ZNF142</i>	2	FALSE	0.70	0.63	0.08	<0.001
cg27212977	<i>DEFA6</i>	8	FALSE	0.81	0.73	0.08	<0.001
cg12218747	<i>SETD4</i>	21	TRUE	0.68	0.61	0.08	0.007
cg17994910	<i>CCDC30</i>	1	FALSE	0.49	0.41	0.08	0.013
cg17758148	<i>JMY</i>	5	FALSE	0.42	0.34	0.08	0.036
cg04601137	<i>ADAMTSL5</i>	19	FALSE	0.40	0.32	0.08	0.021
cg17496921	<i>TSPAN16</i>	19	FALSE	0.31	0.24	0.07	0.035
cg11376198	<i>AFAR3</i>	1	TRUE	0.22	0.14	0.07	0.030
cg21784940	<i>REPIN1</i>	7	FALSE	0.43	0.35	0.07	0.001
cg25112853	<i>HSC20</i>	22	FALSE	0.57	0.50	0.07	0.030
cg15792367	<i>KLK11</i>	19	FALSE	0.58	0.50	0.07	0.021
cg13525683	<i>TIAF1</i>	17	TRUE	0.73	0.66	0.07	0.010
cg13044136	<i>AES</i>	19	TRUE	0.16	0.09	0.07	0.011
cg11147886	<i>NFAT5</i>	16	FALSE	0.73	0.66	0.07	0.046
cg24612198	<i>CD3E</i>	11	FALSE	0.58	0.51	0.07	<0.001
cg18236297	<i>CYSLTR2</i>	13	FALSE	0.53	0.46	0.07	0.035
cg09325101	<i>OSTbeta</i>	15	FALSE	0.25	0.18	0.07	0.048
cg01817393	<i>GNAS</i>	20	TRUE	0.28	0.22	0.07	0.013
cg11584936	<i>BNIP1</i>	1	FALSE	0.67	0.60	0.07	0.045

cg08666623	<i>ST6GALNAC2</i>	17	FALSE	0.22	0.15	0.07	0.028
cg21644628	<i>HEATR3</i>	16	FALSE	0.63	0.56	0.07	0.009
cg19468534	<i>NUSAP1</i>	15	FALSE	0.55	0.49	0.07	<0.001
cg19103704	<i>FCGBP</i>	19	FALSE	0.46	0.39	0.07	0.024
cg27044702	<i>TPSAB1</i>	16	FALSE	0.70	0.64	0.07	0.042
cg00943909	<i>GNAS</i>	20	TRUE	0.51	0.44	0.07	0.029
cg04008843	<i>TTR</i>	18	FALSE	0.51	0.45	0.06	0.006
cg11151665	<i>PSG6</i>	19	FALSE	0.81	0.75	0.06	<0.001
cg19740969	<i>CXCL9</i>	4	FALSE	0.74	0.68	0.06	0.007
cg15862544	<i>EGFL4</i>	19	FALSE	0.83	0.77	0.06	0.021
cg23154064	<i>FAM208A</i>	3	FALSE	0.59	0.53	0.06	0.001
cg19279346	<i>LILRB2</i>	19	FALSE	0.68	0.62	0.06	0.005
cg09559551	<i>RSC1A1</i>	1	FALSE	0.78	0.72	0.06	0.024
cg02212280	<i>MMP1</i>	11	FALSE	0.80	0.74	0.06	<0.001
cg20812929	<i>DHRS4L2</i>	14	TRUE	0.31	0.25	0.06	0.022
cg08046471	<i>CXCL11</i>	4	FALSE	0.72	0.66	0.06	0.025
cg27016609	<i>STON1</i>	2	FALSE	0.49	0.44	0.06	0.001
cg26981881	<i>DEC1</i>	9	FALSE	0.73	0.67	0.06	0.039
cg09873510	<i>NLN</i>	5	FALSE	0.67	0.62	0.06	0.015
cg13982505	<i>KCNJ13</i>	2	FALSE	0.71	0.66	0.06	0.003
cg25803423	<i>C14orf119</i>	14	TRUE	0.15	0.09	0.06	0.028
cg27383744	<i>BRCA1</i>	17	TRUE	0.84	0.79	0.06	0.001
cg27661264	<i>GNAS</i>	20	TRUE	0.28	0.22	0.05	0.030
cg08972170	<i>Ells1</i>	7	TRUE	0.73	0.67	0.05	0.036
cg06776256	<i>GPRC5A</i>	12	TRUE	0.33	0.28	0.05	0.044
cg11003133	<i>AIM2</i>	1	FALSE	0.86	0.81	0.05	0.032
cg17606194	<i>SYCE1</i>	10	TRUE	0.47	0.41	0.05	0.037
cg14837082	<i>HRH1</i>	3	FALSE	0.65	0.60	0.05	0.015
cg11251498	<i>INDOL1</i>	8	FALSE	0.21	0.16	0.05	0.002
cg20895028	<i>CDH26</i>	20	FALSE	0.79	0.74	0.05	<0.001
cg16879115	<i>APOBEC1</i>	12	FALSE	0.70	0.65	0.05	0.021
cg25743584	<i>TIAF1</i>	17	FALSE	0.69	0.64	0.05	0.001
cg09964921	<i>KCNE1</i>	21	FALSE	0.78	0.73	0.05	0.002
cg22726338	<i>AKNAD1</i>	1	FALSE	0.68	0.62	0.05	0.011
cg27090087	<i>TINAG</i>	6	FALSE	0.51	0.45	0.05	0.032
cg17896229	<i>PROKR2</i>	20	TRUE	0.61	0.56	0.05	0.005
cg25372103	<i>DLL1</i>	6	TRUE	0.28	0.23	0.05	0.003
cg02131853	<i>TMEM156</i>	4	FALSE	0.70	0.65	0.05	<0.001
cg25420952	<i>AMBP</i>	9	FALSE	0.79	0.74	0.05	0.049

cg25650811	<i>CCDC129</i>	7	TRUE	0.59	0.54	0.05	0.008
cg20891917	<i>IFRD1</i>	7	FALSE	0.86	0.81	0.05	0.001
cg15344028	<i>ICOS</i>	2	FALSE	0.74	0.69	0.05	0.031
cg23580000	<i>ADCY7</i>	16	TRUE	0.87	0.82	0.05	0.040
cg00182461	<i>PPIL3</i>	2	TRUE	0.14	0.09	0.05	0.004
cg15674997	<i>GRM6</i>	5	TRUE	0.35	0.40	-0.05	0.001
cg10316764	<i>TAOK2</i>	16	TRUE	0.35	0.40	-0.05	0.038
cg12958778	<i>TBC1D14</i>	4	TRUE	0.47	0.52	-0.05	0.033
cg06637774	<i>P2RY6</i>	11	TRUE	0.24	0.29	-0.05	0.025
cg16601861	<i>ALDH1A1</i>	9	FALSE	0.34	0.39	-0.05	0.043
cg25509184	<i>CFTR</i>	7	TRUE	0.57	0.62	-0.05	0.024
cg00968931	<i>MRPL54</i>	19	FALSE	0.69	0.74	-0.05	0.025
cg17692403	<i>R3HDML</i>	20	FALSE	0.13	0.18	-0.05	0.006
cg00666746	<i>SYDE1</i>	19	TRUE	0.11	0.16	-0.05	0.001
cg10929387	<i>ITIH4</i>	3	FALSE	0.82	0.87	-0.05	0.017
cg09354267	<i>ATG5</i>	6	TRUE	0.28	0.34	-0.05	0.049
cg25938646	<i>SLITRK1</i>	13	TRUE	0.42	0.47	-0.05	0.023
cg00296685	<i>GTF2H4</i>	6	TRUE	0.44	0.49	-0.05	0.004
cg25356886	<i>CRYGD</i>	2	TRUE	0.42	0.47	-0.05	0.005
cg02337166	<i>NR1D1</i>	17	FALSE	0.10	0.15	-0.05	0.036
cg07880854	<i>FBLN7</i>	2	FALSE	0.17	0.22	-0.05	0.007
cg09893305	<i>HAPLN1</i>	5	FALSE	0.50	0.55	-0.05	0.040
cg27465566	<i>TRIO</i>	5	TRUE	0.30	0.35	-0.05	0.007
cg19903229	<i>C14orf105</i>	14	FALSE	0.57	0.62	-0.05	0.013
cg10537269	<i>TIMM9</i>	14	TRUE	0.20	0.25	-0.05	0.041
cg15343119	<i>GALR1</i>	18	TRUE	0.19	0.24	-0.05	0.004
cg08041019	<i>ATXN2</i>	12	TRUE	0.23	0.29	-0.05	0.005
cg10731149	<i>CYBRD1</i>	2	TRUE	0.59	0.64	-0.05	0.010
cg07657236	<i>KCNH8</i>	3	TRUE	0.18	0.24	-0.05	0.002
cg00567749	<i>CSPG2</i>	5	TRUE	0.34	0.40	-0.05	0.015
cg08445039	<i>FKBP9</i>	7	TRUE	0.13	0.18	-0.05	0.033
cg03464655	<i>SLC38A11</i>	2	TRUE	0.22	0.27	-0.05	0.026
cg10742801	<i>PRAP1</i>	10	FALSE	0.29	0.34	-0.05	0.007
cg02065387	<i>GABRA1</i>	5	FALSE	0.56	0.62	-0.05	0.047
cg22193702	<i>PADI1</i>	1	FALSE	0.82	0.87	-0.05	0.047
cg19188060	<i>PSMD2</i>	3	TRUE	0.13	0.19	-0.05	<0.001
cg09604428	<i>PB1</i>	3	FALSE	0.88	0.93	-0.05	0.025
cg02318535	<i>PPM1E</i>	17	TRUE	0.78	0.83	-0.05	0.048
cg09788239	<i>PCQAP</i>	22	TRUE	0.12	0.17	-0.05	0.003

cg03743584	<i>PRAP1</i>	10	FALSE	0.18	0.23	-0.05	0.020
cg08223748	<i>MEF2C</i>	5	TRUE	0.25	0.30	-0.05	0.008
cg07536847	<i>PAX7</i>	1	TRUE	0.16	0.21	-0.05	0.006
cg16468910	<i>SNX4</i>	3	TRUE	0.27	0.33	-0.05	0.022
cg16046951	<i>MKKS</i>	20	TRUE	0.21	0.26	-0.05	0.025
cg16168311	<i>APOA1BP</i>	1	TRUE	0.10	0.15	-0.05	0.001
cg16608652	<i>B3GALT2</i>	1	FALSE	0.81	0.86	-0.05	0.038
cg08261177	<i>ALDH16A1</i>	19	TRUE	0.07	0.12	-0.05	0.010
cg15014458	<i>LYPD3</i>	19	FALSE	0.24	0.30	-0.05	0.037
cg18411898	<i>RPRM</i>	2	TRUE	0.38	0.43	-0.05	0.002
cg17509872	<i>CNOT7</i>	8	FALSE	0.28	0.34	-0.05	0.018
cg15109571	<i>SUFU</i>	10	TRUE	0.07	0.13	-0.05	0.001
cg02727285	<i>RELB</i>	19	TRUE	0.38	0.43	-0.05	0.035
cg26815021	<i>SFRS2</i>	17	TRUE	0.17	0.23	-0.05	<0.001
cg08207256	<i>DNM2</i>	19	TRUE	0.17	0.22	-0.05	0.003
cg11885098	<i>EFNA2</i>	19	TRUE	0.23	0.28	-0.05	0.009
cg24958765	<i>RAB4B</i>	19	TRUE	0.15	0.20	-0.05	0.009
cg00021527	<i>TAF15</i>	17	TRUE	0.09	0.15	-0.05	0.010
cg19948393	<i>ANKRD33</i>	12	TRUE	0.48	0.54	-0.05	0.030
cg08054038	<i>PVRL2</i>	19	TRUE	0.46	0.51	-0.05	0.003
cg22430790	<i>FRMD6</i>	14	TRUE	0.20	0.25	-0.06	0.001
cg09209002	<i>SAS10</i>	4	TRUE	0.09	0.14	-0.06	0.027
cg18001427	<i>RWDD2B</i>	21	TRUE	0.16	0.22	-0.06	0.032
cg16195804	<i>C12orf65</i>	12	TRUE	0.16	0.21	-0.06	0.008
cg06150803	<i>TNFRSF19</i>	13	FALSE	0.23	0.28	-0.06	0.004
cg17166812	<i>NDUFS2</i>	1	FALSE	0.24	0.29	-0.06	0.041
cg23061257	<i>YIPF1</i>	1	TRUE	0.25	0.31	-0.06	0.019
cg06543018	<i>RBP1</i>	3	TRUE	0.19	0.25	-0.06	0.017
cg15350194	<i>FAM70B</i>	13	TRUE	0.28	0.34	-0.06	0.003
cg01190915	<i>MT2A</i>	16	TRUE	0.38	0.44	-0.06	0.036
cg02630888	<i>FBXL5</i>	4	TRUE	0.64	0.70	-0.06	0.034
cg20513206	<i>C19orf47</i>	19	TRUE	0.65	0.70	-0.06	0.048
cg12619509	<i>DNASE1L2</i>	16	TRUE	0.25	0.31	-0.06	<0.001
cg20867633	<i>GOLT1A</i>	1	TRUE	0.33	0.39	-0.06	0.002
cg20449692	<i>CLDN11</i>	3	TRUE	0.06	0.12	-0.06	0.002
cg23771929	<i>FREQ</i>	9	TRUE	0.19	0.25	-0.06	0.013
cg05154390	<i>MRPS15</i>	1	TRUE	0.17	0.23	-0.06	0.014
cg01333131	<i>CDC42BPB</i>	14	TRUE	0.13	0.19	-0.06	0.010
cg09164559	<i>KIAA1279</i>	10	TRUE	0.24	0.30	-0.06	0.047

cg08361238	<i>PTGFRN</i>	1	TRUE	0.38	0.44	-0.06	0.037
cg24083641	<i>MGC46496</i>	4	TRUE	0.40	0.45	-0.06	0.013
cg02586730	<i>EFEMP2</i>	11	TRUE	0.38	0.44	-0.06	0.044
cg05856931	<i>MSI2</i>	17	TRUE	0.52	0.57	-0.06	0.003
cg07425555	<i>FLJ23447</i>	19	FALSE	0.27	0.33	-0.06	0.002
cg24450312	<i>RASSF5</i>	1	TRUE	0.16	0.22	-0.06	0.001
cg14892768	<i>AXL</i>	19	FALSE	0.16	0.21	-0.06	0.008
cg03942271	<i>AUH</i>	9	TRUE	0.26	0.32	-0.06	0.019
cg14191360	<i>MET</i>	7	TRUE	0.60	0.66	-0.06	0.047
cg03532005	<i>PSPH</i>	7	TRUE	0.24	0.30	-0.06	0.002
cg11503011	<i>EBF</i>	5	FALSE	0.16	0.22	-0.06	0.001
cg05179880	<i>PDCD7</i>	15	TRUE	0.22	0.28	-0.06	0.021
cg00066816	<i>IL12B</i>	5	TRUE	0.35	0.41	-0.06	0.029
cg04759439	<i>CAST1</i>	3	TRUE	0.19	0.25	-0.06	<0.001
cg04065065	<i>PIGO</i>	9	TRUE	0.20	0.26	-0.06	<0.001
cg11976166	<i>TGFB2</i>	1	TRUE	0.19	0.25	-0.06	0.001
cg08697665	<i>RARRES1</i>	3	TRUE	0.33	0.39	-0.06	0.011
cg22134325	<i>NPAS4</i>	11	TRUE	0.17	0.23	-0.06	0.012
cg08216808	<i>ARPC2</i>	2	FALSE	0.22	0.28	-0.06	0.009
cg14166009	<i>HKR1</i>	19	TRUE	0.18	0.23	-0.06	0.013
cg25482967	<i>MRPS10</i>	6	TRUE	0.31	0.36	-0.06	0.010
cg02214188	<i>BDH2</i>	4	FALSE	0.47	0.52	-0.06	0.004
cg16152813	<i>FAM57B</i>	16	FALSE	0.16	0.22	-0.06	0.001
cg11466908	<i>AUH</i>	9	TRUE	0.09	0.15	-0.06	<0.001
cg04371779	<i>GPATCH2L</i>	14	TRUE	0.09	0.15	-0.06	0.008
cg02401978	<i>ZNF746</i>	7	FALSE	0.53	0.58	-0.06	0.040
cg01457653	<i>FBXL8</i>	16	TRUE	0.09	0.14	-0.06	0.024
cg09310112	<i>JMJD2B</i>	19	TRUE	0.09	0.15	-0.06	0.022
cg11418559	<i>ZNF593</i>	1	TRUE	0.27	0.33	-0.06	0.025
cg27069753	<i>ELA3B</i>	1	FALSE	0.51	0.57	-0.06	0.020
cg17593391	<i>RRAGC</i>	1	TRUE	0.26	0.32	-0.06	0.046
cg08749917	<i>RTP1</i>	3	FALSE	0.43	0.49	-0.06	0.029
cg07036530	<i>GPR26</i>	10	TRUE	0.29	0.35	-0.06	0.012
cg21151355	<i>GJB3</i>	1	FALSE	0.24	0.30	-0.06	0.008
cg17166338	<i>TERT</i>	5	TRUE	0.48	0.54	-0.06	0.026
cg19350340	<i>ASPM</i>	1	TRUE	0.32	0.38	-0.06	0.008
cg22986999	<i>MRGPRF</i>	11	TRUE	0.28	0.34	-0.06	0.042
cg27112247	<i>TMED2</i>	12	TRUE	0.53	0.59	-0.06	<0.001
cg01200177	<i>POLR2D</i>	2	TRUE	0.31	0.37	-0.06	0.011

cg11052143	<i>ALS2CR11</i>	2	TRUE	0.18	0.25	-0.06	0.025
cg03682712	<i>LOXL1</i>	15	TRUE	0.10	0.16	-0.06	0.016
cg20119051	<i>R3HDM1</i>	2	TRUE	0.48	0.54	-0.06	0.001
cg10927536	<i>SRRD</i>	22	TRUE	0.35	0.41	-0.06	0.019
cg04845628	<i>MINA</i>	3	TRUE	0.63	0.69	-0.06	0.001
cg05194726	<i>NRIP2</i>	12	FALSE	0.11	0.17	-0.06	0.017
cg11412582	<i>HERC2</i>	15	TRUE	0.12	0.18	-0.06	0.024
cg23769143	<i>TIMP4</i>	3	FALSE	0.18	0.25	-0.06	0.032
cg12256080	<i>ABT1</i>	6	TRUE	0.09	0.15	-0.06	0.004
cg11730100	<i>FEN1</i>	11	TRUE	0.23	0.29	-0.06	0.002
cg25225238	<i>GRM3</i>	7	FALSE	0.33	0.39	-0.06	0.039
cg12324629	<i>ULK2</i>	17	TRUE	0.37	0.44	-0.06	0.029
cg04532952	<i>CA4</i>	17	TRUE	0.14	0.20	-0.06	0.002
cg15557833	<i>MFSDB8</i>	4	TRUE	0.25	0.32	-0.06	<0.001
cg07884019	<i>HMP19</i>	5	FALSE	0.28	0.34	-0.06	0.047
cg11177693	<i>ZNF513</i>	2	TRUE	0.56	0.62	-0.06	0.020
cg21759080	<i>STX5A</i>	11	TRUE	0.13	0.19	-0.06	0.021
cg24674220	<i>GMEB2</i>	20	FALSE	0.71	0.77	-0.06	0.045
cg03098721	<i>TLL7</i>	1	TRUE	0.58	0.64	-0.06	0.024
cg25982743	<i>TIMP4</i>	3	TRUE	0.14	0.21	-0.06	0.001
cg20856064	<i>PH-4</i>	3	TRUE	0.17	0.23	-0.06	<0.001
cg24792360	<i>FUCA1</i>	1	TRUE	0.41	0.48	-0.06	0.038
cg03513163	<i>PCDHB1</i>	5	TRUE	0.29	0.35	-0.06	0.032
cg05587474	<i>MOV10</i>	1	TRUE	0.38	0.45	-0.06	<0.001
cg17327630	<i>ZNF212</i>	7	TRUE	0.17	0.23	-0.07	0.007
cg00647741	<i>ZNF274</i>	19	FALSE	0.43	0.49	-0.07	0.043
cg11536940	<i>PGCP</i>	8	TRUE	0.25	0.32	-0.07	0.038
cg17865752	<i>CCNT2</i>	2	TRUE	0.30	0.36	-0.07	0.019
cg19974223	<i>ANKRD33</i>	12	TRUE	0.60	0.66	-0.07	0.013
cg21493666	<i>PPME1</i>	11	TRUE	0.20	0.26	-0.07	0.005
cg05303448	<i>AACS</i>	12	TRUE	0.22	0.29	-0.07	0.001
cg10994379	<i>CAPSL</i>	5	FALSE	0.37	0.44	-0.07	0.050
cg00571634	<i>WDR5B</i>	3	TRUE	0.41	0.48	-0.07	0.003
cg14920846	<i>NAV1</i>	1	TRUE	0.42	0.48	-0.07	0.025
cg08707819	<i>RCOR1</i>	14	TRUE	0.35	0.42	-0.07	0.001
cg24362726	<i>C4orf33</i>	4	FALSE	0.64	0.71	-0.07	0.048
cg26431343	<i>HSPC117</i>	22	FALSE	0.48	0.55	-0.07	0.005
cg11908570	<i>KIAA0040</i>	1	TRUE	0.24	0.31	-0.07	0.001
cg22972055	<i>UNC84A</i>	7	TRUE	0.68	0.75	-0.07	0.019

cg17783509	<i>PHOX2B</i>	4	FALSE	0.30	0.37	-0.07	0.009
cg23547429	<i>SLC43A3</i>	11	FALSE	0.20	0.26	-0.07	<0.001
cg14435807	<i>LOXL1</i>	15	TRUE	0.13	0.20	-0.07	0.002
cg05257610	<i>NDUFAF7</i>	2	FALSE	0.57	0.64	-0.07	0.039
cg01860753	<i>RASSF5</i>	1	TRUE	0.22	0.29	-0.07	0.012
cg12271671	<i>FGL2</i>	7	FALSE	0.29	0.35	-0.07	0.016
cg07129274	<i>HIST1H2AL</i>	6	TRUE	0.27	0.34	-0.07	0.012
cg02860543	<i>IGF2BP3</i>	7	TRUE	0.42	0.49	-0.07	0.043
cg25345738	<i>PWP1</i>	12	FALSE	0.16	0.22	-0.07	0.018
cg01718365	<i>AOF2</i>	1	TRUE	0.24	0.31	-0.07	0.008
cg01288089	<i>CXCL10</i>	4	FALSE	0.25	0.32	-0.07	<0.001
cg02147791	<i>SAP18</i>	13	TRUE	0.22	0.29	-0.07	0.035
cg09404633	<i>LMOD1</i>	1	TRUE	0.21	0.28	-0.07	0.001
cg15868302	<i>FOXD2</i>	1	TRUE	0.42	0.49	-0.07	0.018
cg09047884	<i>TLL1</i>	22	TRUE	0.58	0.65	-0.07	0.001
cg02849695	<i>CCDC19</i>	1	TRUE	0.24	0.31	-0.07	0.001
cg07693270	<i>RPL39L</i>	3	TRUE	0.41	0.48	-0.07	<0.001
cg03160508	<i>RHOD</i>	11	TRUE	0.18	0.25	-0.07	0.015
cg18632102	<i>CNOT8</i>	5	TRUE	0.37	0.44	-0.07	0.020
cg20426860	<i>FLJ20422</i>	19	TRUE	0.18	0.25	-0.07	0.006
cg24088408	<i>E2F1</i>	20	TRUE	0.53	0.61	-0.07	0.027
cg21422208	<i>RFT1</i>	3	TRUE	0.28	0.35	-0.07	0.011
cg19453250	<i>STAT1P1</i>	18	FALSE	0.31	0.38	-0.07	0.007
cg18847227	<i>SUMF1</i>	3	TRUE	0.39	0.47	-0.07	0.015
cg27239157	<i>MCF2L2</i>	3	TRUE	0.41	0.48	-0.07	<0.001
cg15815843	<i>MFAP5</i>	12	FALSE	0.72	0.79	-0.07	0.017
cg20773127	<i>ENPEP</i>	4	TRUE	0.41	0.48	-0.07	0.037
cg03876622	<i>CSDA</i>	12	TRUE	0.21	0.29	-0.07	0.017
cg14036856	<i>MGC52423</i>	1	FALSE	0.62	0.69	-0.07	0.025
cg17387870	<i>CHFR</i>	12	TRUE	0.24	0.31	-0.07	0.017
cg11672225	<i>RNF185</i>	22	TRUE	0.20	0.27	-0.07	0.006
cg01337047	<i>DSG1</i>	18	FALSE	0.46	0.53	-0.07	0.048
cg08713365	<i>C20orf98</i>	20	TRUE	0.08	0.16	-0.07	0.017
cg14711201	<i>SKP2</i>	5	TRUE	0.14	0.21	-0.07	0.001
cg07460665	<i>CALCOCO2</i>	17	TRUE	0.16	0.23	-0.07	0.002
cg19759064	<i>PHKG1</i>	7	FALSE	0.29	0.36	-0.07	0.046
cg11816577	<i>YWHAE</i>	17	TRUE	0.15	0.23	-0.07	0.047
cg18977436	<i>FGF14</i>	13	FALSE	0.32	0.39	-0.08	0.006
cg26924825	<i>LCAT</i>	16	FALSE	0.54	0.62	-0.08	0.039

cg15881727	ZBED4	22	TRUE	0.11	0.18	-0.08	0.001
cg00674922	SATB1	3	TRUE	0.39	0.46	-0.08	0.005
cg05624932	CRISPLD1	8	TRUE	0.35	0.42	-0.08	0.031
cg17378989	ERCC1	19	TRUE	0.32	0.40	-0.08	0.020
cg27394046	XRN2	20	TRUE	0.51	0.59	-0.08	0.027
cg05333568	CCDC185	1	TRUE	0.26	0.34	-0.08	0.019
cg16121444	NME7	1	TRUE	0.16	0.23	-0.08	0.025
cg01919208	LAMB2	3	TRUE	0.16	0.24	-0.08	0.009
cg20055101	ZNF206	16	FALSE	0.33	0.41	-0.08	0.041
cg10217449	GNPDA2	4	TRUE	0.45	0.53	-0.08	0.018
cg18964732	TMCO1	1	TRUE	0.16	0.24	-0.08	0.002
cg21993406	CENPH	5	FALSE	0.32	0.40	-0.08	0.039
cg01446393	FAM107A	3	FALSE	0.58	0.66	-0.08	0.045
cg26284390	NFKBIZ	3	TRUE	0.25	0.33	-0.08	0.026
cg13549845	GRID2	4	TRUE	0.48	0.56	-0.08	0.011
cg00984602	SRF	6	TRUE	0.20	0.28	-0.08	0.001
cg26486702	USP21	1	TRUE	0.23	0.31	-0.08	0.022
cg05420896	DCC	18	TRUE	0.29	0.37	-0.08	0.007
cg10841258	CTTNBP2NL	1	TRUE	0.23	0.31	-0.08	0.037
cg12148581	RPL14	3	TRUE	0.41	0.49	-0.08	0.028
cg18053607	PIB5PA	22	FALSE	0.22	0.30	-0.08	0.045
cg12435611	BRIP1	17	TRUE	0.28	0.36	-0.08	0.014
cg19972619	MYC	8	TRUE	0.08	0.16	-0.08	0.005
cg24333473	ZNF597	16	TRUE	0.23	0.31	-0.08	0.032
cg05681757	FGD4	12	FALSE	0.34	0.43	-0.09	0.001
cg16858125	ELOVL1	1	TRUE	0.45	0.54	-0.09	0.018
cg21374864	TOR1A	9	TRUE	0.30	0.39	-0.09	0.012
cg06363129	SOSTDC1	7	FALSE	0.34	0.42	-0.09	0.001
cg03813905	NDUFB9	8	TRUE	0.28	0.37	-0.09	0.011
cg01185080	ZNF710	15	TRUE	0.25	0.34	-0.09	0.005
cg25162921	MTAP	9	TRUE	0.24	0.33	-0.09	0.004
cg23904249	MGC2574	11	TRUE	0.59	0.68	-0.09	0.001
cg08005849	HGF	7	FALSE	0.38	0.47	-0.09	0.005
cg12477119	CRKRS	17	TRUE	0.30	0.39	-0.09	0.003
cg04561804	TLOC1	3	FALSE	0.30	0.39	-0.09	0.025
cg09494546	SLC16A4	1	FALSE	0.58	0.67	-0.09	0.017
cg24115040	DLX5	7	TRUE	0.42	0.51	-0.09	0.021
cg16706631	HIST1H4E	6	TRUE	0.29	0.38	-0.09	0.038
cg06609049	THOP1	19	TRUE	0.36	0.45	-0.09	0.016

cg08586737	<i>GCC1</i>	7	TRUE	0.30	0.39	-0.09	0.038
cg27546682	<i>STK40</i>	1	TRUE	0.29	0.38	-0.09	0.004
cg15298323	<i>ACAT2</i>	6	TRUE	0.62	0.71	-0.09	0.001
cg01745657	<i>PLCXD2</i>	3	TRUE	0.28	0.37	-0.09	0.005
cg04975920	<i>TSPAN1</i>	1	FALSE	0.47	0.56	-0.09	0.047
cg20050113	<i>SLC9A2</i>	2	TRUE	0.35	0.44	-0.09	0.016
cg03787486	<i>ADH5</i>	4	TRUE	0.24	0.34	-0.09	<0.001
cg01985396	<i>DAAM2</i>	6	FALSE	0.26	0.35	-0.10	<0.001
cg15780361	<i>ALS2CR11</i>	2	TRUE	0.33	0.43	-0.10	0.006
cg22496254	<i>HCAP-G</i>	4	FALSE	0.56	0.65	-0.10	0.035
cg23242898	<i>DCC</i>	18	TRUE	0.57	0.67	-0.10	0.011
cg06493080	<i>HOXB7</i>	17	TRUE	0.35	0.45	-0.10	0.038
cg10735607	<i>TMEM109</i>	11	TRUE	0.53	0.63	-0.10	0.048
cg19573166	<i>SLC22A17</i>	14	FALSE	0.47	0.57	-0.10	0.035
cg27413025	<i>CYP20A1</i>	2	TRUE	0.28	0.38	-0.10	<0.001
cg24745738	<i>EDNRB</i>	13	TRUE	0.22	0.32	-0.10	0.001
cg10003443	<i>FOXA2</i>	20	TRUE	0.36	0.46	-0.10	0.010
cg07455279	<i>NDUFA3</i>	19	TRUE	0.21	0.31	-0.10	0.046
cg27202708	<i>CCDC185</i>	1	TRUE	0.27	0.38	-0.11	0.001
cg03882305	<i>TRIM50C</i>	7	TRUE	0.38	0.49	-0.11	0.003
cg26777475	<i>PCOLCE</i>	7	FALSE	0.44	0.55	-0.11	0.048
cg04689061	<i>PKIA</i>	8	TRUE	0.31	0.42	-0.11	0.025
cg03454353	<i>ZFP37</i>	9	TRUE	0.45	0.56	-0.11	<0.001
cg20229788	<i>GCKR</i>	2	FALSE	0.37	0.49	-0.11	0.005
cg23970338	<i>TSFM</i>	12	TRUE	0.13	0.25	-0.12	0.010
cg21168622	<i>ZNF350</i>	19	TRUE	0.24	0.36	-0.12	0.032
cg22502502	<i>TRIM38</i>	6	FALSE	0.28	0.40	-0.12	0.002
cg08965324	<i>LTA4H</i>	12	TRUE	0.32	0.45	-0.13	0.032
cg20587336	<i>ARMC1</i>	8	TRUE	0.35	0.49	-0.14	0.006
cg07713361	<i>APOL1</i>	22	FALSE	0.41	0.55	-0.14	0.003
cg12992720	<i>EDG4</i>	19	TRUE	0.25	0.39	-0.14	0.001
cg25125453	<i>SPTLC3</i>	20	FALSE	0.44	0.58	-0.15	0.002
cg08942800	<i>CRISP2</i>	6	TRUE	0.36	0.52	-0.17	0.017

**Tabla 5. Lista de CDMs presentes en TH en la comparación de los grupos de OD y OND.**

CpG	Símbolo del gen	Cromosoma	Isla CpG	Beta DO	Beta OB	Delta Beta	Valor p
cg10296238	<i>SPATC1L</i>	21	TRUE	0.59	0.47	0.12	0.029
cg18145505	<i>GREM1</i>	15	TRUE	0.35	0.23	0.12	0.013
cg23002761	<i>FBLIM1</i>	1	TRUE	0.31	0.19	0.11	0.026
cg10746737	<i>HLA-DRB5</i>	6	FALSE	0.71	0.61	0.11	0.018
cg09794131	<i>HYDIN</i>	16	TRUE	0.34	0.23	0.11	0.030
cg07747299	<i>SPATC1L</i>	21	TRUE	0.56	0.46	0.10	0.040
cg06851207	<i>FLJ10781</i>	19	TRUE	0.72	0.62	0.09	0.028
cg06361108	<i>CCNF</i>	16	TRUE	0.21	0.13	0.09	0.009
cg25902889	<i>FSD1</i>	19	FALSE	0.62	0.53	0.09	0.009
cg17483510	<i>GNB4</i>	3	TRUE	0.45	0.36	0.08	0.011
cg26764244	<i>GNG12</i>	1	TRUE	0.28	0.20	0.08	0.034
cg16670497	<i>GSTM2</i>	1	TRUE	0.44	0.36	0.08	0.024
cg17179881	<i>BIK</i>	22	TRUE	0.62	0.54	0.08	0.017
cg12699145	<i>TMC7</i>	16	TRUE	0.29	0.21	0.08	0.009
cg07404485	<i>PON1</i>	7	FALSE	0.38	0.31	0.08	0.002
cg06268694	<i>CELSR1</i>	22	TRUE	0.30	0.23	0.07	0.026
cg26577529	<i>KRT6E</i>	12	FALSE	0.73	0.65	0.07	0.016
cg04557383	<i>MT1H</i>	16	TRUE	0.43	0.35	0.07	0.005
cg19297232	<i>SMPD3</i>	16	TRUE	0.59	0.52	0.07	0.029
cg22039287	<i>RIT2</i>	18	FALSE	0.61	0.53	0.07	0.006
cg22609784	<i>MSX1</i>	4	TRUE	0.55	0.48	0.07	0.001
cg07640473	<i>SEMA3F</i>	3	TRUE	0.51	0.44	0.07	0.029
cg10447080	<i>FILIP1</i>	6	FALSE	0.37	0.30	0.07	0.012
cg18055394	<i>EPHA3</i>	3	TRUE	0.34	0.27	0.07	0.041
cg03283421	<i>CUZD1</i>	10	FALSE	0.72	0.65	0.07	0.034
cg08137040	<i>ZNF800</i>	7	TRUE	0.35	0.28	0.07	0.003
cg15534366	<i>CDH4</i>	20	FALSE	0.52	0.46	0.07	0.012
cg00563926	<i>TGFBR3</i>	1	TRUE	0.27	0.21	0.06	0.047
cg26525091	<i>MADCAM1</i>	19	TRUE	0.24	0.18	0.06	0.004
cg00949442	<i>ABCA3</i>	16	TRUE	0.24	0.18	0.06	0.002
cg06147863	<i>SPI1</i>	11	FALSE	0.67	0.61	0.06	0.001
cg07914866	<i>IRAK3</i>	12	TRUE	0.33	0.27	0.06	0.010
cg13391638	<i>FLJ13576</i>	7	TRUE	0.41	0.35	0.06	0.028
cg21974239	<i>MAPK12</i>	22	TRUE	0.22	0.16	0.06	0.007
cg00489401	<i>FLT4</i>	5	TRUE	0.20	0.14	0.06	0.021

cg15778232	<i>PHB2</i>	12	FALSE	0.63	0.57	0.06	0.019
cg13975369	<i>TSGA14</i>	7	TRUE	0.32	0.26	0.06	0.010
cg14620221	<i>OR8B8</i>	11	FALSE	0.80	0.74	0.06	0.018
cg08946332	<i>ALOX12</i>	17	TRUE	0.87	0.81	0.06	0.016
cg27038439	<i>MSX1</i>	4	TRUE	0.75	0.70	0.06	0.044
cg12499211	<i>SH2D2A</i>	1	TRUE	0.44	0.38	0.06	0.049
cg24789869	<i>DDX11</i>	12	TRUE	0.12	0.07	0.06	0.001
cg26069745	<i>HOXA2</i>	7	TRUE	0.25	0.19	0.06	0.021
cg27063525	<i>NUS1</i>	6	TRUE	0.17	0.11	0.06	0.049
cg03760483	<i>ALOX12</i>	17	TRUE	0.43	0.37	0.06	0.043
cg18815943	<i>FOXE3</i>	1	TRUE	0.13	0.07	0.06	0.001
cg07637239	<i>KCNK18</i>	10	FALSE	0.52	0.46	0.06	0.018
cg09328024	<i>DYRK3</i>	1	TRUE	0.28	0.22	0.06	0.022
cg00043004	<i>NOXO1</i>	16	TRUE	0.16	0.11	0.06	0.006
cg18501026	<i>DOCK3</i>	3	TRUE	0.23	0.17	0.06	0.002
cg19777470	<i>CRABP1</i>	15	TRUE	0.25	0.20	0.06	0.013
cg13707560	<i>NME5</i>	5	TRUE	0.42	0.37	0.05	0.026
cg09606564	<i>MFAP4</i>	17	FALSE	0.34	0.29	0.05	0.036
cg19428417	<i>RRAD</i>	16	TRUE	0.52	0.47	0.05	0.025
cg09238677	<i>C3AR1</i>	12	FALSE	0.47	0.41	0.05	0.047
cg00328227	<i>C1orf59</i>	1	TRUE	0.53	0.48	0.05	0.048
cg16352283	<i>FAM46B</i>	1	TRUE	0.52	0.47	0.05	0.031
cg21096915	<i>MGC16291</i>	10	TRUE	0.17	0.22	-0.05	0.013
cg19149785	<i>KLK8</i>	19	TRUE	0.65	0.70	-0.05	0.044
cg16330965	<i>SNAPC5</i>	15	TRUE	0.23	0.28	-0.05	0.012
cg06690548	<i>SLC7A11</i>	4	TRUE	0.73	0.78	-0.05	0.005
cg13817266	<i>HSPA6</i>	1	TRUE	0.35	0.40	-0.05	0.047
cg02104644	<i>SYT7</i>	11	TRUE	0.11	0.16	-0.05	0.046
cg10735607	<i>TMEM109</i>	11	TRUE	0.48	0.53	-0.05	0.013
cg15619125	<i>MAMDC4</i>	9	FALSE	0.44	0.49	-0.05	0.037
cg00754253	<i>HRASLS5</i>	11	FALSE	0.33	0.38	-0.05	0.035
cg13823701	<i>TNXB</i>	6	FALSE	0.27	0.33	-0.05	0.049
cg26125600	<i>PF4V1</i>	4	FALSE	0.38	0.43	-0.05	0.003
cg26205432	<i>PLN</i>	6	FALSE	0.56	0.61	-0.05	0.032
cg15784615	<i>LTBR</i>	12	FALSE	0.22	0.27	-0.05	0.013
cg14861570	<i>MMD</i>	17	FALSE	0.26	0.32	-0.05	0.001
cg09547190	<i>C9orf89</i>	9	TRUE	0.38	0.44	-0.05	0.009
cg23685580	<i>CATSPER2</i>	15	TRUE	0.81	0.87	-0.05	0.027
cg18940763	<i>XBP1</i>	22	TRUE	0.13	0.19	-0.05	0.013

cg05341115	<i>HYAL4</i>	7	FALSE	0.67	0.72	-0.05	0.001
cg14532519	<i>TCF20</i>	22	FALSE	0.58	0.63	-0.05	0.019
cg24603941	<i>MIA2</i>	14	FALSE	0.51	0.57	-0.05	0.023
cg12815142	<i>SPAG7</i>	17	TRUE	0.30	0.36	-0.05	0.037
cg04991214	<i>PFDN2</i>	1	FALSE	0.50	0.56	-0.05	0.050
cg14882700	<i>OTOP1</i>	4	TRUE	0.20	0.26	-0.05	0.037
cg06948408	<i>TMEM125</i>	1	TRUE	0.18	0.23	-0.05	0.017
cg18184219	<i>CEP170</i>	1	FALSE	0.73	0.79	-0.05	0.031
cg02741177	<i>PROL1</i>	4	FALSE	0.65	0.70	-0.05	0.005
cg03964111	<i>LR8</i>	7	FALSE	0.17	0.22	-0.05	0.003
cg17122311	<i>IL27</i>	16	FALSE	0.46	0.51	-0.05	0.040
cg10742801	<i>PRAP1</i>	10	FALSE	0.29	0.34	-0.05	0.006
cg01035422	<i>PLIN</i>	15	FALSE	0.70	0.76	-0.05	0.018
cg01895214	<i>LOC654342</i>	2	TRUE	0.49	0.54	-0.05	0.001
cg01040850	<i>MR1</i>	1	FALSE	0.53	0.59	-0.05	0.046
cg14851685	<i>CYP4F22</i>	19	FALSE	0.60	0.65	-0.05	0.036
cg05507459	<i>NXNL2</i>	9	TRUE	0.29	0.34	-0.05	0.001
cg00135393	<i>FGG</i>	4	FALSE	0.31	0.37	-0.05	0.036
cg25017250	<i>APOC4</i>	19	TRUE	0.28	0.34	-0.05	0.038
cg13431205	<i>RB1</i>	13	TRUE	0.51	0.57	-0.05	0.039
cg10574499	<i>UNQ2446</i>	16	FALSE	0.28	0.34	-0.06	0.037
cg02655623	<i>HSA277841</i>	17	FALSE	0.61	0.67	-0.06	0.003
cg03894103	<i>PREPL</i>	2	FALSE	0.70	0.76	-0.06	0.033
cg07514381	<i>LRRC2</i>	3	FALSE	0.69	0.75	-0.06	0.042
cg14477619	<i>NPC1L1</i>	7	FALSE	0.41	0.47	-0.06	0.013
cg04106785	<i>CDK5R1</i>	17	TRUE	0.32	0.37	-0.06	0.010
cg17229388	<i>MGC35169</i>	13	TRUE	0.70	0.76	-0.06	0.022
cg13849691	<i>ACSL5</i>	10	TRUE	0.78	0.84	-0.06	0.050
cg06048973	<i>ACTC</i>	15	FALSE	0.50	0.55	-0.06	0.044
cg08137716	<i>TLL6</i>	17	FALSE	0.71	0.76	-0.06	0.022
cg24652919	<i>WDR58</i>	16	FALSE	0.64	0.69	-0.06	0.039
cg20199333	<i>F2</i>	11	FALSE	0.48	0.54	-0.06	0.016
cg24898863	<i>S100A8</i>	1	FALSE	0.23	0.29	-0.06	0.002
cg20099806	<i>CCDC47</i>	17	FALSE	0.25	0.31	-0.06	0.004
cg18294158	<i>ORC5L</i>	7	FALSE	0.66	0.72	-0.06	0.007
cg15398520	<i>LPAL2</i>	6	FALSE	0.35	0.41	-0.06	0.027
cg25677709	<i>NDST1</i>	5	FALSE	0.50	0.56	-0.06	0.016
cg24269657	<i>F7</i>	13	FALSE	0.41	0.46	-0.06	0.006
cg00466492	<i>CTXN1</i>	19	TRUE	0.76	0.81	-0.06	0.025

cg01484156	<i>NCALD</i>	8	FALSE	0.34	0.40	-0.06	<0.001
cg20584011	<i>ZDHC11</i>	5	TRUE	0.72	0.78	-0.06	0.002
cg16153267	<i>RB1</i>	13	TRUE	0.56	0.61	-0.06	0.008
cg22337624	<i>DHX38</i>	16	FALSE	0.27	0.33	-0.06	0.003
cg06850526	<i>MGC15523</i>	17	TRUE	0.27	0.33	-0.06	0.039
cg18901980	<i>KRT25A</i>	17	FALSE	0.68	0.74	-0.06	0.003
cg16639185	<i>LGTN</i>	1	TRUE	0.33	0.39	-0.06	0.031
cg10303487	<i>DPYS</i>	8	TRUE	0.07	0.13	-0.06	0.033
cg00579402	<i>FUT6</i>	19	FALSE	0.52	0.58	-0.06	0.034
cg04837071	<i>NOXA1</i>	9	TRUE	0.53	0.59	-0.06	0.033
cg12694870	<i>HPD</i>	12	FALSE	0.38	0.44	-0.06	0.027
cg07233761	<i>ESM1</i>	5	TRUE	0.27	0.33	-0.06	0.031
cg22171829	<i>PDK4</i>	7	TRUE	0.12	0.18	-0.06	0.037
cg15201291	<i>CYP2C8</i>	10	FALSE	0.53	0.60	-0.06	0.014
cg05985767	<i>ANPEP</i>	15	TRUE	0.36	0.42	-0.06	0.008
cg07163603	<i>HLA-A</i>	6	FALSE	0.34	0.40	-0.06	0.032
cg24920358	<i>PPIE</i>	1	TRUE	0.32	0.38	-0.06	0.046
cg03835296	<i>SLC17A1</i>	6	FALSE	0.32	0.38	-0.07	0.014
cg12542604	<i>ANKS1A</i>	6	TRUE	0.14	0.20	-0.07	0.020
cg07745725	<i>PSG3</i>	19	FALSE	0.55	0.62	-0.07	0.008
cg02523400	<i>SERPIND1</i>	22	FALSE	0.34	0.40	-0.07	0.048
cg24792360	<i>FUCA1</i>	1	TRUE	0.34	0.41	-0.07	0.011
cg27420123	<i>FSHB</i>	11	FALSE	0.34	0.41	-0.07	0.007
cg23834593	<i>HNF4A</i>	20	FALSE	0.37	0.44	-0.07	0.029
cg10414946	<i>MS4A2</i>	11	FALSE	0.47	0.54	-0.07	0.020
cg07150830	<i>NOS2A</i>	17	FALSE	0.52	0.59	-0.07	0.020
cg25514304	<i>PSEN2</i>	1	FALSE	0.42	0.49	-0.07	0.041
cg15783800	<i>HAK</i>	18	TRUE	0.36	0.43	-0.07	0.007
cg27440834	<i>SNX4</i>	3	FALSE	0.56	0.63	-0.07	0.038
cg02735486	<i>ANK2</i>	4	TRUE	0.46	0.53	-0.07	0.030
cg15149645	<i>P8</i>	16	FALSE	0.17	0.24	-0.07	0.003
cg13614083	<i>KCNAB2</i>	1	TRUE	0.51	0.58	-0.07	0.032
cg12003230	<i>LINC00313</i>	21	FALSE	0.48	0.55	-0.07	0.017
cg02399455	<i>SRI</i>	7	FALSE	0.54	0.61	-0.07	0.025
cg15357639	<i>OGG1</i>	3	TRUE	0.78	0.85	-0.07	0.013
cg07109801	<i>NDUFAF3</i>	3	TRUE	0.50	0.57	-0.07	0.018
cg19464944	<i>FCGR1A</i>	1	FALSE	0.31	0.39	-0.07	0.038
cg20615832	<i>PF4V1</i>	4	TRUE	0.28	0.35	-0.07	0.022
cg23322523	<i>TRIM55</i>	8	FALSE	0.26	0.33	-0.07	0.013

cg05976325	<i>LOC284912</i>	22	FALSE	0.51	0.58	-0.07	0.038
cg13520715	<i>LINC00479</i>	21	FALSE	0.70	0.77	-0.07	0.022
cg25657700	<i>SNRPN</i>	15	TRUE	0.54	0.62	-0.07	0.026
cg04994456	<i>RNF186</i>	1	FALSE	0.40	0.48	-0.08	0.010
cg19554294	<i>VN1R2</i>	19	FALSE	0.51	0.58	-0.08	0.010
cg18429742	<i>ZDHHC11</i>	5	TRUE	0.64	0.72	-0.08	0.016
cg13705284	<i>ACOX2</i>	3	FALSE	0.19	0.27	-0.08	0.012
cg13726463	<i>COX6A2</i>	16	TRUE	0.51	0.58	-0.08	0.004
cg26955850	<i>OXT</i>	20	TRUE	0.37	0.45	-0.08	0.050
cg04662594	<i>EPB49</i>	8	FALSE	0.32	0.40	-0.08	0.002
cg20131968	<i>CCDC47</i>	17	FALSE	0.33	0.42	-0.08	0.020
cg03743584	<i>PRAP1</i>	10	FALSE	0.19	0.27	-0.08	0.003
cg06784466	<i>FPRL2</i>	19	FALSE	0.39	0.48	-0.08	0.008
cg11108890	<i>VAMP5</i>	2	TRUE	0.10	0.18	-0.08	0.040
cg26631477	<i>GPR125</i>	4	TRUE	0.19	0.27	-0.08	<0.001
cg02142461	<i>LYAR</i>	4	FALSE	0.72	0.80	-0.08	0.013
cg03533858	<i>MORN1</i>	1	FALSE	0.43	0.51	-0.08	0.029
cg08510456	<i>BSN</i>	3	TRUE	0.39	0.47	-0.08	0.039
cg06194808	<i>MGC9712</i>	7	FALSE	0.48	0.57	-0.09	0.008
cg25598083	<i>ACOT2</i>	14	FALSE	0.48	0.57	-0.09	0.025
cg07251788	<i>CLTCL1</i>	22	TRUE	0.42	0.51	-0.09	0.028
cg18678121	<i>SEC61A2</i>	10	TRUE	0.50	0.60	-0.09	0.011
cg03733371	<i>LIPH</i>	3	FALSE	0.44	0.54	-0.10	0.047
cg02192965	<i>SLC3A1</i>	2	FALSE	0.60	0.70	-0.10	0.023
cg24333473	<i>ZNF597</i>	16	TRUE	0.37	0.47	-0.10	0.042
cg17264470	<i>FGF21</i>	19	FALSE	0.76	0.87	-0.11	0.016
cg22730830	<i>PRSS21</i>	16	TRUE	0.57	0.68	-0.11	0.003
cg24362726	<i>C4orf33</i>	4	FALSE	0.31	0.42	-0.11	0.039
cg01600189	<i>FLJ20444</i>	9	TRUE	0.18	0.30	-0.11	0.005
cg24092914	<i>VHL</i>	3	TRUE	0.46	0.58	-0.12	0.021
cg26267561	<i>OXT</i>	20	TRUE	0.68	0.84	-0.15	0.001
cg20655558	<i>DNAJB7</i>	22	FALSE	0.56	0.72	-0.16	0.035
cg23349790	<i>IGSF21</i>	1	TRUE	0.12	0.30	-0.18	<0.001

**Tabla 6. Términos enriquecidos en TAS en el análisis ontológico de genes de los procesos biológicos.**

Termino GO	Nivel de enriquecimiento	Número de genes	Valor p	Genes
Regulation of cellular ketone metabolic process	22.1	4	0.001	<i>LEP, CPT1B, IRS1, ADIPOQ</i>
Regulation of carbohydrate biosynthetic process	44.9	3	0.002	<i>LEP, IRS1, ADIPOQ</i>
Muscle organ development	7.5	5	0.004	<i>CPT1B, TSC1, MYF5, SGCD, ALX4</i>
Regulation of lipid metabolic process	11.2	4	0.005	<i>LEP, CPT1B, IRS1, ADIPOQ</i>
Regulation of glucose metabolic process	27	3	0.005	<i>LEP, IRS1, ADIPOQ</i>
Fatty acid catabolic process	26.2	3	0.006	<i>LEP, CPT1B, ADIPOQ</i>
Regulation of cellular carbohydrate metabolic process	24.8	3	0.006	<i>LEP, IRS1, ADIPOQ</i>
Regulation of carbohydrate metabolic process	24.2	3	0.006	<i>LEP, IRS1, ADIPOQ</i>
Regulation of fatty acid metabolic process	19.3	3	0.010	<i>CPT1B, IRS1, ADIPOQ</i>
Embryonic skeletal system morphogenesis	16.6	3	0.013	<i>HOXA4, MYF5, ALX4</i>
Skeletal system development	4.9	5	0.017	<i>HOXA4, CLEC3A, KAZALD1, MYF5, ALX4</i>
Development of primary female sexual characteristics	13.7	3	0.019	<i>LEP, FGF7, FANCG</i>
Cell adhesion	3.1	7	0.020	<i>TSC1, MYF5, SIGLEC7, LGALS7, NINJ2, CTNNA1, DST</i>
Biological adhesion	3.1	7	0.020	<i>TSC1, MYF5, SIGLEC7, LGALS7, NINJ2, CTNNA1, DST</i>
Cellular lipid catabolic process	12.4	3	0.023	<i>LEP, CPT1B, ADIPOQ</i>
Regulation of gluconeogenesis	78.7	2	0.025	<i>LEP, ADIPOQ</i>
Negative regulation of response to stimulus	9.4	3	0.038	<i>LEP, IRS1, ADIPOQ</i>
Response to insulin stimulus	9.4	3	0.038	<i>LEP, TSC1, IRS1</i>
Phosphatidylcholine biosynthetic process	44.9	2	0.043	<i>CPT1B, FGF7</i>
Organic acid catabolic process	8.5	3	0.046	<i>LEP, CPT1B, ADIPOQ</i>
Carboxylic acid catabolic process	8.5	3	0.046	<i>LEP, CPT1B, ADIPOQ</i>
Skeletal system morphogenesis	8.4	3	0.047	<i>HOXA4, MYF5, ALX4</i>

**Tabla 7. Términos enriquecidos en TAV en el análisis ontológico de genes de los procesos biológicos.**

Termino GO	Número de genes	Valor p	Genes
Regulation of apoptosis	26	0.003	<i>DCC, MEF2C, ADA, TGFB2, EDNRB, ATG5, PAX7, GRID2, TNFRSF19, MYC, TERT, ERCC1, FGD4, CD3E, SKP2, TRIO, HGF, CSDA, YWHAE, BRCA1, JMY, KCNH8, IL12B, TIAF1, PDCD7, DNM2</i>
Regulation of programmed cell death	26	0.003	<i>DCC, MEF2C, ADA, TGFB2, EDNRB, ATG5, PAX7, GRID2, TNFRSF19, MYC, TERT, ERCC1, FGD4, CD3E, SKP2, TRIO, HGF, CSDA, YWHAE, BRCA1, JMY, KCNH8, IL12B, TIAF1, PDCD7, DNM2</i>
Regulation of cell death	26	0.003	<i>DCC, MEF2C, ADA, TGFB2, EDNRB, ATG5, PAX7, GRID2, TNFRSF19, MYC, TERT, ERCC1, FGD4, CD3E, SKP2, TRIO, HGF, CSDA, YWHAE, BRCA1, JMY, KCNH8, IL12B, TIAF1, PDCD7, DNM2</i>
Negative regulation of lyase activity	5	0.014	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6</i>
Negative regulation of adenylate cyclase activity	5	0.014	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6</i>
Negative regulation of cyclase activity	5	0.014	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6</i>
Negative regulation of neuron differentiation	4	0.018	<i>PHOX2B, FOXA2, DLL1, ASPM</i>
Negative regulation of apoptosis	13	0.019	<i>MEF2C, SKP2, HGF, CSDA, ADA, EDNRB, ATG5, PAX7, KCNH8, TIAF1, MYC, ERCC1, TERT</i>
DNA catabolic process	5	0.019	<i>GTF2H4, DNASE1L2, MYC, XRN2, ERCC1</i>
Negative regulation of programmed cell death	13	0.02	<i>MEF2C, SKP2, HGF, CSDA, ADA, EDNRB, ATG5, PAX7, KCNH8, TIAF1, MYC, ERCC1, TERT</i>
Negative regulation of cell death	13	0.021	<i>MEF2C, SKP2, HGF, CSDA, ADA, EDNRB, ATG5, PAX7, KCNH8, TIAF1, MYC, ERCC1, TERT</i>
Regulation of adenylate cyclase activity	6	0.024	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Regulation of cell cycle	12	0.027	<i>E2F1, CCNT2, SKP2, RPRM, BRIP1, NUSAP1, HERC2, CHFR, PKIA, MYC, BRCA1, TGFB2</i>
Regulation of cyclase activity	6	0.027	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Regulation of camp biosynthetic process	6	0.029	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Regulation of lyase activity	6	0.029	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Regulation of camp metabolic process	6	0.032	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Positive regulation of apoptosis	14	0.033	<i>DCC, CD3E, SKP2, TRIO, YWHAE, BRCA1, TGFB2, JMY, TNFRSF19, IL12B, MYC, PDCD7, DNM2, FGD4</i>
Hepatocyte growth factor receptor signaling pathway	2	0.034	<i>MET, HGF</i>
Positive regulation of programmed cell death	14	0.035	<i>DCC, CD3E, SKP2, TRIO, YWHAE, BRCA1, TGFB2, JMY, TNFRSF19, IL12B, MYC, PDCD7, DNM2, FGD4</i>
Positive regulation of cell death	14	0.036	<i>DCC, CD3E, SKP2, TRIO, YWHAE, BRCA1, TGFB2, JMY, TNFRSF19, IL12B, MYC, PDCD7, DNM2, FGD4</i>
Lymphocyte activation during immune response	3	0.037	<i>RELB, IL12B, ADA</i>
Cell death	20	0.039	<i>E2F1, MEF2C, DCC, TAOK2, FGF14, TRIO, YWHAE, BRCA1, RRAGC, TGFB2, ATXN2, BNIPL, RASSF5, APOL1, ATG5, TNFRSF19, TIAF1, MYC, PDCD7, FGD4</i>
Regulation of nucleotide biosynthetic process	6	0.04	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Regulation of cyclic nucleotide biosynthetic process	6	0.04	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>

Death	20	0.042	<i>E2F1, MEF2C, DCC, TAOK2, FGF14, TRIO, YWHAE, BRCA1, RRAGC, TGFB2, ATXN2, BNIPL, RASSF5, APOL1, ATG5, TNFRSF19, TIAF1, MYC, PDCD7, FGD4</i>
Regulation of cyclic nucleotide metabolic process	6	0.044	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Cell migration	10	0.047	<i>DCC, PHOX2B, EDNRB, TAOK2, MET, ENPEP, IL12B, SRF, YWHAE, TGFB2</i>
Second-messenger-mediated signaling	9	0.048	<i>EDNRB, P2RY6, HRH1, ADCY7, GALR1, GRM6, HIST1H4E, GNAS, FEN1</i>
Regulation of nucleotide metabolic process	6	0.049	<i>EDNRB, GRM3, ADCY7, GALR1, GRM6, GNAS</i>
Regulation of survival gene product expression	3	0.049	<i>MEF2C, SKP2, MYC</i>

**Tabla 8.** Términos enriquecidos en TH en el análisis ontológico de genes de los procesos biológicos.

Termino GO	Número de genes	Valor p	Genes
Response to wounding	13	0.002	<i>C3AR1, KLK8, S100A8, NDST1, IL27, F7, SYT7, EPHA3, FGG, HNF4A, F2, MS4A2, SERPIND1</i>
Regulation of cell growth	7	0.006	<i>HNF4A, SEMA3F, RB1, ESM1, GREM1, CDH4, ALOX12</i>
Regulation of body fluid levels	6	0.007	<i>FGG, HNF4A, OXT, F2, SERPIND1, F7</i>
Regulation of cell size	7	0.008	<i>HNF4A, SEMA3F, TGFB3, RB1, GREM1, CDH4, ALOX12</i>
Regulation of cellular component size	8	0.008	<i>HNF4A, SEMA3F, TGFB3, RB1, EPB49, GREM1, CDH4, ALOX12</i>
Blood coagulation	5	0.011	<i>FGG, HNF4A, F2, SERPIND1, F7</i>
Coagulation	5	0.011	<i>FGG, HNF4A, F2, SERPIND1, F7</i>
Homeostatic process	14	0.011	<i>SRI, C3AR1, OXT, CCDC47, RB1, EPHA3, HNF4A, APOC4, PLN, F2, NPC1L1, TGFB3, DYRK3, MT1H</i>
Hemostasis	5	0.013	<i>FGG, HNF4A, F2, SERPIND1, F7</i>
Regulation of homeostatic process	5	0.016	<i>KLK8, OXT, F2, SPI1, MS4A2</i>
Di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	7	0.016	<i>SRI, C3AR1, OXT, PLN, F2, CCDC47, MT1H</i>
Superoxide metabolic process	3	0.019	<i>NOXO1, NOXA1, ALOX12</i>
Wound healing	6	0.023	<i>FGG, HNF4A, F2, SERPIND1, F7, SYT7</i>
Regulation of nervous system development	6	0.024	<i>HOXA2, CDK5R1, KLK8, SEMA3F, OXT, CDH4</i>
Regulation of cell morphogenesis	5	0.025	<i>KLK8, SEMA3F, TGFB3, FBLIM1, CDH4</i>
Regulation of neuron differentiation	5	0.027	<i>HOXA2, CDK5R1, KLK8, SEMA3F, CDH4</i>
Regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	4	0.028	<i>KLK8, SEMA3F, TGFB3, CDH4</i>
Chemical homeostasis	10	0.030	<i>SRI, C3AR1, HNF4A, APOC4, OXT, PLN, F2, NPC1L1, CCDC47, MT1H</i>
Regulation of cell development	6	0.031	<i>HOXA2, CDK5R1, KLK8, SEMA3F, TGFB3, CDH4</i>
Negative regulation of cellular component organization	5	0.033	<i>IRAK3, KLK8, SEMA3F, TGFB3, EPB49</i>

Calcium ion transport	5	0.033	<i>SRI, CATSPER2, PLN, F2, PSEN2</i>
Response to prostaglandin stimulus	2	0.034	<i>OXT, TGFBR3</i>
Response to prostaglandin E stimulus	2	0.034	<i>OXT, TGFBR3</i>
Muscle organ development	6	0.034	<i>SRI, MSX1, MAPK12, PLN, VAMP5, TGFBR3</i>
Cation homeostasis	7	0.035	<i>SRI, C3AR1, OXT, PLN, F2, CCDCA47, MT1H</i>
Negative regulation of cell growth	4	0.044	<i>HNF4A, SEMA3F, RB1, GREM1</i>
Cellular di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	6	0.044	<i>SRI, C3AR1, OXT, PLN, F2, MT1H</i>
Myeloid cell differentiation	4	0.045	<i>PSEN2, TGFBR3, DYRK3, RB1</i>

**Tabla 9. Genes diferencialmente expresados en ST en la comparación OND y OD.**

Símbolo	Identificador	logFC	Valor p
<i>RAP1GAP</i>	NM_002885.1	1.430	0.001
<i>UTS2</i>	NM_006786.2	1.307	0.009
<i>AMFR</i>	NM_001144.4	1.245	0.020
<i>NFIX</i>	NM_002501.2	1.175	0.023
<i>LOC100131164</i>	XM_001721919.1	1.160	0.002
<i>MCOLN1</i>	NM_020533.1	1.152	<0.001
<i>C16ORF35</i>	NM_001039476.1	1.126	<0.001
<i>RNF182</i>	NM_152737.2	1.101	0.001
<i>SLC4A1</i>	NM_000342.2	1.096	<0.001
<i>HSPC157</i>	NR_023918.1	1.068	0.037
<i>SOCS1</i>	NM_003745.1	1.064	0.008
<i>KRT1</i>	NM_006121.3	1.004	0.001
<i>USF1</i>	NM_007122.3	0.993	0.013
<i>UTS2</i>	NM_021995.1	0.969	0.043
<i>C17ORF97</i>	NM_001013672.3	0.948	0.045
<i>ZDHHC19</i>	NM_001039617.1	0.912	0.001
<i>C16ORF35</i>	NM_012075.1	0.899	<0.001
<i>RBM38</i>	NM_017495.4	0.880	0.029
<i>CMBL</i>	NM_138809.3	0.853	0.032
<i>VWCE</i>	NM_152718.2	0.841	0.005
<i>LOC100128714</i>	XM_001722756.1	0.833	<0.001
<i>TSTA3</i>	NM_003313.2	0.828	0.001
<i>NR1D1</i>	NM_021724.2	0.827	0.002
<i>TMEM86B</i>	NM_173804.3	0.827	0.005
<i>ACSL6</i>	NM_001009185.1	0.823	<0.001

<i>TRIM58</i>	NM_015431.3	0.821	0.002
<i>SCARNA17</i>	NR_003003.2	0.820	<0.001
<i>PLEK2</i>	NM_016445.1	0.813	0.007
<i>SLC6A10P</i>	NR_003083.2	0.810	0.010
<i>SLC22A16</i>	NM_033125.2	-0.843	0.001
<i>NAPSA</i>	NM_004851.1	-0.849	0.020
<i>LACTB2</i>	NM_016027.1	-0.870	0.001
<i>LOC653071</i>	XM_930721.1	-0.885	0.006
<i>ODF2L</i>	NM_001007022.1	-0.893	0.003
<i>SPAST</i>	NM_199436.1	-0.935	0.000
<i>ORM2</i>	NM_000608.2	-0.975	<0.001
<i>COPG2</i>	NM_012133.2	-0.977	0.005
<i>NKX3-1</i>	NM_006167.2	-0.988	0.002
<i>LOC283547</i>	XM_378454.3	-1.007	<0.001
<i>PLCB1</i>	NM_015192.2	-1.013	0.004
<i>ORM1</i>	NM_000607.1	-1.067	0.050
<i>MFF</i>	NM_020194.4	-1.273	0.040
<i>LOC253039</i>	NR_024408.1	-1.348	0.002

**Tabla 10. Genes diferencialmente expresados en TAS en la comparación OND y OD.**

Símbolo	Identificador	logFC	Valor p
<i>CCL20</i>	NM_004591.1	1.310	0.032
<i>SLAMF1</i>	NM_003037.1	1.068	0.034
<i>AMFR</i>	NM_001144.4	0.955	0.005
<i>PTX3</i>	NM_002852.2	0.937	0.035
<i>ACTA1</i>	NM_001100.3	0.862	0.013
<i>LIPG</i>	NM_006033.2	0.831	0.021
<i>TNC</i>	NM_002160.2	0.828	0.011
<i>EDN1</i>	NM_001955.2	0.815	0.018
<i>SERPINA3</i>	NM_001085.4	0.809	0.026
<i>LOC645313</i>	XR_017585.2	-0.829	0.026
<i>MS4A4A</i>	NM_148975.1	-0.829	0.003
<i>ITGB1BP1</i>	NM_022334.3	-0.854	0.020
<i>MIR1974</i>	NR_031738.1	-0.966	0.011
<i>SEL1L2</i>	NM_025229.1	-1.032	0.004
<i>STMN2</i>	NM_007029.2	-1.127	<0.001
<i>LOC644936</i>	NR_004845.1	-1.164	0.016
<i>STMN2</i>	NM_007029.2	-1.333	<0.001

**Tabla 11. Genes diferencialmente expresados en TAV en la comparación OND y OD.**

<b>Símbolo</b>	<b>Identificador</b>	<b>logFC</b>	<b>Valor p</b>
<i>AMFR</i>	NM_001144.4	1.149	0.034
<i>G3BP2</i>	NM_203504.1	1.020	0.021
<i>G3BP2</i>	NM_203504.1	0.829	0.022
<i>GZMH</i>	NM_033423.3	-0.832	<0.001
<i>RNU1A3</i>	NR_004430.1	-0.860	0.028
<i>DHRS9</i>	NM_005771.3	-0.860	0.036
<i>LOC648984</i>	XM_938063.1	-0.868	<0.001
<i>CCL18</i>	NM_002988.2	-0.884	0.037
<i>NR4A3</i>	NM_173199.1	-0.996	0.006
<i>ACPS5</i>	NM_001611.2	-1.011	0.011
<i>RNU1-3</i>	NR_004408.1	-1.015	0.046
<i>ALAS2</i>	NM_001037968.1	-1.047	0.009
<i>HBE1</i>	NM_005330.3	-1.070	0.004
<i>RNU1G2</i>	NR_004426.1	-1.081	0.038
<i>RNU1-5</i>	NR_004400.1	-1.088	0.028
<i>HSPA1B</i>	NM_005346.3	-1.100	0.034
<i>DEFB1</i>	NM_005218.3	-1.133	0.012
<i>KLF4</i>	NM_004235.3	-1.225	0.038
<i>KLF4</i>	NM_004235.3	-1.366	0.044
<i>JUN</i>	NM_002228.3	-1.389	0.031
<i>LOC644936</i>	NR_004845.1	-1.402	0.037
<i>HBD</i>	NM_000519.3	-1.443	0.001
<i>NR4A2</i>	NM_006186.2	-1.547	0.034
<i>HBA1</i>	NM_000558.3	-1.731	0.006
<i>LOC731682</i>	XM_001129369.1	-1.877	0.010
<i>HBG2</i>	NM_000184.2	-1.899	0.001
<i>HBG1</i>	NM_000559.2	-2.020	0.001
<i>FOS</i>	NM_005252.2	-2.757	0.021
<i>FOSB</i>	NM_006732.1	-3.175	0.024

**Tabla 12. Genes diferencialmente expresados en TH en la comparación OND y OD.**

<b>Símbolo</b>	<b>Identificador</b>	<b>logFC</b>	<b>Valor p</b>
<i>HLA-DRB1</i>	NM_002124.1	1.447	0.043
<i>PLA2G2A</i>	NM_000300.2	1.179	0.026
<i>LOC729708</i>	XM_001725700.1	-1.053	0.039
<i>LOC100132564</i>	XM_001713808.1	-1.091	0.049

**Tabla 13. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en ST.**

<b>Símbolo</b>	<b>Identificador</b>	<b>Delta Beta</b>	<b>Valor p (Delta Beta)</b>	<b>log FC</b>	<b>Valor p (logFC)</b>
<i>BRDT</i>	cg14732540	0.086	0.008	-0.132	0.007
<i>PSG6</i>	cg11151665	0.064	<0.001	-0.125	0.029
<i>PPP2R2D</i>	cg21750602	0.039	0.044	-0.196	0.029
<i>GPR175</i>	cg13728650	0.031	0.006	-0.193	0.037
<i>KRT13</i>	cg10742225	0.027	0.017	-0.132	0.015
<i>C21orf94</i>	cg17266238	0.025	0.032	-0.140	0.047
<i>PSG6</i>	cg17642353	0.022	0.040	-0.125	0.029
<i>HBQ1</i>	cg17714030	0.019	0.008	-0.570	0.001
<i>HBD</i>	cg20609368	0.016	0.041	-1.443	0.001
<i>SLC7A6OS</i>	cg27077685	0.010	0.025	-0.283	0.024
<i>STEAP3</i>	cg04749104	0.010	0.038	-0.176	0.010
<i>THSD1</i>	cg16114640	0.009	0.013	-0.169	0.004
<i>PRMT2</i>	cg06725035	0.008	0.018	-0.295	0.007
<i>ASAH1</i>	cg13563405	-0.004	0.048	0.164	0.004
<i>TTC9C</i>	cg24515202	-0.004	0.027	0.195	0.049
<i>APBA1</i>	cg15840658	-0.005	0.037	0.138	0.037
<i>APBA1</i>	cg15623573	-0.005	0.048	0.138	0.037
<i>BCKDHB</i>	cg15256539	-0.006	0.020	0.191	0.048
<i>BCKDHB</i>	cg15256539	-0.006	0.020	0.284	0.009
<i>PPM1J</i>	cg12687922	-0.006	0.024	0.092	0.039
<i>RET</i>	cg05621401	-0.008	0.014	0.155	0.035
<i>LARGE</i>	cg05670348	-0.008	0.028	0.301	0.019
<i>MEIS2</i>	cg02917381	-0.008	0.005	0.109	0.027
<i>RBKS</i>	cg06869899	-0.009	0.017	0.176	0.036
<i>MBD6</i>	cg25107978	-0.012	0.015	0.334	0.043
<i>ERCC8</i>	cg11649654	-0.012	0.047	0.239	0.001
<i>PPP1R3D</i>	cg08966023	-0.013	0.044	0.165	0.045

<i>GOSR1</i>	cg19098314	-0.014	0.002	0.139	0.033
<i>RFK</i>	cg13789236	-0.014	0.009	0.127	0.032
<i>PLEKHA1</i>	cg01246254	-0.020	<0.001	0.282	0.040
<i>IRX3</i>	cg24662961	-0.020	0.003	0.774	0.021
<i>DPH2</i>	cg25955969	-0.026	0.035	0.163	0.026
<i>IGF2</i>	cg02166532	-0.027	0.008	0.132	0.024
<i>LRPPRC</i>	cg26538116	-0.027	0.013	0.227	0.024
<i>SNX16</i>	cg06027949	-0.034	0.011	0.435	0.032
<i>FLJ44060</i>	cg08489623	-0.041	0.032	0.128	0.034
<i>CRB3</i>	cg03258472	-0.046	0.026	0.173	0.033
<i>BARHL2</i>	cg17241310	-0.046	0.036	0.255	0.004
<i>C14orf105</i>	cg19903229	-0.051	0.013	0.132	0.012
<i>SNX4</i>	cg16468910	-0.054	0.022	0.212	0.015
<i>HMP19</i>	cg07884019	-0.062	0.047	0.119	0.031
<i>EDNRB</i>	cg24745738	-0.101	0.001	0.193	0.026

**Tabla 14. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en TAS.**

Símbolo	Identificador	Delta Beta	Valor p (Delta Beta)	log FC	Valor p (logFC)
<i>LEP</i>	cg12782180	0.056	0.008	-0.352	0.022
<i>ZNF3</i>	cg00929606	0.054	0.023	-0.142	0.001
<i>CAPSL</i>	cg24202119	0.028	0.040	-0.166	0.006
<i>KCNQ1</i>	cg17229197	0.026	0.019	-0.293	<0.001
<i>KCNQ1</i>	cg27491887	0.024	0.037	-0.293	<0.001
<i>C1QC</i>	cg11393848	0.023	0.029	-0.600	0.007
<i>CTSE</i>	cg04457794	0.015	0.021	-0.232	0.018
<i>CLTA</i>	cg26966384	0.015	0.035	-0.206	0.003
<i>CLTA</i>	cg26966384	0.015	0.035	-0.174	0.027
<i>NIT1</i>	cg10053203	0.015	0.010	-0.284	0.006
<i>ST7L</i>	cg01183669	0.015	0.009	-0.145	0.031
<i>OPRM1</i>	cg14262937	0.014	0.022	-0.129	0.013
<i>OPRM1</i>	cg14262937	0.014	0.022	-0.198	<0.001
<i>PTGER3</i>	cg12739034	0.012	0.009	-0.635	0.001
<i>DHFR</i>	cg16161425	0.011	0.040	-0.170	0.047
<i>PTPRO</i>	cg27196745	0.008	0.043	-0.447	0.011
<i>POFUT1</i>	cg25811820	0.006	0.016	-0.078	0.048
<i>ULBP1</i>	cg25589890	0.006	0.041	-0.173	0.015

<i>SFRS3</i>	cg08027745	0.005	0.044	-0.406	0.017
<i>TSC22D4</i>	cg08487374	0.005	0.016	-0.292	0.010
<i>CCDC5</i>	cg18307767	0.004	0.046	-0.219	0.047
<i>POP5</i>	cg07236358	0.004	0.042	-0.310	0.031
<i>F5</i>	cg09891761	-0.004	0.032	0.559	0.007
<i>DICER1</i>	cg16184930	-0.005	0.016	0.146	0.011
<i>GUCY1A2</i>	cg23984434	-0.005	0.030	0.131	0.021
<i>USP48</i>	cg20956373	-0.005	0.028	0.347	0.048
<i>MLL5</i>	cg05566397	-0.006	0.045	0.542	0.008
<i>AMPH</i>	cg10293925	-0.007	0.002	0.660	0.011
<i>YWHAB</i>	cg07064406	-0.008	0.047	0.156	0.045
<i>ZNF273</i>	cg05306735	-0.013	0.016	0.189	0.032
<i>CUGBP2</i>	cg15777781	-0.015	0.014	0.338	0.014
<i>LRRC39</i>	cg26117431	-0.015	0.009	0.129	0.005
<i>TUB</i>	cg15480475	-0.015	0.019	0.427	0.041
<i>TOMM34</i>	cg11454415	-0.017	0.014	0.325	0.017
<i>DNM1L</i>	cg27387222	-0.017	0.017	0.327	0.025
<i>CLN8</i>	cg23833896	-0.020	0.006	0.227	0.023
<i>C1orf124</i>	cg15459773	-0.021	0.046	0.183	0.005
<i>C1orf124</i>	cg15459773	-0.021	0.046	0.233	0.031
<i>C11orf47</i>	cg18103150	-0.021	0.012	0.211	0.031
<i>PDE4D</i>	cg05992340	-0.022	0.008	0.405	0.033
<i>SCT</i>	cg05782292	-0.025	0.048	0.075	0.038
<i>TCAP</i>	cg01680823	-0.026	0.049	0.228	0.011
<i>ADRA1D</i>	cg09614401	-0.030	0.039	0.102	0.017
<i>BVES</i>	cg20624391	-0.034	0.023	0.073	0.045
<i>NR2E3</i>	cg18860847	-0.034	0.038	0.098	0.016
<i>SYNJ2</i>	cg13645811	-0.034	0.001	0.553	0.002
<i>RIMS3</i>	cg08394377	-0.036	0.016	0.291	0.030
<i>RUNX2</i>	cg05996042	-0.037	0.003	0.123	0.042
<i>ADPRHL1</i>	cg00463202	-0.045	0.010	0.091	0.007
<i>P4HA3</i>	cg25599211	-0.048	0.015	0.085	0.025
<i>DST</i>	cg04452713	-0.051	0.003	0.319	0.024
<i>MGAT4C</i>	cg18344063	-0.062	0.047	0.121	0.038

**Tabla 15. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en TAV.**

<b>Símbolo</b>	<b>Identificador</b>	<b>Delta Beta</b>	<b>Valor p (Delta Beta)</b>	<b>log FC</b>	<b>Valor p (logFC)</b>
<i>BRDT</i>	cg14732540	0.086	0.008	-0.132	0.007
<i>PSG6</i>	cg11151665	0.064	<0.001	-0.125	0.029
<i>PPP2R2D</i>	cg21750602	0.039	0.044	-0.196	0.029
<i>GPR175</i>	cg13728650	0.031	0.006	-0.193	0.037
<i>KRT13</i>	cg10742225	0.027	0.017	-0.132	0.015
<i>C21orf94</i>	cg17266238	0.025	0.032	-0.140	0.047
<i>PSG6</i>	cg17642353	0.022	0.040	-0.125	0.029
<i>HBQ1</i>	cg17714030	0.019	0.008	-0.570	0.001
<i>HBD</i>	cg20609368	0.016	0.041	-1.443	0.001
<i>SLC7A6OS</i>	cg27077685	0.010	0.025	-0.283	0.024
<i>STEAP3</i>	cg04749104	0.010	0.038	-0.176	0.010
<i>THSD1</i>	cg16114640	0.009	0.013	-0.169	0.004
<i>PRMT2</i>	cg06725035	0.008	0.018	-0.295	0.007
<i>ASAH1</i>	cg13563405	-0.004	0.048	0.164	0.004
<i>TTC9C</i>	cg24515202	-0.004	0.027	0.195	0.049
<i>APBA1</i>	cg15840658	-0.005	0.037	0.138	0.037
<i>APBA1</i>	cg15623573	-0.005	0.048	0.138	0.037
<i>BCKDHB</i>	cg15256539	-0.006	0.020	0.191	0.048
<i>BCKDHB</i>	cg15256539	-0.006	0.020	0.284	0.009
<i>PPM1J</i>	cg12687922	-0.006	0.024	0.092	0.039
<i>RET</i>	cg05621401	-0.008	0.014	0.155	0.035
<i>LARGE</i>	cg05670348	-0.008	0.028	0.301	0.019
<i>MEIS2</i>	cg02917381	-0.008	0.005	0.109	0.027
<i>RBKS</i>	cg06869899	-0.009	0.017	0.176	0.036
<i>MBD6</i>	cg25107978	-0.012	0.015	0.334	0.043
<i>ERCC8</i>	cg11649654	-0.012	0.047	0.239	0.001
<i>PPP1R3D</i>	cg08966023	-0.013	0.044	0.165	0.045
<i>GOSR1</i>	cg19098314	-0.014	0.002	0.139	0.033
<i>RFK</i>	cg13789236	-0.014	0.009	0.127	0.032
<i>PLEKHA1</i>	cg01246254	-0.020	<0.001	0.282	0.040
<i>IRX3</i>	cg24662961	-0.020	0.003	0.774	0.021
<i>DPH2</i>	cg25955969	-0.026	0.035	0.163	0.026
<i>IGF2</i>	cg02166532	-0.027	0.008	0.132	0.024
<i>LRPPRC</i>	cg26538116	-0.027	0.013	0.227	0.024
<i>SNX16</i>	cg06027949	-0.034	0.011	0.435	0.032

<i>FLJ44060</i>	cg08489623	-0.041	0.032	0.128	0.034
<i>CRB3</i>	cg03258472	-0.046	0.026	0.173	0.033
<i>BARHL2</i>	cg17241310	-0.046	0.036	0.255	0.004
<i>C14orf105</i>	cg19903229	-0.051	0.013	0.132	0.012
<i>SNX4</i>	cg16468910	-0.054	0.022	0.212	0.015
<i>HMP19</i>	cg07884019	-0.062	0.047	0.119	0.031
<i>EDNRB</i>	cg24745738	-0.101	0.001	0.193	0.026

**Tabla 16. Lista de genes con correlación en la alteración de metilación del DNA y expresión genética en LT.**

<b>Símbolo</b>	<b>Identificador</b>	<b>Delta Beta</b>	<b>Valor p (Delta Beta)</b>	<b>log FC</b>	<b>Valor p (logFC)</b>
<i>SLC12A8</i>	cg14391622	0.049	0.021	-0.353	0.034
<i>CACNB4</i>	cg18272264	0.042	0.011	-0.152	0.033
<i>FAM3B</i>	cg03158400	0.040	0.040	-0.128	0.037
<i>SYK</i>	cg10025443	0.038	0.022	-0.133	0.047
<i>CTBS</i>	cg08380539	0.004	0.046	-0.263	0.020
<i>MARCH8</i>	cg02702510	-0.011	0.027	0.070	0.041
<i>SON</i>	cg26265060	-0.027	0.050	0.064	0.050
<i>KCNJ1</i>	cg14481339	-0.033	0.022	0.096	0.034
<i>TMEM92</i>	cg25949363	-0.035	0.038	0.116	0.031
<i>PLA2G2A</i>	cg11037787	-0.042	0.025	1.179	0.026
<i>NRG4</i>	cg13044277	-0.043	0.028	0.236	0.036
<i>PNLIPRP1</i>	cg27600794	-0.044	0.021	0.110	0.014
<i>SYT7</i>	cg02104644	-0.051	0.046	0.138	0.033
<i>LTBR</i>	cg15784615	-0.052	0.013	0.250	0.028
<i>CATSPER2</i>	cg23685580	-0.052	0.027	0.078	0.032
<i>LPAL2</i>	cg15398520	-0.058	0.027	0.107	0.010
<i>NCALD</i>	cg01484156	-0.059	<0.001	0.266	0.013
<i>ZDHHC11</i>	cg20584011	-0.059	0.002	0.763	0.007
<i>LGTN</i>	cg16639185	-0.060	0.031	0.241	0.031
<i>ZDHHC11</i>	cg18429742	-0.078	0.016	0.763	0.007
<i>OXT</i>	cg26955850	-0.080	0.050	0.802	0.037
<i>PRSS21</i>	cg22730830	-0.113	0.003	0.132	0.012
<i>OXT</i>	cg26267561	-0.154	0.001	0.802	0.037

**Tabla 17. Análisis de enriquecimiento de los genes con correlación en la alteración de la expresión genética y metilación.**

Tejido	Termino	Cuenta	Valor p	Genes
ST	GO:0042981~regulation of apoptosis	9	0.011	<i>MSH6, CASP9, SNCB, DEDD, PLEKHG5, HSPA5, IGFBP3, CLN8, GCH1</i>
	GO:0043067~regulation of programmed cell death	9	0.012	<i>MSH6, CASP9, SNCB, DEDD, PLEKHG5, HSPA5, IGFBP3, CLN8, GCH1</i>
	GO:0010941~regulation of cell death	9	0.012	<i>MSH6, CASP9, SNCB, DEDD, PLEKHG5, HSPA5, IGFBP3, CLN8, GCH1</i>
	GO:0009416~response to light stimulus	4	0.016	<i>MSH6, CASP9, NR2E3, SCARA3</i>
	GO:0009411~response to UV	3	0.022	<i>MSH6, CASP9, SCARA3</i>
	GO:0043065~positive regulation of apoptosis	6	0.024	<i>MSH6, CASP9, DEDD, PLEKHG5, IGFBP3, GCH1</i>
	GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	6	0.025	<i>MSH6, CASP9, DEDD, PLEKHG5, IGFBP3, GCH1</i>
	GO:0006979~response to oxidative stress	4	0.025	<i>UCP2, TXNRD2, SCARA3, CLN8</i>
	GO:0010942~positive regulation of cell death	6	0.025	<i>MSH6, CASP9, DEDD, PLEKHG5, IGFBP3, GCH1</i>
	GO:0050884~neuromuscular process controlling posture	2	0.034	<i>CLN8, GCH1</i>
	GO:0045773~positive regulation of axon extension	2	0.034	<i>LIMK1, MAPT</i>
	GO:0009314~response to radiation	4	0.041	<i>MSH6, CASP9, NR2E3, SCARA3</i>
	GO:0000305~response to oxygen radical	2	0.041	<i>UCP2, TXNRD2</i>
	TAS	GO:0007005~mitochondrion organization	4	0.007
GO:0008015~blood circulation		4	0.015	<i>F5, TCAP, KCNQ1, ADRA1D</i>
GO:0003013~circulatory system process		4	0.015	<i>F5, TCAP, KCNQ1, ADRA1D</i>
GO:0040029~regulation of gene expression, epigenetic		3	0.020	<i>MLL5, DICER1, KCNQ1</i>
GO:0007188~G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger		3	0.024	<i>OPRM1, PTGER3, ADRA1D</i>
GO:0019933~cAMP-mediated signaling		3	0.029	<i>OPRM1, PTGER3, ADRA1D</i>
GO:0007187~G-protein		3	0.041	<i>OPRM1, PTGER3, ADRA1D</i>

	signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger			
<b>TAV</b>	GO:0007497~posterior midgut development	2	0.004	<i>EDNRB, RET</i>
	GO:0048484~enteric nervous system development	2	0.020	<i>EDNRB, RET</i>
	GO:0015671~oxygen transport	2	0.027	<i>HBQ1, HBD</i>
<b>TH</b>	GO:0046903~secretion	5	0.000	<i>OXT, FAM3B, CACNB4, SYK, KCNJ1</i>
	GO:0003001~generation of a signal involved in cell-cell signaling	3	0.004	<i>FAM3B, CACNB4, SYK</i>
	GO:0030001~metal ion transport	4	0.016	<i>SLC12A8, CATSPER2, CACNB4, KCNJ1</i>
	GO:0006812~cation transport	4	0.026	<i>SLC12A8, CATSPER2, CACNB4, KCNJ1</i>
	GO:0048584~positive regulation of response to stimulus	3	0.031	<i>PLA2G2A, CACNB4, SYK</i>
	GO:0007267~cell-cell signaling	4	0.032	<i>OXT, FAM3B, CACNB4, SYK</i>
	GO:0050851~antigen receptor-mediated signaling pathway	2	0.038	<i>CACNB4, SYK</i>
	GO:0051094~positive regulation of developmental process	3	0.042	<i>OXT, PLA2G2A, SYK</i>
	GO:0002429~immune response-activating cell surface receptor signaling pathway	2	0.045	<i>CACNB4, SYK</i>