ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Paula
Mariño Lorenzo

Tesis doctoral

Efecto inmunomodulador y epigenético de la cetosis nutricional y compuestos bioactivos de la dieta sobre el riesgo de cáncer asociado a la obesidad

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Endocrinología

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

EFECTO INMUNOMODULADOR Y EPIGENÉTICO DE LA CETOSIS NUTRICIONAL Y COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA DIETA SOBRE EL RIESGO DE CÁNCER ASOCIADO A LA OBESIDAD

Autor

Paula Mariño Lorenzo

Directores: Ana Belén Crujeiras Martínez y Felipe Casanueva Freijo

Tutor: Felipe Casanueva Freijo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL (EDIUS)

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Doña Paula Mariño Lorenzo declara no tener ningún conflicto de intereses en relación con la Tesis Doctoral titulada:

EFECTO INMUNOMODULADOR Y EPIGENÉTICO DE LA CETOSIS NUTRICIONAL Y COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA DIETA SOBRE EL RIESGO DE CÁNCER ASOCIADO A LA OBESIDAD

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Tras cinco años de mucho aprendizaje, trabajo, vivencias y sobre todo mucho esfuerzo siempre compartido con grandes compañeros, ha llegado este momento, el momento de escribir los agradecimientos de mi Tesis Doctoral. “Mi Tesis Doctoral”, todavía me impresiona decir estas palabras y me produce escalofríos, es un camino largo y a veces duro, pero sobre todo muy reconfortante, y es por ello por lo que tengo mucho que agradecer.

En primer lugar, quiero dar las gracias tanto a la Universidad de Santiago de Compostela como al Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A mis directores de tesis, la Dra. Ana Belén Crujeiras y el Dr. Felipe Casanueva por brindarme esta gran oportunidad. Ana, gracias por confiar en mi sin conocerme, por enseñarme este maravilloso mundo de la epigenética. Gracias a esta oportunidad he podido aprender infinidad de técnicas de laboratorio y a trabajar con cultivos celulares, para mi, dietista-nutricionista de carrera, es sin duda un aprendizaje de valor incalculable. Gracias por darme siempre la oportunidad de mejorar y avanzar en esta profesión, y sobre todo gracias por tu cercanía. Felipe, es un honor poder contar contigo como tutor y director de esta Tesis Doctoral, gracias por tu amabilidad.

Por otra parte, quiero agradecer al Servicio de Endocrinología y Nutrición del CHUS. Especialmente me gustaría agradecer a los Doctores, Gemma Rodríguez, Antía Fernández, Aurelio Sueiro, y a la enfermera Pilar Bolaño por su dedicación en este trabajo y, junto con los Doctores Ana Cantón, Miguel A. Martínez-Olmos y Rocío Villar, por ayudar a que la investigación llegue a los pacientes. Del mismo modo, me gustaría agradecer, al Servicio de Oncología, especialmente los Drs. Rafael López y Juan Cueva que han contribuido a que este trabajo se haya completado con las pacientes con cáncer de mama, así como a todos los grupos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del IDIS y otros Servicios del CHUS con los que he podido colaborar a lo largo de mi etapa como investigadora predoctoral.

Quiero agradecerles a todos mis compañeros del IDIS, mi segunda casa los últimos 5 años. En especial a los compañeros de Epigenómica, Aida, Aitor y Nico por esos momentos vividos, esas confidencias y por los grandes momentos de risas que han hecho mucho más ameno este mundo de la investigación, gracias por siempre haber podido contar con vosotros. Ángel, gracias por tu ayuda. A las chicas del laboratorio 3, nuestras vecinas Tamara y Nerea, siempre disponibles con una sonrisa para echar una mano. A los chicos del laboratorio 4, en especial a Carlos por esos ratitos a primera hora que nos alegran la mañana. Por supuesto, también a las chicas del laboratorio 14.

Un espacio relevante en estas palabras lo tiene mi querido laboratorio 2, al que tanto echo de menos, esa especie de amor-odio que cuando te vas sientes que lo necesitas tanto. A Marcos Couselo por poner ese punto de humor en el trabajo diario y hacerlo tan fácil y a Ana Castro por los buenos momentos vividos dentro de esas cuatro paredes. No podría faltar el tremendo agradecimiento que tengo hacia mis compis del laboratorio 2, mi segunda familia, mis compañeros de batallas, los que sin duda han hecho que estos 5 años se hayan convertido en una experiencia única y a los que tanto estoy echando de menos durante este último año en el que hemos estado más separados. Maribel eres como esa hermana mayor que siempre tiene un buen consejo para darte, siempre dispuesta a ayudar, a resolver nuestros problemas y sobre todo siempre dispuesta a escucharnos y a cuidarnos, sin ti ese laboratorio no se sostendría. Andrea, mi compañera en este mundo de la investigación, gracias por enseñarme tanto y ayudarme, por apoyarme en esta última etapa y aguantar mis momentos más bajos, sabes que parte de esta Tesis también es tuya. Jesús, desde que llegaste supe que haríamos buenas migas, siempre colaborador, gracias infinitivas por estar siempre disponible para todos esos mensajes que te mando pidiéndote cosas.

También me quiero acordar de mis directores y profesores del E-MENU de la Universidad de Navarra donde descubrí el mundo de la investigación en el campo de la nutrición. Gracias a ellos supe que mi futuro estaba aquí, unir la investigación con mi gran pasión, la nutrición, es sin duda mi sitio. Por supuesto, a mis compañeras del Máster, especialmente a mis dos Cristinas, ese año en Pamplona no hubiese sido igual sin vosotras, sois lo mejor que me llevé de esa maravillosa aventura.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Por supuesto, también me gustaría agradecer a mis amigos de toda la vida, los que siempre han estado pese a la distancia o al vernos poco, los que cuando los necesitas siempre están ahí. En especial a Cristina García, amigas desde preescolar, de esas amigas que sabes que siempre puedes contar con ella, y sobre todo la que en estos últimos meses ha sufrido también mis momentos de angustia y desesperación para terminar este trabajo, gracias por escucharme e intentar ver siempre el lado positivo.

A mis padres, María José y Juan, siempre me habéis apoyado en todas mis decisiones y sobre todo habéis respetado mis tiempos para llegar a alcanzar mis objetivos. Se que no siempre he seguido los pasos habituales que todo padre quiere para su hija, y aun así lo habéis respetado hasta que llegó el momento en el que decidí volver a estudiar. Gracias por la educación basada en el respeto que me habéis inculcado y por quererme tanto, sois mis papis "guays".

A Pablo, mi compañero de vida, gracias a ti me encuentro hoy escribiendo estas palabras. Sin duda la vida no me ha podido hacer mejor regalo que el haberte conocido, no existen palabras ni páginas suficientes para expresarte toda mi gratitud. Hace ya más de 14 años, poco a poco hiciste que confiase más en mi. Tenía un sueño, el cual ya no pensaba conseguir, pero tu me apoyaste y me ayudaste a lograrlo, estudiar el Grado de Nutrición, y aquí estamos, terminando mi Tesis Doctoral, quien nos lo iba a decir, un trabajo que es de los dos. Juntos, sin duda, hacemos el mejor equipo, hemos crecido personal y laboralmente siempre unidos, incluso en la distancia. Eres el amor de mi vida, pero también mi mejor amigo, gracias por tu serenidad y por protegerme siempre por encima de todo. Recuerda, no dejes que me pinchen.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mis padres

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A Pablo

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

EFECTO INMUNOMODULADOR Y EPIGENÉTICO DE LA CETOSIS NUTRICIONAL Y COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA DIETA SOBRE EL RIESGO DE CÁNCER ASOCIADO A LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica compleja y de carácter multifactorial, que además de ser una enfermedad por sí misma, también es un factor de riesgo modificable de diversas comorbilidades asociadas, entre ellas el cáncer. Actualmente, la obesidad se considera un problema de salud pública, denominada la pandemia del siglo XXI y se prevé que su prevalencia siga en aumento, arrastrando con ella el incremento en la prevalencia de cáncer. La inflamación y el estrés oxidativo, provocados por un tejido adiposo disfuncional, característicos de la obesidad y las marcas epigenéticas se han propuesto como posibles vínculos mecanicistas entre la obesidad y sus enfermedades asociadas, entre las que se encuentra el cáncer. Estos mecanismos pueden remodelarse modificando factores del estilo de vida mediante la adquisición de hábitos dietéticos saludables por medio de ciertos compuestos bioactivos de los alimentos y con tratamientos para la reducción del peso corporal, pudiendo ser útiles en el tratamiento del cáncer relacionado con la obesidad. En el contexto de los tratamientos para la obesidad, la dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD) se ha propuesto como una estrategia con efectos beneficiosos sobre la salud, en la cual la pérdida de peso se consigue principalmente a expensas de la masa grasa. Este efecto sobre la reducción de la masa grasa puede conllevar una mejora en la función del tejido adiposo y por tanto una disminución de los factores promotores del cáncer como las citoquinas proinflamatorias y el estrés oxidativo. La cetosis nutricional inducida por la VLCKD, además de la pérdida de peso, podría estar implicada en dicho beneficio y ejercer su acción por medio de mecanismos epigenéticos. Por lo tanto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue evaluar si la cetosis nutricional inducida por una VLCKD enriquecida en DHA es capaz de modular los niveles de citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo y los niveles de factores asociados al desarrollo de cáncer como la osteopontina, así como su efecto epigenético en genes relacionados con el cáncer en obesidad. Los principales hallazgos de esta Tesis Doctoral demuestran la capacidad inmunomoduladora de una VLCKD mediante la regulación de los niveles de factores implicados en la cascada de señalización del INF-γ, como la IL-12 e IL-2, e inducción de mitohormesis. Este efecto parece estar mediado en gran parte por la cetosis nutricional inducida por la VLCKD y podría estar asociado a una reducción del riesgo de desarrollo de cáncer en pacientes con obesidad. De hecho, los estudios *in vitro* demuestran la capacidad de los cuerpos cetónicos de reducir la proliferación de células tumorales de mama y la regulación de genes implicados en procesos tempranos de desarrollo tumoral, contrario a lo que ocurre cuando las células son tratadas con secretoma procedente de tejido adiposo visceral de pacientes con obesidad severa. Finalmente, se demuestra que la cetosis nutricional inducida por una VLCKD es capaz de modular epigenéticamente genes relacionados con la carcinogénesis. Todo ello pone de manifiesto que el tratamiento con una terapia nutricional en la obesidad capaz de inducir cetosis, podría ser una estrategia útil, no solo para la reducción del peso corporal sino también para prevenir el desarrollo de cáncer en este grupo de pacientes más susceptibles, como son los pacientes con obesidad.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IMMUNOMODULATORY AND EPIGENETIC EFFECT OF NUTRITIONAL KETOSIS AND DIETARY BIOACTIVE COMPOUNDS ON THE RISK OF CANCER ASSOCIATED WITH OBESITY

Obesity is a complex, multifactorial chronic disease that, in addition to being a disease in itself, is also a modifiable risk factor for various associated comorbidities, including cancer. Currently, obesity is considered a public health problem, called the pandemic of the 21st century, and its prevalence is expected to continue to increase, dragging with it the increase in the prevalence of cancer. Inflammation and oxidative stress, caused by dysfunctional adipose tissue, characteristic of obesity, and epigenetic marks have been proposed as possible mechanistic links between obesity and its associated diseases, including cancer. These mechanisms can be remodeled by modifying lifestyle factors through the acquisition of healthy dietary habits through certain bioactive compounds in foods and with treatments to reduce body weight, which may be useful in the treatment of obesity-related cancer. In the context of obesity treatments, the very low-calorie ketogenic diet (VLCKD) has been proposed as a strategy with beneficial health effects, in which weight loss is achieved mainly at the expense of fat mass. This effect on the reduction of fat mass may lead to an improvement in the function of adipose tissue and therefore a decrease in cancer-promoting factors such as proinflammatory cytokines and oxidative stress. Nutritional ketosis induced by VLCKD, in addition to weight loss, could be involved in this benefit and exert its action through epigenetic mechanisms. Therefore, the main objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate whether nutritional ketosis induced by a VLCKD enriched in DHA is capable of modulating the levels of proinflammatory cytokines, oxidative stress and the levels of factors associated with the development of cancer such as osteopontin, as well as its epigenetic effect on genes related to cancer in obesity. The main findings of this Doctoral Thesis demonstrate the immunomodulatory capacity of a VLCKD by regulating the levels of factors involved in the INF-γ signaling cascade, such as IL-12 and IL-2, and induction of mitohormesis. This effect appears to be largely mediated by VLCKD-induced nutritional ketosis and could be associated with a reduced risk of cancer development in patients with obesity. In fact, *in vitro* studies demonstrate the ability of ketone bodies to reduce the proliferation of breast tumor cells and the regulation of genes involved in early processes of tumor development, contrary to what happens when the cells are treated with secretome from visceral adipose tissue from patients with severe obesity. Finally, it is demonstrated that nutritional ketosis induced by VLCKD is capable of epigenetically modulating genes related to carcinogenesis. All of this shows that treatment with nutritional therapy in obesity capable of inducing ketosis could be a useful strategy, not only for reducing body weight but also for preventing the development of cancer in this group of more susceptible patients, such as the patients with obesity.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

EFECTO INMUNOMODULADOR E EPIXENÉTICO DA CETOSE NUTRICIONAL E DOS COMPOSTOS BIOACTIVOS DA DIETA SOBRE O RISCO DE CANCRO ASOCIADO Á OBESIDADE

A obesidade é unha enfermidade crónica complexa e multifactorial que se define como unha acumulación anormal ou excesiva de tecido adiposo que, ademais de ser unha enfermidade en si mesma, é tamén un factor de risco modificable para diversas comorbilidades asociadas, entre elas o cancro. Na actualidade, a obesidade considérase un problema de saúde pública, denominada a pandemia do século XXI, e prevese que a súa prevalencia siga aumentando, arrastrando consigo o aumento da prevalencia do cancro. Aínda non están claros e continúanse investigando os mecanismos involucrados no desenrolo desta enfermidade e o seu vínculo coas súas enfermidades asociadas, sendo necesarias novas estratexias para o abordaxe da obesidade. A inflamación e o estrés oxidativo, causados pola disfunción do tecido adiposo, característicos da obesidade, e as marcas epixenéticas propuxéronse como posibles vínculos mecanicistas entre a obesidade e as súas enfermidades asociadas, incluído o cancro. O tecido adiposo é un órgano complexo con funcións endocrinas, metabólicas e inmunoreguladoras. Cun balance enerxético positivo prodúcese unha remodelación do tecido adiposo que se acelera de maneira patolóxica en estado de obesidade producindo a disfunción do tecido adiposo, a cal se relaciona con estados prooxidantes e proinflamatorios. Tanto a inflamación crónica, característica da obesidade, como a produción alterada de células inmunes provocan unha interacción entre a obesidade e o sistema inmunolóxico. Todas estas condicións están estreitamente relacionadas con varias enfermidades, especialmente co cancro. Pola súa parte, a epixenética defínese actualmente como a ciencia que estuda os cambios hereditarios e reversibles do ADN que modulan a expresión xénica pero non producen cambios na secuencia do ADN, sendo a metilación do ADN o mecanismo epixenético máis presente no organismo e o máis estudado. O perfil de metilación global do ADN na obesidade está sendo amplamente estudado, descubríndose novos biomarcadores e dianas terapéuticas necesarios no tratamento da obesidade no contexto da medicina de precisión. Estes mecanismos pódense remodelar modificando factores de estilo de vida mediante a adquisición de hábitos alimenticios saudables a través de determinados compostos bioactivos presentes nos alimentos e con tratamentos para reducir o peso corporal, os cales poden ser útiles no tratamento do cancro relacionado coa obesidade.

No contexto dos tratamentos da obesidade, destacan as intervención dietéticas e de estilo de vida, as terapias farmacolóxicas e o abordaxe cirúrxico, pero as terapias máis estudadas ata o momento son as intervencións dietéticas e de estilo de vida. Os individuos inxerimos un conxunto de nutrientes e alimentos, por iso investigacións recentes céntranse no estudo dos patróns dietéticos saudables, como a Dieta Mediterránea ou a Dieta Atlántica, e a súa asociación co risco de enfermidades. A Dieta Atlántica conta con menor evidencia científica ca outros patróns máis estudados, pero trátase dun patrón rico en nutrientes e compostos bioactivos de gran relevancia para a saúde, como o sulfurafano presente nos grelos ou os ácidos graxos omega-3 presentes nos peixes azuis. Dun xeito importante, propúxose a dieta cetoxénica moi baixa en calorías (VLCKD) como unha estratexia con efectos beneficiosos para a saúde, na que a perda de peso se consegue principalmente a costa da masa graxa, preservando a masa e a forza muscular. Este efecto sobre a redución da masa graxa pode levar a unha mellora na función do tecido adiposo e, polo tanto, a unha diminución dos factores promotores do cancro como as citoquinas proinflamatorias e o estrés oxidativo. A cetose nutricional é unha situación metabólica adaptativa fisiolóxica, onde as reservas de glucosa son insuficientes, e o noso organismo emprega outras fontes alternativas de enerxía, como os corpos cetónicos. A cetose

USC DE COMPOSTELA

nutricional inducida pola VLCKD, ademais da perda de peso, podería estar implicada neste beneficio e exercer a súa acción a través de mecanismos epixenéticos.

Polo tanto, o obxectivo principal da presente Tese Doutoral foi avaliar se os patróns de alimentación saudable, ricos en compostos bioactivos, e a cetose nutricional inducida por unha VLCKD enriquecida en DHA son capaces de modular os niveis de citoquinas proinflamatorias, o estrés oxidativo e os niveis de factores asociados ao desenvolvemento do cancro como a osteopontina, así como o seu efecto epixenético sobre xenes relacionados co cancro na obesidade. Para acadar os obxectivos, realizouse un estudo do perfil de metilación e expresión de xenes asociados ó cancro de mama en función do estado de adiposidade, estado menopáusico e o patrón de alimentación en doentes con cancro de mama. Tamén se realizaron procedementos experimentais en mostras de doentes con obesidade sometidos a tratamentos de perda de peso, con VLCKD, dieta baixa en calorías e cirurxía bariátrica para avaliar o efecto da cetose nutricional e a perda de peso sobre factores de inmunidade e estrés oxidativo, así como, en doentes con obesidade e en animais para avaliar o efecto da cetose nutricional e a perda de peso sobre os niveis proteicos e epixenéticos da osteopontina, proteína asociada co cancro. Ademais, investigouse o efecto *in vitro* da cetose e outros compostos bioactivos, como o sulforafano, presente en vexetais propios de patróns dietéticos saudables, sobre a expresión de xenes implicados na carcinoxénese en células tumorais de mama, en comparación co efecto inducido polo secretoma do tecido adiposo de doentes con obesidade. Por último, quixemos investigar os cambios nos niveis de metilación en mostras de leucocitos de sangue periférica de xenes relacionados co desenrolo tumoral tras unha VLCKD en doentes con obesidade e avaliar o efecto *in vitro* en liñas celulares de cancro de mama dos corpos cetónicos sobre a metilación dos xenes relacionados co cancro previamente identificados en doentes con obesidade.

Os principais resultados desta Tese Doutoral demostran que o patrón de metilación do xene *ZNF577*, representativo dunha sinatura epixenética do cancro de mama asociado a obesidade, está asociado co estado de adiposidade, o estado menopáusico e a adherencia a Dieta Mediterránea, en concreto co consumo de vexetais e peixe. Ademais, observáronse niveis máis baixos de expresión do xene supresor de tumores *BRCA1* en pacientes con cancro de mama e obesidade en comparación coas mulleres con cancro de mama que non presentaban obesidade. Por outra parte, tamén se demostrou a capacidade inmunomoduladora dunha VLCKD ao regular os niveis de factores implicados na cascada de sinalización de INF-γ, como a IL-12 e a IL-2, e biomarcadores de estrés oxidativo, mediante a indución da mitohormese. Este efecto parece estar mediado en gran medida pola cetose nutricional inducida por VLCKD e podería estar asociado cun risco reducido de desenvolvemento de cancro en pacientes con obesidade. Así mesmo, observáronse cambios nos niveis de metilación da *osteopontina* e unha mellora nos seus niveis circulantes nos doentes que seguiron unha VLCKD, que evidencia que a adiposidade ou a cetose nutricional poderían regularse epixenéticamente. De feito, estudos *in vitro* demostran a capacidade dos corpos cetónicos para reducir a proliferación de células tumorais de mama e a regulación dos xenes implicados nos procesos iniciais do desenvolvemento do tumor, ao contrario do que ocorre cando as células son tratadas con secretoma do tecido adiposo visceral dos pacientes con obesidade severa. Finalmente, demóstrase que a cetose nutricional inducida pola VLCKD é capaz de modular epixenéticamente xenes relacionados coa carcinoxénese. Todo isto demostra que o tratamento con terapia nutricional na obesidade capaz de inducir a cetose podería ser unha estratexia útil, non só para reducir o peso corporal senón tamén para previr o desenvolvemento de cancro neste grupo de pacientes máis susceptibles, como son os pacientes con obesidade.

USC
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

5mc: 5-metilcitosina

8-OHdG: 8-hidroxi-2-desociguanosina

AcAc: acetoacetate

ACTB: beta-actina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: AND complementario

ADP: adesín difosfato

AGL: ácidos grasos libres

AHA: *American Heart Association*

ALDH3A1: aldehído deshidrogenasa 3A1

ANCOVA: análisis de la covarianza

ANOVA: análisis de la varianza

AOP: potencia total antioxidante

APRIL: ligando inductor de la proliferación A

array: chip

ARN: ácido ribonucleico

ARNlnc: ARNnc largos

ARNnc: ARN no codificantes

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato

AUC: área bajo la curva

BAFF: factor de activación de células B

BIA: impedancia bioeléctrica

BIRC5: *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*

USC DE COMPOSTELA

BRCA1: gen *breast cancer* 1

BS: cirugía bariátrica

body: cuerpo

bypass: derivación

β-OHB: β-hidroxibutirico

CD: grupo de diferenciación

CC: circunferencia de la cintura

CEEA: Comité de Ética de Experimentación Animal

CGIs: islas CG

CHUS: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

CoA: coenzima A

COVID-19: enfermedad por coronavirus 2019

CpG: citosina unida a guanina por grupo fosfato

DASH: *Dietary Approaches to Stop Hypertension*

DEPC: dietilpirocarbonato

DHA: ácido docosahexaenoico

DIO: obesidad inducida por la dieta

DNasa: desocirribonucleasa

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNMTs: enzimas ADN metiltransferasas

DXA: *Dual-Energy X-ray Absorptiometry*

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

EPA: ácido eicosapentaenoico

FBS: suero fetal bovino

USC DE COMPOSTELA

FDR: *false discovery rate*

FFM: masa libre de grasa

FFQ: cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos 21

FM: masa grasa

forward: adelante

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GLP-1: péptido similar al glucagón-1

Gp: glicoproteína

GO: gene ontology

GSTM2: glutatión S-transferasa Mu 2

HDAC III: histona desacetilasa de clase III

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HMG-CoA: 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A

HOMA-IR: índice de resistencia a la insulina

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IDIS: Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago

IFN: interferón

IGOBE: Intervención Grupal en OBEsidad

IL: interleucina

IMC: Índice de Masa Corporal

LCD: dieta hipocalórica

MDA: malondialdehído

MEDAS: *Mediterranean Diet Adherence Screener*

miARN: microARN

microarray: microchip

USC DE COMPOSTELA

MMP: metaloproteinasa de matriz

MYC: oncogén *myelocytomatosis*

n: tamaño muestral

NAD^+: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NK: células *natural killer*

OMS: Organización Mundial de la Salud

open sea: mar abierto

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

primer: cebador

PTEN: gen supresor de tumores homólogo de fosfatasa y tensina

PTM: modificaciones postraduccionales de histonas

PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados

RC: restricción energética

RE: receptor de estrógenos

reverse: inversa

ROS: especies reactivas de oxígeno

RP: receptor de progesterona

RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

SEAD: Dieta Atlántica del Sur de Europa

SENC: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria

***seq*:** secuencia

shelf: plataforma

shore: orilla

USC DE COMPOSTELA

SIRT: sirtuína

SPP1: *secreted phosphoprotein* 1

TAS: tejido adiposo visceral

TAV: tejido adiposo subcutáneo

TNF-α: factor de necrosis tumoral α

TNF-R1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral

TP53: proteína tumoral 53

TSLP: linfopoyetina estromal tímica

TSS: sitio de inicio de la trascripción

TWEAK: inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral

VLCKD: dieta cetogénica muy baja en calorías

X^2: prueba Chi-cuadrado

WHR: relación cintura-cadera

WHtR: relación cintura-altura

ZNF: *zinc finger protein*

ZNF577: *zinc finger protein* 577

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN **35**
1. OBESIDAD 37
1.1. Epidemiología y diagnóstico 38
1.2. Tratamiento para la obesidad 39
1.2.1. Intervenciones dietéticas y de estilo de vida 40
1.2.1.1.Patrones dietéticos 40
1.2.1.1.1. Dieta Mediterránea 40
1.2.1.1.2. Dieta Atlántica 41
1.2.1.1.3. Otros patrones dietéticos 43
1.2.1.2.Intervención dietética con dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD) 43
1.2.1.2.1. Cetosis nutricional 44
1.2.1.2.2. Concepto de dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD) 45
1.2.1.3.Otras intervenciones dietéticas y de estilo de vida 45
1.2.2. Abordaje quirúrgico de la obesidad 45
2. OBESIDAD Y CÁNCER 47
2.1. Cáncer de mama asociado a obesidad 48
2.2. Cetosis nutricional en el tratamiento del cáncer asociado a obesidad 49
3. TEJIDO ADIPOSO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD 51
3.1. Tejido adiposo como órgano endocrino 51
3.2. Disfunción del tejido adiposo 52
3.3. Estrés oxidativo e inflamación asociado a la disfunción del tejido adiposo en obesidad 52
4. INMUNIDAD, OBESIDAD Y CÁNCER 55
4.1. Citoquinas implicadas en la regulación inmunitaria 55
4.1.1. Interferón γ 55
4.1.2. Sistema BAFF-APRIL 56
4.1.3. Osteopontina 56
4.2. Inmunonutrición 57
5. CARCINOGÉNESIS Y GENES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO TUMORAL TEMPRANO 59
5.1. Oncogenes 60
5.2. Genes vinculados a la protección antioxidante 60
5.3. Genes supresores tumorales 61
6. REGULACIÓN EPIGENÉTICA 63
6.1. Mecanismos epigenéticos 63
6.1.1. Metilación del ADN 64
6.1.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas (PTM) 65
6.1.3. ARN no codificantes (ARNnc) 65
6.2. La epigenética en la enfermedad humana 66
6.2.1. Metilación del ADN en la obesidad y enfermedades asociadas 66

HIPÓTESIS **69**

OBJETIVOS **73**

MATERIAL Y MÉTODOS **77**
1. ESTUDIOS *IN VIVO* 79

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1. Pacientes 79
1.1.1. Cohorte trasversal de cáncer de mama 80
1.1.1.1.Evaluación dietética 80
1.1.2. Cohortes de obesidad 80
1.1.2.1.Cohorte trasversal 80
1.1.2.1.1. Sujetos normopeso 81
1.1.2.1.2. Pacientes con obesidad 81
1.1.2.2.Cohortes longitudinales 81
1.1.2.2.1. Pacientes con obesidad sometidos a una intervención nutricional con dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD) 81
1.1.2.2.2. Pacientes con obesidad sometidos a una intervención nutricional con dieta hipocalórica estándar (LCD) 81
1.1.2.2.3. Pacientes con obesidad sometidos a cirugía bariátrica (BS) 82
1.1.3. Diseños experimentales 82
1.1.3.1.Tratamientos para pérdida de peso 82
1.1.3.1.1. Intervención nutricional basada en una dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD) 82
1.1.3.1.2. Intervención nutricional basada en una dieta hipocalórica estándar (LCD) 83
1.1.3.1.3. Cirugía bariátrica (BS) 83
1.1.3.1.4. Obtención de secretoma de tejido adiposo 84
1.2. Animales de experimentación 85
1.2.1. Cepas de roedores y dietas 85
2. ESTUDIOS *IN VITRO* 87
2.1. Líneas celulares de mama humano 87
2.1.1. Líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 87
2.1.1.1.Cultivo celular 87
2.1.2. Línea celular MCF10A 87
2.1.2.1.Cultivo celular 87
2.1.3. Tratamientos 88
2.1.3.1.Exposición a tratamiento con sulforafano 88
2.1.3.2.Exposición a tratamiento con cuerpos cetónicos 89
2.1.3.3.Exposición a tratamiento con secretomas de tejido adiposo 89
2.1.4. Ensayo de proliferación y viabilidad celular (WST-1) 89
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS 91
3.1. Análisis de metabolitos 91
3.1.1. Determinación de marcadores de estrés oxidativo 91
3.1.1.1.Cuantificación de la capacidad antioxidante 91
3.1.1.2.Cuantificación de malondialdehido 91
3.1.1.3.Cuantificación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina 91
3.1.2. Determinación de marcadores de inflamación 92
3.2. Análisis de la expresión génica 92
3.2.1. Extracción de ARN 92
3.2.1.1.Extracción desde células mononucleares de sangre periférica 92
3.2.1.2.Extracción desde línea celular 93
3.2.2. Cuantificación de ARN 93
3.2.3. Purificación de las muestras de ARN 93
3.2.4. Retrotranscripción 93

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.5. PCR en tiempo real 93
3.3. Análisis de la metilación de ADN 95
3.3.1. Extracción de ADN 95
3.3.2. Cuantificación de ADN 95
3.3.3. Conversión con bisulfito 95
3.3.4. Metilación del ADN 95
3.3.4.1. *Microarray* de metilación 95
3.3.4.2. Análisis de pirosecuenciación 96
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 99

RESULTADOS 101

CAPÍTULO I. ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGÉNESIS LIGADA A OBESIDAD 103
1. ESTUDIO DEL GEN *ZNF577* EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA SEGÚN LA ADIPOSIDAD, EL ESTADO MENOPÁUSICO Y LA DIETA 103
1.1. Características de las pacientes 103
1.2. Niveles de metilación y expresión de *ZNF577* según la adiposidad, el estado menopáusico y el consumo de alimentos 108
2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL GEN *BRCA1* 115
2.1. Niveles de expresión de *BRCA1* según la adiposidad 115
3. ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DE COMPUESTOS NUTRICIONALES O DE LA INDUCCIÓN DE OBESIDAD SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGÉNESIS LIGADA A LA OBESIDAD 117
3.1. Estudio del perfil de expresión de genes en líneas celulares expuestas a tratamiento con sulforafano 117
3.2. Estudio del perfil de expresión de genes en líneas celulares expuestas a tratamiento con β-OHB 120
3.3. Estudio del perfil de expresión de genes en líneas celulares expuestas a tratamiento con secretomas de tejido adiposo humano 122
CAPÍTULO II. ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE UNA DIETA CETOGÉNICA MUY BAJA EN CALORÍAS 127
1. ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE UNA DIETA CETOGÉNICA MUY BAJA EN CALORÍAS EN PACIENTES CON OBESIDAD 127
1.1. Diferencias en los niveles circulantes de citoquinas según la adiposidad 127
1.2. Cambios en los niveles circulantes de citoquinas después de las terapias de pérdida de peso 131
1.3. Cambios en los niveles circulantes de biomarcadores de estrés oxidativo después de las terapias de pérdida de peso 141
2. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA OSTEOPONTINA 143
2.1. Diferencias en la expresión de la *osteopontina/SPP1* en tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratones DIO y tras inducción de restricción energética 143
2.2. Diferencias en los niveles basales de osteopontina según la adiposidad en humanos 145
2.3. Cambios en los niveles circulantes de osteopontina después de los tratamientos de pérdida de peso en humanos 147
2.4. Diferencias en la metilación del ADN de *osteopontina/SPP1* asociadas a la cetosis nutricional en pacientes con obesidad 150

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. ESTUDIO DE LA CETOSIS NUTRICIONAL SOBRE LA METILACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CÁNCER 153
3.1. Efecto de la cetosis nutricional inducida por una VLCKD sobre la metilación de genes relacionados con cáncer 153
3.2. Estudio del efecto del tratamiento *in vitro* con cuerpos cetónicos sobre la metilación de genes relacionados con cáncer en líneas celulares de cáncer de mama 155

DISCUSIÓN 163

CAPÍTULO I. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADIPOSIDAD Y DE LA DIETA SOBRE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGÉNESIS LIGADA A OBESIDAD 165

CAPÍTULO II. VALORACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR Y EPIGENÉTICO DE UNA DIETA CETOGÉNICA MUY BAJA EN CALORÍAS 170

CONCLUSIONES 179

BIBLIOGRAFÍA 183

ANEXOS 215

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. OBESIDAD

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal. Esta condición se desencadena debido a un desequilibrio en el balance energético donde la ingesta calórica es superior a los requerimientos energéticos del individuo (1). La obesidad es una enfermedad crónica grave y compleja (2), la cual afecta tanto a países desarrollados como a países en vías de desarrollo (2,3), a todos los grupos de edad y a todas las clases socioeconómicas (2), la cual provoca un aumento de los costes sanitarios (4–6). La etiopatogenia de la obesidad es multifactorial e incluye factores socioculturales, ambientales (7,8), conductuales, psicosociales, dietéticos o de estilo de vida, genéticos y epigenéticos, contribuyendo al desarrollo de esta patología (2). Además de una enfermedad por si misma, la obesidad puede afectar a diversos órganos y sistemas (9), e incrementa el riesgo de varias comorbilidades asociadas, como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, esteatosis hepática y algunos tipos de cáncer (10,11) (**Figura 1**). De este modo, las personas con obesidad tienen más probabilidad de tener una esperanza de vida más corta en comparación con personas con peso normal, debido a todas las comorbilidades relacionadas con la obesidad (2). En la actualidad, no están claros y se continúan investigando los mecanismos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad y el vínculo con sus comorbilidades asociadas, siendo cada vez más necesarias nuevas estrategias para su adecuado abordaje terapéutico y de prevención (12). Por lo tanto, dilucidar la fisiopatología subyacente y desarrollar tratamientos eficaces es vital para el control de la expansión de la obesidad (13).

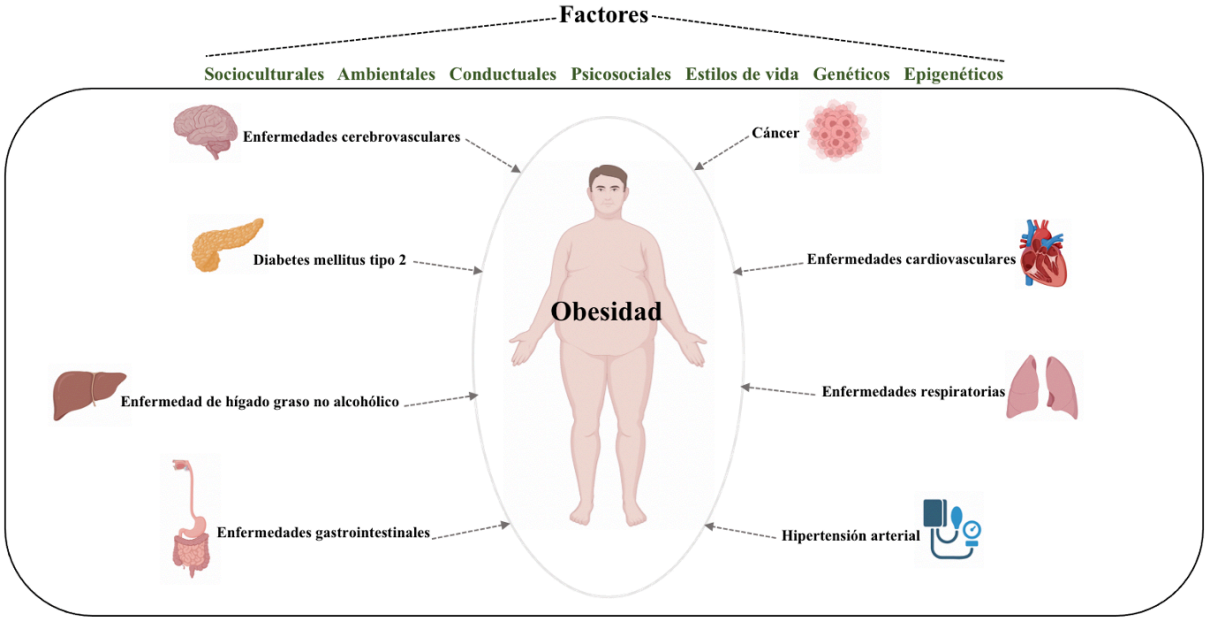


Figura 1. Factores predisponentes al desarrollo de obesidad y las comorbilidades asociadas a la obesidad. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO

En las últimas décadas, la obesidad se ha convertido en un problema de salud pública cada vez con mayor relevancia alrededor del mundo (14,15), considerada la pandemia del siglo XXI (16). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2016, el 39% de las personas adultas tenían sobrepeso, y el 13% tenían obesidad (1). Asimismo, las estimaciones de los niveles mundiales de sobrepeso y obesidad sugieren que más de 4 mil millones de personas podrían verse afectadas en el año 2035 por este problema de salud (17). El aumento de la prevalencia de obesidad, que se ha triplicado desde el año 1975 (18), es considerado una epidemia con gran impacto sobre la morbilidad y la mortalidad (19) que amenaza con reducir la esperanza y la calidad de vida tanto de las generaciones actuales como de las futuras (10). Debido a la imposibilidad de detener el incremento de la prevalencia de obesidad, se estima que en los próximos años se puede convertir en la principal causa de mortalidad (20).

En el diagnóstico de la obesidad existen cuatro métodos básicos de evaluación, métodos antropométricos, clínicos, bioquímicos y dietéticos (21). En la actualidad, coexisten diferentes marcadores que se emplean para el diagnóstico clínico de la obesidad. Dentro de los métodos clásicos, el Índice de Masa Corporal (IMC) es el método de clasificación más aceptado para identificar el sobrepeso y la obesidad (14). Se trata de un índice que utiliza la relación entre el peso corporal (kg) y la altura al cuadrado (m^2) estableciendo unos puntos de corte, que la OMS emplea para clasificar a una persona como con bajo peso, peso normal, sobrepeso u obesidad (**Tabla 1**) (22). Además, recientes investigaciones asocian un IMC alto con mayor riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas, como diabetes tipo 2, hipertensión arterial o cáncer (23), y mayor riesgo de mortalidad por todas las causas (24). Además, datos publicados recientemente muestran que el IMC se asocia positivamente con resultados más graves de enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) (11).

Tabla 1. Clasificación según el Índice de Masa Corporal (IMC).

IMC (kg/m^2)					
Bajo peso	Peso normal	Sobrepeso	Obesidad tipo I	Obesidad tipo II	Obesidad tipo III
< 18,5	18,5 – 24,9	25 - 29,9	30 - 34,9	35 - 39,9	≥ 40

Aunque el IMC es el método más empleado para clasificar la obesidad por su sencillez, este índice tiene algunas limitaciones, donde factores como la edad, la masa muscular y el origen étnico pueden influir en su relación con la grasa corporal (25), no proporcionando información suficiente sobre su distribución (26). Algunas medidas antropométricas, como el espesor de los pliegues cutáneos, la circunferencia de la cintura y la relación cintura-cadera, se utilizan cada vez más como alternativa al IMC para evaluar el riesgo de desarrollo de afecciones relacionadas con la obesidad (25). En concreto, la obesidad abdominal calculada principalmente por la circunferencia de la cintura se asocia con mayores riesgos para la salud que la obesidad en general (11). El manejo exitoso de la obesidad debe medirse teniendo en cuenta los objetivos de salud y calidad de vida establecidos a través de la toma de decisiones compartida por el paciente y su profesional de atención médica, en lugar de por los cambios en el IMC únicamente (27).

USC
DE COMPOSTELA

Asimismo, existen otros métodos más avanzados para evaluar la composición corporal, entre los que destaca la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA, del inglés "*Dual-Energy X-ray Absorptiometry"*), el cual se ha convertido en el método de elección proporcionando una evaluación multicompartimental incluyendo la masa ósea. Aunque se trata de la técnica preferida, además de su elevado coste, su limitación principal es la exposición a la radiación, por ello otras técnicas avanzadas menos invasivas y costosas se emplean más habitualmente con buenos resultados. Este es el caso del análisis de impedancia bioeléctrica (BIA). La BIA implica una corriente eléctrica de bajo nivel que pasa a través del cuerpo del individuo y mide la oposición al flujo de la corriente, donde el tejido graso provoca resistencia a esa corriente (28).

La obesidad se clasifica además en cuatro categorías: obesidad con peso normal, obesidad metabólica con peso normal, obesidad metabólicamente saludable y obesidad metabólicamente no saludable. Es por ello, que la utilización de biomarcadores para el diagnóstico de la obesidad es un método objetivo que se puede utilizar para un diagnóstico más fiable (21). Entre los biomarcadores más destacados se encuentran los biomarcadores inflamatorios (proteína C reactiva, interleucina-6 (IL-6) o factor de necrosis tumoral (TNF)) (14,21), adipoquinas (adiponectina, leptina o resistina), el estrés oxidativo, los microARN (miARN) o la microbiota intestinal (21).

Si bien es cierto que los métodos más utilizados para diagnosticar y clasificación de la obesidad siguen siendo los descritos anteriormente, debido a la complejidad de esta enfermedad que conlleva aspectos multidimensionales en cuanto a su fisiopatología, progresión y respuesta al tratamiento, en la actualidad sería más correcto hablar de diversas "obesidades" (29). En la era de la medicina de precisión, es necesario fenotipar las obesidades y utilizar la información que nos aporta para un enfoque holístico y personalizado en el tratamiento de esta enfermedad (29,30). En este contexto, nuevas estrategias basadas en la medicina personalizada hablan de dirigir los tratamientos a metabotipos específicos para mejorar el éxito de las intervenciones nutricionales o de estilo de vida (31), o a la evaluación morfofuncional que incluye composición corporal, pruebas funcionales, ecografía muscular y determinaciones de laboratorio para obtener información para definir de forma completa los fenotipos de los pacientes que viven con obesidad (32).

1.2. TRATAMIENTO PARA LA OBESIDAD

Debido al aumento de la prevalencia de obesidad y sus consecuencias a nivel mundial, cada vez es más necesario encontrar estrategias adecuadas para el tratamiento de esta patología. Uno de los aspectos fundamentales en el momento de elegir el tratamiento más eficaz para tratar la obesidad, es que debe adaptarse a las necesidades de cada individuo (25). Para el tratamiento de pérdida de peso se emplean diferentes estrategias, donde destacan las intervenciones dietéticas y de estilo de vida, terapias farmacológicas o el abordaje quirúrgico (11,25). Actualmente han surgido nuevas oportunidades farmacológicas que están despertando grandes esperanzas en el tratamiento de la obesidad, dando lugar a fármacos destinados a reducir el apetito y ayudar a la pérdida de peso. Los enfoques farmacológicos incluyen actuar sobre enzimas y hormonas implicadas en la fisiopatología de la obesidad (33–37). Hasta hace pocos años, el principal fármaco aprobado para su utilización en Europa para el tratamiento de la obesidad era Orlistat, un inhibidor de la lipasa, con una eficacia modesta (37), pero en la

actualidad son los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) los que se postulan como fármacos prometedores para promover la pérdida de peso debido a su eficacia y seguridad (33–37). Sin embargo, hasta el momento, las terapias disponibles y las más estudiadas son las intervenciones nutricionales y de estilo de vida o la cirugía bariátrica en aquellos pacientes con obesidad más grave. Por tanto, en este apartado se hablará principalmente de las intervenciones dietéticas y de estilo de vida, y brevemente sobre el abordaje quirúrgico de la obesidad.

1.2.1. Intervenciones dietéticas y de estilo de vida

1.2.1.1. Patrones dietéticos

Durante mucho tiempo, la investigación en nutrición se ha centrado en los efectos sobre la salud de nutrientes o alimentos de forma individual. Sin embargo, los individuos no ingerimos nutrientes o alimentos aislados, sino una combinación de ellos. Este aspecto ha hecho que investigaciones recientes se interesen por la sinergia entre todos los componentes de la dieta, principalmente en los patrones dietéticos (38,39). Los patrones dietéticos se definieron por primera vez por el Comité Asesor de Guías Dietéticas de 2015 como: "las cantidades, proporciones, variedad o combinación de diferentes alimentos, bebidas y nutrientes (cuando estén disponibles) en las dietas y la frecuencia con la que se consumen" (40). El estudio de patrones dietéticos y su adherencia ha demostrado asociaciones con el riesgo de enfermedades (38).

1.2.1.1.1. Dieta Mediterránea

La Dieta Mediterránea es un patrón dietético tradicional que se da de forma natural en determinadas regiones y está arraigado a la tradición local, y no solo se percibe como una dieta saludable sino también como un estilo de vida (41). Es propia de países europeos mediterráneos, entre ellos destacan España, Grecia o Italia, y abarca no solo al tipo de alimentos consumidos y sus beneficios para la salud, sino también a un enfoque donde se tiene en cuenta la sostenibilidad, la proximidad y temporalidad de los alimentos, la forma de cocinado, así como otros aspectos fundamentales como el estilo de vida (realización de actividad física de forma regular, el descanso, o comer y compartir en familia) (42). La Dieta Mediterránea fue definida por primera vez por Ancel Keys como una dieta pobre en grasas saturadas y con alto contenido en aceites vegetales, capaz de proteger el sistema cardiovascular (43). Sin embargo, en la actualidad se describe más detalladamente como un patrón dietético que se caracteriza por un alto consumo de verduras, frutas, frutos secos, legumbres y cereales de grano entero, rico en grasas monoinsaturadas procedentes del aceite de oliva, y bajo consumo de carnes, carnes procesadas y lácteos, y con un consumo moderado de alcohol (44).

El gran interés sobre la Dieta Mediterránea ha desembocado en importantes investigaciones, siendo identificado como un patrón capaz de reducir el riesgo de mortalidad en general (45), prevenir el riesgo de diversas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares (46,47), diabetes tipo 2, síndrome metabólico, depresión o deterioro cognitivo

USC DE COMPOSTELA

(47), así como reducir la incidencia de algunos tipos de cáncer (48) o prevenir el aumento de peso corporal (47). Además, debido a su alto contenido en compuestos nutricionales bioactivos, que influyen en mecanismos epigenéticos capaces de proteger contra el cáncer y procesos de envejecimiento, se postula como una "dieta epigenética" (49), término acuñado por primera vez en el año 2011 por Hardy y Tollesfsbol (50).

1.2.1.1.2. Dieta Atlántica

En los últimos años han destacado otros patrones dietéticos tradicionales potencialmente saludables. En concreto, en el noroeste de la Península Ibérica, principalmente Galicia y norte de Portugal existe un patrón dietético por sí mismo, la Dieta Atlántica del Sur de Europa (SEAD), también llamada Dieta Atlántica (51). La Dieta Atlántica cuenta con menor evidencia científica hasta el momento, comparándolo con otros patrones dietéticos más estudiados, pero se asocia con beneficios para la salud similares a los que produce la Dieta Mediterránea. Aunque ambos patrones dietéticos, Dieta Atlántica y Mediterránea, muestran bases comunes, hay ciertos aspectos que los diferencian haciéndolos únicos e independientes (**Tabla 2**) (41).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2. Diferencias entre las raciones de grupos de alimentos en la Dieta Atlántica y la Dieta Mediterránea.

Componentes	Dieta Atlántica	Dieta Mediterránea
Pan de grano entero	≥ 1 ración/día	≥ 1 ración/día
Arroz y cereales	≥ 1 ración/día, cereales integrales	1-2 raciones/comida principal
Patatas	≥ 1 ración/día	≤ 3 raciones/semana
Aceite	Uso frecuente de aceite de oliva	Uso frecuente de aceite de oliva
Frutas frescas	≥ 2 raciones/día	1-2 raciones/comida principal
Verduras/hortalizas	≥ 2 raciones/día de *Brassicas* ≥ 3 raciones/semana	≥ 2 raciones/comida principal
Legumbres	≥ 2 raciones/semana	≥ 2 raciones/semana
Pescados	≥ 3 raciones/semana	≥ 2 raciones/semana
Mariscos	≥ 1 raciones/semana	No se especifica
Carnes	Cerdo, ≥ 1 ración/semana Aves de corral/caza ≥ 1 ración/semana Ternera ≥ 1 ración/semana	Carne blanca, 2 raciones/semana Carne roja, < 2 raciones/semana
Productos lácteos	≥ 2 raciones/día	2 raciones/día
Huevos	≥ 3 raciones/semana	2 a 4 raciones/semana
Frutos secos	Preferiblemente castañas, nueces y almendras, ≥ 2 raciones/semana	1-2 raciones/día
Dulces	Nunca o casi nunca	≤ 2 raciones/semana
Alcohol*	Vino, ≥ 1 ración/día	Bebidas fermentadas, 1-2 vasos/día

*Vaso/bebida: vino, 100 mL; cerveza, 200 mL.

Entre las características principales de este patrón se encuentra un alto consumo de pescado y marisco, alto consumo de cereales de grano entero, patatas y legumbres, alto consumo de frutas y vegetales, empleo de aceite de oliva como grasa de elección, consumo diario de productos lácteos, consumo moderado de carne, principalmente cerdo o ternera, y agua como principal bebida. Además, los métodos de cocción empleados son sencillos, se mantienen los buenos hábitos alimentarios tradicionales del Atlántico, y se realiza actividad física diariamente (52,53).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Dentro de los grupos de alimentos más destacados en la Dieta Atlántica, se encuentran los vegetales *Brassica,* en concreto las crucíferas, la variedad de vegetales más

presente en este patrón (52). En este género se incluyen el brócoli, repollo, berza o grelo. Los vegetales *Brassica* tienen un alto contenido en antioxidantes y fitoquímicos que contribuyen a la prevención de enfermedades cardiovasculares (54) y cáncer (55). Estos efectos beneficiosos sobre la salud están relacionados con metabolitos secundarios denominados glucosinolatos y su hidrólisis por la mirosinada a isotiocianatos y otros compuestos (55). Las propiedades beneficiosas se atribuyen fundamentalmente a los isotiocianatos. Uno de los isotiacianatos más investigados es el sulforafano, antioxidante natural con potenciales efectos sobre la prevención y el tratamiento del cáncer (56,57), modulando las enzimas que metabolizan los carcinógenos, inhibiendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis, e inhibiendo la neoangiogénesis y la metástasis (57). Otro de los grupos de alimentos con mayor consumo en este patrón dietético es el del pescado y marisco, destacando el consumo de pescado azul (52). Este grupo de alimentos aporta un alto valor biológico por su contenido en proteína de buena calidad (41), calcio, vitamina D, elementos traza y por el contenido de ácidos grasos omega-3 (52), pertenecientes a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Los ácidos grasos omega-3 presentan propiedades cardioprotectoras (58), antiinflamatorias (58,59), mejorando el perfil de adipoquinas (59), y además decrecen la resistencia a la insulina (59) y los niveles de triglicéridos (58).

Uno de los mayores intereses sobre la Dieta Atlántica reside en que en esas regiones, donde existe este patrón, presentan una mayor esperanza de vida vinculada a factores interconectados, como factores socieconómicos, sanitarios, ambientales y genéticos. Particularmente, en la región de Galicia las tasas de supervivencia son más altas, con 1823 centenarios registrados en el año 2020 según el Instituto Nacional de Estadística (60–62). En este contexto, en el noroeste de España se encuentran tasas más bajas de mortalidad por enfermedad cardiovascular frente a las encontradas en el resto de Europa, donde la muerte por esta patología representa el 49% de las muertes totales (61,63,64). Asimismo, la Dieta Atlántica tiene características que son capaces de modular mecanismos epigenéticos, que a su vez podrían promover un envejecimiento saludable, proponiéndola recientemente como una "dieta epigenética" (41).

1.2.1.1.3. Otros patrones dietéticos

Además de los descritos previamente, en cuanto a patrones dietéticos saludables, otro ejemplo ampliamente estudiado es la *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH), la cual fue creada como resultado de estudios para mejorar ciertas patologías, como la elevación de la presión sanguínea y otras enfermedades cardiovasculares (65). Asimismo, en los últimos años también han destacado otros patrones potencialmente saludables, además de la Dieta Mediterránea o Atlántica, como la Dieta Nórdica basada en alimentos finlandeses donde se enfatizan alimentos locales y de temporada, y se promueve la sostenibilidad (66,67).

1.2.1.2. Intervención dietética con dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Interesantemente, además de los tratamientos para la obesidad descritos hasta el momento, la tendencia actual se centra en diseñar terapias para perder peso que se centren o

simulen la situación de ayuno. Las estrategias más destacadas en esta línea hablan del ayuno intermitente (68–70), una herramienta que se ha propuesto debido a la evidencia sobre sus beneficios sobre el control del peso corporal (69,70) y la salud cardiovascular asociada a la obesidad (70), y las dietas cetogénicas que inducen la producción de cuerpos cetónicos, como las dietas cetogénicas muy bajas en calorías (VLCKD), que imitan el ayuno caracterizadas por formulaciones bajas en grasas y carbohidratos y un contenido de proteínas de alto valor biológico, las cuales se asocian con una reducción del peso corporal y mejora de la calidad de vida, medidas antropométricas y parámetros bioquímicos (68,71–75).

1.2.1.2.1. Cetosis nutricional

La cetosis nutricional es una situación metabólica adaptativa fisiológica, que ocurre cuando se produce una restricción intencional de la ingesta de carbohidratos. Esta situación puede producirse tras dejar de ingerir alimentos durante varios días, con una dieta con muy bajo contenido en carbohidratos o si se realiza ejercicio físico de forma intensa. En estas situaciones, las reservas de glucosa son insuficientes, por lo que nuestro organismo tiene que buscar fuentes alternativas de energía, como son los cuerpos cetónicos (71,76,77). Los principales cuerpos cetónicos son el acetoacetato (AcAc), el ácido β-hidroxibutírico (β-OHB) y la acetona. Estos cuerpos cetónicos se obtienen principalmente a partir de la lipolisis del tejido adiposo, descomponiéndose en ácidos grasos libres (AGL), los cuales no sirven directamente de energía debido a que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que es necesario que previamente lleguen al hígado para formar, por β-oxidación en los hepatocitos, los cuerpos cetónicos, y estos ser transportados a otros tejidos extrahepáticos donde son utilizados para la obtención de energía (**Figura 2**) (76). En la cetosis nutricional los niveles de cetonas en sangre son de 0,5 a 3 mg/dL, hecho que contrasta con un estado fisiopatológico de cetoacidosis diabética, con el cual no debe confundirse (71).

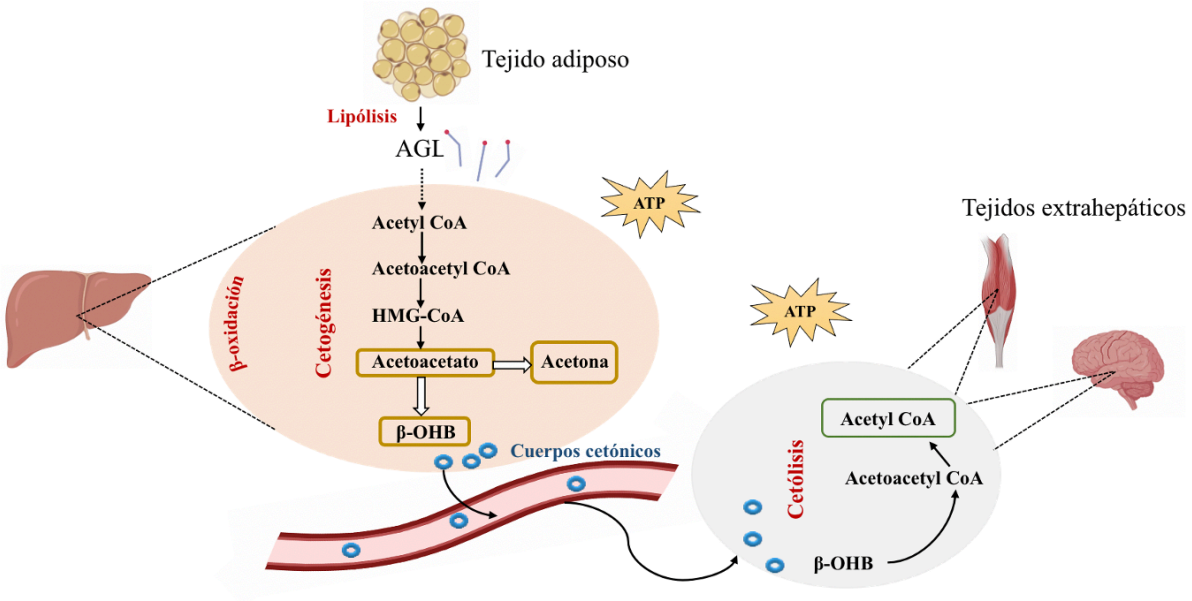


Figura 2. Descripción del proceso fisiológico de cetosis. AGL, ácidos grasos libres; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A; ATP, adenosín trifosfato; ß-OHB, ácido ß-hidroxibutírico; CoA, coenzima A. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.1.2.2. Concepto de dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD)

Las VLCKD han ido ganando interés en los últimos años como potencial terapia para el tratamiento de la obesidad (78). La VLCKD es una intervención nutricional que emula el ayuno restringiendo la ingesta de carbohidratos y lípidos y un aumento relativo de la ingesta de proteínas de alto valor biológico. Además, durante la fase cetogénica se proporcionan los suplementos de vitaminas y minerales necesarios según las recomendaciones (79). Esta intervención nutricional consta de varias fases, una primera fase activa o fase cetogénica (600-800 kcal/día), con la distribución de macronutrientes siguiente: carbohidratos < 50 g/día de vegetales, lípidos < 10 g/día de aceite de oliva y proteínas entre 0,8-1,2 g/kg de peso corporal ideal del individuo. Tras esta fase activa, una segunda fase de reeducación (800-1500 kcal/día), donde se reintroducirán progresivamente varios grupos de alimentos junto con un programa de reeducación nutricional para mantener la pérdida de peso conseguida. En cuanto a los carbohidratos, se incorporan primeros los de bajo índice glucémico, seguidos de moderado y alto índice glucémico. Por último, llega la fase denominada de mantenimiento (1500-2000 kcal/día, dependiendo del individuo) fomentando un estilo de vida saludable y el mantenimiento a largo plazo de la pérdida de peso (78).

En los últimos años, los estudios han evidenciado que las VLCKD pueden ser herramientas eficaces para la pérdida de peso y su mantenimiento a largo plazo, principalmente a expensas de la pérdida de masa grasa (75), con disminución de la grasa visceral (72) y preservando la masa y fuerza muscular (75). Asimismo, estudios recientes han evidenciado que tiene efectos sobre el mantenimiento de un buen estado de ánimo y calidad de vida (74), es segura respecto al equilibrio ácido-base (80) y no afecta a la tasa metabólica en reposo del individuo (81).

1.2.1.3. Otras intervenciones dietéticas y de estilo de vida

Dentro de las intervenciones dietéticas y de estilo de vida coexisten diferentes estrategias ampliamente estudiadas y empleadas en las últimas décadas. Entre las intervenciones dietéticas para pérdida de peso más destacadas se encuentra las dietas hipocalóricas (LCD) con restricción calórica entre 500-1000 kcal/día y con una distribución variable de macronutrientes según el programa de pérdida de peso (82–84).

Habitualmente, los pacientes con obesidad asisten a consultas presencialmente de forma individual y con un tiempo limitado, es por ello por lo que las visitas o intervenciones grupales como parte del apoyo en los cambios en la dieta y en el estilo de vida son una alternativa que cada vez gana más adeptos. Programas como la Intervención Grupal en OBEsidad (IGOBE), un programa estructurado de educación nutricional para pacientes con obesidad basado en la atención grupal y promoción de una dieta saludable, la realización de ejercicio físico y apoyo conductual, informa sobre cambios en la composición corporal, pérdida de peso y modificaciones de los hábitos de vida, y disminución de la prevalencia de comorbilidades asociadas a la obesidad (85,86).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2. Abordaje quirúrgico de la obesidad

La cirugía bariátrica (BS), es el método quirúrgico empleado con el fin de lograr una pérdida de peso en personas con obesidad severa asociada a múltiples efectos adversos sobre la salud. El paciente objetivo para este tipo de abordaje es el paciente que no ha podido perder peso o mantener esa pérdida por métodos no quirúgicos. Los criterios específicos indican que la BS es apropiada en pacientes con IMC > 40 y pacientes con IMC de 35 a 40 con comorbilidades asociadas, aunque también puede estar indicada en obesidad menos grave (IMC de 30 a 35) y diabetes tipo 2. Entre los procedimientos más empleados de BS se encuentran el *bypass* gástrico (en Y de Roux) y la banda gástrica (87).

Aunque la BS es un método efectivo para la pérdida de peso debido a la rápida y gran disminución del peso corporal durante los primeros meses tras la intervención, además de la pérdida de masa grasa, también se produce una importante pérdida de masa libre de grasa (88,89).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. OBESIDAD Y CÁNCER

La obesidad, además de ser una enfermedad por si misma, es también un potente factor de riesgo de numerosas enfermedades. De hecho, la relación entre la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 o enfermedades cardiovasculares se conoce desde hace mucho tiempo y se ha estudiado en profundidad. Sin embargo, el conocimiento de la asociación entre la obesidad y el cáncer es relativamente reciente. Investigaciones de las últimas décadas evidencian que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de varios tipos de cáncer (90,91), su peor pronóstico y la disminución de la supervivencia (91). De hecho, en 2016, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), después de revisar más de 1000 estudios epidemiológicos, asocia el exceso de grasa corporal con un mayor riesgo de hasta 13 tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama postmenopáusico, endometrio, próstata, páncreas o colon (**Figura 3**) (92). Después del tabaquismo, la obesidad se considera el factor más importante de riesgo modificable de cáncer, siendo actualmente la segunda causa modificable de desarrollo y mortalidad por cáncer (93). Añadido a esta evidencia, la inactividad física, el exceso en la ingesta energética y la calidad de la dieta, los cuales aumentan el IMC, juegan un papel importante en la etiología del cáncer (2). Se estima que el número de pacientes con cáncer aumente en los próximos años a nivel mundial, por eso las estrategias de prevención dirigidas principalmente al sobrepeso y la obesidad cobran especial interés en la población, para poder evitar diagnósticos futuros (94).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

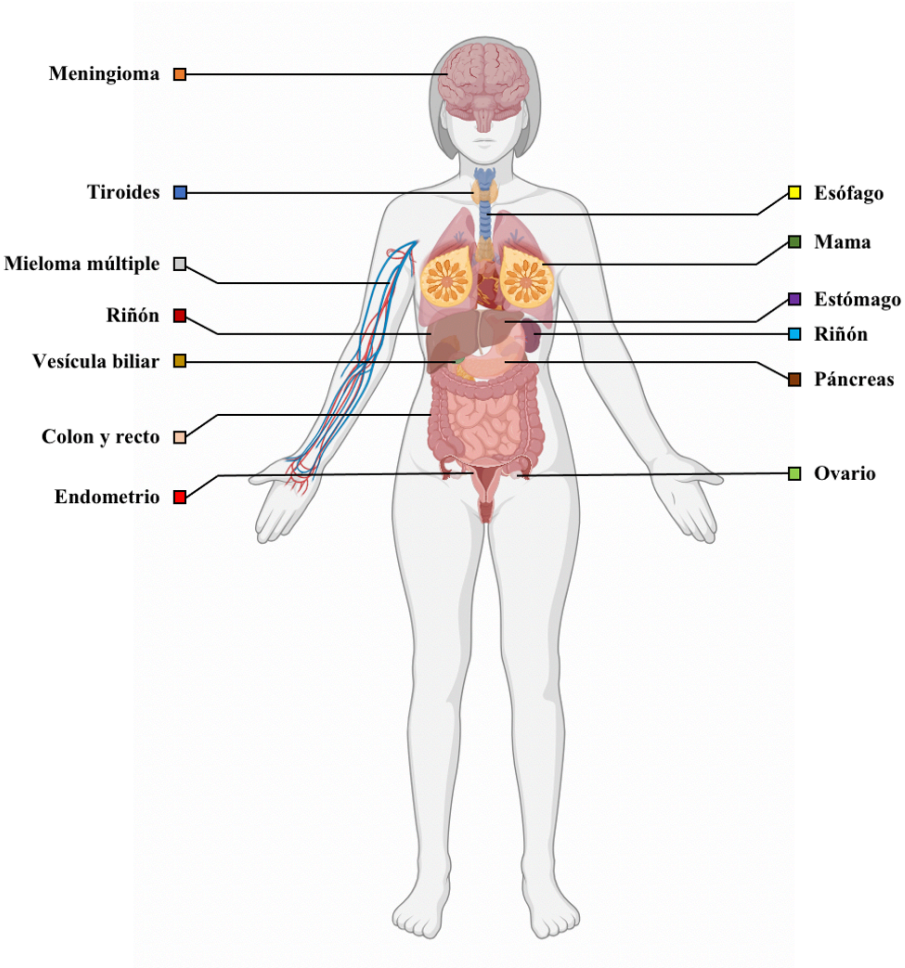


Figura 3. Representación de los 13 tipos de cáncer asociados a la obesidad. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

A pesar de la evidencia epidemiológica, los mecanismos moleculares que subyacen a la asociación entre la obesidad y riesgo de cáncer no están claros actualmente (93). Las complicaciones sistémicas de la obesidad, entre las que se encuentran procesos inflamatorios, hormonales o del sistema inmunológico, se han investigado como posibles causas o contribuyentes al aumento del riesgo y la progresión del cáncer. La inflamación crónica de los tejidos es una característica de la obesidad, y esta inflamación se relaciona con diferentes fases de la tumorigénesis (91). Asimismo, el exceso en la ingesta energética se almacena en forma de lípidos en el tejido adiposo y otros órganos. Esta mayor cantidad de lípidos tiene como resultado la activación de cascadas de señalización que impulsan la absorción de glucosa, y pueden activar el crecimiento, la proliferación celular, y la angiogénesis en los procesos oncogénicos (90). Estos mecanismos que vinculan la obesidad y el cáncer pueden remodelarse con terapias de pérdida de peso en pacientes con obesidad. Por lo tanto, las intervenciones de pérdida de peso podrían ser una buena estrategia para contrarrestar el riesgo y el mal pronóstico del cáncer relacionado con la obesidad en general, y con el cáncer de mama en particular (93).

2.1. CÁNCER DE MAMA ASOCIADO A OBESIDAD

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El cáncer de mama es un tipo de cáncer que afecta gravemente a la salud de las mujeres. Es el cáncer más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres. Sin embargo, a medida que los tratamientos han ido evolucionando, el número de supervivientes de cáncer de mama ha aumentado notablemente (95,96). Varios factores aumentan el riesgo del cáncer de mama, la obesidad y los hábitos de vida se encuentran entre los factores modificables más relevantes (**Figura 4**) (97). Así, debido al aumento de la prevalencia de la obesidad, la incidencia y el mal pronóstico de cáncer de mama pueden aumentar en el futuro. Además, la supervivencia en mujeres con obesidad con cáncer de mama ha disminuido. Esta caída en la supervivencia puede deberse a la enfermedad en sí misma, comorbilidades asociadas o debido a una mal respuesta al propio tratamiento de la enfermedad. Las mujeres con obesidad presentan mayores complicaciones relacionadas con la radioterapia y la cirugía, y actualmente no hay consenso sobre la dosis adecuada de quimioterapia en pacientes con obesidad. Por lo tanto, la obesidad se considera un problema de salud grave que puede tener efectos significativos sobre la incidencia y el tratamiento de neoplasias malignas ginecológicas, como el cáncer de mama (98).

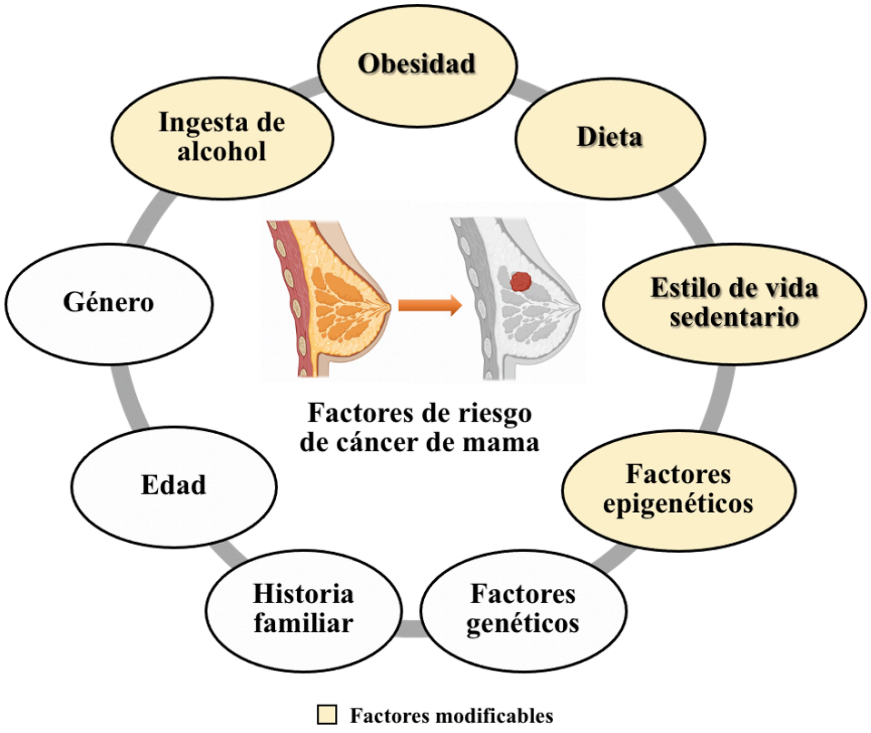


Figura 4. Factores de riesgo de desarrollo de cáncer de mama. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

Las complicaciones sistémicas de la obesidad, que incluyen la inflamación, la resistencia a la insulina, y la hiperglucemia, se han investigado como posibles causas o contribuyentes al aumento del riesgo y la progresión del cáncer de mama (99). Además, se han propuesto los mecanismos epigenéticos como un vínculo mecánico potencial entre las características de la obesidad y el cáncer de mama (100,101).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

2.2. CETOSIS NUTRICIONAL EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER ASOCIADO A OBESIDAD

Recientemente, se ha propuesto la dieta cetogénica como terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer (102–105). La evidencia científica sobre el uso de esta dieta se centro en el hecho de que reduce los niveles de glucosa en circulación e induce cetosis, privando de este modo a las células cancerosas de energía mientras que las células normales adaptan su metabolismo para utilizar los cuerpos cetónicos como combustible para sobrevivir. Además, reducir los niveles de glucosa en sangre también disminuye los niveles de insulina y de los factores de crecimiento similares a la insulina, que se conocen como impulsores relevantes en la proliferación de las células cancerosas (102). Sin embargo, es fundamental diferenciar los diversos tipos de dietas inductoras de cetosis como la cetosis inducida por niveles bajos de carbohidratos y alta ingesta de grasa o la cetosis inducida por bajos niveles de carbohidratos y baja ingesta de grasas (106), ya que una alta ingesta de grasas en la dieta podría resultar peligroso para la progresión del cáncer (107).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. TEJIDO ADIPOSO EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD

El tejido adiposo es un órgano complejo (108) con varias funciones importantes en el organismo. Entre las funciones que más destacan se encuentran la regulación de procesos fisiológicos como la homeostasis y mantenimiento de la temperatura corporal, la inmunidad, la reproducción, la adipogénesis, la angiogénesis, la reestructuración de la matriz extracelular o el metabolismo de esteroides (109). La ejecución de las diferentes funciones depende de los diferentes tipos celulares que conforman este tejido: adipocitos, preadipocitos, fibroblastos, macrófagos, monocitos, células del estroma vascular y células de inervación (109,110).

El tejido adiposo está compuesto a su vez por tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo (108). El tejido adiposo pardo solo representa el 4,3% del tejido adiposo total en adultos humanos (18) y se encuentra en la zona de la clavícula y áreas abdominal, espinal y cuello (111). Su principal función es producir calor a través de la termogénesis (111–113) y entre sus beneficios destacan la reducción de la grasa corporal, participación en la homeostasis de la glucosa y mejora del perfil lipídico (112). Sin embargo, la principal función del tejido adiposo blanco, sobre el que se centra este apartado, es almacenar energía y mantener la homeostasis energética (114), y es dependiente del estado nutricional (115,116). El tejido adiposo blanco representa la mayor proporción del tejido adiposo en el cuerpo y se encuentra alrededor de los órganos y vasos sanguíneos, en la cavidad abdominal y debajo de la piel (18). A su vez, el tejido adiposo blanco se subdivide en tejido adiposo visceral (TAV) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) (117). El TAV genera AGL (118,119) y una desregulación de la expresión de factores derivados del tejido adiposo (120). Todo ello hace que el TAV sea el principal responsable de las comorbilidades asociadas a la obesidad (118,121), relacionado con la resistencia a la insulina, la inflamación, la dislipemia y la diabetes tipo 2 (6). Por el contrario, el TAS se asocia con un riesgo reducido de trastornos metabólicos (110). Investigar las diferentes características bioquímicas y moleculares del tejido adiposo blanco, tanto visceral como subcutáneo, puede abrir puertas a nuevas estrategias para combatir las comorbilidades asociadas a la obesidad (120).

3.1. TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO

Hasta la década de 1980 se pensaba que el tejido adiposo era simplemente un órgano inerte de almacenamiento de grasa con la única función de aislarnos del frío (13). Sin embargo, actualmente se considera que el tejido adiposo es un órgano complejo con funciones endocrinas, metabólicas e inmunoreguladoras (122), y es conocido como el órgano endocrino más grande del cuerpo humano (13) que se comunica con otros tejidos para contribuir a la regulación del metabolismo (110) cuando se encuentra en cantidades fisiológicamente adecuadas (6).

USC DE COMPOSTELA

Los depósitos de tejido adiposo liberan hormonas y moléculas de señalización denominadas adipoquinas que actúan local y periféricamente (122). Estas sustancias secretadas controlan el metabolismo energético, lipídico y de los carbohidratos (6,123), regulan la presión arterial y la inflamación (123), y pueden modular la actividad del sistema inmunológico (6). Las adipoquinas más importantes asociadas con el desarrollo de obesidad son la leptina y la adiponectina (124). La leptina es una proteína no glicosilada que regula el apetito, el gasto de energía (125,126) y la masa corporal (127), con efectos anorexigénicos (128). Por el contrario, la adiponectina muestra una correlación negativa con el TAV, tiene efectos antiinflamatorios suprimiendo la producción de factores proinflamatorios y modulando la expresión de citoquinas antiinflamatorias (6), efectos antiapoptóticos (129), y se correlaciona inversamente con el IMC, los niveles de triglicéridos y la resistencia a la insulina (125). Además, nuevas adipoquinas se están investigando en los últimos años (130), como la resistina, adipsina, quimerina o visfatina (125,128).

3.2. DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

Como respuesta a un balance energético positivo se produce una remodelación del tejido adiposo, un proceso continuo que se acelera de manera patológica en estado de obesidad (131) para poder adaptarse a la captación y almacenamiento excesivo de grasa (5), conocido como disfunción del tejido adiposo (132). En condiciones de obesidad, aproximadamente entre el 70-80% de las personas experimentan una remodelación del tejido adiposo (133). Para ello se producen varios procesos de remodelación celular y estructural con expansión del tejido adiposo mediante hipertrofia (aumento de los adipocitos) e hiperplasia (aumento del número de adipocitos), aumento de células inflamatorias y remodelación de la matriz celular (134). Por lo tanto, la remodelación angiogénica, la sobreproducción de la matriz extracelular y un estado elevado de infiltración de células inmunes prevalecen en la grasa corporal en condiciones de obesidad (131), provocando una cascada inflamatoria (133).

La disfunción del tejido adiposo se ha asociado con efectos nocivos como disfunción mitocondrial, inflamación, fibrosis, hipoxia o secreción alterada de citoquinas (134,135), creando un microambiente en el que los adipocitos secretan mayores cantidades de citoquinas proinflamatorias (125). En concreto, es la acumulación de TAV la que estimula estados prooxidantes y proinflamatorios (136).

3.3. ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN ASOCIADO A LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN OBESIDAD

En condiciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres en bajas concentraciones son necesarios para un estado rédox normal, además de participar en diversas funciones biológicas, como la defensa contra patógenos y la señalización intracelular (137). Sin embargo, en estados no fisiológicos, niveles elevados pueden provocar daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (137,138), por ejemplo, en estado de inflamación las células liberan una mayor cantidad de ROS (138). Un excesivo estrés oxidativo derivado de una acumulación de ROS desregula el sistema de defensa antioxidante, lo cual está estrechamente asociado con varias enfermedades, especialmente el cáncer (139) (**Figura 5**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

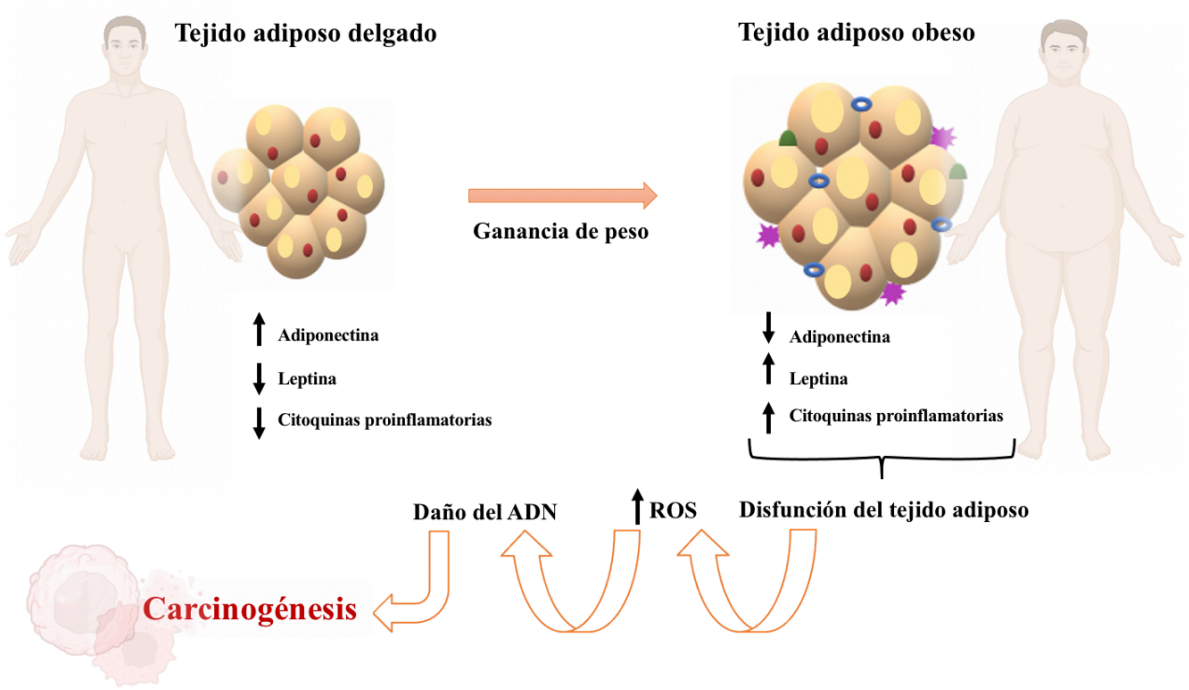


Figura 5. Diferencias entre el tejido adiposo delgado y el tejido adiposo obeso y su papel en la carcinogénesis. ROS, especies reactivas de oxígeno. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

La producción de ROS es fundamental para la progresión de enfermedades inflamatorias (138). En este contexto, el estrés oxidativo desempeña un papel relevante en el desarrollo de la obesidad y sus comorbilidades asociadas, interviniendo en procesos inflamatorios, favoreciendo la adipogénesis y lipogénesis, e interviniendo en el equilibrio energético (137). Asimismo, la obesidad *per se* también puede inducir estrés oxidativo sistémico a través de varios mecanismos, como son la generación de superóxido a partir de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas, la autooxidación de gliceraldehído, la fosforilación oxidativa o la activación de la proteína quinasa C (136).

Cuando la inflamación aguda provocada por el tejido adiposo disfuncional perdura, se produce una inflamación crónica de bajo grado (133,140,141). El exceso de TAV es una fuente de citoquinas que crea un eje de estrés oxidativo-inflamatorio (142). Los adipocitos hipertróficos sintetizan altos niveles de citoquinas proinflamatorias (6,123,143), incluidas la IL-1β, la IL-6, el TNF-α (6,123), la IL-12 o el interferón γ (IFN-γ). Por lo tanto, estas citoquinas contribuyen a la inflamación y a las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad (123).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. INMUNIDAD, OBESIDAD Y CÁNCER

Varios mecanismos están involucrados en el efecto del exceso de grasa corporal sobre la carcinogénesis, pero el más investigado y el más respaldado científicamente es el papel del tejido adiposo disfuncional observado en el contexto de la obesidad (144,145). El eje de estrés inflamatorio-oxidativo que se genera a través de la producción descontrolada de citoquinas proinflamatorias en el TAV (142), junto con una producción alterada de células inmunitarias en obesidad (146), se asocian con la aparición de comorbilidades de la obesidad, incluido un mayor riesgo de cáncer (145). Por lo tanto, tanto la inflamación crónica como los cambios en la producción de células inmunes son las formas clave que provocan una interacción entre la obesidad y el sistema inmunológico (146,147).

4.1. CITOQUINAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN INMUNITARIA

4.1.1. Interferón γ

La inflamación crónica que se observa en estado de obesidad se debe principalmente a un sistema inmunológico desregulado. Esta desregulación afecta a las células *natural killer* (NK), un subgrupo de linfocitos, que se encuentran alteradas en pacientes con obesidad. Estas células son un componente clave en la inmunidad antitumoral (148,149) y antiviral innata (149). Es posible que estas células NK funcionalmente defectuosas contribuyan a la multimorbilidad en la obesidad, incluyendo un mayor riesgo de cáncer. Las células NK pueden dar forma a respuestas inmunitarias mediante la producción rápida de citoquinas como el IFN-γ (148). Esta producción rápida de IFN-γ está mediada por la IL-12, una citoquina heterodimérica de dos subunidades, p40 y p35 que envía señales a través de sus receptores en las células T y NK para inducir la secreción de IFN-γ (150,151).

El IFN-γ es un interferón tipo II modulador de la inflamación que regula las respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Este interferón es producido predominantemente por células NK y también por células T durante la respuesta inmune innata y adaptativa (152–155). El IFN-γ puede unirse a los receptores de IFN-γ 1 y 2 para coordinar diferentes funciones celulares como la regulación inmune, la proliferación celular, la apoptosis, o funciones antitumorales (156). Además, el IFN-γ tiene un papel relevante en la mediación de la inflamación asociada a la obesidad (157). Adicionalmente, la IL-2 también puede regular a diferentes niveles la expresión de IFN-γ en los macrófagos, destacando la importancia de estas células en la interacción entre la inmunidad innata y adaptativa (158).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De este modo, el IFN-γ podría ayudar a un mejor control de enfermedades inflamatorias crónicas, como la obesidad (157), facilitar la mejora de la inmunidad antitumoral con acciones inmunomoduladoras (156), y su señalización puede ser importante en el tratamiento de la obesidad (157) y sus enfermedades asociadas, como el cáncer, así como en el desarrollo de tratamientos oncológicos (156). En este contexto, nuevas terapias para el tratamiento de la obesidad ya apuntan que una mayor producción de IFN-γ con células NK más funcionales podría estar contribuyendo a los beneficios que se observan tras la pérdida de peso en pacientes con obesidad (159).

4.1.2. Sistema BAFF-APRIL

Este sistema inmunológico desregulado característico de la obesidad puede interferir en otros tipos celulares, además de las células NK. El factor activador de células B (BAFF) perteneciente a la familia de TNF y su homólogo, el ligando inductor de proliferación A (APRIL) tienen funciones sobre la inmunidad humoral con la regulación de la diferenciación, proliferación, supervivencia y respuesta de las células B (160). Ambos son producidos por diferentes tipos celulares, incluidos los adipocitos (161). Juntos forman el sistema BAFF-APRIL, y aunque por una parte puede servir como mediador del control del peso corporal (161), su producción alterada tiene un papel importante en la patogénesis de algunos tipos de cáncer (160,162), postulándose como actores relevantes en el microambiente tumoral tanto de tumores sólidos como hematológicos (163).

4.1.3. Osteopontina

La osteopontina es una citoquina que presenta valores elevados en el tejido adiposo (164). Es una proteína multifuncional (165) que fue identificada por primera vez en 1985 por Heingard y colaboradores como una sialoproteína derivada de la matriz ósea bovina (164). Esta citoquina se ha encontrado fisiológicamente en células óseas, así como en adipocitos, cardiomiocitos, células renales y vasculares (166). Existe abundante evidencia que sugiere que la osteopontina desempeña un papel fundamental en patologías hepáticas (167,168), enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (164). Particularmente, en el cáncer, los niveles de osteopontina se correlacionan con la metástasis tumoral, el grado de la enfermedad, el mal pronóstico y la recurrencia temprana del tumor, teniendo un papel relevante en la menor supervivencia global y libre de enfermedad en varios cánceres (169). Además, la osteopontina participa en la fisiopatología del tejido adiposo relacionado con la obesidad (170,171).

Destacadamente, la osteopontina está envuelta en varios procesos fisiopatológicos incluyendo la inflamación, la transformación neoplásica, progresión de la metástasis, promoción de la supervivencia celular o la inmunidad (171). De hecho, la osteopontina presenta capacidad inmunomoduladora actuando sobre la regulación de la respuesta inmune en múltiples niveles, actuando sobre la inflamación y en la regulación de la diferenciación de linfocitos (172).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2. INMUNONUTRICIÓN

Los biomarcadores de inflamación y de estrés oxidativo exacerbados se modifican con una correcta intervención dietética y con la pérdida de peso (173), mejorando o atenuando los factores de riesgo metabólico relacionados con la obesidad y sus comorbilidades asociadas. Actualmente, se está investigando el papel de la nutrición sobre la modulación de la función del sistema inmunológico como coadyuvante de las terapias convencionales en varias enfermedades como el cáncer (174). Esto se debe a que se ha observado que algunos componentes nutricionales en particular pueden mejorar las concentraciones de varios biomarcadores proinflamatorios y prooxidativos (175–177).

Así, en inmunonutrición, la rama de la nutrición que estudia los procesos por los cuales los nutrientes de la dieta modulan el sistema inmunitario (178), se ha estudiado que algunos nutrientes como aminoácidos, nucleótidos, antioxidantes o ácidos grasos omega 3 (147,178,179) tienen capacidad de modular mecanismos específicos involucrados en vías inmunes e inflamatorias (147). De hecho, estudios recientes han mostrado que la inmunonutrición produce cambios en el microambiente tumoral (**Figura 6**) (180).

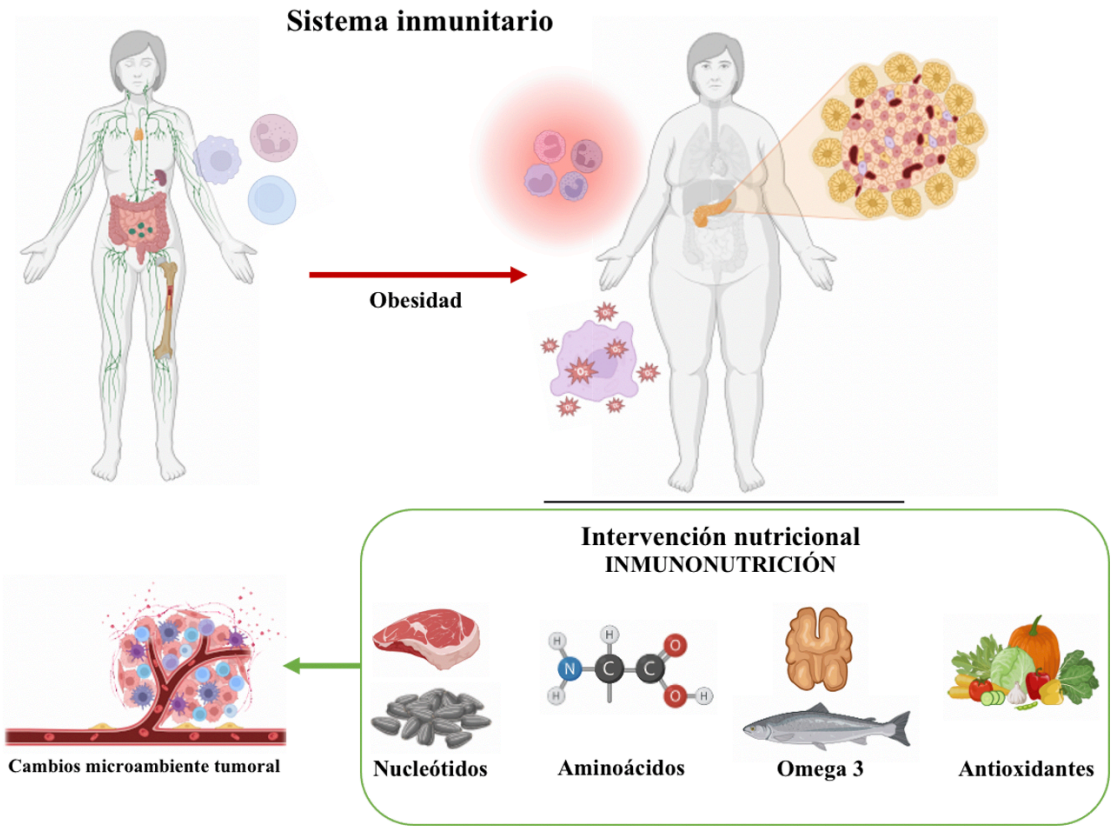


Figura 6. Efecto de la intervención nutricional con inmunonutrición sobre el sistema inmunitario en obesidad. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

En el contexto de la inmunonutrición, también se ha propuesto que los cuerpos cetónicos ejerzan una acción antiinflamatoria y antioxidante en el organismo (181). Los mecanismos moleculares mediante los cuales los cuerpos cetónicos previenen el estrés oxidativo y la inflamación aún están pendientes de dilucidar por completo. En este sentido, basándose en los

estudios preclínicos y clínicos existentes hasta el momento, recientemente se ha propuesto que los cuerpos cetónicos podrían promover un estrés mitocondrial moderado que resulta en una respuesta adaptativa que conduce a un estado antioxidante y antiinflamatorio, una mejor función mitocondrial, reparación celular y mecanismos de regeneración (182). Estos hallazgos sugieren que las terapias dietéticas en las que se produce un incremento de los cuerpos cetónicos pueden reducir la inflamación y sus efectos negativos (183) en patologías como la obesidad y sus enfermedades relacionadas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. CARCINOGÉNESIS Y GENES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO TUMORAL TEMPRANO

La carcinogénesis es un proceso de etiología compleja (184), por el cual células normales se convierten en células precancerosas, se multiplican y finalmente evolucionan a células cancerosas (185,186). Estos procesos están mediados por múltiples factores con etiología endógena y exógena como exposiciones a sustancias químicas, mutaciones en protooncogenes y supresores tumorales o desregulación de vías de señalización involucradas en la homeostasis celular (187). La carcinogénesis depende tanto de alteraciones genéticas como epigenéticas (185).

La inflamación crónica y la sobreproducción de ROS se relacionan con el desarrollo tumoral (188). Las ROS impulsan y desempeñan funciones en la tumorigénesis, contribuyendo a la activación de protooncogenes e inactivación de genes supresores tumorales, y están implicadas en el crecimiento anormal celular y la metástasis (139). El exceso de ROS produce daños en el ADN conduciendo a cambios permanentes en el material genético implicados en la mutación cancerígena (139,184). Estos daños en el ADN pueden afectar a la interpretación y trasmisión de la información genética (189).

Los protooncogenes son genes que juegan un papel relevante en la regulación de la división celular normal, los cuales al sufrir una mutación se activan y se convierten en oncogenes con un papel potencial en el desarrollo de cáncer (190). Por otra parte, los genes supresores de tumores codifican proteínas que mantienen bajo control la división celular, y cuando estos se inactivan se produce una división celular descontrolada que en ocasiones desencadena el desarrollo tumoral (191). A continuación, se describen algunos de los oncogenes y genes supresores tumorales implicados en procesos tempranos del desarrollo tumoral, así como genes implicados en la protección antioxidante (**Tabla 3**). Con su determinación se podría ayudar en la prevención del cáncer asociado a la obesidad puesto que previamente se ha demostrado que presentan una desregulación en estados de obesidad tanto en tejido no tumoral de mama (145) o tejido no tumoral hepático (192) en ambos casos sin evidencia de masa tumoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Genes relacionados con procesos tumorales tempranos.

Oncogenes	Protección antioxidante	Supresores tumorales
ALDH3A1	*GSTM2*	*BRCA1*
Survivina/BIRC5	*SIRT1*	*PTEN*
MYC	*SIRT3*	*TP53*
	SIRT6	*ZNF577*

ALDH3A1, aldehído deshidrogenasa 3A1; *BIRC5*, *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*; *MYC*, *myelocytomatosis*; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *SIRT*, sirtuina; *BRCA1*, *breast cáncer 1*; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *ZNF577*, *zinc finger protein* 577.

5.1. ONCOGENES

La aldehído deshidrogenasa 3A1 (ALDH3A1) es una enzima de la familia de las aldehído deshidrogenasas metabólicamente dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) que oxida varios aldehídos endógenos y exógenos ácidos carboxílicos. La expresión de *ALDH3A1* se relaciona con cambios en el comportamiento de células tumorales, promoviendo el crecimiento tumoral o la metástasis, y resistencia a los tratamientos anticancerígenos (193), y está involucrada en la expansión y diferenciación de las células madre del cáncer (194).

La Survivina también conocida como *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5* (BIRC5) es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (195–197) descubierta en 1997. Se expresa en tejidos embrionarios y en tumores y su expresión se asocia con la diferenciación, proliferación, invasión y metástasis de células tumorales (197). De este modo, BIRC5 desempeña funciones importantes en el ciclo celular. Por todo ello, se ha convertido en un objetivo terapéutico oncológico en las últimas décadas (196).

El oncogén *myelocytomatosis* (*MYC*) es parte de una superfamilia de genes que se encuentran entre los más activados en los tumores humanos. Su principal función es como factor de transcripción que regula la expresión de genes directa o indirectamente (198), involucrado en varios procesos celulares, como el crecimiento celular, la diferenciación o la apoptosis (199), además de influir en el microambiente tumoral (198). *MYC* no solo está implicado en la formación, mantenimiento y progresión del cáncer, si no que también favorece la resistencia a la quimioterapia y las terapias dirigidas (200).

5.2. GENES VINCULADOS A LA PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE

La glutatión S-transferasa Mu 2 (GSTM2) pertenece a una subfamilia de importantes enzimas antioxidantes en organismos vivos (201–203), que participan en la desintoxicación de compuestos como carcinógenos, tóxicos ambientales, fármacos y productos del estrés oxidativo, mediante el acoplamiento del glutatión (202,203). Se ha observado en varios estudios

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

una expresión reducida de *GSTM2* en tejidos tumorales y se asocia con una menor tasa de supervivencia en pacientes oncológicos (203).

La sirtuina 1 (SIRT1) es una histona desacetilasa de clase III (HDAC III) (204,205), enzimas que median la desacetilación de histonas y proteínas no histonas (205) dependientes de NAD^+ (204,205). Se encuentra principalmente en el núcleo de células normales y en el citoplasma de las células tumorales (206). *SIRT1* está involucrada en la regulación genética y epigenética, mantenimiento de la estabilidad del genoma, la apoptosis, la senescencia, la proliferación, el envejecimiento y la tumorigénesis. Tiene implicaciones ambiguas como supresor o promotor tumoral, dependiendo del tipo celular y localización (204).

La sirtuina 3 (SIRT3) se localiza principalmente en las mitocondrias. SIRT3 está involucrada en el metabolismo de aminoácidos, glucósidos y lípidos en las mitocondrias (206), y es fundamental en el estrés oxidativo donde regula la producción de ROS (206,207). Asimismo, participa en la patogénesis de diversas enfermedades, como el cáncer, la diabetes, la neurodegeneración o la esteatosis hepática (206). En cáncer, se sugiere que *SIRT3* tiene un doble papel, actuando como promotor o supresor tumoral dependiendo del tipo de cáncer (206,207).

Otra de las sirtuinas de especial relevancia es la sirtuina 6 (SIRT6), la cual se localiza fundamentalmente en el núcleo (208), con actividad enzimática, es responsable de la desacetilación de histonas, desgrasado-acilación y adesín difosfato-ribosilación (ADP-ribosilación) (208,209). Participa en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos, incluidos el envejecimiento, la inmunidad y el cáncer, y desempeña un papel positivo en el mantenimiento de la estabilidad genómica. En cáncer, la *SIRT6* está implicada tanto en la aparición como en su desarrollo. En algunos tipos de cánceres, tiene funciones contradictorias, actuando como oncogén o supresor tumoral (209).

5.3. GENES SUPRESORES TUMORALES

El gen *breast cancer* 1 (*BRCA1*) es un supresor tumoral identificado en 1994, cuya mutación afecta a la susceptibilidad al cáncer de mama, ovario (210–212) o próstata (211), cuyos portadores tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de cánceres a lo largo de su vida (210,212). El *BRCA1* está implicado en múltiples procesos biológicos, como la respuesta al daño del ADN, el ciclo celular y la apoptosis. Además, tiene un papel clave al establecer la sensibilidad a la quimioterapia (211).

El gen supresor de tumores homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*) se reconoció originalmente como mutado en múltiples cánceres (213), siendo uno de los mutados con mayor frecuencia en tumores humanos. La inactivación genética de *PTEN* se encuentra habitualmente en glioblastomas, melanomas, cáncer de endometrio, próstata, colon y vejiga, y se ha observado una expresión reducida en cáncer de pulmón y mama (214).

La proteína tumoral 53 (*TP53*) es un gen supresor tumoral que actúa como un factor de transcripción de unión al ADN y regula la expresión de cientos de genes. *TP53* juega un papel fundamental en la regulación de procesos celulares involucrados en el control de la proliferación y mantenimiento de la estabilidad del genoma (215). Asimismo, actúa como

USC DE COMPOSTELA

mecanismo clave de las defensas celulares contra el cáncer, siendo común su mutación en procesos oncológicos humanos (216).

El gen *zinc finger protein* 577 (*ZNF577*) es uno de los miembros de la familia de los *zinc finger protein* (ZNFs) que regulan la transcripción genética y se encuentran hipermetilados y silenciados a menudo en diferentes tipos de tumores (217). La expresión de algunos ZNFs está regulada por el estado nutricional (218). En un contexto metabólico, los ZNFs se han asociado con la adipogénesis, la resistencia a la insulina o la regulación de la lipogénesis hepática (219–221).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. REGULACIÓN EPIGENÉTICA

El término epigenética fue acuñado por primera vez por Conrad Waddington en el año 1942, que la definió por primera vez como "la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo" (222), pero el auge de la epigenética llegó en las décadas de 1990 y 2000 (223). La epigenética se define actualmente como la ciencia que estudia los cambios hereditarios y reversibles del ADN que modulan la expresión génica pero que no producen cambios en la secuencia del ADN, determinando en última instancia el fenotipo a partir del genotipo (224–227). En los últimos años, las investigaciones en epigenética demuestran que el epigenoma se puede modular por el ambiente, particularmente por la acción de factores externos como el estilo de vida, la dieta, la actividad física, el estrés, la exposición a toxinas, fármacos y los ritmos circadianos (228–231).

6.1. MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Los principales mecanismos involucrados en la regulación epigenética son: la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de histonas (PTM) y la regulación por ácido ribonucleico (ARN) no codificantes (ARNnc) (229,231,232) (**Figura 7**). Junto con importantes avances tecnológicos, la metilación del ADN es el mecanismo epigenético con mayor presencia en el organismo y el más estudiado en las últimas décadas (232,233).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

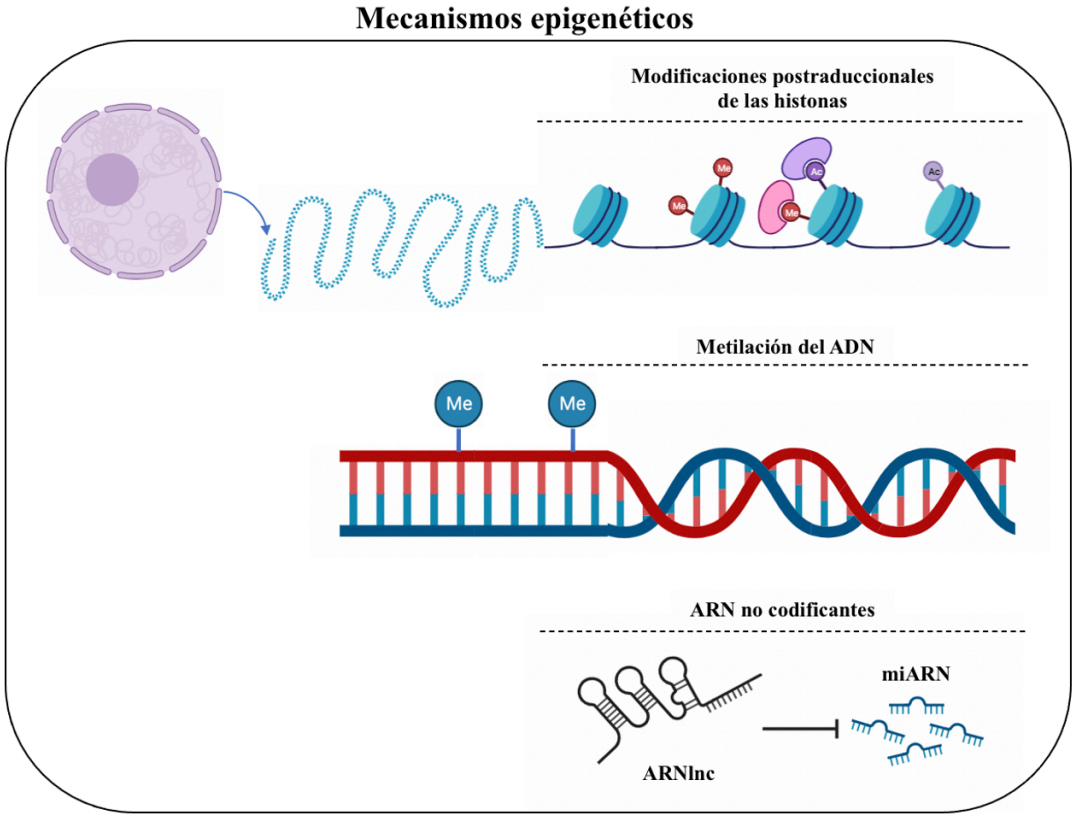


Figura 7. Representación de los principales mecanismos epigenéticos. ARNlnc, ARN no codificantes largos; miARN, micro ARN. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

6.1.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso relativamente estable y un marcador epigenético dinámico y complejo que se hereda a través de varias generaciones y específico de cada tejido (233). En células de mamíferos, la metilación ocurre cuando se agrega un grupo metilo a las bases del ADN. La familia de enzimas ADN metiltransferasa (DNMTs) catalizan este proceso que ocurre principalmente en los dinucleótidos de citosina-guanina, con un grupo fosfato entre los dos nucleótidos (CpG), generando 5-metilcitosina (5mc). Las regiones con una alta densidad de CpG, que a menudo se encuentran en la región promotora, se denominan islas CpG (CGIs) (234,235). Las principales DNMTs son la DNMT1 que mantiene la metilación del ADN durante la replicación celular, y DNMT3a y DNMT3b que son responsables de la metilación del ADN *de novo* (236,237). En general, la metilación en la región promotora se asocia con una disminución de la expresión y la metilación intragénica se asocia con un aumento de la expresión génica. Las CGIs en su mayoría no están metiladas para permitir la transcripción de genes, por lo que la hipermetilación aberrante de estos sitios CpG puede silenciar la expresión de genes que son críticos para la homeostasis celular, la integridad del ADN o la estabilidad del genoma (236).

Aunque la metilación está implicada en una gran variedad de procesos biológicos (238,239), su implicación más importante es en la expresión de los genes (239). En este contexto, el análisis de los niveles de metilación del ADN en el genoma se ha postulado como

una herramienta en el manejo de diversas enfermedades (240), como enfermedades metabólicas, enfermedades autoinmunes, el envejecimiento (241) o el cáncer (237). La metilación del ADN se modula por factores ambientales y de estilo de vida. Cambios en estos factores pueden tener un alto impacto en el patrón de metilación y por consiguiente en la expresión génica. Por lo tanto, la metilación del ADN es un mecanismo importante que subyace a las alteraciones metabólicas (235).

6.1.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas (PTM)

Las PTM son mecanismos fundamentales mediante los cuales se podría alterar la cromatina para regular la expresión génica (235,242). Se refiere a un proceso covalente en el que se añaden diferentes modificaciones de acilación a uno o varios residuos de aminoácidos en las histonas, lo que altera el estado de unión entre las histonas y el ADN (243). Las PTM se encuentran principalmente en la cola amino-terminal de las histonas, pero también sucede en el núcleo (242). Las PTM ocurren principalmente mediante metilación, fosforilación, acetilación o ubiquitinación (235,244), aunque también se han descrito otras modificaciones, como la sumoilación, la adesín difosfato (ADP)-ribosilación, la citrulinación y la biotinilación (244).

Estas modificaciones afectan a una gran variedad de procesos biológicos como la transcripción, la replicación o el mantenimiento de los cromosomas (242). Las PTM están involucradas tanto en la homeostasis celular como en procesos patológicos. En concreto, la evidencia científica muestra que las PTM se encuentran en el tejido adiposo, y se relacionan con enfermedades metabólicas como la obesidad (244) o la diabetes tipo 2 (243).

6.1.3. ARN no codificantes (ARNnc)

Los ARNnc son factores transcripcionales relevantes tanto en procesos fisiológicos como patológicos (235,245). Existen diferentes tipos de ARNnc según su longitud, forma y ubicación, los miARN y los ARNnc largos (ARNlnc) son los más destacados (246). Los miARN son moléculas pequeñas monocatenarias de ARNnc de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud (246), que regulan al menos el 30% de los genes que codifican proteínas (235). Estos miARN se unen a la secuencia complementaria del ARNm objetivo para su degradación. Los ARNlnc tienen más de 200 nucleótidos de longitud y regulan la expresión génica a través de varios mecanismos, incluso pueden actuar como señuelo de miARN para prevenir la degradación del ARNm objetivo (246). Recientes investigaciones han demostrado que los ARNlnc participan en la modulación epigenética de la cromatina para regular la expresión génica, así como en la regulación transcripcional y postranscripcional (235).

Tanto los miARN, que pueden provocar alteraciones en el metabolismo, como los ARNlnc, con un papel importante en la regulación de la adipogénesis, se están considerando actualmente como potenciales dianas terapéuticas para combatir enfermedades metabólicas, como la obesidad (235). Relevantemente, los ARNnc interviene en funciones cruciales en la regulación tanto del inicio como de la progresión de diversos tipos de cáncer y su estudio puede conllevar grandes avances en esta patología (245,246).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2. LA EPIGENÉTICA EN LA ENFERMEDAD HUMANA

La epigenética está involucrada en múltiples procesos celulares importantes, tanto procesos fisiológicos como procesos patológicos. En consonancia con estas funciones, un número creciente de enfermedades en humanos se asocian con la metilación aberrante del ADN (247). Entre las enfermedades que se relacionan con estos cambios destacan enfermedades cardiovasculares (248), obesidad (227,249), diabetes tipo 2 (226,227), enfermedades autoinmunes (247), hipertensión arterial (250), síndrome metabólico (251), enfermedad de hígado graso no alcohólico (252) y cáncer (236,253).

Los recientes avances en el campo de la epigenómica se están centrando en conocer las marcas epigenéticas que subyacen a la patogenia de cada enfermedad, con el fin de encontrar terapias personalizadas hacia una medicina de precisión (254–256). En este sentido, las marcas epigenéticas, como la metilación del ADN, tienen una alta relevancia clínica, ya que se propone que sean posibles biomarcadores para el desarrollo y progresión de enfermedades como el cáncer (254,257).

Como se ha descrito anteriormente, la gran relevancia de las modificaciones epigenéticas es su reversibilidad, y ésta puede realizarse mediante tratamientos con fármacos o intervenciones dietéticas y sobre el estilo de vida. Ciertos nutrientes y compuestos bioactivos en la dieta han sido propuestos para prevenir enfermedades debido a sus potenciales beneficios para la salud, algunos de ellos debido a sus propiedades anticancerígenas. Estos componentes de la dieta pueden modular la expresión de genes a través de mecanismos epigenéticos, que entre sus principales efectos se ha comprobado que actúan sobre la aparición y la progresión de la carcinogénesis (258).

6.2.1. Metilación del ADN en la obesidad y enfermedades asociadas

El papel de las modificaciones epigenéticas en la obesidad es cada vez más evidente. Varios genes implicados en la obesidad y otras enfermedades metabólicas están regulados epigenéticamente. Por ejemplo, el estado de metilación del gen de la leptina y del gen de la adiponectina se asocia con la obesidad, la resistencia la insulina y otros trastornos metabólicos (249). El perfil de metilación global del ADN en la obesidad está siendo ampliamente investigado en los últimos tiempos. Los primeros hallazgos se han centrado en el patrón de metilación global tanto en la sangre como en el tejido adiposo de individuos con obesidad, descubriendo nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas de la patogénesis del tejido adiposo relacionada con la obesidad (232,259).

En cuanto al efecto de la metilación del ADN en las enfermedades asociadas a la obesidad, se han realizado análisis del perfil de metilación del ADN en la obesidad relacionada con la resistencia a la insulina (260,261), la diabetes tipo 2, la enfermedad de hígado graso no alcohólico (262) y el cáncer (263). En cuando al cáncer, la hipermetilación en las CGIs de promotores de genes se asocia con la represión de la expresión génica del supresor de tumores y la hipometilación de todo el genoma en las células cancerosas se ha asociado con la expresión de protooncogenes, la inestabilidad genómica y la transformación maligna de tumores (257). Los niveles de metilación del ADN en los genes implicados en el crecimiento celular y la reparación del ADN tienden a aumentar con la obesidad (264). Por esta razón, las firmas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

epigenéticas pueden ser buenos biomarcadores para la detección temprana, el pronóstico y la terapia dirigida del cáncer asociado a obesidad (265).

La reversibilidad de las marcas epigenéticas es una de las características más importantes y destacadas de la regulación epigenética, principalmente en la metilación del ADN. Estas modificaciones epigenéticas inducidas por el medio ambiente o el estilo de vida ofrecen información relevante para entender el aumento o el descenso de la susceptibilidad al cáncer (266). Por lo tanto, los nutrientes, la dieta (267) o el ejercicio físico (268) también pueden influir directamente sobre la metilación del ADN. La presencia o ausencia de ciertos nutrientes y compuestos bioactivos de la dieta se relacionada con modificaciones epigenéticas en genes que regulan procesos metabólicos, y estas modificaciones pueden predisponer al desarrollo de trastornos metabólicos y algunos tipos de cáncer (267). En concreto, los polifenoles contenidos en altas cantidades en frutas y verduras, los ácidos grasos monoinsaturados, los PUFAs omega-3 influyen en la metilación del ADN (269), o ciertas vitaminas y minerales (266).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

HIPÓTESIS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La obesidad es la segunda causa modificable de cáncer después del consumo de tabaco. Entre los mecanismos propuestos implicados en este vínculo, están las citoquinas proinflamatorias y el estrés oxidativo inducido por la disfunción del tejido adiposo. En este contexto, estudios recientes del grupo han demostrado que el secretoma del tejido adiposo procedente de pacientes con obesidad es capaz de regular la expresión de genes implicados en el desarrollo temprano de la carcinogénesis de mama y de hígado. La reducción de peso corporal inducida por una restricción calórica de la dieta asociada a patrones de alimentación saludables ricos en compuestos bioactivos, fue capaz de revertir dichos efectos, sugiriendo que la pérdida de peso podría asociarse también a la prevención del riesgo de desarrollo de cáncer en los pacientes con obesidad. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que la cetosis nutricional priva a las células cancerígenas de energía y disminuye factores implicados en la proliferación de las células cancerígenas. La VLCKD se encuentra entre las estrategias terapéuticas nutricionales para combatir la obesidad. Dicha terapia nutricional es capaz de inducir una importante pérdida de peso, particularmente a expensas de la reducción en la masa grasa. En base a estos datos, en esta Tesis Doctoral se plantea la hipótesis de que la cetosis nutricional podría mejorar la función del tejido adiposo asociada a la obesidad, ejerciendo un efecto inmunomodulador mediante la inducción de una reducción en la secreción de citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo característicos de la obesidad. Este efecto podría estar relacionado con una reducción en el riesgo de desarrollo de cáncer en pacientes con obesidad. Así mismo, los cuerpos cetónicos inducidos en la cetosis nutricional y compuestos bioactivos incluidos en alimentos propios de patrones dietéticos saludables, como el sulforafano, podrían ejercer un efecto directo sobre las células tumorales, reduciendo la proliferación y regulando la expresión de los genes por medio de mecanismos epigenéticos, particularmente, la metilación del ADN.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de patrones de alimentación saludables y la cetosis nutricional sobre los niveles circulantes de factores implicados en el desarrollo tumoral como la inmunidad y el estrés oxidativo, así como sobre los cambios del perfil de metilación del ADN y expresión de genes relacionados con el cáncer asociado a la obesidad.

Para llevar a cabo dicho objetivo principal, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un estudio diferencial del perfil de metilación y expresión en leucocitos de sangre periférica de genes asociados al cáncer de mama, como el *ZNF577* y *BRCA1*, en función del estado de adiposidad, el estado menopáusico y el patrón de alimentación en pacientes con cáncer de mama.

2. Evaluar el efecto de la cetosis nutricional y la pérdida de peso inducida por una VLCKD sobre factores de inmunidad y estrés oxidativo en pacientes con obesidad y su comparación con el efecto de la cirugía bariátrica o una dieta hipocalórica equilibrada.

3. Determinar el efecto de la cetosis nutricional y la pérdida de peso inducida por una VLCKD, en comparación con cirugía bariátrica o una dieta hipocalórica equilibrada sobre los niveles proteicos y epigenéticos circulantes de la osteopontina, una proteína asociada al cáncer.

4. Investigar el efecto *in vitro* de los cuerpos cetónicos y otros compuestos bioactivos de los alimentos sobre el fenotipo tumoral y expresión de genes implicados en fases tempranas de la carcinogénesis de células tumorales de mama, en comparación con el efecto inducido por el secretoma del tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes con obesidad.

5. Explorar los cambios en los niveles de metilación en leucocitos de sangre periférica de genes relacionados con el desarrollo tumoral tras la cetosis nutricional inducida por una VLCKD en el tratamiento de pérdida de peso en pacientes con obesidad.

6. Evaluar el efecto *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama de los cuerpos cetónicos sobre la metilación de genes relacionados con cáncer previamente identificados en pacientes con obesidad tratados con una VLCKD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. ESTUDIOS *IN VIVO*

1.1. PACIENTES

Los procedimientos experimentales realizados a partir de muestras procedentes de los participantes reclutados e incluidos en la presente tesis doctoral fueron realizados en el Grupo de Epigenómica en Endocrinología y Nutrición del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Todos los participantes de los estudios recibieron y firmaron un consentimiento informado por escrito validado y aprobado por el Comité de Ética y los protocolos de estudio fueron aprobados por las Juntas de Revisión Institucional correspondientes a cada institución participante (Comité Ético de Investigación Clínica, CEIC de Galicia No. 2009/076; CI: 40/13, PNK-DHA 2013-01).

Todas las mediciones antropométricas se realizaron por duplicado y en condiciones de reposo, después de un ayuno nocturno de 8 a 10 horas. Todos los participantes fueron pesados en una báscula calibrada (báscula Seca 200, Medical Resources, EPI Inc OH, EE. UU.). El IMC se calculó como el peso corporal en kg, dividido por el cuadrado de la altura corporal en metros (IMC = peso (kg)/altura (m^2)). La circunferencia de la cintura (CC) se midió utilizando una cinta métrica estándar flexible no elástica colocada sobre el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca, con el paciente de pie y exhalando.

La recolección de las muestras de sangre se realizó después de ayunar durante la noche en tubos específicos para la obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Tubos con EDTA Vacutainer, BD Biosciences, Madrid, España) y en tubos específicos para la obtención de suero (Tubos con gel SST™ II Vacutainer, BD Biosciences, Madrid, España), según la cohorte de estudio y procedimiento experimental correspondiente. El plasma y el suero se separaron por centrifugación a 3.500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C y seguidamente se conservaron en alícuotas a -80ºC para análisis posteriores. La fracción de PBMCs se aisló mediante centrifugación por gradiente de densidad utilizando el reactivo Polymorphprep Axis Shield (Axis-Shield Diagnostics, Oslo, Noruega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Tras la centrifugación diferencial, la fracción celular correspondiente a las PBMCs se resuspendió en 1,5 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) e inmediatamente las alícuotas se congelaron a -80ºC para procedimientos posteriores de extracción de ARN.

La recolección de las muestras de sangre total para la extracción de ADN genómico se realizó después de ayunar durante la noche en tubos específicos (Tubos con EDTA Vacutainer, BD Biosciences, Madrid, España) y se conservaron en alícuotas a -80ºC.

La recolección de las muestras de tejido adiposo blanco se realizó en el momento en el que se intervino a los pacientes con obesidad severa a una cirugía bariátrica. Las muestras extraídas desde depósitos de TAS bajo la piel (zona hipocondrial izquierda), y desde depósitos de TAV localizados alrededor de órganos internos (zona hipocondrial-flanco izquierdo), se recogieron en condiciones estériles en tubos con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) (Lonza

Group, Basilea, Suiza) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (Lonza Group, Basilea, Suiza) para la posterior obtención de secretoma.

1.1.1. Cohorte trasversal de cáncer de mama

Se incluyeron 90 mujeres recién diagnosticadas de cáncer de mama, sin ninguna otra patología de consideración, del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). De estas pacientes se obtuvieron muestras biológicas, datos clínicos completos e información sobre sus hábitos alimentarios. El peso corporal, la altura, la edad y el estado menopáusico antes del diagnóstico se recuperaron de los registros médicos de todas las participantes. Asimismo, también se obtuvieron unos cuestionarios sobre los hábitos dietéticos junto con la recogida de las muestras de sangre en ayunas. A continuación, las pacientes con sobrepeso y obesidad fueron clasificadas como grupo obesidad (IMC > 25 kg/m2) y las pacientes con normopeso fueron clasificadas como grupo sin obesidad (IMC ≤ 25 kg/m2).

1.1.1.1. Evaluación dietética

La ingesta dietética de las pacientes se evaluó utilizando un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ) autorreferenciado y validado (**Anexo 1**). El cuestionario incluía 49 artículos de alimentos y bebidas, así como un pequeño cuestionario sobre el tipo de aceite utilizado para cocinar y aliñar. Para cumplimentar este cuestionario, se pidió a las pacientes que especificaran la frecuencia de consumo de cada alimento o bebida de forma diaria, semanal o mensual, con respeto al último año de su hábito dietético.

Posteriormente, las ingestas se convirtieron en frecuencias diarias. Para ello, se utilizó un manual de medidas domésticas y poder convertir las frecuencias de ingesta, recogidas en el cuestionario, en gramos de ingesta de alimentos por día (270). Teniendo en cuenta las recomendaciones de ingesta de alimentos de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (271), se establecieron dos grupos para cada alimento (consumo inferior al recomendado y consumo superior o igual al recomendado). Asimismo, con los datos obtenidos en el FFQ se evaluó la adherencia a la Dieta Mediterránea a partir de 12 de las 14 preguntas del cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea (MEDAS) validado (**Anexo 2**), teniendo en cuenta los datos de los que se disponía en el FFQ (272). Bajo esta condición se establecieron dos grupos. En primer lugar, las pacientes que obtuvieron más de 7 puntos en las 12 preguntas del cuestionario MEDAS se clasificaron como el grupo con alta adherencia a la Dieta Mediterránea. En segundo lugar, las pacientes que obtuvieron 7 puntos o menos se incluyeron en el grupo con baja adherencia a la Dieta Mediterránea.

1.1.2. Cohortes de obesidad

1.1.2.1. Cohorte trasversal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1.2.1.1. Sujetos normopeso

Se incluyeron 32 participantes con IMC < 25 kg/m^2 y una edad comprendida entre los 18 y los 65 años.

Los participantes fueron reclutados en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Todos ellos manifestaron un buen estado de salud tras realizarles un examen físico inicial y tras los resultados bioquímicos y hematológicos analizados de rutina. Los participantes no usaban suplementos con vitaminas y/o minerales, ni recibieron prescripción regular de medicamentos durante los 3 meses previos a la recolección de las muestras.

1.1.2.1.2. Pacientes con obesidad

Se incluyeron 79 pacientes con sobrepeso y obesidad (IMC ≥ 25 kg/m^2) y una edad comprendida entre los 18 y los 65 años.

Los participantes fueron reclutados en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Ninguno de los participantes padecía ninguna otra enfermedad distinta a la obesidad, de acuerdo con su historial médico, así como de acuerdo con un examen físico inicial y a los resultados hematológicos y bioquímicos analizados de rutina. Los participantes informaron que no usaban suplementos a base de vitaminas y/o minerales, que estuvieron libres de cualquier infección en el mes anterior al estudio y su peso corporal se había mantenido estable durante al menos 3 meses antes del estudio.

1.1.2.2. Cohortes longitudinales

1.1.2.2.1. Pacientes con obesidad sometidos a una intervención nutricional con dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD)

La población de estudio incluyó a 20 pacientes con obesidad IMC = 35,5 ± 4,4; n = 12 mujeres; 47,1 ± 10,2 años) que acudían a la Unidad de Obesidad del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, y 10 pacientes con una media de edad de 48,8±9,2 años y un IMC promedio de 32,9±1,4 kg/m2, reclutados en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Departamento de Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, ambos grupos sometidos a una intervención nutricional basada en una VLCKD.

Esta intervención tuvo una duración máxima de 6 meses y los análisis se realizaron a partir de las muestras recogidas a los 0 (Basal), a los 30 (Máxima Cetosis) y a los 180 días (Punto Final) desde el inicio del tratamiento para pérdida de peso.

1.1.2.2.2. Pacientes con obesidad sometidos a una intervención nutricional con dieta hipocalórica estándar (LCD)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La población de estudio incluyó a 20 pacientes con obesidad (IMC = 35,8 ± 4,5; n= 10 mujeres; 49,9 ± 9,3 años) que siguieron un programa de terapia basado en una

intervención nutricional controlada por dietistas capacitados del Departamento de Nutrición, Bromatología y Fisiología del la Universidad de Navarra.

Los análisis se realizaron a partir de las muestras de sangre venosa y medidas antropométricas y de composición corporal al inicio (Basal, semana 0), al final de la intervención dietética (Final, 2 meses) y 4 meses después del final del tratamiento (Seguimiento, 6 meses).

1.1.2.2.3. Pacientes con obesidad sometidos a cirugía bariátrica (BS)

La población de estudio incluyó a 39 pacientes con obesidad mórbida (IMC = 45,6 ± 6,2; n= 37 mujeres; 40,8 ± 10,4 años) que se sometieron a BS mediante técnicas laparoscópicas como el *bypass* gástrico en Y de Roux (n = 15, 30,6 %), derivación biliopancreática (n = 15, 30,6%) y gastrectomía en manga (n = 19, 38,8%) en el Hospital Clínico Virgen de la Victoria de Málaga y Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

El régimen de seguimiento incluyó visitas a los tres y seis meses, momento en el que se realizaron mediciones antropométricas y de composición corporal, y se recolectaron muestras de sangre venosa. Los análisis se realizaron a partir de las muestras recogidas tras la dieta pre-cirugía (Basal), a los 3 (Seguimiento) y a los 6 meses (Final) tras la cirugía. Los datos de la composición corporal en los tres puntos de seguimiento estuvieron disponibles de n = 24 pacientes incluidos en este grupo.

1.1.3. Diseños experimentales

1.1.3.1. Tratamientos para pérdida de peso

1.1.3.1.1. Intervención nutricional basada en una dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD)

La intervención nutricional se basó en un programa de pérdida de peso comercial que consta de cinco pasos (método PNK®). Este método consiste en un tratamiento médico que combina dieta y recomendaciones de actividad física para la modificación del estilo de vida. Se basa en preparados proteicos de alto valor biológico obtenidos a partir de leche de vaca, soja, huevos de aves, guisantes y cereales. Cada preparación contenía 15 g de proteína, 4 g de carbohidratos, 3 g de grasa y 50 mg de ácido docosahexaenoico, que proporcionaban de 90 a 100 kcal de energía. El programa de pérdida de peso tiene tres fases. La primera fase consiste en una dieta cetogénica muy baja en calorías (600-800 kcal/día) baja en carbohidratos (<50 g/día de vegetales) y lípidos (10 g/día de aceite de oliva) pertenecientes a 0,8-1,2 g/kg de peso corporal ideal. A lo largo de esta fase cetogénica, se proporcionaron suplementos de vitaminas y minerales como potasio, sodio, magnesio, calcio y ácidos grasos omega-3. Cuando se perdió la cantidad objetivo de peso, la fase cetogénica terminó y los pacientes comenzaron una dieta

baja en calorías (800-1500 kcal/día) seguida de una dieta de mantenimiento de 1500-2000 kcal/día. El programa de pérdida de peso tiene cinco pasos y se adhirió a las pautas de 2015 de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria con respecto a la ingesta total de carbohidratos (273).

Los pacientes siguieron los diferentes pasos del programa durante un período máximo de 4 a 6 meses, aunque los pacientes permanecieron bajo supervisión médica durante los siguientes 12 meses. La intervención incluyó una valoración por el médico especialista que realizó el estudio y una valoración por un dietista experto. Todos los pacientes se sometieron a un programa estructurado de ejercicio físico, con supervisión externa (75).

A lo largo del estudio, los pacientes realizaron un máximo de 10 visitas con el equipo de investigación (cada 15 ± 2 días); cuatro visitas incluyeron una evaluación física, antropométrica y bioquímica completa, mientras que las visitas restantes incluyeron el control de la adherencia al programa y la evaluación de los posibles efectos secundarios. Las cuatro visitas de evaluación se programaron de acuerdo con el desarrollo de la cetosis de cada paciente de la siguiente manera: nivel normal de cuerpos cetónicos (basal), cetosis máxima (1-2 meses), reducción del enfoque cetogénico debido a la reintroducción parcial de la nutrición normal (aproximadamente 3 meses), y sin cetosis (4–6 meses, final del estudio) (75). El estado de cetosis total duró de 60 a 90 días. En todas las visitas, los pacientes recibieron instrucciones dietéticas, asesoramiento de apoyo individual y estímulo para hacer ejercicio de forma regular mediante un programa de ejercicio, aunque no se registró el cumplimiento de este consejo.

1.1.3.1.2. Intervención nutricional basada en una dieta hipocalórica estándar (LCD)

La intervención nutricional con una LCD estándar duró seis meses divididos en dos períodos secuenciales; un período de intervención de dos meses (30% de restricción energética, es decir, una reducción de 600-800 kcal/día; 40-55% de aporte energético a partir de hidratos de carbono, 30% de lípidos y 15-30% de proteínas), durante el cual los pacientes recibieron evaluación nutricional cada 15 días, seguida de un período de autocontrol de cuatro meses, durante el cual se les aconsejó seguir el estilo de vida adoptado en el primer período. Las dietas con restricción calórica prescritas se basaron en las pautas de la *American Heart Association* (AHA) e incluyeron de 3 a 5 ingestas al día y una distribución de macronutrientes del 50-55 % del valor calórico total a partir de hidratos de carbono, el 15 % de proteínas y el 30 % de lípidos. Además, se pidió a todos los participantes que mantuvieran su actividad física normal durante el estudio, aunque no se registró el cumplimiento de la recomendación.

1.1.3.1.3. Cirugía bariátrica (BS)

Antes de la intervención quirúrgica, se aconsejó a los pacientes seguir una dieta especial que consistía en dieta líquida durante un mes, dieta blanda durante un mes y, posteriormente, una dieta de consistencia normal que aportaba unas 800 kcal/día con una distribución de macronutrientes de 48-50% de las calorías totales a partir de carbohidratos, 23-27% de proteínas y 21-27% de lípidos. A los pacientes sometidos a BS se les suministró un suplemento vitamínico-mineral diario, a partir del día del procedimiento quirúrgico, para reducir el riesgo de desarrollar deficiencias nutricionales (274). Los pacientes involucrados en este estudio regresaron a la clínica para todas las visitas de seguimiento. Se prescribieron

USC DE SANTIAGO

recomendaciones generales sobre movilidad y ejercicio, aunque no se registró el cumplimiento de estas recomendaciones.

Los tratamientos de pérdida de peso se describen en la **Figura 8**.

☐ **TRATAMIENTOS DE PÉRDIDA DE PESO**

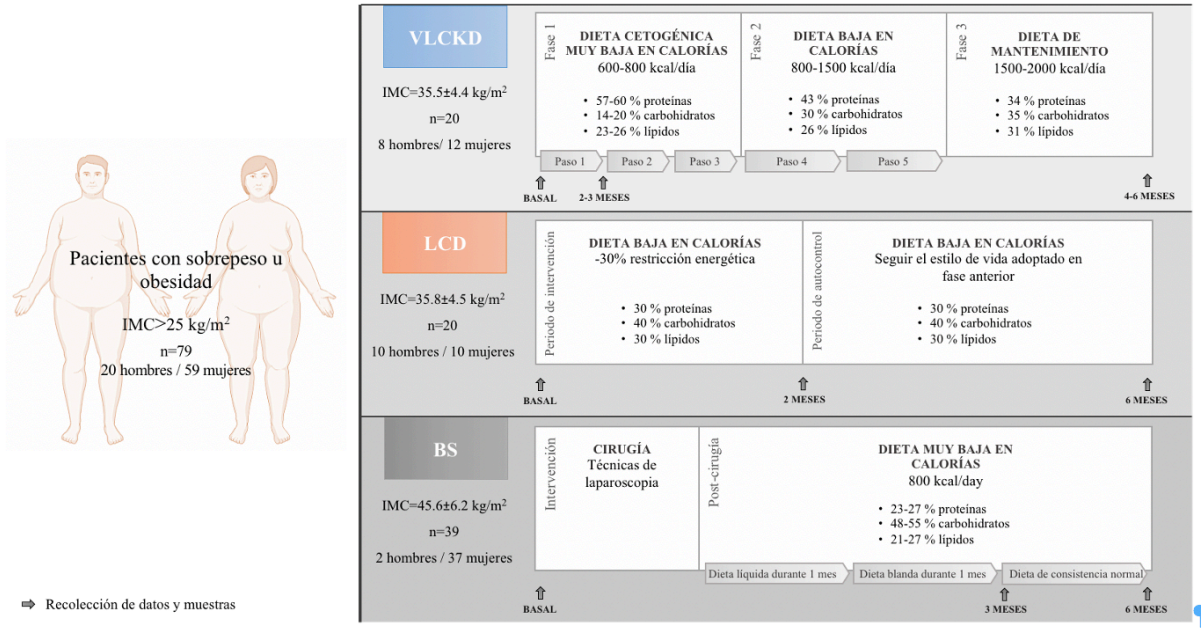


Figura 8. Representación de los tratamientos de pérdida de peso incluidos en el estudio. IMC, índice de masa corporal; VLCKD, dieta cetogénica muy baja en calorías; LCD, dieta baja en calorías; BS, cirugía bariátrica. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

1.1.3.1.4. Obtención de secretoma de tejido adiposo

Las muestras de TAS y TAV a partir de las cuales se obtuvo el secretoma, procedían de 9 pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Las muestras recogidas en tubos con PBS 1X (Lonza Group, Basilea, Suiza) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (Lonza Group, Basilea, Suiza) se procesaron en condiciones estériles. Se realizaron una serie de lavados en PBS con 1% penicilina/estreptomicina y se retiraron restos de vasos sanguíneos con ayuda de un bisturí. Con las muestras ya limpias, fragmentos de aproximadamente 2-3 g de tejido se distribuyeron en placas de 6 pocillos conteniendo 3 ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con 4,5 g/L glucosa, sin L-glutamina, sin rojo fenol (Lonza Group, Basilea, Suiza) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina y se mantuvieron en cultivo a 37ºC con 5% CO_2 durante 2 horas. Seguidamente, se retiró este medio, se añadió medio fresco y se incubó a 37ºC con 5% CO_2 durante 16-18 horas. Tras este tiempo, se realizó otro reemplazo de medio que se mantuvo en cultivo a 37ºC con 5% CO_2 durante 24 horas. Finalizada esta incubación, los medios conteniendo factores secretados por las muestras de tejido adiposo o secretomas, se recogieron en condiciones estériles en alícuotas de 1,5 ml y se conservaron a -80ºC hasta su uso posterior.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los procedimientos experimentales con animales incluidos en la presente tesis doctoral fueron realizados en la Universidad de Santiago de Compostela y aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia, registrados bajo el número de procedimiento 15005/2015/003 (IP: Felipe Casanueva Freijo), de acuerdo a la legislación vigente europea y española para el cuidado y uso de animales de experimentación (Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia). Los certificados de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo son B522, C560 y D316, expedidos por la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia – Agencia Gallega de la Calidad Alimentaria. Los centros usuarios autorizados donde se realizó la experimentación con animales fueron las instalaciones del Animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela, con código REGA ES 150780263401, y del lnstituto de lnvestigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), con código REGA ES 1507802928[01].

Todos los animales de experimentación fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura de 20-24ºC y ciclos de 12h de luz/oscuridad, con un periodo de aclimatación de 4-7 días previo al inicio de cualquier experimento donde tuvieron acceso libre a agua y comida estándar. La estabulación de los animales fue colectiva (a excepción de los casos en los que se requiera una estabulación individual) para preservar el comportamiento social de los mismos. Una valoración del correcto aspecto físico y adaptación de los animales fue seguida periódicamente con el fin de minimizar el posible estrés, sufrimiento o angustia generado durante el desarrollo de los distintos procedimientos experimentales. Para todos los animales, la monitorización semanal del peso corporal e ingesta de alimentos se determinó mediante una balanza de precisión y el registro la composición corporal se evaluó periódicamente por resonancia magnética nuclear usando un sistema EchoMRI-700 (Echo Medical Systems, Houston, TX, EE. UU.). La ingesta de alimentos fue promediada en función del número de individuos por caja.

Al término de los experimentos, los animales fueron sacrificados por decapitación. Inmediatamente, se recogieron muestras de sangre del tronco, que se mantuvieron a 4ºC y, a su llegada al laboratorio, se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4ºC para la obtención de plasma, que fue almacenado a -80ºC para posteriores mediciones bioquímicas. Los órganos y tejidos extraídos fueron pesados y congelados en hielo seco y, a su llegada al laboratorio, almacenados a -80ºC hasta el momento de su posterior procesamiento y análisis.

1.2.1. Cepas de roedores y dietas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El presente estudio se realizó en ratones hembra de obesidad inducida por la dieta (DIO) (n = 14) y en ratones hembra delgadas (n = 10) como control, que se adquirieron en Charles

River Laboratories (Barcelona, España). Para el experimento, se obtuvieron 24 ratones hembra adultas (obesas, n = 14; delgadas, n = 10) a las 8 semanas de edad y se sacrificaron 19 semanas después. Los ratones hembra delgadas se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar (SAFE-Panlab, España) *ad libitum*, que estaba compuesta por 5,5% de lípidos, 23% de proteínas y 70% de carbohidratos, durante 19 semanas tras el periodo de aclimatación. El conjunto de ratones hembra obesas se alimentó con una dieta alta en grasa (Open Source Diets, Research Diets; Brogaarden, Alemania, Referencia D 12492) *ad libitum*, que estaba compuesta por 60% de lípidos, 20% de proteínas y 20% de carbohidratos, durante 12 semanas, después de lo cual 4 de los animales del grupo obeso aleatoriamente se sometieron a un protocolo de pérdida de peso basado en una restricción energética (RC). Los ratones hembra obesas restantes (el grupo de control designado como grupo *ad libitum* (DIO)) se mantuvieron con una dieta *ad libitum*. Los animales se mantuvieron según los protocolos aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia, registrados bajo el número de procedimiento (Ref. 15005/2015/003) de acuerdo con nuestras directrices institucionales y los estándares de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales de experimentación. Los ratones hembra se alojaron en habitaciones con aire acondicionado (22-24 °C) bajo un ciclo de luz-oscuridad controlado (12:12 horas) con libre acceso a alimentos y agua.

En el protocolo de pérdida de peso experimental, con restricción de energía, estos ratones hembra obesas se alojaron primero individualmente durante 1 semana, y se pesó y registró su ingesta de alimentos de forma individual. Luego, los ratones recibieron una dieta con un 30 % menos de cantidad que su ingesta de alimentos individual habitual (basada en el peso de los alimentos) durante 7 semanas (**Figura 9**).

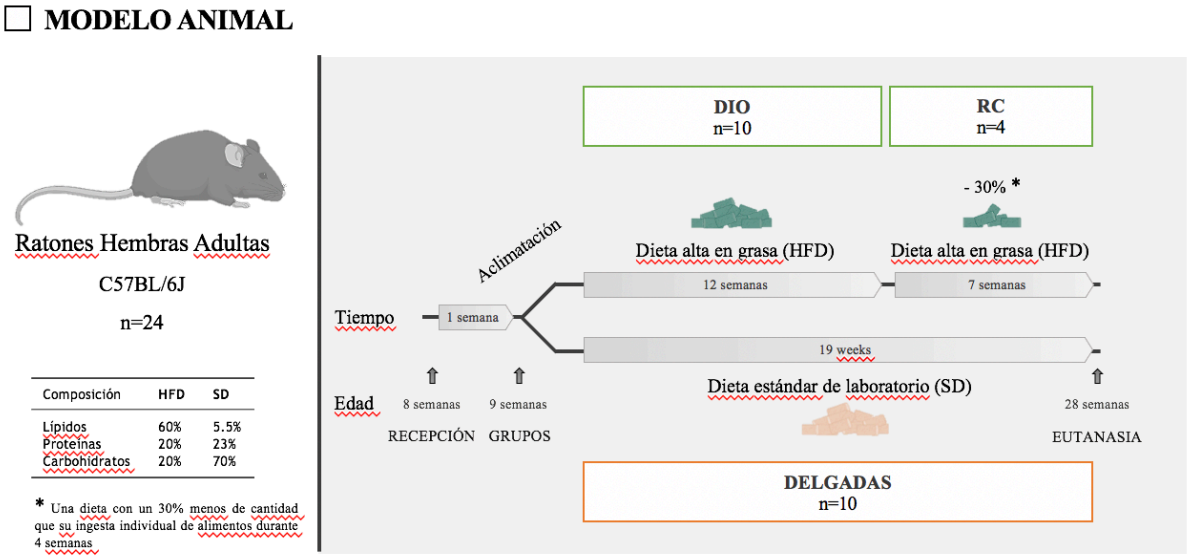


Figura 9. Representación de los grupos experimentales de animales empleados en el estudio. DIO, grupo de obesidad inducida por la dieta; RC, grupo de restricción calórica; HFD, dieta alta en grasas; SD, dieta estándar de laboratorio. Fuente: elaboración propia creada con BioRender.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. ESTUDIOS *IN VITRO*

2.1. LÍNEAS CELULARES DE MAMA HUMANO

2.1.1. Líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231

MCF7 es una línea celular de cáncer de mama humano, de uso común (275), con morfología de tipo epitelial, con presencia de receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides (276). Pertenece al subtipo de cáncer de mama luminal A, con el pronóstico más optimista entre los diferentes subtipos de este cáncer (277).

MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama humano triple negativo altamente agresiva e invasiva, ya que carece de expresión de receptor de estrógeno y progesterona, así como amplificación de receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (278). Es conocido que este tipo celular es resistente a varios agentes anticancerígenos (279).

2.1.1.1. Cultivo celular

Las células de cáncer de mama humano, MCF-7 y MDA-MB-231 fueron proporcionadas por American Type Culture Collection (ATCC) (HTB-22, ATCC, Virginia, EE.UU.). Las células se cultivaron y mantuvieron en monocapa utilizando medio DMEM (Lonza, Iberica S.A. Barcelona, España) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Lonza, Iberica S.A. Barcelona, España), y 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza), en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 a 37˚C.

Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se subcultivaron aspirando el medio, se lavaron con PBS 1X (Lonza Group, Basilea, Suiza) e incubaron de 1-2 minutos con solución de tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en ratios 1:3-1:5. El medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días durante la fase de mantenimiento, donde las células proliferan con un tiempo de duplicación de alrededor de 24 horas.

La criopreservación se realizó a partir del pellet celular, obtenido tras una centrigufación a 900 g durante 5 minutos, en medio de congelación (FBS (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) suplementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)).

2.1.2. Línea celular MCF10A

La línea celular epitelial mamaria humana MCF10A, no tumorigénica, es un modelo *in vitro* ampliamente utilizado para estudiar la función y transformación normal de las células mamarias (280), caracterizada por una falta de expresión del receptor de estrógenos (277).

2.1.2.1. Cultivo celular

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las células MCF10A fueron proporcionadas por ATCC (HTB-22, ATCC, Virginia, EE.UU.) y se cultivaron y mantuvieron en monocapa utilizando medio DMEM-Ham's F-12 (Sigma, EE. UU.) suplementado con 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de insulina y 250 ng/µL hidrocortisona, 10% de FBS (Lonza, Iberica S.A. Barcelona, España), y 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza), en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 a 37˚C.

Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se subcultivaron aspirando el medio, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) (Lonza Group, Basilea, Suiza) e incubaron de 1-2 minutos con solución de tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en ratios 1:3-1:5. El medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días durante la fase de mantenimiento, donde las células proliferan con un tiempo de duplicación de alrededor de 24 horas.

La criopreservación se realizó a partir del pellet celular, obtenido tras una centrigufación a 900 g durante 5 minutos, en medio de congelación con medio DMEM-Ham's F-12 completo suplementado con 7,5% de DMSO (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

2.1.3. Tratamientos

Para comprobar el efecto de diferentes tratamientos sobre las 3 líneas celulares descritas previamente, se realizó el siguiente procedimiento experimental:

- Siembra: se siembran las células en placas de 6 pocillos con una densidad de 3 x 10^5/pocillo en 2 mL del medio de cultivo correspondiente para cada línea celular, serodeprivando durante 24 horas.
- Adición de tratamientos: tras 24 horas desde la siembra en medio de cultivo serodeprivado, se aspira el medio y se procede a la adición de los tratamientos en las diferentes concentraciones de estudio en medio de cultivo completo o solo con adición de medio completo, por triplicado en cada condición.

2.1.3.1. Exposición a tratamiento con sulforafano

El sulforafano, un isotiocianato natural presente en vegetales crucíferos ha presentado efectos positivos en la prevención y tratamiento del cáncer. En este sentido, el tratamiento con sulforafano en líneas celulares tumorales ha mostrado hallazgos interesantes en los últimos años (56,57,281).

Por ello, se evaluó el efecto *in vitro* sobre las células MCF7, MDA-MB-231 y MCF10A, exponiéndolas a un tratamiento con sulforafano. Así, a las células se les adicionó, en su medio de cultivo habitual, en concentraciones crecientes sulforafano (L-Sulforaphane, Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) diluído (2,82 mM de concentración stock, diluyente etanol) durante 24, 48 o 72 horas, renovando el medio cada 24 horas.

Finalizada la exposición al sulforafano durante 72 horas, las células se recogieron como lisados celulares y se conservaron a -80ºC para extracciones de ARN y ADN.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1.3.2. Exposición a tratamiento con cuerpos cetónicos

Estudios recientes evidencian que los cuerpos cetónicos tienen un papel importante sobre la inhibición del crecimiento de células cancerígenas (282), el estrés oxidativo o sobre el efecto beneficioso de la restricción calórica (283).

Por ello, se evaluó el efecto del tratamiento con cuerpos cetónicos *in vitro* sobre las células MCF7, MDA-MB-231 y MCF10A, exponiéndolas a un tratamiento con sal de sodio de β-OHB. Así, a las células se les adiciona, en su medio de cultivo habitual, en concentraciones crecientes la sal de sodio de β-OHB (Sodium 3-hydroxybutyrate, Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) diluído (1M de concentración stock, diluyente H_2O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC)) durante 24, 48 o 72 horas, renovando el medio cada 24 horas.

Finalizada la exposición a la sal de sodio de β-OHB durante 72 horas, las células se recogieron como lisados celulares y se conservaron a -80ºC para extracciones de ARN y ADN.

2.1.3.3. Exposición a tratamiento con secretomas de tejido adiposo

El tratamiento *in vitro* en líneas celulares con secretomas obtenidos de fragmentos de TAV y TAS ha demostrado cambios en la proliferación de células de mama humano y modulación de la expresión de genes relacionados con la carcinogénesis (145).

Para ello, las células MCF7, MDA-MB-231 fueron sometidas a tratamientos con secretomas de TAV y de TAS, a distintas concentraciones de estudio. Las muestras a partir de las cuales se elaboraron estos tratamientos proceden de pacientes con obesidad severa, extraídas en el momento de someterse a una cirugía bariátrica para pérdida de peso. El protocolo para la obtención de los secretomas de tejido adiposo ha sido explicado previamente en el apartado de pacientes. Los tratamientos se elaboraron a partir de la mezcla o *pool* de 3 muestras desde las diferentes alícuotas obtenidas de los pacientes con obesidad, y las concentraciones ensayadas fueron de 1 y 5% (v/v), seleccionadas de acuerdo con estudios previos del grupo donde se aplicaron tratamientos similares (145).

Este procedimiento se realizó a partir de los protocolos anteriores con los tratamientos de sulforafano o sal de sodio de β-OHB, y también en las tres líneas celulares sin ninguno de los tratamientos adicionados durante 24, 48 y 72 horas de exposición a las diferentes condiciones de estudio.

Finalizado el tratamiento con secretomas durante 72 horas, las células se recogieron como lisados celulares y se conservaron a -80ºC para extracciones de ARN y ADN.

2.1.4. Ensayo de proliferación y viabilidad celular (WST-1)

La proliferación y viabilidad celular *in vitro* se evaluó mediante la utilización del reactivo de proliferación celular WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Applied Science, Penzberg, Alemania).

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Se trata de un ensayo colorimétrico no radioactivo para la cuantificación por espectrofotometría de la proliferación y viabilidad celular utilizando el formato de placa de 96 pocillos. El fundamento del ensayo consiste en la conversión de la sal estable de tetrazolio WST-1 en formazán soluble mediante las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, que ocurre principalmente en la superficie celular. De este modo, la cantidad de colorante formazán se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas.

El kit empleado se aplicó de acuerdo con las indicaciones del fabricante y con el siguiente protocolo:

- En primer lugar, se sembraron las células MCF7, MDA-MB-231 y MCF10A en placas de 96 pocillos con una densidad de 1 x 10^4/pocillo en un volumen final de 100 µl del medio de cultivo de cada tipo celular serodeprivado.

- Después de 24 horas, se adicionaron los diferentes tratamientos, controles y vehículos, previamente descritos, a las células por cuadriplicado (4 pocillos por cada condición), en medio de cultivo completo.

- Tras 24, 48 y 72 horas se añaden 10 µl en cada pocillo de las placas del ensayo. Se incluye un control del fondo o *background* añadiendo 10 µl de reactivo en 100 µl de medio de cultivo sin células por cada tipo celular. A continuación, las placas se incuban a 37ºC con 5% de CO_2 durante 3 horas. Por último, se procede a la lectura de la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.). Se corrigen los valores de absorbancia obtenidos restando el valor medio de los pocillos *background*. En las placas donde de realiza la adición del reactivo y lectura de absorbancia a las 48 y 72 horas, se reemplazan los medios de cultivo con los tratamientos correspondientes cada 24 horas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. ANÁLISIS DE METABOLITOS

3.1.1. Determinación de marcadores de estrés oxidativo

3.1.1.1. Cuantificación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante total es el método más empleado para cuantificar e identificar los antioxidantes de una muestra y así poder determinar la capacidad amortiguadora de las reacciones de oxidación (284).

La cuantificación de los niveles de la potencia total antioxidante (AOP) activa se realizó en muestras de plasma, obtenido según los protocolos previamente descritos, utilizando un kit comercial (BIOXYTECH AOP-450 Assay for Total Antioxidant Potential, OXIS Health Products, Inc., Portland, OR, EE. UU.). Este ensayo colorimétrico cuantitativo se basa el potencial de reducción de la muestra o estándar para convertir de manera efectiva Cu^{+2} en Cu^{+1}. Esta forma reducida de cobre formará selectivamente un complejo estable con el reactivo cromogénico. La medición de este complejo a una absorbancia de 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) determina el nivel de AOP presente en las muestras ensayadas.

3.1.1.2. Cuantificación de malondialdehído

El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación lipídica que se produce a partir de ácidos grasos poliinsaturados, tanto por reacciones químicas como por reacciones catalizadas por enzimas. De este modo, el MDA se emplea como indicador de peroxidación lipídica, un mecanismo de daño celular que se utiliza para determinar estrés oxidativo (285).

La cuantificación de los niveles de MDA se realizó en muestras de plasma, obtenido según los protocolos previamente descritos, utilizando un kit comercial (BIOXYTECH LPO-586 Colorimetric Assay For Lipid Peroxidation Markers, OXIS Health Products, Inc., Portland, OR, EE. UU.). Este ensayo colorimétrico se basa en la reacción a 45°C del MDA con un reactivo cromogénico, N-metil-2-fenilindol (R1), la cual produce un cromóforo estable. La medición de este producto a una absorbancia máxima de 586 nm se realiza en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.) para determinar la cantidad de MDA presente en las muestras ensayadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.1.3. Cuantificación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina

Durante la reparación del ADN se produce 8-hidroxi-2-desociguanosina (8-OHdG) y su detección se utiliza como biomarcador de daño oxidativo del ADN (286).

La cuantificación de los niveles de 8-OHdG se realizó en muestras de plasma, obtenidos según los protocolos previamente descritos, utilizando un kit comercial (Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA, Japan Institute for the Control of Aging (JaICA), Shizuoka, Japan). Este kit se basa en un ensayo ELISA competitivo que cuantifica la cantidad de reacción antígeno-anticuerpo de forma colorimétrica tras la adición de cromógeno. La medición de la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) determina el nivel de 8-OHdG presente en las muestras ensayadas.

3.1.2. Determinación de marcadores de inflamación

Las citoquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que están involucradas en la respuesta inflamatoria e inmunitaria y sirven como biomarcadores en muchas enfermedades. La cuantificación de citoquinas puede usarse en el diagnóstico y tratamiento de procesos patológicos (287).

La cuantificación de los niveles de una selección de citoquinas se realizó en muestras de plasma, obtenido en base a protocolos previamente descritos, mediante el uso de un kit comercial de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) multiplex (Bio-Plex custom assay, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Francia), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que cuantifica las citoquinas según la cantidad de reacción antígeno-anticuerpo mediable por absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch 2, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.). Se utilizaron los valores mínimos detectables especificados en el kit en donde no se obtuvieron datos para cada citoquina. Bajo este procedimiento se analizaron las siguientes citoquinas: ligando inductor de la proliferación (APRIL), factor de activación de células B (BAFF), grupo de diferenciación (CD) 163, CD30, Chitanasa, glicoproteína (Gp) 130, IFN-α2, IFN-β, IFN-γ, IL-2, IL-6R, IL-11, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-22, IL-26, IL-28A, IL-29, IL-35, metaloproteinasa de matriz (MMP)1, MMP3, Osteocalcina, Osteopontina, Pentraxina-3, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)-R1, TNF-R2, linfopoyetina estromal tímica (TSLP) e inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK).

3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.2.1. Extracción de ARN

3.2.1.1. Extracción desde células mononucleares de sangre periférica

Como método para la extracción de ARN desde PBMCs se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). El ARN total se aisló desde alícuotas de PBMCs conservadas en 1,5 mL de reactivo TRIzol y congeladas a -80ºC siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras la finalización del proceso de extracción, el ARN total obtenido se

resuspendió en 30 µL de H_2O DEPC y se conservó a -80ºC. La separación de PBMCs a partir de muestras de sangre periférica fue descrita previamente.

3.2.1.2. Extracción desde línea celular

El aislamiento de ARN total desde células mantenidas en cultivo se realizó con el kit comercial GeneJet RNA Purification Kit (ThermoScientific, Waltan, MA, EE. UU.), basado en un método de separación por columnas. Las células se lisaron y homogeneizaron en 600 µl de tampón de lisis suministrado en el kit y suplementado con β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), de acuerdo con protocolo del fabricante. Finalmente, se eluyó el ARN total en 50 µl de H_2O tratada con DEPC y se conservó a -80ºC.

3.2.2. Cuantificación de ARN

La determinación de la concentración del ARN total extraído desde los distintos tipos de muestras se cuantificó mediante un espectrofotómetro de gota en pedestal utilizando el equipo NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Waltan, MA, EE. UU.) ajustado a las longitudes de onda 260 y 280 nm. El grado de pureza de las muestras se determinó en base a la ratio 260/280, según el cual un valor cercano a 2 es considerado como óptimo o aceptable para mediciones de ARN.

3.2.3. Purificación de las muestras de ARN

Para la purificación de las muestras de ARN extraídas con TRIzol se empleó un tratamiento con DNasas con un kit comercial (DNase Free, Ambion, Austin, TX, EE. UU.), a partir de 1µg de cantidad de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.4. Retrotranscripción

La conversión cuantitativa de ARN total a ADN complementario (ADNc) monocatenario se realizó con un kit de transcripción inversa de gran capacidad (High-Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), basado en una única reacción que parte de 1 µg de ARN en 20 µl de volumen final y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El equipo utilizado fue el termociclador Swift MaxPro (Esco Healthcare Pte. Ltd., Singapore) bajo las condiciones de incubación de 25ºC durante 10 minutos, 37ºC durante 120 minutos y 85ºC durante 5 minutos.

3.2.5. PCR en tiempo real

Los experimentos cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (RT-qPCR) se realizaron en el equipo *Step One Plus system* de acuerdo con las indicaciones del fabricante para ensayos de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA,

EE. UU.). Todas las reacciones, a un volumen final de 10 µl, se ensayaron por triplicado para cada gen y muestra analizada utilizando los siguientes parámetros de ciclado: 50ºC durante 2 minutos, 95ºC durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95ºC durante 15 segundos + 60ºC durante 1 minuto. Las sondas TaqMan adquiridas para los diferentes genes de interés ensayados se detallan en la **Tabla 4**.

Para el análisis de los datos, los niveles de expresión génica de ARNm se normalizaron utilizando beta-actina (ACTB) o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno o housekeeping dependiendo del experimento. El cálculo se basó en el método de cuantificación relativa de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.).

Tabla 4. Sondas TaqMan utilizadas para la técnica RT-qPCR.

Gen	Referencia	Casa comercial	Especie diana
ACTB	Mm00607939_s1	Applied Biosystems, EE. UU.	Ratón
ALDH3A1	Hs00964880_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
BRCA1	Hs01556193_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
DNMT1	Hs00945875_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
DNMT3A	Hs01027162_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
DNMT3B	Hs00171876_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
GAPDH	Hs02758991_g1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
GSTM2	Hs03044640_gH	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
MYC	Hs00153408_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
PTEN	Hs02621230_s1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
SIRT1	Hs01009000_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
SIRT3	Hs00202030_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
SIRT6	Hs00213036_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
SPP1/osteopontina	Hs00959010_m1 Mm00436767_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Ratón, humano
Survivina/BIRC5	Hs04194392_s1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
TP53	Hs01034249_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano
ZNF577	Hs00261929_m1	Applied Biosystems, EE. UU.	Humano

ACTB, beta-actina; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1; *BRCA1*, *breast cancer* 1; *DNMT*, ADN metiltransferasas; *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *MYC*, myelocitomatosis; *PTEN*, gen supresor de tumores homólogo de fosfatasa y tensina; *SIRT*, sirtuína; *SPP1*, *secreted phosphoprotein* 1; *BIRC5*, *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing* 5; *TP53*, proteína tumoral 53; *ZNF577*, *zinc finger protein* 577.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL ADN

3.3.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico a partir de las muestras de sangre total criopreservadas (congelación a -80ºC) se realizó usando un kit comercial de purificación de ADN (MasterPure DNA Extraction Kit, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, EE. UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. Finalmente, el ADN se resuspendió en 40 µl de tampón TE suministrado en el propio kit.

3.3.2. Cuantificación de ADN

La determinación de la concentración del ADN genómico extraído desde las distintas muestras de origen se cuantificó mediante un método fluorimétrico usando un kit comercial (Quan-iT PicoGreen DsDNA Assay, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El grado de pureza de las muestras se determinó en base a la ratio 260/280, según el cual un valor cercano a 1,8 es considerado como óptimo o aceptable para mediciones de ADN. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de gota en pedestal utilizando el equipo NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Waltan, MA, EE. UU.) ajustado a las longitudes de onda 260 y 280 nm.

3.3.3. Conversión con bisulfito

Tras verificar la integridad del ADN genómico mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Promega Biotech Corporation, Madison, WI, EE. UU.), las muestras de ADN, 500 ng de cantidad se trataron con bisulfito de sodio usando el kit EZ DNA Methylation-Direc KIT (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) según las indicaciones del fabricante. Este kit comercial combina en un solo paso la desnaturalización del ADN por temperatura con la conversión con bisulfito, proceso en el que las citosinas metiladas se convierten a uracilos.

El equipo utilizado fue el termociclador Swift MaxPro (Esco Healthcare Pte. Ltd., Singapore) bajo las condiciones de incubación a 95°C durante 30 segundos + 50°C durante 60 minutos en 16 ciclos.

3.3.4. Metilación del ADN

3.3.4.1. *Microarray* de metilación del ADN

USC

Las muestras de ADN genómico de alta calidad, tras el proceso de conversión con bisulfito, se hibridaron en la plataforma Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina Inc.,

CA, EE. UU.) de acuerdo con el seguimiento del protocolo de metilación Illumina Infinium HD del fabricante. Este kit comercial emplea una tecnología de *microarrays* que permite determinar el estado de metilación del ADN de más de 850.000 sitios CpG en todo el genoma con una resolución de un solo nucleótido. La hibridación al *microarray* se hace por complementariedad de bases con las sondas inmovilizadas al soporte, generando señales lumínicas en dos canales que permiten distinguir las hibridaciones de secuencias metiladas y no metiladas.

La detección se realizó en el HiScan SQ System (Illumina Inc., CA, EE. UU.), un secuenciador de nueva generación y analizador de alto rendimiento integrados en un mismo equipo. La visualización de los datos de metilación del ADN y el análisis de la metilación diferencial se realizó con el módulo GenomeStudio (Illumina Inc., CA, EE. UU.), software empleado para datos generados en este tipo de plataformas de *arrays* en estudios a pequeña escala. La anotación y categorización genómica fue en base a la distancia y posición respecto a las regiones con alta densidad de sitios CpG, denominadas como islas CG (CGIs). En el contexto de distancia, se distinguieron las regiones adyacentes a las CGIs designadas como *shore* y *shelf* (*shore*, secuencias de 2 kb que flanquean una CGI; *shelf*, secuencias de 2 kb que flanquean un *shore*) y las regiones que no incluyen CGIs u *open sea*. En el contexto de posición relativa a los genes, se distinguieron entre regiones localizadas en el promotor, regiones intragénicas o *body* y regiones intergénicas.

Los niveles de metilación del ADN de cada citosina se calcularon cuantitativamente a partir de la ratio de las señales fluorescentes de los sitios metilados frente a los no metilados, expresado como valor beta (β), que oscila entre 0 (completamente no metilado) y 1 (completamente metilado). El control de calidad y la normalización de los datos se realizó utilizando diferentes controles internos presentes en el Infinium MethylationEPIC BeadChip a través del software GenomeStudio, de acuerdo con los procedimientos experimentales previamente descritos (288,289).

3.3.4.2. Análisis de pirosecuenciación

Se utilizó el análisis de pirosecuenciación para evaluar los niveles de metilación del gen *ZNF577*. Las secuencias de *primers* utilizadas en este análisis se diseñaron utilizando el software PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) para hibridar con sitios libres de CpG para garantizar una amplificación independiente de la metilación.

Brevemente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando condiciones estándar con *primers* biotinilados y para ello se usó el termociclador Swift MaxPro (Esco Healthcare, Singapur) para preparar productos de PCR monocatenarios de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de pirosecuenciación y la cuantificación de la metilación se realizaron en un sistema PyroMark Q24 versión 2.0.7 (Qiagen), utilizando los reactivos adecuados y los protocolos recomendados. Las secuencias utilizadas fueron (todas dadas 5' > 3'): *ZNF577* prePCR *forwad*: GGGTAGAGGYGAGTGTTTAGAGAT, *ZNF577* pre-PCR *reverse*: [Btn] CTCCCTACCCCTAAAACAT; *ZNF577 seq*: TTTAGTAGTGGAGATAGG). Estos *primers* permitieron cuantificar los niveles de metilación de dos CpG correspondientes a los objetivos buscados: cg03562414 y cg10635122 del *array* Infinium Human Mmethylation 450 BeadChip (mapinfo 52391078 y 52391090, respectivamente, según GRCh37/hg19 de UCSC Genome Browser). Estos sitios CpG se

identificaron previamente como metilados diferencialmente en tejidos tumorales de mama según el estado de menopausia y adiposidad (100). Ambos sitios CpG están ubicados en la región promotora y la isla de *ZNF577* (**Figura 10**). La región promotora se definió como la secuencia desde 1500 pb del sitio de inicio de la transcripción hasta el primer exón (288,290).

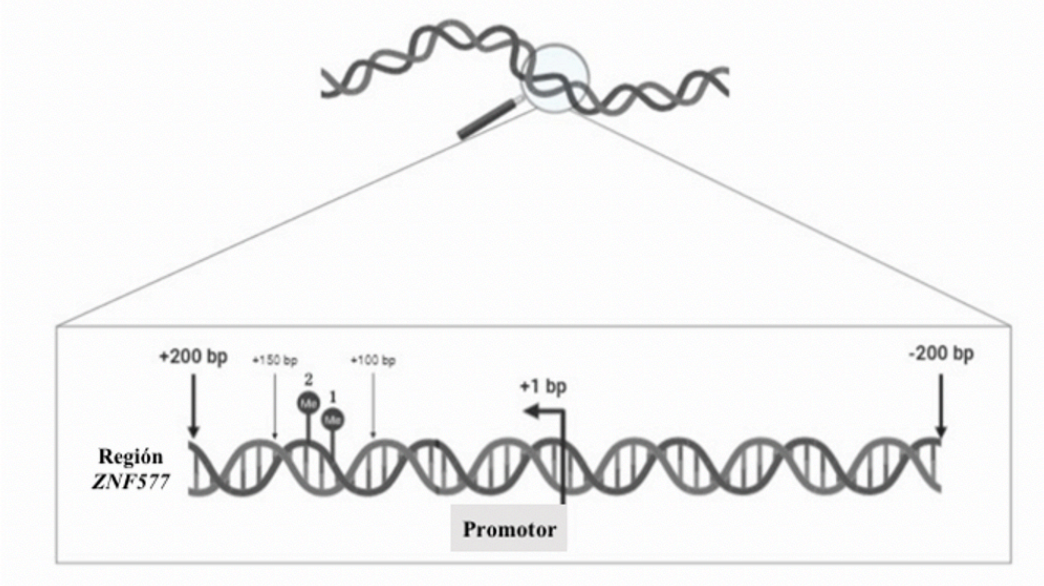


Figura 10. Mapa de un fragmento de ADN del promotor del gen *ZNF577* con 200 nucleótidos aguas arriba (-) y 200 nucleótidos aguas abajo (+) del sitio de inicio de la transcripción (TSS) que contiene los sitios CpG examinados. Los puntos 1 y 2 representan sitios CpG ubicados en mapinfo 52391078 y 52391090, respectivamente, según GRCh37/hg19 de UCSC Genome Browser y corresponden a los ID de destino cg03562414 y cg10635122 de la matriz Infinium Human Mmethylation 450 BeadChip. Estos sitios CpG se identificaron previamente como metilados diferencialmente en tejidos tumorales de mama según el estado de menopausia y adiposidad (100,288,290). Fuente: elaboración propia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., EE. UU.) y el software IBM SPSS Statistics 25 (SPSS Inc, EE. UU.) para Windows 10 (Microsoft, EE. UU.) e IBM SPSS Statistics 28 (SPSS Inc, EE. UU.) para macOS High Sierra versión 10.13.6 (Apple, EE. UU.). El tamaño muestral de los estudios se calculó en base a un nivel de significación (α) igual a 0,05 y una potencia estadística (1-β) de 0,80. Los datos obtenidos en los distintos experimentos son expresados como media ± desviación estándar en las tablas y como media ± error estándar de la media en las figuras. En todos los análisis, se consideraron estadísticamente significativos los resultados con un $p < 0,05$, y se consideró indicativo de una tendencia a la significación un $p \leq 0,1$.

La normalidad de la distribución de los datos se evaluó mediante la prueba Shapiro-Wilk y la prueba Kolmogorov-Smirnov, según el caso. En base al resultado obtenido para evaluar la normalidad, se aplicaron test paramétricos, cuando los datos seguían una distribución normal, o test no paramétricos, en el caso contrario.

En concreto, se aplicaron:

- Prueba *t* de Student, para comparar las diferencias entre las medias de dos grupos, como test paramétrico. Prueba de U de Mann-Whitney para comparar las diferencias entre las medianas de dos grupos, como test no paramétrico.
- Prueba Chi-cuadrado (X^2), para examinar las diferencias entre dos variables categóricas.
- Análisis de la varianza (ANOVA), para examinar las diferencias entre las medias de tres o más grupos, aplicando un post-hoc o prueba de comparación múltiple de Bonferroni para determinar qué medias difieren, o análisis de la covarianza (ANCOVA) para eliminar el efecto causado por una o más covariables, empleando como covariables la edad y/o el sexo según el caso, como test parámetricos. Prueba de Kruskal Wallis para examinar las diferencias entre las medianas de tres o más grupos.
- ANOVA de medidas repetidas (en los estudios con cohortes longitudinales), para estudiar el efecto de uno o más factores cuando al menos uno de ellos es un factor intra-sujetos, aplicando un post-hoc de Bonferroni para determinar qué medias difieren.
- Coeficiente de correlación de Pearson y Spearman, para evaluar la asociación o relación lineal entre variables cuantitativas.
- Modelos de regresión lineal multivariada, para evaluar la posible asociación entre los niveles de metilación de *ZNF577* y el consumo de alimentos, ajustados por el IMC y la edad; y para evaluar la asociación entre los cambios después de los tratamientos, ajustados según los procedimientos terapéuticos.
- Análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC), para demostrar que el modelo de regresión que incluye solo el consumo de pescado en las pacientes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con cáncer de mama es la mejor herramienta predictiva para identificar pacientes con un alto nivel de metilación de *ZNF577*.

Para el filtrado y análisis estadístico de los niveles de metilación global, se consideraron válidos los valores de detección con un $p < 0,01$. La identificación de patrones consistentes de sitios DMCpGs entre los diferentes pasos de la intervención nutricional fueron evaluados mediante un modelo de regresión lineal B-spline, ajustado por comparaciones múltiples mediante un test de "*false discovery rate*" (FDR) de Bejamini and Hochberg, donde un valor FDR<0,10 se consideró estadísticamente significativo. Adicionalmente, se seleccionaron las DMCpGs con un cambio en la metilación $\beta > 2\%$. Estos análisis se realizaron utilizando el software R Project (The R Foundation for Statistical Computing, EE. UU.).

Por último, a partir de un análisis con ontología genética (GO, de sus siglas en inglés, *Gene Ontology*) de datos del metiloma de pacientes con obesidad tratados con una VLCKD para la pérdida de peso, se evaluaron específicamente los genes pertenecientes a rutas relacionadas con el cáncer. Para un análisis más exhaustivo, se realizó un análisis STRING para obtener la red de interacción gen-proteína de estos genes y se identificaron los más relevantes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO I. ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGÉNESIS LIGADA A OBESIDAD

1. ESTUDIO DEL GEN *ZNF577* EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA SEGÚN LA ADIPOSIDAD, EL ESTADO MENOPÁUSICO Y LA DIETA

En gen *ZNF577* se ha mostrado como el más representativo de una firma epigenética del cáncer de mama asociado a la obesidad identificado previamente (100). De este modo, se evaluaron los niveles de metilación de este gen según el grado de adiposidad, estado menopáusico y el patrón dietético en leucocitos circulantes, una muestra no invasiva, en pacientes con cáncer de mama.

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES

Entre las 90 pacientes con cáncer de mama recién diagnosticado incluidas en este estudio, 64 pacientes (71,1%) fueron clasificadas con sobrepeso/obesidad y 26 (28,9%) fueron clasificadas con normopeso, y 62 (68,9%) de las pacientes estaban en etapa postmenopáusica (**Tabla 5**). El IMC medio fue de 25,0 ± 3,4 en las pacientes en etapa premenopáusica y de 30,0 ± 5,5 en pacientes en etapa postmenopáusica. El perímetro de cintura medio fue de 83,7 ± 12,2 para las pacientes en etapa premenopáusica y de 93,8 ± 14,2 para las pacientes en postmenopausia. Asimismo, la relación cintura-cadera (WHR) medio fue de 0,81 ± 0,14 para las pacientes en etapa premenopáusica y de 0,92 ± 0,07 para las pacientes en etapa postmenopáusica. Estas diferencias según el estado menopáusico fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). De hecho, el IMC y la relación cintura-altura (WHtR) más altos se observaron entre las mujeres en etapa postmenopáusica con sobrepeso u obesidad (**Tabla 5**). No se encontró que las características de los tumores fueran diferentes según el grado de adiposidad (**Tabla 6**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Medidas antropométricas y composición corporal según la adiposidad y el estado menopaúsico en las participantes del estudio.

Variables	Nomopeso			Sobrepeso/obesidad		
	Premenopausia (n = 13)	Postmenopausia (n = 13)	*p*-valor	Premenopausia (n = 15)	Postmenopausia (n = 49)	*p*-valor
Edad (años)	42,4 ± 4,8	59,9 ± 6,6	**<0,001**	43,5 ± 4,5	61,1 ± 8,5	**<0,001**
Peso corporal (kg)	58,0 ± 7,2	58,6 ± 7,0	0,827	73,5 ± 8,1	77,5 ± 12,6	0,253
Altura (m)	1,62 ± 0,08	1,58 ± 0,06	0,171	1,63 ± 0,07	1,56 v 0,05	**<0,001**
IMC (kg/m^2)	22,0 ± 1,9	23,4 ± 1,7	0,073	27,5 ± 1,9	31,7 ± 4,7	**0,001**
Circunferencia cintura (cm)	75,3 ± 8,1	80,4 ± 9,4	0,175	90,8 ± 10,5	98,3 ± 12,7	0,061
Circunferencia cadera (cm)	108,0 ± 14,5	99,2 ± 9,7	0,089	102,9 ± 10,7	103,6 ± 12,1	0,830
WHR	0,72 ± 0,11	0,81 ± 0,12	0,085	0,88 ± 0,13	0,96 ± 0,19	0,179
WHtR	0,46 ± 0,05	0,51 ± 0,04	**0,027**	0,55 ± 0,06	0,63 ± 0,08	**0,002**

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. El valor *p* se calcula mediante la prueba *t* de Student. IMC, índice de masa corporal; WHR, relación cintura-cadera; WHtR, relación cintura-altura.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Características del tumor y valor *p* de la prueba Chi-cuadrado asociado según el índice de masa corporal (IMC).

Características	IMC		*p*-valor
	< 25	≥ 25	
Estadío al diagnóstico			0,636
I/II	15 (57,7)	43 (67,2)	
III/IV	5 (19,2)	8 (12,5)	
Desconocido	6 (23,1)	13 (20,3)	
Estado del receptor			
Receptor de estrógeno (RE)			0,595
Positivo	21 (80,8)	48 (75,0)	
Negativo	2 (7,7)	10 (15,6)	
Desconocido	3 (11,5)	6 (9,4)	
Receptor de progesterona (RP)			0,604
Positivo	19 (73,1)	42 (65,6)	
Negativo	4 (15,4)	16 (25,0)	
Desconocido	3 (11,5)	6 (9,4)	
Hercept test			0,893
Positivo	2 (7,7)	7 (10,9)	
Negativo	20 (76,9)	48 (75,0)	
Desconocido	4 (15,4)	9 (14,1)	
Histología			0,966
Carcinoma ductal invasivo	20 (76,9)	48 (75,0)	
Otros	4 (15,4)	10 (15,6)	
Desconocido	2 (7,7)	6 (9,4)	
Talla del tumor (cm)			0,343
≤ 2	13 (50,0)	41 (64,1)	
> 2	11 (42,3)	17 (26,6)	
Desconocido	2 (7,7)	6 (9,4)	

Los datos se muestran como el tamaño de la muestra (porcentaje) de cada grupo según la adiposidad. El valor *p* se calcula mediante la prueba Chi cuadrado (X^2). IMC, índice de masa corporal.

Para evaluar la asociación entre las características relacionadas con la obesidad entre las pacientes con cáncer de mama y los hábitos alimentarios, se analizó el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos en el contexto de la adherencia a la Dieta Mediterránea y el consumo de los grupos de alimentos más importantes (verduras, legumbres, pescado, y carnes y carnes procesadas) (**Tabla 7**). El análisis estadístico posterior al ajuste del IMC no arrojó diferencias estadísticamente significativas en el contexto de la adherencia a la Dieta

USC DE COMPOSTELA

Mediterránea y el consumo de verduras y legumbres (**Tabla 7**). Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la altura, edad y perímetro de cintura en relación con el consumo de carnes rojas y procesadas. La edad de las pacientes y su asociación con el consumo de pescado también obtuvo resultados estadísticamente significativos. Las mujeres con cáncer de mama que consumían cantidades superiores a las recomendadas de carnes rojas y procesadas eran más altas que las pacientes que consumían cantidades inferiores de carnes rojas y procesadas a las recomendadas. Además, las mujeres con cáncer de mama que consumían cantidades de pescado superiores a las recomendadas eran mayores que las pacientes que consumían cantidades de pescado inferiores a las recomendadas (**Tabla 7**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Asociación entre características relacionadas con la obesidad y hábitos alimentarios en las pacientes con cáncer de mama.

Características	Adherencia Dieta Mediterránea		Consumo de vegetales		Consumo de legumbres		Consumo de pescado		Consumo de carne roja y carnes procesadas	
	≤7 puntos (73.1%)	>7 puntos (29.9%)	<recomendado (72.5%)	≥recomendado (27.5%)	<recomendado (59.4%)	≥recomendado (40.6%)	<recomendado (73.9%)	≥recomendado (26.1%)	<recomendado (51.5%)	≥recomendado (48.5%)
Prevalencia (%)	73.1	29.9	72.5	27.5	59.4	40.6	73.9	26.1	51.2	48.5
Peso corporal (kg)	72.3±14.1	68.9±8.9	71.0±13.8	71.6±10.4	70.8±13.9	71.7±11.4	70.5±13.6	73.5±10.2	69.1±11.4	73.4±14.5
Altura (m)	1.60±0.07	1.47±0.05	1.59±0.07	1.58±0.07	1.59±0.07	1.58±0.06	1.59±0.07	1.58±0.04	1.57±0.06	1.61±0.07*
IMC (kg/m^2)	28.3±5.7	27.8±3.2	28.1±5.6	28.6±3.6	28.0±5.5	28.6±4.5	27.9±5.5	29.4±3.6	28.0±4.7	28.3±5.8
Edad (años)	53.7±11.4	57.9±7.3	55.0±11.4	56.5±9.4	54.6±11.3	56.6±10.3	53.6±11.1	61.3±7.7*	58.7±10.5	51.3±10.0*
Circunferencia cintura (cm)	91.7±15.3	87.8±9.1	91.1±14.5	89.4±12.6	90.8±14.3	90.1±13.4	90.8±15.3	89.9±9.2	88.6±12.7	92.1±14.9‡
Circunferencia cadera (cm)	104.7±11.7	106.3±11.7	106.1±12.2	100.8±10.2	105.0±12.3	103.8±11.1	105.0±11.6	102.9±12.6	102.5±11.7	106.5±11.8
WHR	0.87±0.18	0.82±0.14	0.84±0.15	0.89±0.19	0.85±0.13	0.87±0.21	0.86±0.17	0.87±0.14	0.86±0.15	0.86±0.18
WHtR	0.57±0.10	0.56±0.06	0.57±0.10	0.57±0.08	0.57±0.10	0.57±0.09	0.57±0.10	0.57±0.06	0.56±0.09	0.57±0.10‡
Prevalencia de obesidad†	68.9% (31)	80.0% (12)	67.4% (31)	81.3% (13)	65.8% (25)	79.2% (19)	66.7% (32)	85.5% (12)	69.7% (23)	71.4% (20)

Los datos muestran la media ± desviación estándar. † los datos muestran el porcentaje (tamaño de la muestra). Asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a < recomendado evaluado mediante la prueba t de Student dentro del consumo de cada grupo de alimentos. ‡ las diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) se evaluaron con ANCOVA univariante ajustado por el índice de masa corporal (IMC) y la edad. WHR: relación cintura-cadera; WHtR: relación cintura-altura.

1.2. NIVELES DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN DE *ZNF577* SEGÚN LA ADIPOSIDAD, EL ESTADO MENOPÁUSICO Y EL CONSUMO DE ALIMENTOS

En primer lugar, se analizó si los resultados obtenidos en muestras de leucocitos circulantes iban en la misma línea que los obtenidos en muestras de biopsias de tejido tumoral de mama. En este contexto, se encontró una correlación positiva entre los niveles de metilación de *ZNF577* de leucocitos y biopsias de tejido tumoral de mama de 8 mujeres con cáncer de mama considerando datos de CpG1, CpG2 y la media de ambas CpGs (**Figura 11**; r = 0,62; *p* = 0,001). En consecuencia, los niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos de las mujeres con cáncer de mama fueron mayores en las pacientes con obesidad en comparación con las pacientes con normopeso (*p* = 0,002; **Figura 12A**), y en mujeres en etapa posmenopáusica en comparación con las mujeres en etapa premenopáusica (*p* = 0,022; **Figura 12B**). Los resultados fueron en una dirección similar a la publicada anteriormente en la biopsia de tejido tumoral de mama (100).

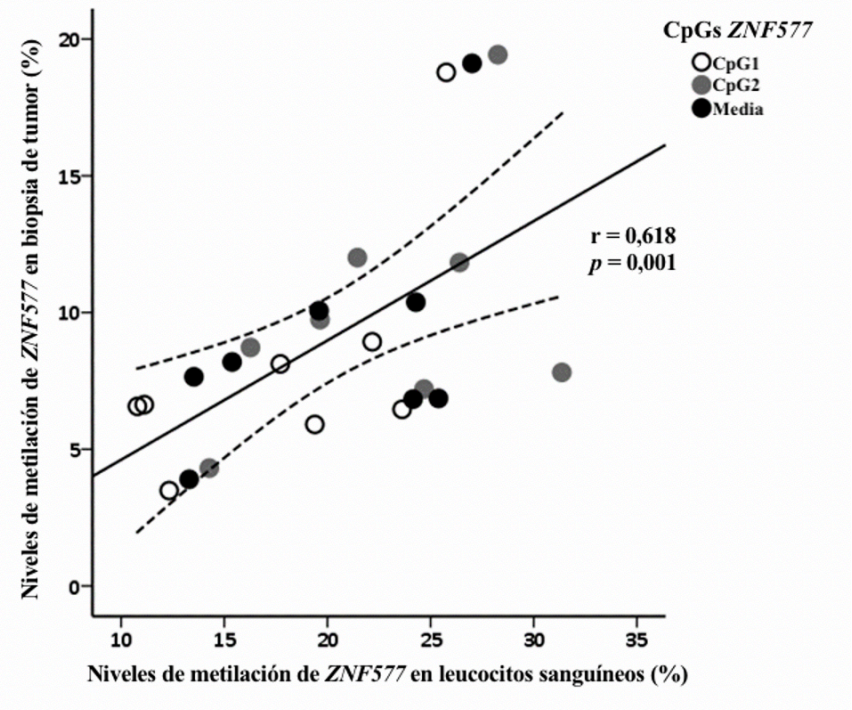


Figura 11. Análisis de los niveles de metilación del gen *ZNF577.* Diagrama de dispersión que representa la correlación de los niveles de metilación de *ZNF577* de CpG1, CpG2 y la media en leucocitos y biopsias de tejido tumoral de mama. La línea central representa la línea de tendencia de regresión lineal. Las líneas por encima y por debajo de la línea central representan los límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% alrededor de la línea de tendencia. r, coeficiente de correlación evaluado mediante la prueba de Pearson; *p*, valor *p*.

Para evaluar el efecto de la metilación del promotor sobre su función, se evaluaron los niveles de expresión de *ZNF577* y se encontró una correlación inversa con significación estadística entre los niveles de transcripción y los niveles de metilación en CpG1 y la media de ambos CpG (CpG1: r = −0,28; *p* = 0,023, CpG2: r = −0,18; *p* = 0,143, media: r = −024; *p* = 0,05). De hecho, la expresión de este gen en los leucocitos de mujeres con cáncer de mama fue menor en mujeres con obesidad que en mujeres con normopeso (*p* = 0,039; **Figura 12C**), y menor en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mujeres en etapa posmenopáusica que en mujeres en etapa premenopáusica (p = 0,007; **Figura 12D**).

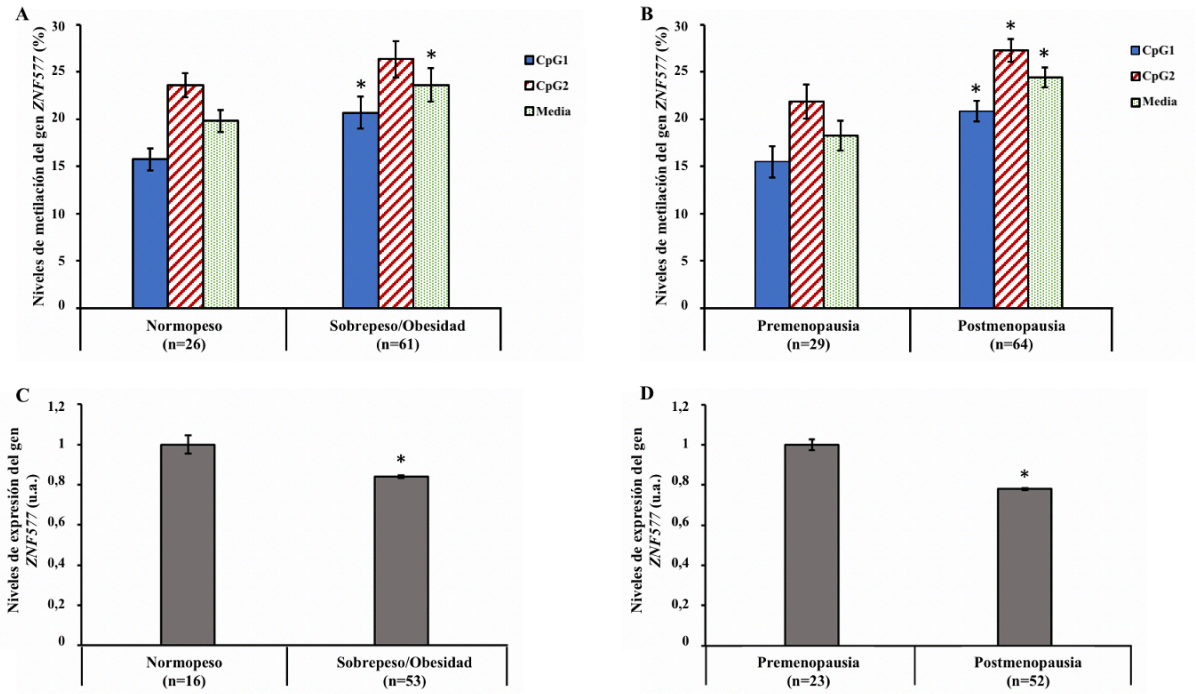


Figura 12. Metilación y expresión génica de ZNF577 según adiposidad y estado menopáusico. Niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos de pacientes de este estudio según (**A**) adiposidad y (**B**) estado menopáusico. Expresión génica de *ZNF577* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) según (**C**) adiposidad y (**D**) estado menopáusico. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. Asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en relación con normopeso o el estado premenopáusico evaluado mediante la prueba t de Student.

Al analizar los niveles de metilación de *ZNF577* en relación con la adherencia a la Dieta Mediterránea, se observó que las mujeres que tienen mayor adherencia a este patrón dietético presentaban mayores niveles de metilación, como lo demuestran las diferencias estadísticamente significativas en CpG1 y en la media de los dos sitios CpG evaluados (**Figura 13A**). Cabe destacar que las diferencias en los niveles de metilación según la adherencia a la Dieta Mediterránea se correlacionaron inversamente con las diferencias en la expresión genética de *ZNF577*. Estas diferencias se observaron con significación estadística (p = 0,007, **Figura 13B**).

Se realizaron análisis adicionales mediante la evaluación individual de los grupos de alimentos de la Dieta Mediterránea en relación con los niveles de metilación de *ZNF577*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en ítems específicos (**Figura 13C**). Los niveles de metilación de *ZNF577* fueron más altos en mujeres que consumían más cantidades de verduras y pescado de las recomendadas. Los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos en CpG2 y en la media de los dos sitios CpG evaluados en el consumo de vegetales, en CpG1 y en la media de CpGs ajustados por edad e IMC en el consumo de legumbres, y en CpG1, CpG2 y en la media de CpGs en el consumo de pescado. No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en relación con el consumo de carnes rojas y procesadas (**Figura 13C**). A pesar de las diferencias en los niveles de metilación según

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

grupos de alimentos específicos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *ZNF577* según estos grupos (**Tabla 8**).

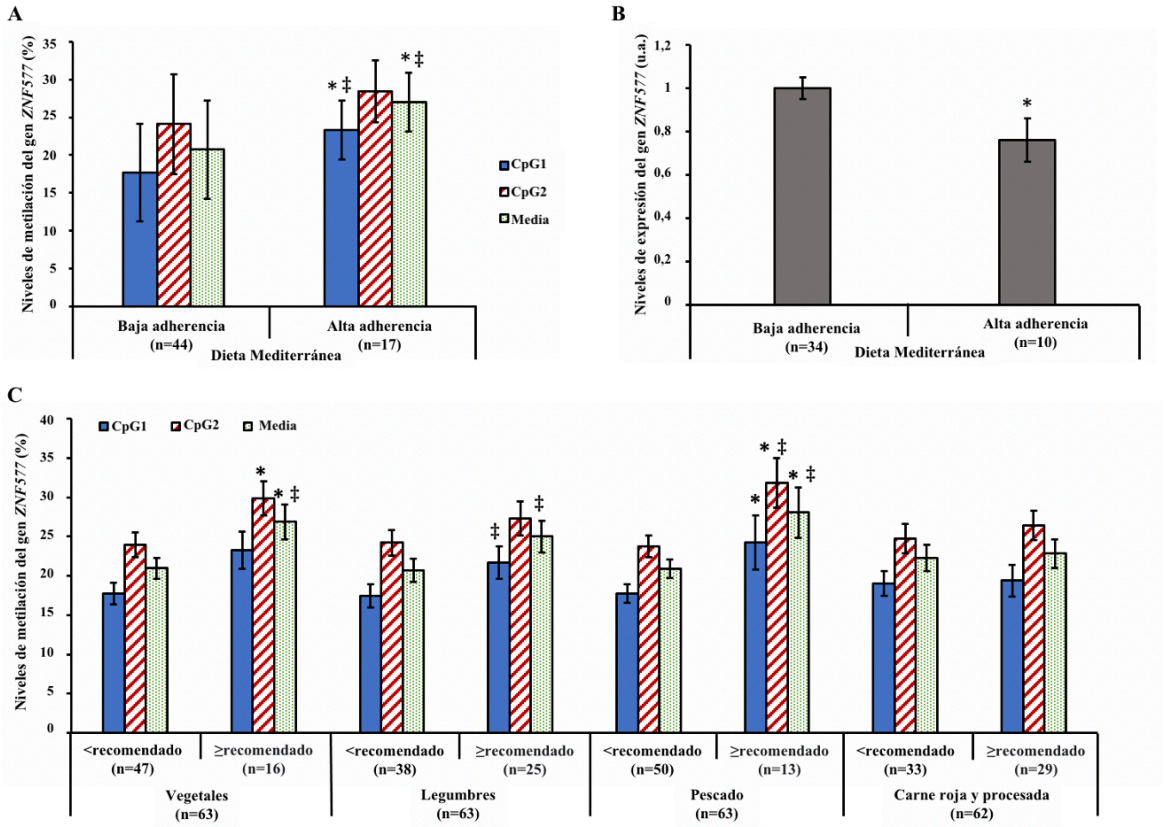


Figura 13. Metilación y expresión génica de *ZNF577* según los patrones dietéticos. (**A**) Niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos de pacientes de este estudio según la adherencia a la Dieta Mediterránea. (**B**) Expresión génica de *ZNF577* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en pacientes de este estudio según la adherencia a la Dieta Mediterránea. (**C**) Niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos de pacientes de este estudio según grupos de alimentos de la Dieta Mediterránea. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. Asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con una baja adherencia a la Dieta Mediterránea o un consumo inferior al recomendado de los grupos de alimentos de la Dieta Mediterránea evaluados mediante la prueba *t* de Student. ‡ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con una baja adherencia a la Dieta Mediterránea o un consumo inferior al recomendado de los grupos de alimentos de la Dieta Mediterránea evaluados mediante ANCOVA univariante ajustado por índice de masa corporal (IMC) y edad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 8. Asociación entre los niveles de expresión del gen *ZNF577* en leucocitos de pacientes con cáncer de mama y consumo de grupos de alimentos.

Grupos de alimentos	Niveles de expresión de *ZNF577* (u.a.)	*p*-valor
Vegetales		0,082
<recomendado (n=34)	1,00±0,06	
≥recomendado (n=11)	0,84±0,10	
Legumbres		0,566
<recomendado (n=28)	1,05±0,07	
≥recomendado (n=17)	0,99±0,09	
Pescado		0,317
<recomendado (n=37)	1,00±0,06	
≥recomendado (n=8)	1,20±0,14	
Carnes rojas y procesadas		0,822
<recomendado (n=22)	1,07±0,09	
≥recomendado (n=22)	1,10±0,09	

Los datos muestran la media ± error estándar. El valor *p* proviene del ANCOVA univariante ajustado por el índice de masa corporal (IMC) y la edad. Verduras: 200 g/ración 2 veces/día; legumbres: 80 g/ración cruda 2 veces/semana; pescado: 150 g/ración 3 veces/semana; carnes rojas y procesadas: 125 g/ración 3 veces/semana (271).

En particular, los niveles de metilación de *ZNF577* se correlacionaron directamente con el consumo de pescado (**Figura 14A**), mientras que no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de metilación y el consumo de verduras, legumbres y carnes. Además, los modelos de regresión lineal revelaron que el 16% de la variabilidad en los niveles de metilación de *ZNF577*, ajustados por edad e IMC, se explicaba conjuntamente por el consumo de verduras, legumbres y pescado (**Tabla 9**). De hecho, una curva de características operativas del receptor (ROC) determina la capacidad de los niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos para discriminar pacientes según el consumo de pescado con un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,72 ($p < 0,001$) (**Figura 14B**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

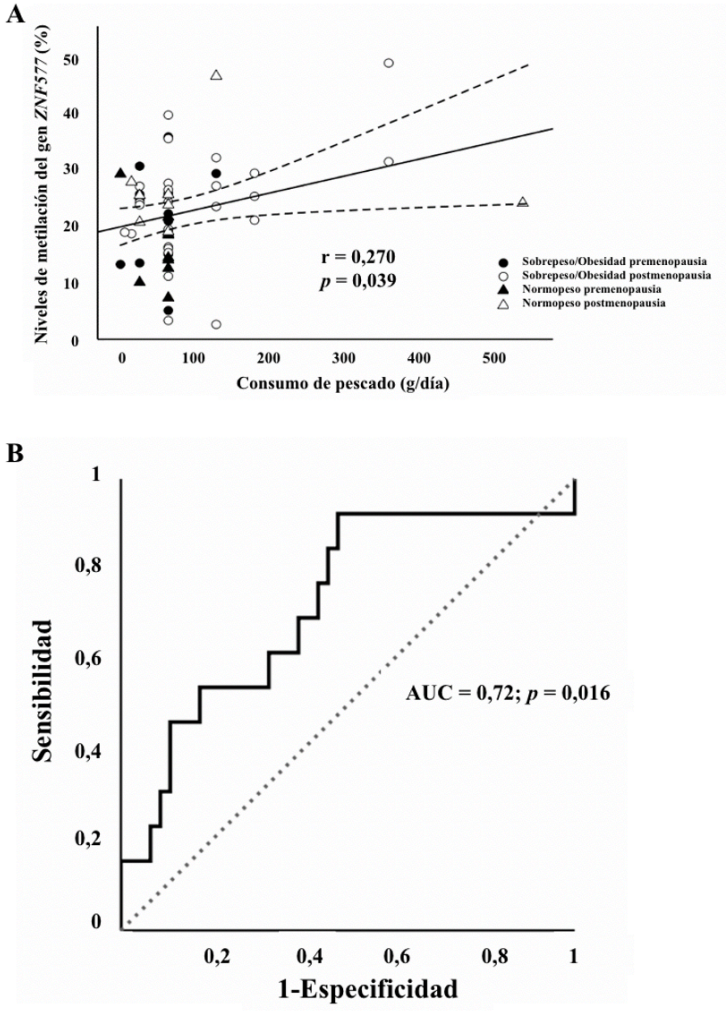


Figura 14. Asociación entre los niveles de metilación de *ZNF577* y el consumo de pescado. (**A**) Diagrama de dispersión que representa la asociación entre los niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos de pacientes de este estudio y el consumo de pescado en gramos por día. La línea central representa la línea de tendencia de regresión lineal. Las líneas por encima y por debajo de la línea central representan los límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% alrededor de la línea de tendencia. r, coeficiente de correlación evaluado mediante la prueba de Pearson; *p*, valor *p*. (**B**) Curvas de características operativas del receptor (ROC) para los niveles de metilación de *ZNF577* para discriminar a los pacientes según el consumo de pescado. AUC, área bajo la curva.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Efectos independientes del consumo de verduras, legumbres, pescado y carnes rojas y procesadas sobre los niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos de mujeres con cáncer de mama en el momento del diagnóstico.

Modelos	Coeficientes estandarizados β (95% IC)	*p*-valor
Modelo 1		
Consumo de vegetales	0,159 (-2,4; 9,21)	0,246
Consumo de legumbres	0,201 (-1,25; 8,88)	0,137
Consumo de pescado	0,183 (-2,21; 10,43)	0,197
Consumo de carnes rojas y procesadas	0,148 (-2,38; 7,95)	0,284
R^2 corregido = 0,15		**0,027**
Modelo 2		
Consumo de vegetales	0,168 (-2,18; 9,33)	0,218
Consumo de legumbres	0,187 (-1,44; 8,50)	0,160
Consumo de pescado	0,189 (-1,99; 10,48)	0,178
R^2 corregido = 0,16		**0,019**
Modelo 3		
Consumo de pescado	0,278 (0,18; 12,34)	**0,044**
R^2 corregida = 0,11		**0,029**

Ajustado por edad e índice de masa corporal (IMC).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *BRCA1*

El gen *BRCA1* es un supresor tumoral que regula el ciclo celular y evita la proliferación incontrolada (211), cuya mutación incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama, ovario (210–212) o próstata (211). De este modo, se evaluaron los niveles de expresión de este gen según el grado de adiposidad en leucocitos circulantes, una muestra no invasiva, en pacientes con cáncer de mama.

Las características de las 90 pacientes con cáncer de mama incluidas en este estudio y del tipo de tumores se describen previamente en la **Tabla 5** y la **Tabla 6**.

2.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE *BRCA1* SEGÚN LA ADIPOSIDAD

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión del gen *BRCA1* según el grado de adiposidad mostrándose que las mujeres con sobrepeso y obesidad presentaban niveles significativamente más bajos de expresión de este gen supresor de tumores en comparación con las mujeres con normopeso (**Figura 15A**). Tras la observación de este hallazgo, se quiso evaluar si estos resultados se asociaban con el IMC. En este sentido, los resultados mostraron una interesante correlación negativa entre los niveles de expresión del gen *BRCA1* y el IMC (**Figura 15B**).

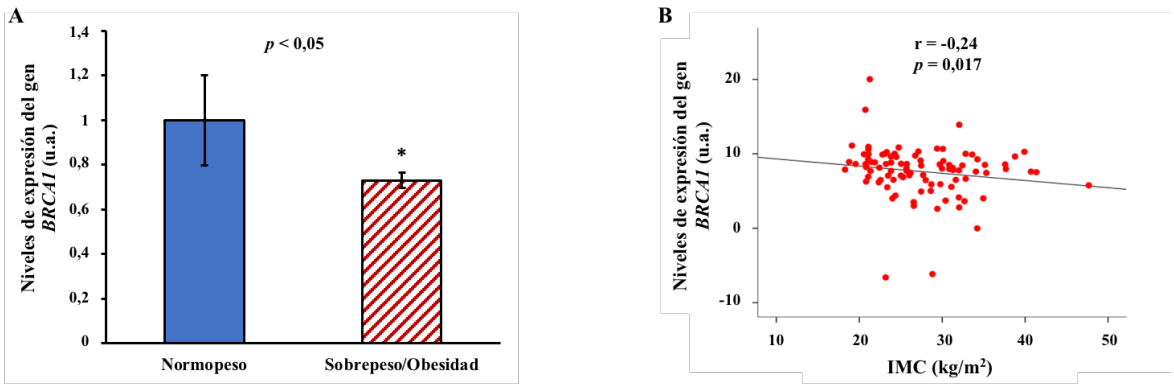


Figura 15. Expresión génica de *BRCA1* según la adiposidad en leucocitos circulantes de mujeres con cáncer de mama. (**A**) Niveles de expresión del gen *BRCA1* según el grado de adiposidad. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. El valor *p* proviene de la prueba *t* de Student. (**B**) Correlación entre el índice de masa corporal (IMC) y la expresión génica de *BRCA1*. Las líneas por encima y por debajo de la línea central representan los límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% alrededor de la línea de tendencia. r, coeficiente de correlación evaluado mediante la prueba de Rho Spearman; *p*, valor *p*.

Tras evaluar los niveles de expresión en relación con nivel de adiposidad, se analizaron los niveles de expresión de *BRCA1* en relación con la adherencia a la Dieta Mediterránea, no

observándose diferencias estadísticamente significativas **Figura 16A**. Del mismo modo ocurre cuando se realizaron análisis adicionales mediante la evaluación individual de los grupos de alimentos de la Dieta Mediterránea en relación con los niveles de expresión de *BRCA1*, aunque se observan niveles mayores de expresión en mujeres con mayor consumo de legumbres frente a las que presentaban menor consumo, no llegándose a encontrar diferencias estadísticamente significativas debido a la dispersión de los datos **Figura 16B**.

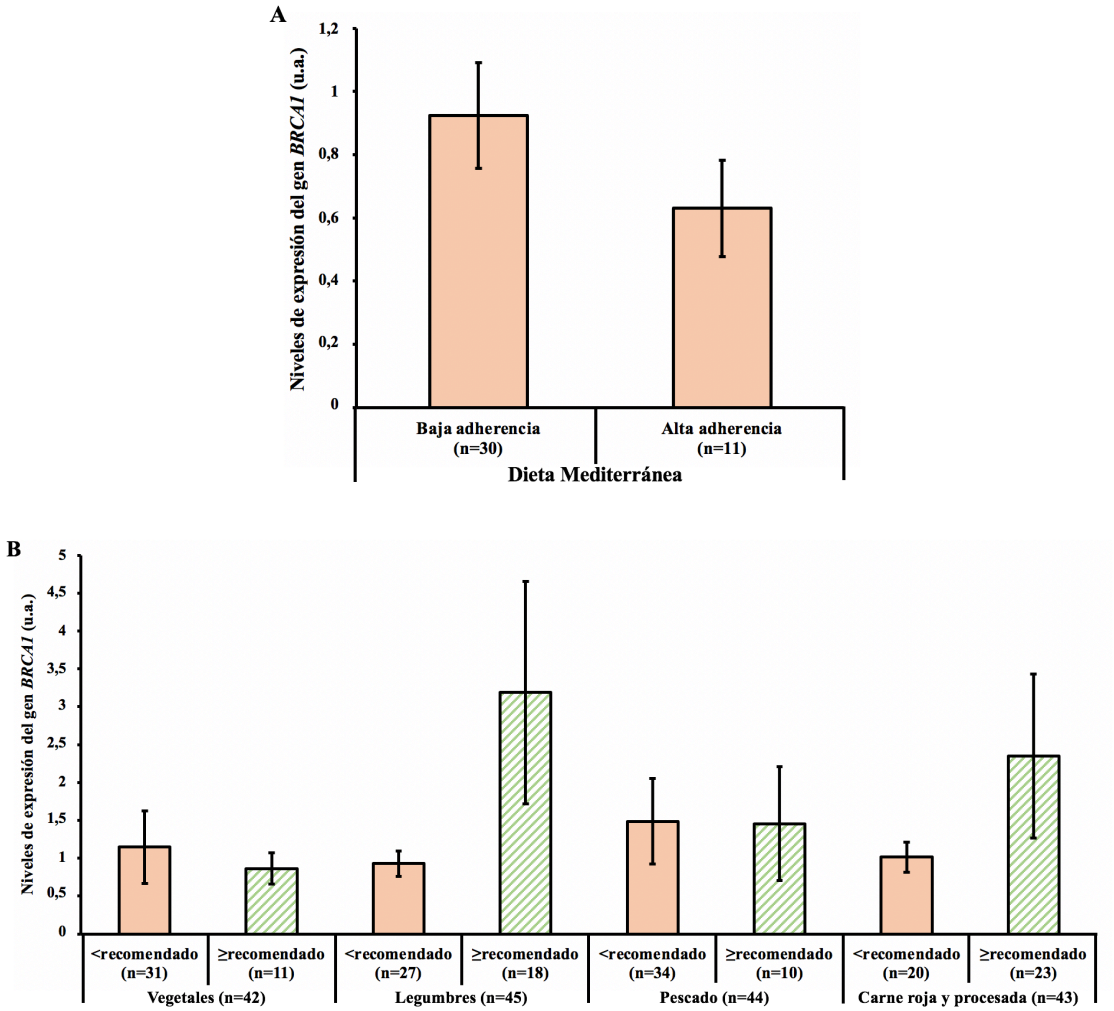


Figura 16. Expresión génica de *BRCA1* según los patrones dietéticos. (**A**) Expresión génica de *BRCA1* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes de este estudio según la adherencia a la Dieta Mediterránea. (**B**) Expresión génica de *BRCA1* en PBMC en pacientes de este estudio según grupos de alimentos de la Dieta Mediterránea. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. Análisis realizado mediante la prueba *t* de Student.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DE COMPUESTOS NUTRICIONALES O DE LA INDUCCIÓN DE OBESIDAD SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGÉNESIS LIGADA A LA OBESIDAD

Para evaluar el efecto de la obesidad y de los tratamientos dietéticos para la pérdida de peso sobre el cáncer asociado a la obesidad, se realizó un estudio *in vitro* en tres líneas celulares, la línea epitelial mamaria humana no tumorigénica MCF10A, y las líneas tumorales mamarias humanas MCF7 y MDA-MB-231, descritas previamente. Para estudiar este efecto se expuso a dichas líneas celulares a diferentes concentraciones de secretomas de tejido adiposo humano de pacientes con obesidad y a diferentes concentraciones de compuestos de la dieta, el sulforafano, compuesto destacado en los vegetales crucíferos, los cuales predominan en la Dieta Atlántica y el β-OHB principal compuesto de la cetosis nutricional inducida por una VLCKD. El análisis de la expresión génica se realizó tras la exposición a secretomas de tejido adiposo y compuestos de la dieta durante 72 horas en los tres tipos celulares después de la valoración de los resultados de proliferación celular, en un grupo de genes supresores tumorales (*BRCA1*, *PTEN* y *TP53*), genes relacionados con la protección antioxidante (*SIRT1*, *SIRT3*, *SIRT6* y *GSTM2*), las *DNMTs* (*DNMT1*, *DNMT3a* y *DNMT3b*) y un grupo de genes promotores tumorales (*BIRC5*, *MYC* y *ALDH3A1*), todos ellos relacionados con la carcinogénesis.

3.1. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES EN LÍNEAS CELULARES EXPUESTAS A TRATAMIENTO CON SULFORAFANO

En primer lugar, se analizó el efecto de la exposición a sulforafano, mostrando una disminución estadísticamente significativa en la proliferación celular de las tres líneas celulares estudiadas, principalmente a las 72 horas de exposición y con una disminución de la proliferación más acentuada conforme la concentración de sulforafano fue mayor, excepto en las MCF10A que aumenta la proliferación celular a las 72 horas en las concentraciones más bajas (**Figura 17A, Figura 18A, Figura 19A**).

Tras esta observación, se utilizó sulforafano en concentración 10 μM para evaluar su efecto en las tres líneas celulares sobre la expresión de los genes de interés. En las MCF10A expuestas a tratamiento con sulforafano se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de los genes *BRCA1* (**Figura 17B**), *SIRT1* (**Figura 17C**), *DNMT1* (**Figura 17D**) y *BIRC5* (**Figura 17E**), y una disminución de la expresión en *MYC* y *ALDH3A1* (**Figura 17E**),

USC

respecto al control de células sin tratar. En cuanto a las MCF7 expuestas a tratamiento con sulforafano, se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de los genes *PTEN* (**Figura 18B**), *GSTM2* (**Figura 18C**), *DNMT1*, *DNMT3A* (**Figura 18D**), *BIRC5* y *ALDH3A1* (**Figura 18E**), respecto al control de células sin tratar. En las MDA-MB-231 expuestas a tratamiento con sulforafano se observó un aumento estadísticamente significativo en los genes *TP53* (**Figura 19B**), *SIRT6* (**Figura 19C**), *BIRC5* y *ALDH3A1* (**Figura 19E**), y una disminución de la expresión estadísticamente significativa en los genes *PTEN* (**Figura 19B**) y *GSTM2* (**Figura 19C**), respecto al control de células sin tratar.

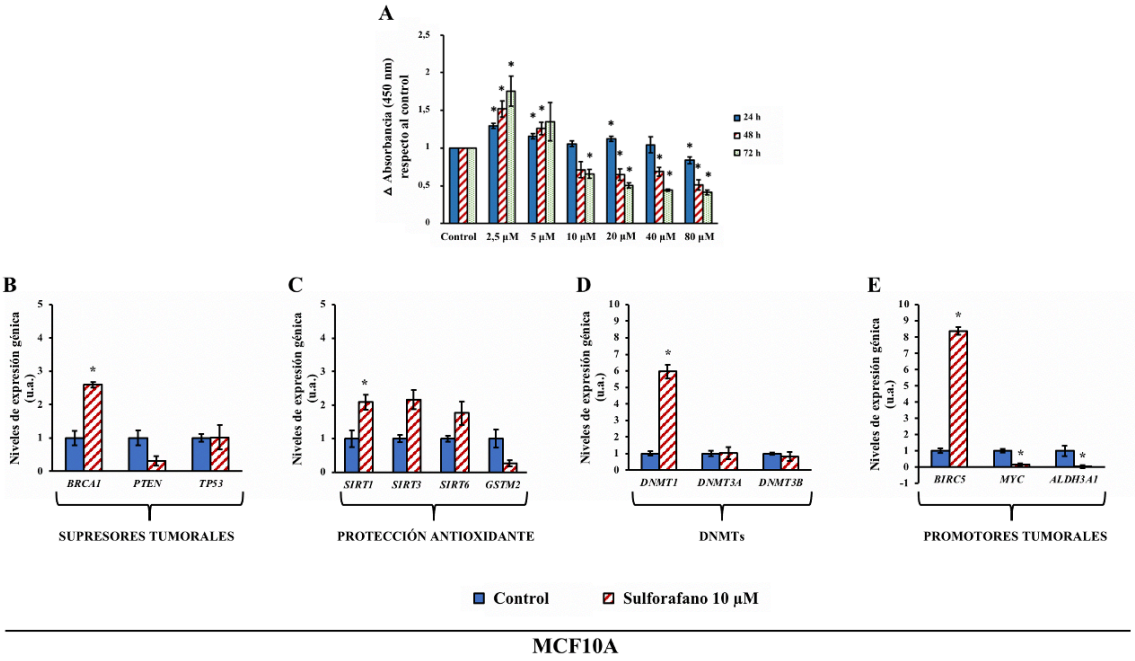


Figura 17. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MCF10A expuesta a tratamiento con sulforafano. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

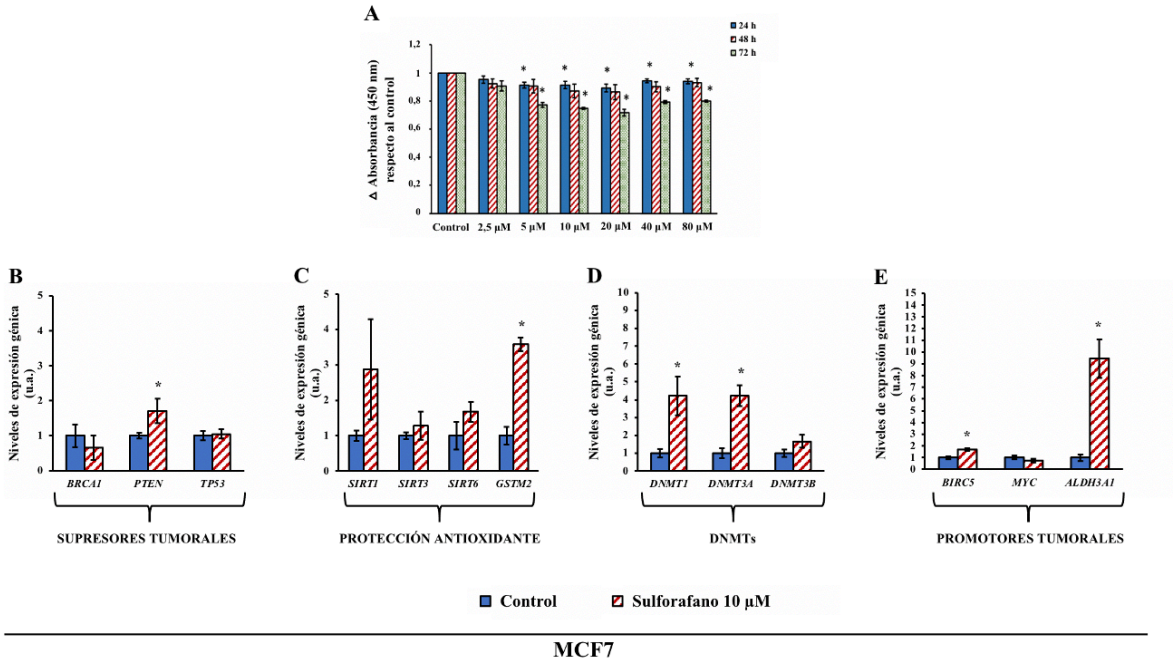


Figura 18. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MCF7 expuesta a tratamiento con sulforafano. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1.

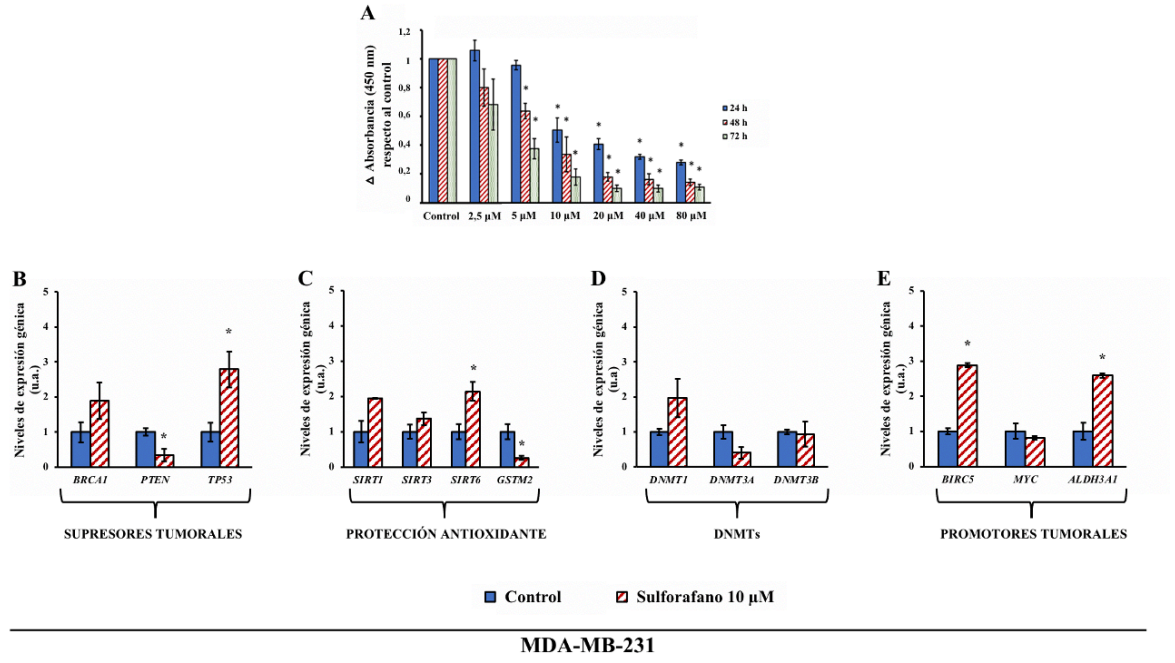


Figura 19. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MDA-MB-231 expuesta a tratamiento con sulforafano. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1.

3.2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES EN LÍNEAS CELULARES EXPUESTAS A TRATAMIENTO CON B-OHB

Se evaluó el efecto de la exposición a β-OHB, mostrando una disminución estadísticamente significativa en la proliferación celular de las tres líneas celulares estudiadas, principalmente a las 72 horas de exposición y con una disminución de la proliferación más acentuada conforme la concentración de β-OHB fue mayor, excepto en las MCF10A que aumenta la proliferación celular a las 72 horas en las concentraciones más bajas (**Figura 20A**, **Figura 21A**, **Figura 22A**).

Tras observar los resultados de la proliferación celular, se utilizó β-OHB en concentración 50 mM en las MCF10A y 200 mM en las MCF7 y MDA-MB-231 para evaluar su efecto en las tres líneas celulares sobre la expresión de los genes de interés. En las MCF10A expuestas a tratamiento con β-OHB se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de los genes *SIRT3*, *GSTM2* (**Figura 20C**), *DNMT1*, *DNMT3B* (**Figura 20D**) y *BIRC5* (**Figura 20E**), y una disminución de la expresión en MYC (**Figura 20E**) respecto al control de células sin tratar. En cuanto a las MCF7 expuestas a tratamiento con β-OHB, se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de los genes *PTEN* (**Figura 21B**), *GSTM2* (**Figura 21C**), *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* (**Figura 21D**) y *ALDH3A1* (**Figura 21E**), respecto al control de células sin tratar. En las MDA-MB-231 expuestas a tratamiento con β-OHB se observó un aumento estadísticamente significativo en los genes *TP53* (**Figura 22B**), *SIRT1* (**Figura 22C**), *DNMT1* y *DNMT3B* (**Figura 22D**), y una disminución de la expresión estadísticamente significativa en el gen *BIRC5* (**Figura 22E**), respecto al control de células sin tratar.

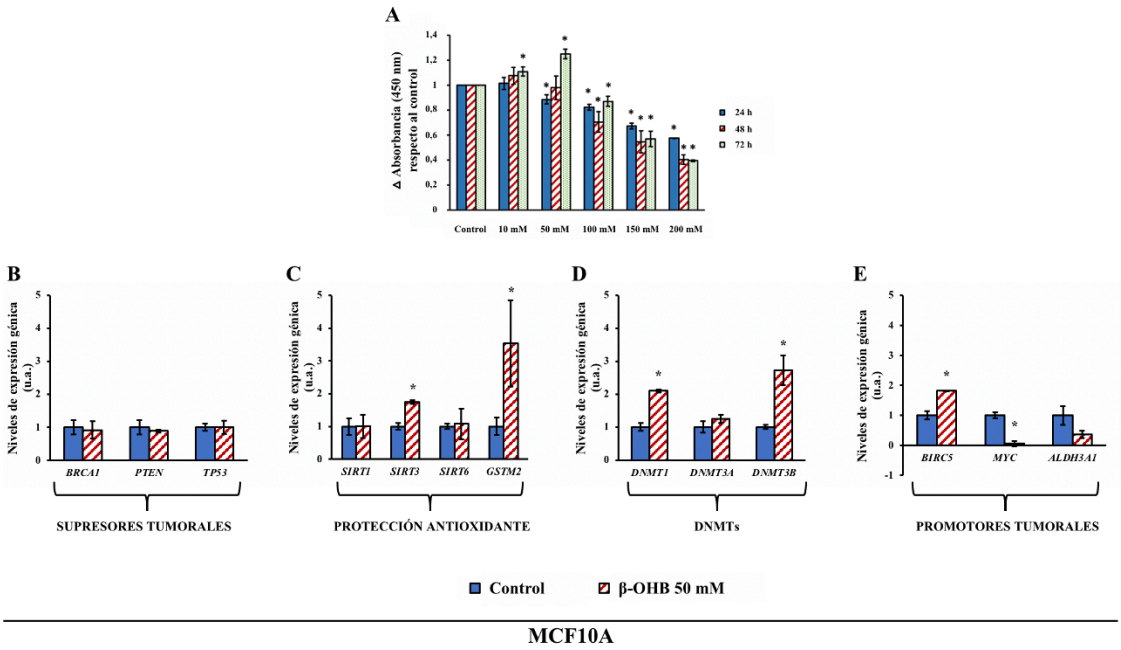


Figura 20. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MCF10A expuesta a tratamiento con ß-hidroxibutirato (ß-OHB). El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

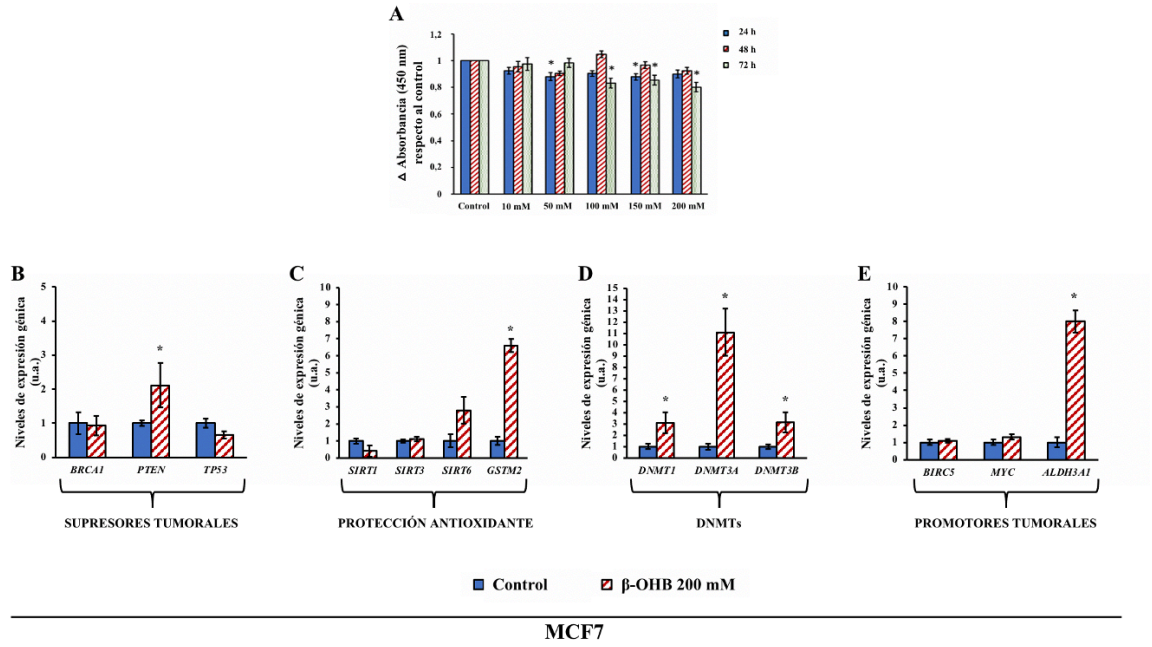


Figura 21. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MCF7 expuesta a tratamiento con ß-hidroxibutirato (ß-OHB). El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1.

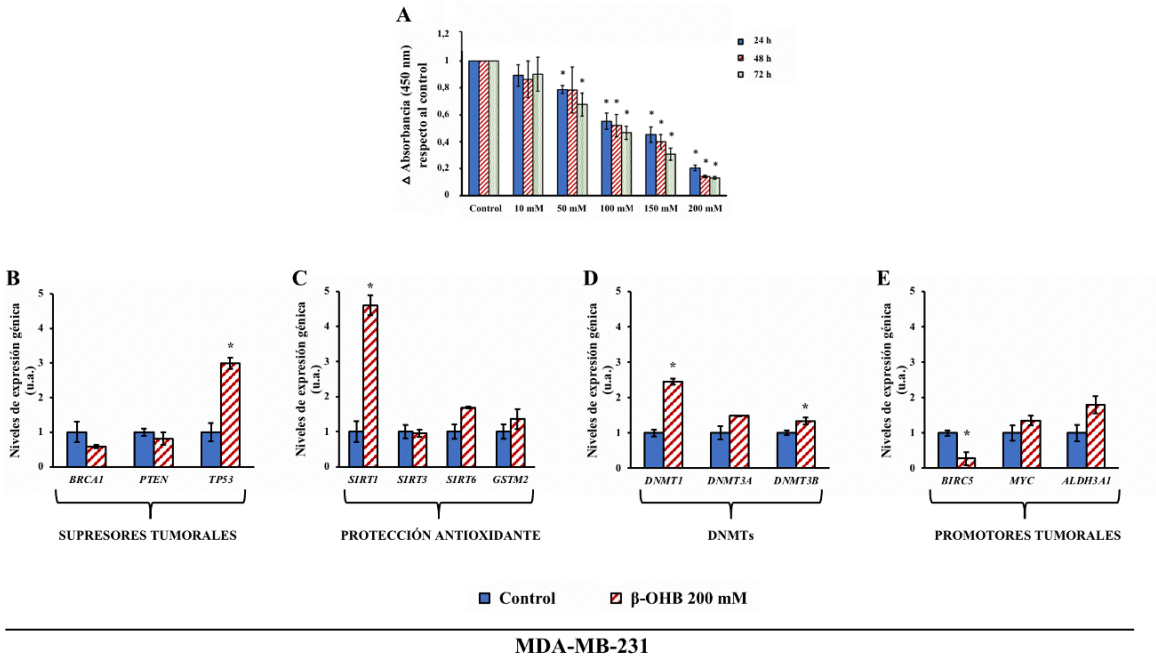


Figura 22. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MDA-MB-231 expuesta a tratamiento con ß-hidroxibutirato (ß-OHB). El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1.

USC DE COMPOSTELA

3.3. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES EN LÍNEAS CELULARES EXPUESTAS A TRATAMIENTO CON SECRETOMAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO

Para analizar el efecto de la obesidad, se evaluó el efecto de la exposición a secretomas de TAV y TAS humano en las tres líneas celulares. En relación con la proliferación celular, se observó un aumento estadísticamente significativo en MCF7 y MDA-MB-231, en las MCF7 ese aumento significativo se produjo a las 72 horas de exposición en TAV y TAS al 5%, y en las MDA-MB-231 el aumento fue significativo a las 48 horas en TAV y TAS al 5% (**Figura 24A, Figura 25A**).

Tras el estudio de la proliferación, se utilizaron secretomas de TAV y TAS al 5% de concentración para evaluar su efecto en las tres líneas celulares sobre la expresión de los genes de interés. En las MCF10A expuestas a secretomas de TAV se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión del gen *DNMT1* (**Figura 23C**) y una disminución de la expresión en *BRCA1* (**Figura 23A**) y *ALDH3A1* (**Figura 23D**) respecto al control de células sin tratar. En las MCF10A expuestas a secretomas de TAS, se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión del gen DNMT1 (**Figura 23G**) y una disminución de la expresión en *BIRC5* y *ALDH3A1* (**Figura 23H**), respecto al control de células sin tratar. En cuanto a las MCF7 expuestas a secretomas de TAV, se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de los genes *SIRT1* (**Figura 24C**), *DNMT1*, (**Figura 24D**) y *ALDH3A1* (**Figura 24E**), y una disminución de la expresión en *TP53* (**Figura 24B**), respecto al control de células sin tratar. En las MCF7 expuestas a secretomas de TAS, se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de los genes *BRCA1* (**Figura 24F**), *SIRT6* (**Figura 24G**), *DNMT1*, (**Figura 24H**) y *ALDH3A1* (**Figura 24I**), y una disminución de la expresión en *PTEN*, *TP53* (**Figura 24F**) y *MYC* (**Figura 24I**), respecto al control de células sin tratar. En las MDA-MB-231 expuestas a secretomas de TAV, se observó un aumento estadísticamente significativo en el gen *BIRC5* (**Figura 25E**), respecto al control de células sin tratar. En las MDA-MB-231 expuestas a secretomas de TAS, se observó un aumento estadísticamente significativo en el gen *TP53* (**Figura 25F**), *SIRT3* (**Figura 25G**) y *BIRC5* (**Figura 25I**), respecto al control de células sin tratar.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

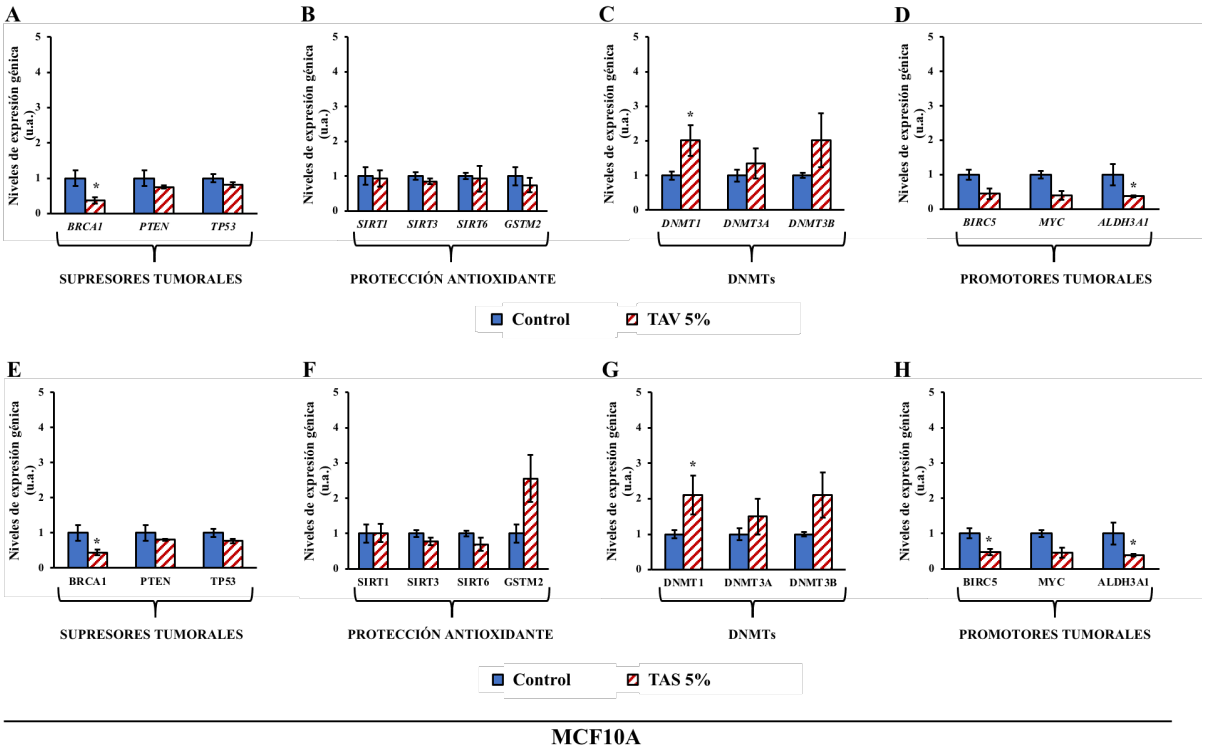


Figura 23. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MCF10A expuesta a tratamiento con secretomas de tejido adiposo humano. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1; TAV, tejido adiposo visceral; TAS, tejido adiposo subcutáneo.

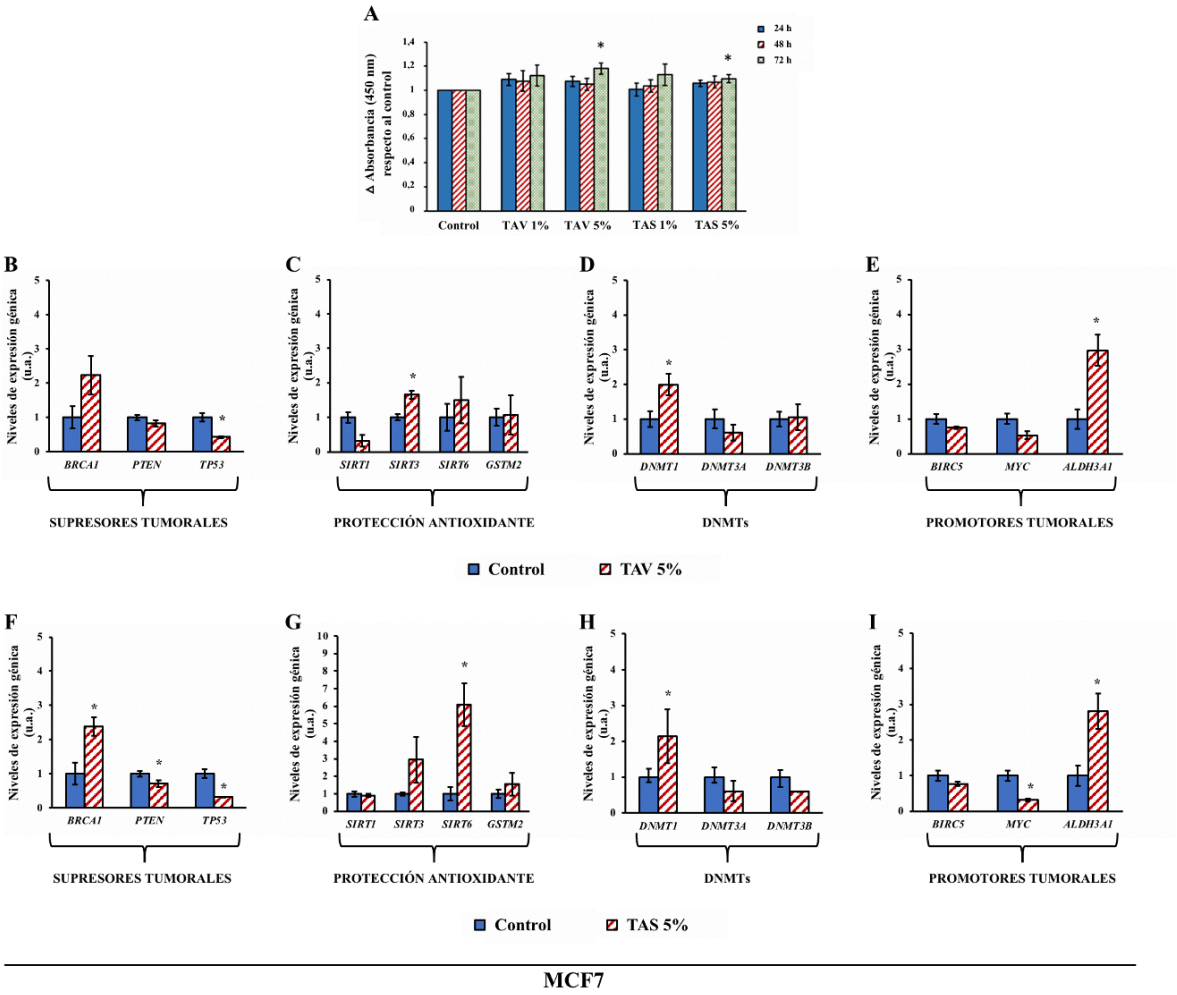


Figura 24. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MCF7 expuesta a tratamiento con secretomas de tejido adiposo humano. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1; TAV, tejido adiposo visceral; TAS, tejido adiposo subcutáneo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

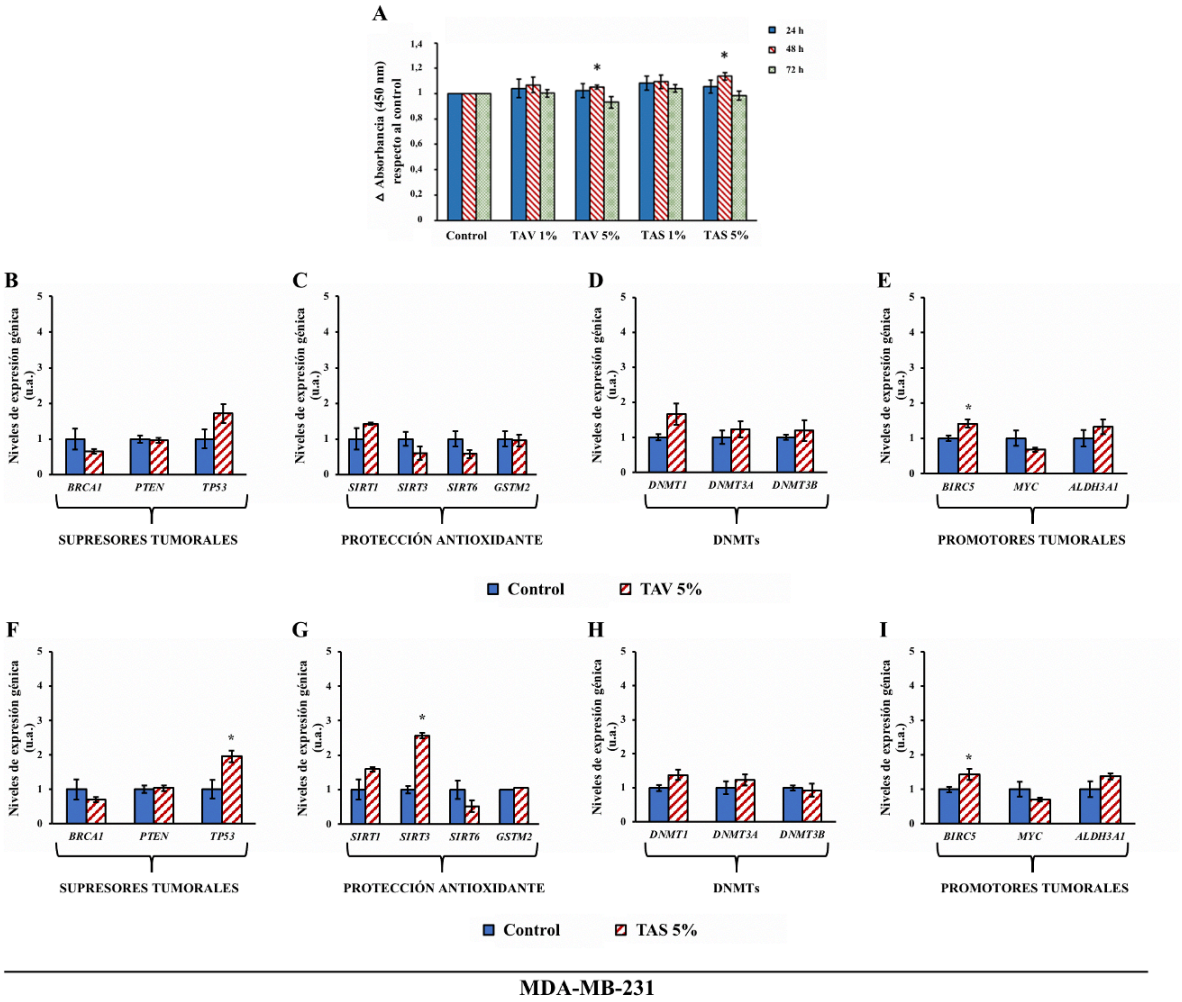


Figura 25. Proliferación celular y niveles de expresión génica en la línea celular MDA-MB-231 expuesta a tratamiento con secretomas de tejido adiposo humano. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente signitificativas ($p < 0,05$) respecto al control evaluado mediante la prueba *t* de Student. *BRCA1*, breast cancer 1; *PTEN*, homólogo de fosfatasa y tensina; *TP53*, proteína tumoral 53; *SIRT*, sirtuina; *GSTM2*, glutatión S-transferasa Mu 2; *DNMT*, ADN metiltransferasa; *BIRC5*, baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; *MYC*, myelocytomatosis; *ALDH3A1*, aldehído deshidrogenasa 3A1; TAV, tejido adiposo visceral; TAS, tejido adiposo subcutáneo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO II. ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOMODULADOR Y EPIGENÉTICO DE UNA DIETA CETOGÉNICA MUY BAJA EN CALORÍAS

1. ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE UNA DIETA CETOGÉNICA MUY BAJA EN CALORÍAS EN PACIENTES CON OBESIDAD

Se evaluó el efecto de la cetosis nutricional y la pérdida de peso inducida por una VLCKD sobre el perfil inflamatorio y de estrés oxidativo en comparación con una LCD y BS en pacientes con obesidad. Para ello, se analizó una batería de citoquinas y varios biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo.

1.1. DIFERENCIAS EN LOS NIVELES CIRCULANTES DE CITOQUINAS SEGÚN LA ADIPOSIDAD

Para evaluar el efecto de los tratamientos de pérdida de peso sobre las citoquinas, primero se evaluaron los niveles de citoquinas en relación con el exceso de adiposidad (**Tabla 11**). Así, la cohorte de pacientes con exceso de peso corporal se clasificó según su IMC en sobrepeso (IMC 25-29,9), obesidad (IMC 30-39,9), obesidad severa (IMC ≥ 40) y se comparó con un grupo de sujetos con normopeso (IMC < 25). En relación con la composición corporal, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Tabla 10, Figura 26A**). En estas condiciones, las citoquinas relacionadas con la inflamación y la carcinogénesis mostraron niveles elevados en pacientes con obesidad en comparación con los individuos con normopeso (**Tabla 11**), como April (**Figura 26B**), MMP3 (**Figura 26D**), TNF-R1 y TNF-R2. Por el contrario, las citoquinas que muestran propiedades antiinflamatorias y de homeostasis metabólica, como GP130, IL-12 (p40) (**Figura 26C**) y Tweak (**Figura 26E**), tuvieron niveles más elevados en sujetos con normopeso que en los individuos con obesidad. En relación con las demás citoquinas evaluadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos relacionados con la adiposidad (**Tabla 11**). La **Figura 26** representa aquellas citoquinas cuya concentración circulante mostró diferencias según el fenotipo de obesidad y además también se modificaron después de las terapias de pérdida de peso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Características basales de los sujetos del estudio según adiposidad.

Variables	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	Obesidad severa	*p*-valor
N	32	8	44	27	
Género (hombres/mujeres)	12/20	6/2	13/31	2/25	**<0,001‡**
Edad (años)	35,9±9,67	37,9±9,41	45,3±9,88*	41,5±8,10	**0,001**
Altura (m)	1,68±0,09	1,66±0,11	1,64±0,09	1,63±0,10	0,252
Peso corporal (kg)	64,7±9,20	78,1±8,18	96,5±13,1*†	133,1±21,5*†¥	**<0,001**
IMC (kg/m^2)	22,7±1,68	27,9±1,46*	34,7±2,58*†	49,3±8,96*†¥	**<0,001**
FM (kg)[a]	24,0±7,01	27,7±2,50	40,9±9,52*†	60,5±7,83*†¥	**<0,001**
FFM (kg)[a]	47,1±8,99	44,8±6,44	54,4±11,1	54,8±12,8	0,062

Los datos muestran la media ± desviación estándar. El *p*-valor se calculó con ANCOVA ajustado por edad y sexo. ‡ el valor de *p* se calculó con Chi-cuadrado. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con individuos con normopeso. † denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con sobrepeso. ¥ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con obesidad. IMC, índice de masa corporal; FM, masa grasa; FFM, masa libre de grasa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 11. Niveles circulantes de citoquinas de los sujetos del estudio según adiposidad.

Variables	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	Obesidad severa	*p*-valor
April (ng/mL)	37,9±21,4	65,3±40,3	90,4±37,9*	110±64,7*	**<0,001**
BAFF (pg/mL)	3703±1161	3617±1083	4215±1879	3950±2207	0,886
CD163 (ng/mL)	63,3±49,6	34,4±12,4	56,2±33,0	64,0±47,3	0,125
CD30 (pg/mL)	157±66,5	128±43,0	197±99,7	199±136	0,224
Chitanase (pg/mL)	4837±2053	3974±1387	5835±4421	7060±4977	0,142
Gp130 (ng/mL)	38,2±16,3	34,7±19,7	22,2±8,09*	22,4±13,2*	**<0,001**
IFN-α2 (pg/mL)	-	-	14,4±4,40	16,4±4,77	0,228
IFN-β (pg/mL)	30,0±11,1	-	30,4±16,3	32,1±17,7	0,459
IFN-γ (pg/mL)	22,1±39,7	3,15±5,92	12,4±10,9	13,6±14,3	0,279
IL-2 (pg/mL)	-	-	7,39±3,06	8,68±4,96	0,240
IL-6R (pg/mL)	3454±1340	3733±1296	4064±2777	4315±3340	0,793
IL-11 (pg/mL)	3,32±1,41	2,40±0,35	3,90±2,48	3,67±2,17	0,065
IL-12(p40) (pg/mL)	62,8±58,7	23,4±29,7*	24,1±24,5*	27,7±24,0*	**0,006**
IL-12(p70) (pg/mL)	-	-	1,09±0,35	0,97±0,42	0,439
IL-22 (pg/mL)	47,9±147	3,29±6,19	7,98±11,4	5,38±8,25	0,071
IL-26 (pg/mL)	-	-	-	-	-
IL-28A (pg/mL)	-	-	20,3±8,27	17,8±8,89	0,349
IL-29 (pg/mL)	-	-	-	-	-
IL-35 (pg/mL)	-	-	104±84,5	109±147	0,830
MMP1 (pg/mL)	242±385	77,8±87,0	307±470	181±226	0,458
MMP3 (pg/mL)	4991±2876	7885±8224	11015±7815*	6675±5525	**0,025**
Osteocalcina (pg/mL)	1222±610	1165±581	1438±914	1155±1049	0,811
Pentraxin-3 (pg/mL)	955±749	549±218	630±360	839±684	0,302
TNF-R1 (pg/mL)	650±204	599±244	1030±572*	1159±790*†	**0,011**
TNF-R2 (pg/mL)	208±56,4	258±89,8	541±388*	642±601*	**0,003**
TSLP (pg/mL)	59,8±21,3	52,8±29,6	72,8±32,8	62,9±30,2	0,372
Tweak (pg/mL)	174±69,3	158±50,2	221±122	130±76,0¥	**0,013**

Los datos de los biomarcadores se han incluido cuando se detectaron niveles en un número de muestras n ≥ 8. Los datos muestran la media ± desviación estándar. El *p*-valor se calculó con ANCOVA ajustado por edad y sexo. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con individuos con normopeso. † denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con sobrepeso. ¥ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con obesidad. April, ligando inductor de la proliferación; BAFF, factor activador de células B; CD, grupo de diferenciación; Gp, glicoproteína; IFN, interferón; IL, interleucina; MMP, metaloproteinasa de matriz; TNF-R, receptor del factor de necrosis tumoral; TSLP, linfopoyetina del estroma tímico; Tweak, inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

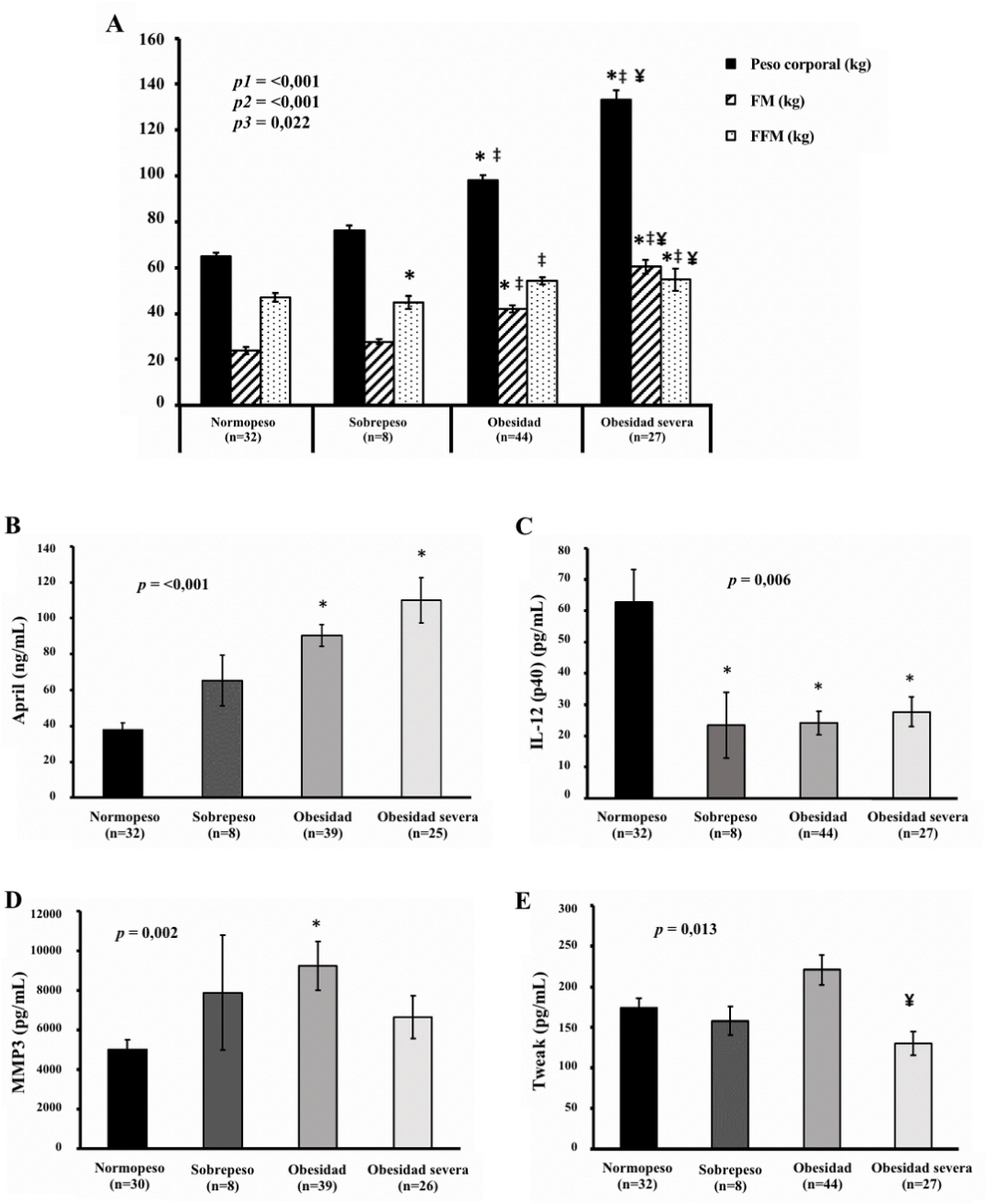


Figura 26. Comparación de la composición corporal y niveles circulantes de citoquinas según la adiposidad basal. (**A**) Diferencias en peso corporal, masa grasa (FM) y masa libre de grasa (FFM) entre individuos con normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad severa. (**B**) Diferencias en los niveles del ligando inductor de la proliferación (April) entre individuos con normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad severa. (**C**) Diferencias en los niveles de interleucina-12 (p40) (IL-12 (p40)) entre individuos con normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad severa. (**D**) Diferencias en los niveles de metaloproteinasa de matriz-3 (MMP3) entre individuos con normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad severa. (**E**) Diferencias en los niveles del inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (Tweak) entre individuos con normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad severa. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. El valor *p* se calculó con ANOVA o ANCOVA ajustado por edad y sexo, según correspondió. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con normopeso. ‡ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con las personas con sobrepeso. ¥ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con obesidad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2. CAMBIOS EN LOS NIVELES CIRCULANTES DE CITOQUINAS DESPUÉS DE LAS TERAPIAS DE PÉRDIDA DE PESO

Las características basales y los cambios inducidos por los tratamientos de pérdida de peso en el peso corporal, la composición corporal y los parámetros bioquímicos se muestran en la **Tabla 12**. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de tratamientos tanto en el peso corporal, como en la composición corporal. Asimismo, también se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de las terapias en el peso corporal, composición corporal y parámetros bioquímicos como los cuerpos cetónicos y el HOMA-IR.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 12. Cambios inducidos por los tratamientos de pérdida de peso en el peso corporal, la composición corporal y parámetros bioquímicos.

Variables	VLCKD (n=20)			LCD (n=20)			BS (n=39)			ANOVA *p*-valor		
	Basal (0 meses)	Final (2-3 meses)	Seguimiento (4-6 meses)	Basal (0 meses)	Final (2 meses)	Seguimiento (6 meses)	Basal (0 meses)	Final (3 meses)	Seguimiento (6 meses)	Tiempo	Estudio	Tiempo* estudio
Peso corporal (kg)	96.0±16.3	84.2±13.0‡	76.6±11.1‡†*	93.0±13.2	89.0±12.5‡	87.6±12.3‡†*	121.3±21.5	88.9±13.4‡	81.7±14.3‡†*	**<0.001**	**<0.001**	**<0.001**
FM (kg)	42.2±9.2	35.0±7.8‡	25.7±5.8‡†*	34.6±8.3	31.4±7.6‡	30.7±7.6‡†*	62.57±14.9	38.9±7.1‡	31.7±8.2‡†*	**<0.001**	**0.012**	**<0.001**
FFM (kg)	52.8±10.3	48.6±9.3‡	49.1±9.7‡*	58.3±11.7	57.6±11.6‡	56.9±11.2‡†*	56.7±9.9	49.3±9.6‡	49.6±8.5‡*	**<0.001**	**0.002**	**<0.001**
ß-OHB (mmol/L)	0.3±0.02	1.34±0.13‡	0.24±0.18‡†*	0.39±0.01	0.38±0.02	0.38±0.01	0.45±0.26	0.51±0.29	0.44±0.30	**<0.001**	0.942	**<0.001**
HOMA-IR	4.43±2.37	1.53±0.47‡	1.71±0.57‡*	3.28±1.54	1.65±0.93‡	1.98±2.31‡*	5.21±2.86	2.52±1.18‡	2.10±1.24‡†*	**<0.001**	**0.029**	0.055

Los datos representan media ± desviación estándar. Asterisco (*) denota cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo evaluado mediante ANOVA de medidas repetidas dentro de cada tratamiento de pérdida de peso. ‡ Denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al valor basal (0 meses) evaluados mediante la prueba *t* de Student dentro de cada tratamiento de pérdida de peso. † Denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al punto de 2-3 meses evaluado mediante la prueba *t* de Student dentro de cada tratamiento de pérdida de peso. VLCKD, dieta cetogénica muy baja en calorías; LCD, dieta baja en calorías; BS, cirugía bariátrica; ß-OHB, ß-hidroxibutirato; HOMA-IR, índice de resistencia a la insulina.

Tras el efecto de los diferentes tratamientos de pérdida de peso, se observaron cambios en varias citoquinas (**Tabla 13**). Estos cambios fueron estadísticamente significativos en los niveles circulantes de April, CD163, CD30, IFN-β, IFN-γ, IL-2, IL-11, IL-12(p40), IL-28A, MMP1, Osteocalcina, Pentraxin-3 y Tweak. Los niveles circulantes de Osteocalcina mostraron una interacción entre los grupos. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los estudios en MMP3 y Pentraxin-3. Además de las citoquinas anteriores, también se obtuvieron cambios estadísticamente significativos en los niveles circulantes de BAFF y TSLP después de VLCKD, en IL-29 después de LCD y en Osteocalcina después de BS (**Tabla 13**). La modulación de las citoquinas circulantes inducida por VLCKD fue particularmente evidente en el punto de cetosis máxima (2-3 meses) (**Tabla 13**). Cuando el análisis de las diferencias con respecto al valor inicial en los niveles de citoquinas entre los tratamientos de pérdida de peso se ajustó para el IMC inicial y pérdida de peso, persistieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los cambios de IFN-β, IFN-γ e IL-2 (**Tabla 13**).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 13. Cambios inducidos por los tratamientos de pérdida de peso en las citoquinas y biomarcadores de estrés oxidativo.

Variables[a]	VLCKD (n = 20)			LCD (n = 20)			BS (n =36)			ANOVA *p*-valor		
	Basal (0 meses)	Final (2-3 meses)	Seguimiento (4-6 meses)	Basal (0 meses)	Final (2 meses)	Seguimiento (6 meses)	Basal (0 meses)	Final (3 meses)	Seguimiento (6 meses)	Tiempo	Estudio	Tiempo * Estudio
April	89370±35152	93837±29710	96733±35588	88718±31585	90680±31110	90637±34628	104552±66852	123402±79404	129227±77569‡*	**0,039**	0,136	0,171
BAFF	3913±1472	3815±1435	3552±1402‡*	4299±1327	3980±1228	4117±1995	4025±2284	4000±1981	4084±2231	0,511	0,779	0,755
CD163	51040±21750	43471±22403	40829±19876‡*	68338±30499	57882±24654‡	56256±26380‡*	62246±48978	58291±39634	62021±35394	**0,047**	0,200	0,328
CD30	191±88,6	238±185	239±240	178±80,9	204±120	166±59,8	198±132	290±274	284±154‡*	**0,018**	0,266	0,056
Chitanase	6186±5432	4767±1942	4415±2230	6084±3563	5452±2757	5310±2969	6591±5167	6940±4811	6590±3660	0,125	0,290	0,388
Gp130	21850±5914	26396±14260	24009±8242	23669±7140	22603±7105	21297±6607	20355±13026	20815±9887	21930±9115	0,706	0,479	0,276
IFN-α2	15,07±4,32	26,67±19,66	24,90±22,36	-	-	-	15,33±5,62	15,30±2,19	16,40±4,35	-	-	-
IFN-β	33,60±16,20	48,80±24,20‡	44,28±17,86‡*	30,40±16,30	31,04±19,60	29,11±15,90	35,14±17,53	37,57±21,98	41,43±24,01	**0,017**	0,250	0,099
IFN-γ	16,50±10,53	38,78±21,39‡	20,35±13,35†*	14,60±6,80	19,32±5,71	16,56±8,68	21,79±11,22	26,72±15,03‡	30,10±16,44‡*	**0,006**	0,122	0,241
IL-2	7,13±3,34	22,65±13,72‡	11,73±7,68‡†*	6,85±2,14	13,19±15,46	8,48±2,76‡*	9,08±3,96	11,76±4,95‡	12,27±5,04‡*	**<0,001**	0,090	0,283
IL-6R	4436±3801	4973±3059	3817±1158	4181±1237	4215±1045	3895±1230	3993±3316	3840±1734	3738±1535	0,282	0,575	0,282
IL-11	3,32±1,75	5,59±3,71‡	4,39±1,99‡†*	2,97±0,94	4,00±1,62‡	3,50±1,36‡*	4,34±3,32	4,74±2,75	6,05±5,58	**0,004**	0,209	0,412
IL-12p40	30,42±28,59	50,14±36,15‡	40,51±35,51†*	25,25±20,08	32,64±20,81	29,84±19,41	40,26±20,31	54,16±32,46‡	50,95±29,57‡*	**0,011**	0,142	0,711
IL-12p70	1,19±0,40	1,41±0,64	1,16±0,35	0,91±0,13	0,97±0,44	1,05±0,30	0,96±0,28	0,99±0,42	0,96±0,29	0,534	0,173	0,470
IL-22	15,61±2,90	22,84±17,57	18,41±5,34	16,40±6,76	18,66±8,95	19,29±10,72	16,49±9,26	19,18±8,89	18,64±10,68	0,071	0,980	0,970
IL-26	27,70±18,66	29,57±17,93	27,57±18,18	25,69±16,69	27,67±18,29	25,34±16,88	30,07±14,13	36,38±20,15	36,67±24,92	0,376	0,340	0,344
IL-28A	18,37±7,30	23,05±11,77	21,11±10,16	20,28±9,19	19,82±7,34	21,76±8,44	20,02±8,50	22,62±10,01	25,10±9,54‡*	**0,017**	0,805	0,487
IL-29	39,69±28,30	57,42±50,38	43,24±23,49	46,18±24,26	57,36±30,89	60,76±34,08‡*	-	-	-	-	-	-
IL-35	91,32±69,98	145,60±123,68	115,81±99,27	97,99±103,38	117,82±164,75	132,20±188,70	133,26±148,12	150,38±135,76	139,46±105,44	0,099	0,879	0,655
MMP1	318±320	611±569‡	415±357*	194±75,15	261±111	249±117	268±222	417±245‡	407±257‡*	**<0,001**	0,120	0,289

Continúa

Tabla 13. Continuación

Variables[a]	VLCKD (n = 20)			LCD (n = 20)			BS (n =36)			ANOVA *p*-valor		
	Basal (0 meses)	Final (2-3 meses)	Seguimiento (4-6 meses)	Basal (0 meses)	Final (2 meses)	Seguimiento (6 meses)	Basal (0 meses)	Final (3 meses)	Seguimiento (6 meses)	Tiempo	Estudio	Tiempo * Estudio
MMP3	12745±10139	10377±5408	8528±3679	11539±7393	11654±8152	11648±7894	6766±5652	6859±3631	6684±3985	0,090	**0,017**	0,074
Osteocalcina	1515±959	1843±1459	1775±1236	1477±1480	1661±1586	1556±1165	1323±1089	1751±1146‡	2183±1299‡†*	**<0,001**	0,880	**0,006**
Pentraxin-3	627±426	1567±1617‡	922±593‡*	488±185	750±481‡	631±313‡*	904±662	1239±751‡	1430±1155‡*	**<0,001**	**0,029**	0,123
TNF-R1	890±506	965±641	755±465	973±650	911±559	844±405	1208±809	1245±701	1242±667	0,244	0,078	0,432
TNF-R2	539±423	656±511	438±309	538±323	541±360	475±314	655±627	752±563	710±494	0,513	0,280	0,433
TSLP	77,42±36,72	96,24±44,39	76,59±26,12†*	69,40±31,94	75,59±30,53	73,93±37,24	61,95±30,21	68,59±32,20	72,84±39,56	0,155	0,275	0,334
Tweak	214±132	265±148	236±140	177±102	225±124	194±89,1	160±83,41	183±100	200±100‡*	**0,008**	0,210	0,556
MDA	0,68±0,08	0,70±0,08	0,75±0,11‡*	-	-	-	0,70±0,15	0,63±0,07	0,64±0,12	0,754	0,101	**0,003**
AOP	0,53±0,21	0,59±0,24	0,52±0,12	-	-	-	0,38±0,14	0,38±0,18	0,33±0,09	0,381	**0,001**	0,604
8-OHdG	1,89±0,34	1,88±0,87	2,06±0,63	-	-	-	2,04±0,49	2,10±0,73	2,10±0,58	0,332	0,495	0,627

Los datos representan la media ± desviación estándar. [a] Unidades de medición de las citoquinas: pg/mL, de malondialdehído (MDA) y poder antioxidante total (AOP): mM, de 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina (8-OHdG): ng/mL. Asterisco (*) denota cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo evaluados mediante ANCOVA de medidas repetidas dentro de cada tratamiento de pérdida de peso, ajustado por edad y sexo. ‡ Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al valor basal (0 meses) evaluadas mediante la prueba *t* de Student dentro de cada tratamiento de pérdida de peso. † Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al criterio de valoración (2-3 meses) evaluado mediante la prueba *t* de Student dentro de cada tratamiento de pérdida de peso. VLCK, dieta cetogénica muy baja en calorías; LCD, dieta baja en calorías; BS, cirugía bariátrica; April, ligando inductor de la proliferación; BAFF, factor activador de células B; CD, grupo de diferenciación; Gp, glicoproteína; IFN, interferón; IL, interleucina; MMP, metaloproteinasa de matriz; TNF-R, receptor del factor de necrosis tumoral; TSLP, linfopoyetina del estroma tímico; Tweak, inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral.

Para un análisis más detallado, en las siguientes tablas se muestran las comparaciones de las diferencias entre los puntos basal, final y seguimiento en los niveles de citoquinas y biomarcadores de estrés oxidativo entre los distintos tratamientos de pérdida de peso. En este análisis se observaron diferencias estadísticamente significativas en las diferencias entre el punto final y el basal entre los tratamientos en IFN-β, IFN-γ, IL-2, IL-11 y MDA, siendo estas diferencias significativas entre la VLCKD y los otros dos tratamientos (**Tabla 14**).

Tabla 14. Comparación de las diferencias entre el punto final y punto basal en los niveles de citoquinas y biomarcadores de estrés oxidativo entre los tratamientos de pérdida de peso.

Variables[a]	VLCKD	LCD	BS	*p*-valor del estudio
April	4467±31541	1962±13319	13782±57247	0,626
BAFF	-98,20±900	-319±616	-88,79±1211	0,741
CD163	-7569±23413	-10456±17465	-4624±27946	0,737
CD30	46,92±135	25,50±105	73,92±217	0,656
Chitanase	-1419±5981	-631±2211	175±2829	0,379
Gp130	4546±15338	-1066±4992	-674±11081	0,276
IFN-α2	11,60±17,77	1,84±3,34	0,28±5,78	0,078
IFN-β	15,90±18,79	0,65±11,10†	1,00±13,63†	**0,010**
IFN-γ	22,28±19,74	4,72±7,76†	4,03±7,32†	**<0,001**
IL-2	15,53±13,53	6,34±15,37	2,02±4,63†	**0,002**
IL-6R	538±4908	34,40±835	-274±2425	0,682
IL-11	2,28±2,98	1,03±1,05	0,39±1,73†	**0,015**
IL-12p40	19,72±28,97	7,39±14,69	11,75±25,88	0,491
IL-12p70	0,22±0,48	-0,06±0,47	0,03±0,26	0,402
IL-22	3,16±17,72	2,26±8,32	2,39±4,36	0,987
IL-26	1,87±6,50	1,97±6,00	4,61±13,25	0,612
IL-28A	4,68±8,65	-0,46±6,41	3,30±7,90	0,289
IL-29	17,73±49,27	11,18±16,89	-8,13±21,73	0,560
IL-35	54,28±75,40	19,83±69,62	15,22±54,87	0,326
MMP1	293±440	66,24±99,35	135±199	0,110
MMP3	2368±9328	115±4452	111±4234	0,387
Osteocalcina	328±912	184±394	384±906	0,729
Pentraxin-3	939±1568	263±347	300±628	0,054
TNF-R1	75,47±629	-62,87±200	-3,28±513	0,721
TNF-R2	118±595	2,60±126	57,37±403	0,735
TSLP	18,82±42,36	6,20±20,03	6,35±21,33	0,303
Tweak	51,24±103	47,91±90,49	19,60±75,25	0,391
MDA	0,02±0,08	-	-0,07±0,14	**0,031**
AOP	0,06±0,24	-	0,004±0,12	0,435
8-OHdG	-0,02±0,80	-	0,05±0,40	0,778

Los datos representan media ± desviación estándar. [a] Unidades de medición de las citoquinas: pg/mL, de malondialdehído (MDA) y poder antioxidante total (AOP): mM, de 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina (8-OHdG): ng/mL. El valor *p* se calculó con ANCOVA ajustado por edad, sexo y niveles iniciales. † diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con la dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD). LCD, dieta baja en calorías; April, ligando inductor de la proliferación; BAFF, factor activador de células B; CD, grupo de diferenciación; Gp, glicoproteína; IFN, interferón; IL, interleucina; MMP, metaloproteinasa de matriz; TNF-R, receptor del factor de necrosis tumoral; TSLP, linfopoyetina del estroma tímico; Tweak, inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a las diferencias entre el punto de seguimiento y el basal, se observaron diferencias estadísticamente entre los tratamientos en CD30, Osteocalcina y MDA, siendo estas diferencias significativas entre la BS y la LCD en CD30 y Osteocalcina y entre VLCKD y BS en MDA (**Tabla 15**).

Tabla 15. Comparación de las diferencias entre el punto de seguimiento y punto basal en los niveles de citoquinas y biomarcadores de estrés oxidativo entre los tratamientos de pérdida de peso.

Variables[a]	VLCKD	LCD	BS	*p*-valor del estudio
April	4353±24168	2856±18335	24675±55593	0,115
BAFF	-853±1635	-201±1072	38,72±2479	0,285
CD163	-16154±25674	-8218±14958	143±36787	0,162
CD30	17,30±184	-10,45±51,84‡	86,22±116	**0,036**
Chitanase	-2094±5722	-685±1689	-113±3465	0,237
Gp130	687±6756	-1114±5673	661±12238	0,782
IFN-α2	7,51±19,25	-	1,07±3,85	0,368
IFN-β	9,87±10,23	0,47±7,97	6,58±16,77	0,156
IFN-γ	4,94±10,87	1,75±3,37	10,01±13,99	0,127
IL-2	4,37±6,06	1,79±1,89	3,30±4,56	0,294
IL-6R	-593±3439	-122±824	-361±2608	0,848
IL-11	1,12±1,43	0,64±0,93	1,71±4,01	0,419
IL-12p40	10,01±21,50	4,84±7,63	10,98±20,20	0,658
IL-12p70	-0,004±0,32	0,07±0,29	0,005±0,21	0,849
IL-22	3,86±4,12	2,60±6,54	-2,44±13,80	0,384
IL-26	0,96±9,83	-0,44±3,41	6,24±23,97	0,382
IL-28A	3,08±6,98	0,61±7,24	5,95±8,17	0,207
IL-29	1,89±19,67	16,42±17,85	-2,39±13,53	0,087
IL-35	24,84±41,54	34,40±81,94	6,20±67,79	0,593
MMP1	-41,83±465	49,78±94,39	139±172	0,279
MMP3	-3574±7641	269±2774	-81,37±5065	0,057
Osteocalcina	303±809	92,38±554‡	864±833†	**0,003**
Pentraxin-3	329±596	162±195	500±767	0,177
TNF-R1	-189±466	-127±332	34,74±732	0,262
TNF-R2	-112±417	-58,18±146	55,34±487	0,343
TSLP	1,52±26,52	4,52±17,79	10,89±28,27	0,441
Tweak	7,79±78,78	14,73±33,92	39,80±84,52	0,281
MDA	0,07±0,12	-	-0,06±0,10	**0,003**
AOP	-0,01±0,23	-	-0,05±0,10	0,604
8-OHdG	0,17±0,72	-	0,05±0,33	0,627

Los datos representan media ± desviación estándar. [a] Unidades de medición de las citoquinas: pg/mL, de malondialdehído (MDA) y poder antioxidante total (AOP): mM, de 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina (8-OHdG): ng/mL. El valor *p* se calculó con ANCOVA ajustado por edad, sexo y niveles iniciales. † diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con la dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD) y ‡ diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con la cirugía bariátrica (BS). LCD, dieta baja en calorías; April, ligando inductor de la proliferación; BAFF, factor activador de células B; CD, grupo de diferenciación; Gp, glicoproteína; IFN, interferón; IL, interleucina; MMP, metaloproteinasa de matriz; TNF-R, receptor del factor de necrosis tumoral; TSLP, linfopoyetina del estroma tímico; Tweak, inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por último, en relación con las diferencias entre el punto de seguimiento y el punto final, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en IFN-γ, IL-2, IL-11, Osteocalcina, Pentraxin-3, TSLP, Tweak y MDA, siendo estas diferencias significativas entre la VLCKD y los otros dos tratamientos de pérdida de peso (**Tabla 16**).

Tabla 16. Comparación de las diferencias entre el punto de seguimiento y punto final en los niveles de citoquinas y biomarcadores de estrés oxidativo entre los tratamientos de pérdida de peso.

Variables[a]	VLCKD	LCD	BS	*p*-valor del estudio
April	2895±28920	-43,46±18100	2174±41502	0,965
BAFF	-263±759	137±1091	-33,50±2414	0,810
CD163	-2642±17848	-1625±8829	5668±26772	0,354
CD30	0,76±130	-37,48±90,74	12,81±231	0,663
Chitanase	-352±2236	-142±2191	-207±3672	0,978
Gp130	-2387±16501	-1306±4936	4333±19754	0,346
IFN-α2	-2,30±7,23	-	-1,32±8,39	0,787
IFN-β	-4,83±12,78	-1,94±8,53	5,09±19,63	0,168
IFN-γ	-22,30±21,82	-2,43±7,76[†]	3,11±10,48[†]	**<0,001**
IL-2	-14,09±18,01	-4,71±15,69	0,75±5,44[†]	**0,007**
IL-6R	-1156±3681	-320±851	544±2863	0,143
IL-11	-1,20±2,30	-0,50±1,00	1,12±3,99[†]	**0,038**
IL-12p40	-9,06±15,46	-1,85±14,03	-0,25±27,82	0,495
IL-12p70	-0,25±0,68	0,07±0,16	-0,03±0,21	0,410
IL-22	-7,16±13,67	0,62±6,09	12,68±37,52	0,301
IL-26	-1,97±7,54	-2,32±5,27	0,97±12,22	0,700
IL-28A	-1,93±8,42	1,94±6,01	3,26±7,35	0,183
IL-29	-17,30±44,56	3,81±21,00	5,28±31,68	0,131
IL-35	-29,79±52,14	14,38±31,24	-10,92±36,88	0,083
MMP1	-196±351	-11,36±115	-3,45±198	0,076
MMP3	-1849±2929	-5,99±4236[†]	233±3552[†]	0,208
Osteocalcina	-67,98±1082	-105±550	749±1478	**0,030**
Pentraxin-3	-645±1462	-120±281	246±873[†]	**0,017**
TNF-R1	-210±608	-66,75±242	11,55±493	0,330
TNF-R2	-218±421	-65,75±125	-18,05±389	0,183
TSLP	-19,65±34,03	-1,67±23,04	5,06±30,88[†]	**0,033**
Tweak	-29,69±67,93	-30,61±79,66	28,41±87,52	**0,023**
MDA	0,05±0,12	-	0,007±0,10	**0,031**
AOP	-0,08±0,21	-	-0,05±0,13	0,759
8-OHdG	0,18±0,70	-	0,0008±0,40	0,422

Los datos representan media ± desviación estándar. [a] Unidades de medición de las citoquinas: pg/mL, de malondialdehído (MDA) y poder antioxidante total (AOP): mM, de 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina (8-OHdG): ng/mL. El valor *p* se calculó con ANCOVA ajustado por edad, sexo y niveles iniciales. [†] diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con la dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD). LCD, dieta baja en calorías; April, ligando inductor de la proliferación; BAFF, factor activador de células B; CD, grupo de diferenciación; Gp, glicoproteína; IFN, interferón; IL, interleucina; MMP, metaloproteinasa de matriz; TNF-R, receptor del factor de necrosis tumoral; TSLP, linfopoyetina del estroma tímico; Tweak, inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral.

La **Figura 27** representa las diferencias con respecto al valor inicial después de los tratamientos de pérdida de peso en aquellas citoquinas que mostraron diferencias en el análisis previo según

el grado de adiposidad. Así, se puede observar que los niveles circulantes de April aumentan después de los tratamientos, obteniendo cambios significativos en BS, pero no se observaron cambios estadísticamente significativos después de VLCKD y LCD (**Figura 27A**). Los niveles circulantes de IL-12(p40) (**Figura 27B**) aumentan en el punto de 2-3 meses de los tratamientos de pérdida de peso en las tres terapias, encontrándose diferencias estadísticamente significativas sólo en VLCKD y BS. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MMP3 entre los tratamientos, pero se observaron diferencias entre las terapias de pérdida de peso, donde VLCKD produce una disminución en los niveles de MMP3 en comparación con los otros tratamientos que no llega a alcanzar la significación (**Figura 27C**). Los niveles de Tweak (**Figura 27D**) aumentan en los tres tratamientos, produciendo una tendencia a volver a los niveles iniciales en VLCKD y LCD. Sin embargo, en BS el aumento se mantuvo hasta el final del seguimiento, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles basales en ambos puntos.

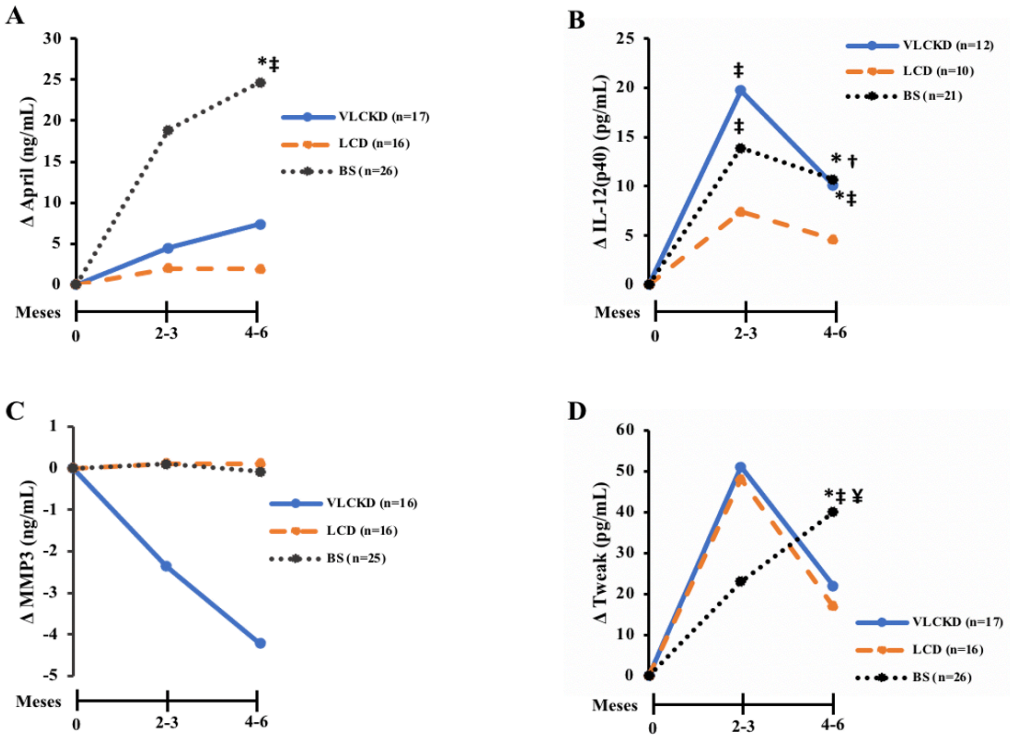


Figura 27. Cambios en los niveles circulantes de citocinas durante una dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD), una dieta hipocalórica (LCD) o una cirugía bariátrica (BS). (**A**) Cambios respecto al valor inicial en el ligando inductor de proliferación (April) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**B**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes de interleucina-12 (p40) (IL-12 (p40)) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**C**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes de metaloproteinasa de matriz-3 (MMP3) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**D**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes del inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (Tweak) durante los tratamientos de pérdida de peso. Los datos muestran diferencias en comparación con el valor inicial durante el transcurso de la intervención. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con ANCOVA de medidas repetidas ajustado por edad y los niveles iniciales de citoquinas. Asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) durante la duración de la intervención (de 0 a 4-6 meses). ‡ Denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en relación con el inicio. † Denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en relación con el punto de 2-3 meses. ¥ Denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre tratamientos en comparación con el valor inicial.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además, se observaron otros cambios estadísticamente significativos en los niveles de citoquinas circulantes y sus cambios con respecto al valor inicial, los cuales se muestran en la **Figura 28**. Los niveles de CD163 tendieron a disminuir después de los tratamientos, con una tendencia a volver a los niveles iniciales al final del seguimiento en BS (**Figura 28A**). Los niveles circulantes de CD30 (**Figura 28B**), IFN-β (**Figura 28C**), IFN-γ (**Figura 28D**), IL-2 (**Figura 28E**), IL-11 (**Figura 28F**), MMP1 (**Figura 28H**), Osteocalcina (**Figura 28I**) y Pentraxina-3 (**Figura 28J**) tendieron a aumentar en el punto de 2-3 meses de los tratamientos de pérdida de peso en las tres terapias, con una tendencia a volver a los niveles iniciales al final del seguimiento en VLCKD y LCD, y en CD30 en BS. Este aumento fue estadísticamente significativo después de VLCKD en los niveles circulantes de IFN-γ y MMP1, y en BS en CD30, IFN-γ y MMP1. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en las diferencias entre el punto de 4-6 meses y el inicio en los niveles de Osteocalcina (**Tabla 15**), y entre el punto de 2-3 meses y el inicio en los niveles de IFN-γ, IFN-β, IL-2 e IL-11 (**Tabla 14**), y entre el punto de 4-6 meses y el punto de 2-3 meses en los niveles de IFN-γ y Osteocalcina (**Tabla 16**). Del mismo modo la IL-28A (**Figura 28G**) aumenta en el punto de 2-3 meses de los tratamientos de pérdida de peso en la VLCKD y BS, con una disminución de sus niveles al final del seguimiento en la VLCKD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

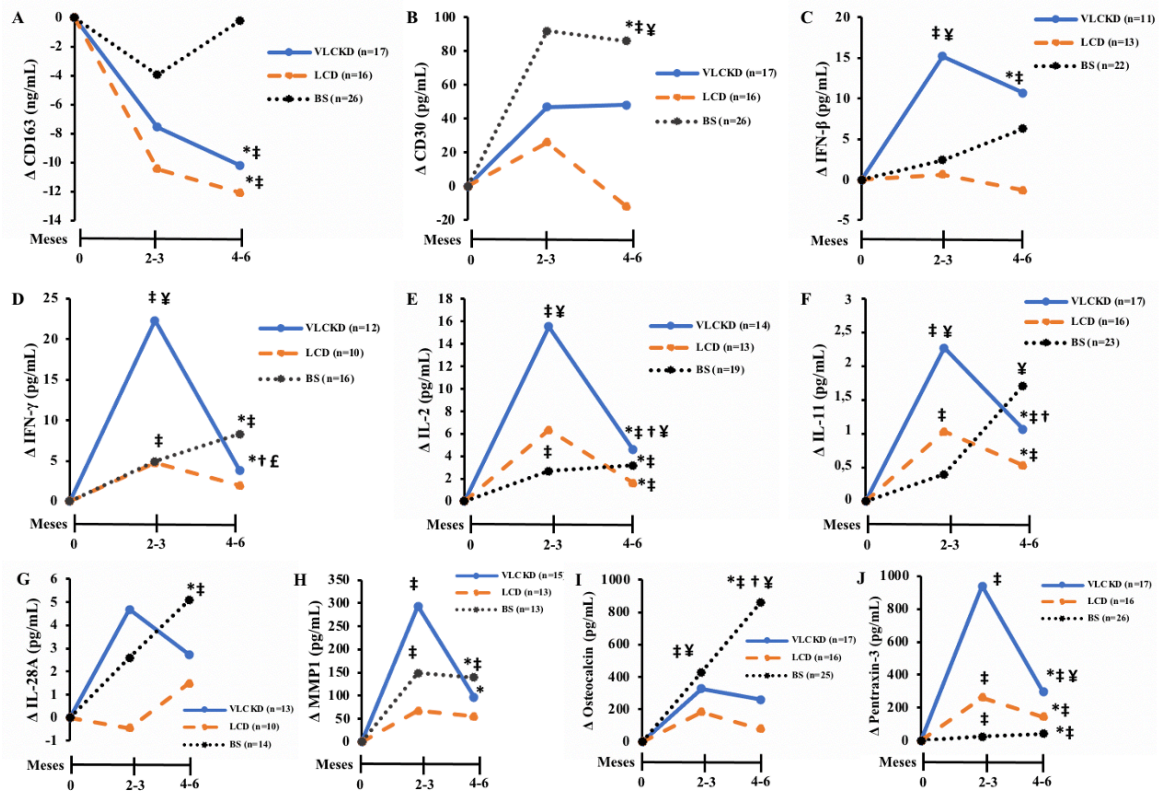


Figura 28. Cambios en los niveles circulantes de citocinas durante una dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD), una dieta hipocalórica (LCD) o una cirugía bariátrica (BS). (**A**) Cambios en comparación con el valor inicial en el grupo de diferenciación 163 (CD163) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**B**) Cambios en comparación con el valor inicial en el grupo de diferenciación 30 (CD30) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**C**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes de interferón-β (IFN-β) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**D**) Cambios en comparación al valor inicial en inferferón-γ (IFN-γ) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**E**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes de interleucina-2 (IL-2) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**F**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes de interleucina-11 (IL-11) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**G**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes de interleucina-28A (IL-28A) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**H**) Cambios respecto al valor inicial en la metaloproteinasa de matriz-1 (MMP1) durante los tratamientos de pérdida de peso. (**I**) Cambios respecto al valor inicial en los niveles circulantes de osteocalcina durante los tratamientos de pérdida de peso. (**J**) Cambios en comparación con el valor inicial en los niveles circulantes de Pentraxina-3 durante los tratamientos de pérdida de peso. Los datos muestran diferencias en comparación con el valor inicial durante el transcurso de la intervención. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con ANCOVA de medidas repetidas ajustado por edad y niveles iniciales de citoquinas. Asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) durante la duración de la intervención (de 0 a 4-6 meses). ‡ Denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con el inicio. † Denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con el punto de 2-3 meses. ¥ Denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos en comparación con el valor inicial. £ Denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos en comparación con el punto de 2-3 meses.

1.3. Cambios en los niveles circulantes de biomarcadores de estrés oxidativo después de las terapias de pérdida de peso

Los marcadores de estrés oxidativo se evaluaron después de los tratamientos de pérdida de peso con VLCKD o BS. No se observaron cambios estadísticamente significativos después de los tratamientos de pérdida de peso en AOP u 8-OHdG, pero se observó un aumento

USC DE COMPOSTELA

estadísticamente significativo en MDA en pacientes después de VLCKD (**Tabla 13**). Además, se observó una interacción en MDA entre ambos tratamientos de pérdida de peso (**Tabla 13**) que se tradujo en un aumento después de VLCKD y una disminución después de BS respecto a los valores iniciales. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (**Tabla 13**).

Es importante destacar que se observó una correlación positiva entre los niveles circulantes de β-OHB a los 2-3 meses de las intervenciones (punto final) y MDA (r = 0,56; p = 0,001) (**Figura 29A**) y AOP (r = 0,47; p = 0,009) en el punto de seguimiento (**Figura 29B**). Además, los cuerpos cetónicos a los 2-3 meses de intervención se correlacionaron con los cambios a los 2-3 meses con respecto al valor inicial inducidos por la intervención en MDA (r = 0,37; p = 0,042) y AOP (r = 0,40; p = 0,029), y los cambios a los 4-6 meses respecto al inicio en MDA (r = 0,72; p = <0,001) y AOP (r = 0,37; p = 0,047).

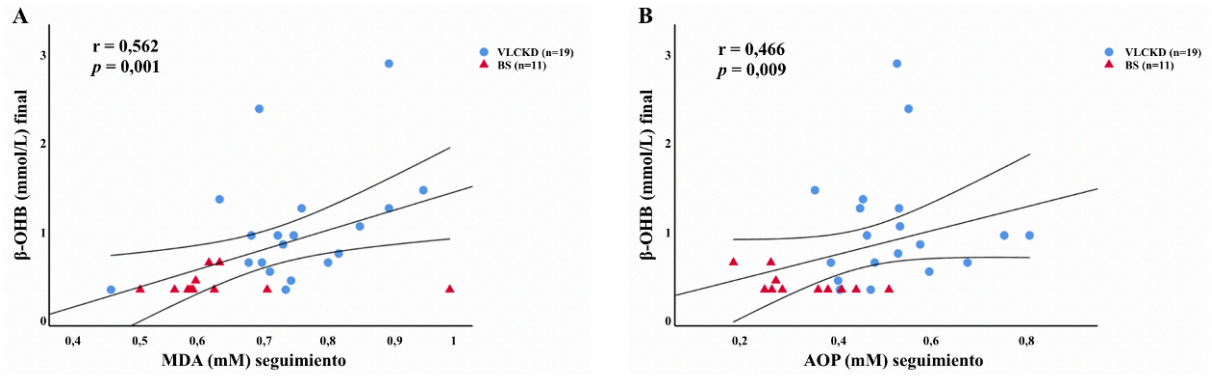


Figura 29. Asociación entre los niveles circulantes de cuerpos cetónicos a los 2-3 meses de las intervenciones y los biomarcadores de estrés oxidativo en el seguimiento. Diagrama de dispersión que representa la asociación entre los niveles circulantes de ß-hidroxibutirato (ß-OHB) a los 2 a 3 meses y (**A**) los niveles de malondialdehído (MDA) en el punto de seguimiento y (**B**) los niveles de poder antioxidante total (AOP) en el punto de seguimiento. La línea central representa la línea de tendencia de regresión lineal. Las líneas por encima y por debajo de la línea central representan los límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% alrededor de la línea de tendencia. r, coeficiente de correlación evaluado mediante la prueba de Rho Spearman; *p*, valor *p*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA OSTEOPONTINA

La osteopontina es una citoquina que juega un papel relevante en varias enfermedades, como enfermedades inflamatorias crónicas o varios tipos de cáncer (164). En concreto, la osteopontina está involucrada en la fisiopatología del tejido adiposo relacionado con la obesidad (170,171). Por todo ello, se analizaron los niveles de expresión de la osteopontina en un modelo animal, sus niveles en sangre en pacientes con obesidad y tras los tratamientos de pérdida de peso, así como los niveles de metilación.

2.1. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE OSTEOPONTINA/*SPP1* EN TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y SUBCUTÁNEO DE RATONES DIO Y TRAS INDUCCIÓN DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA

Para evaluar si la asociación entre los niveles circulantes de osteopontina y la adiposidad podría ser un reflejo de su expresión en el tejido adiposo, se realizó un modelo animal de obesidad inducida por la dieta (DIO) y pérdida de peso por restricción calórica (RC). En la **Tabla 17** se muestran las características y composición corporal de los grupos experimentales de animales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 17. Características y composición corporal de los grupos experimentales de animales.

Grupo	Delgadas	DIO	Delgadas	DIO	RC	Delgadas	DIO	RC
n	10	14	10	10	4	10	10	4
Edad (semanas)	9	9	21	21	21	28	28	28
Tiempo (semanas)*	0		12			19		
Peso corporal (g)	19.1±1.08	18.8±0.95	21.8±2.40	25.6±3.85	26.2±3.07	22.9±2.78	29.7±3.09 [a]	25.4±1.23
FM (%)	15.6±1.88	15.0±3.31	13.9±2.12	25.1±9.31 [a]	23.5±6.69 [a]	14.9±2.47	31.2±6.89 [a]	16.9±3.46 [b]
FFM (%)	80.2±2.60	80.4±4.34	83.6±2.69	71.8±9.53 [a]	73.3±6.84 [a]	80.4±2.59	64.6±7.26 [a]	82.6±5.83 [b]
Ingesta alimentaria (g/día)	-	-	2.69±0.37	2.29±0.34	2.22±0.71	1.59±0.10	1.55±0.13	1.03±0.18

Los datos muestran la media ± desviación estándar. DIO, grupo de obesidad inducida por la dieta; RC: grupo de restricción calórica; FM, masa grasa; FFM, masa libre de grasa. * Descripción del período experimental (Tiempo): 0 semanas, denota el inicio del período de obesidad inducida por la dieta; 12 semanas, denota el inicio del periodo de restricción calórica; 19 semanas, marca el punto final del experimento y la eutanasia de los animales. [a] Diferencias estadísticamente significativas en comparación con sus homólogos delgados control ($p < 0,05$); [b] Diferencias estadísticamente significativas en comparación con sus homólogos DIO ($p < 0,05$).

Los ratones DIO mostraron un mayor peso corporal total (**Figura 30A**) y TAV (**Figura 30B**) que los ratones delgados o los ratones RC. De manera relevante, en comparación con el grupo control de ratones delgados, los ratones DIO mostraron una expresión significativamente mayor de *secreted phosphoprotein* 1 (*SPP1*) en el TAV y el TAS y una expresión significativamente menor en el músculo. En ratones RC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en TAV, TAS o músculo en la expresión de *SPP1* en comparación con los ratones control delgados. Sin embargo, este grupo muestra una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de *SPP1* en TAV en comparación con los ratones DIO (**Figura 30C**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

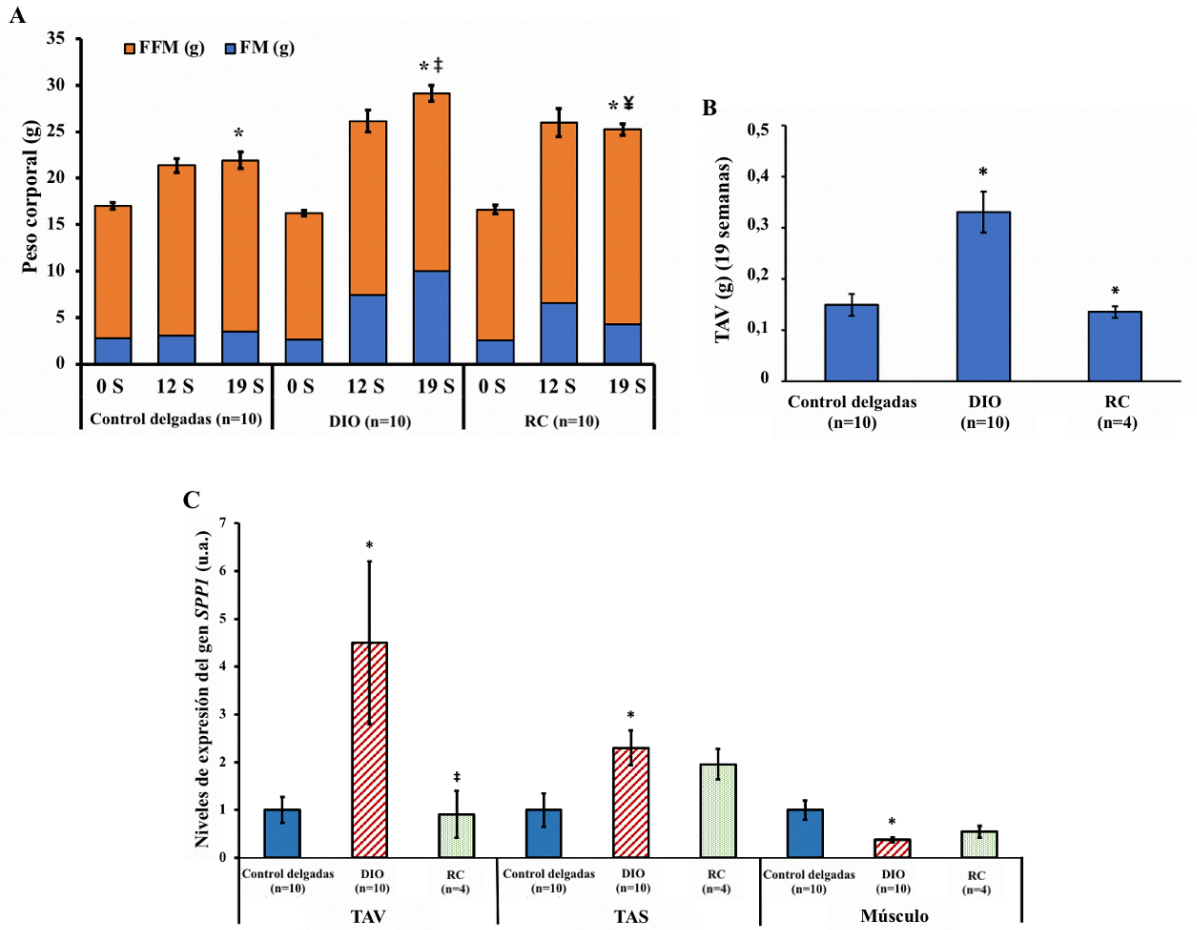


Figura 30. Diferencias en la composición corporal y la expresión del gen *SPP1/osteopontina* en ratones. (**A**) Comparación del peso y la composición corporales entre ratones control delgadas y obesidad inducida por la dieta (DIO) y después de la pérdida de peso inducida por restricción calórica (RC) durante el período de seguimiento. (**B**) Diferencias en el tejido adiposo visceral (TAV) entre ratones control delgadas, DIO y RC a las 19 semanas. (**C**) Diferencias en la expresión del gen *SPP1/osteopontina* en TAV, tejido adiposo subcutáneo (TAS) y músculo de ratones control delgadas, DIO y RC durante el período de seguimiento. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. El valor *p* se calcula mediante la prueba *t* de Student y ANOVA para **(A)**, y mediante la prueba *t* de Student para **(B)** y **(C)**. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con las 0 semanas en (A) y con ratones control delgadas en **(B)** y **(C)**. ‡ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con ratones control delgadas a las 19 semanas o diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los ratones DIO en los niveles de expresión del gen *SPP1/osteopontina*. ¥ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con ratones DIO a las 19 semanas.

2.2. Diferencias en los niveles basales de osteopontina según la adiposidad en humanos

En este estudio se incluyeron un total de 111 sujetos (32 con peso normal y 79 pacientes con obesidad). Los participantes de ambos sexos fueron evaluados para determinar el peso corporal inicial, la composición corporal, los cuerpos cetónicos, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) y los niveles de osteopontina circulantes. Así, la cohorte de pacientes con exceso de peso corporal se clasificó según su IMC en sobrepeso (25-29,9), obesidad (30-39,9) y obesidad severa (≥ 40) y se comparó con un grupo de participantes con peso normal (IMC <

25) (**Figura 31A**). En relación con la composición corporal, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 31A**). Las características iniciales de los participantes se muestran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Características basales y niveles de osteopontina de los sujetos del estudio según adiposidad.

Variables	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	Obesidad severa	*p*-valor
N	32	8	44	27	
Género (hombres/mujeres)	12/20	6/2	13/31	2/25	**<0,001***
Edad (años)	35,9±9,7	37,9±9,4	45,3±9,9	41,5±8,1	**0,001**
Peso corporal (kg)	64,7±9,2	78,1±8,2	96,6±14,3	133,1±21,5	**<0,001**
Altura (m)	1,68±0,09	1,66±0,11	1,69±0,09	1,63±0,10	0,106
IMC (kg/m^2)	22,7±1,7	27,9±1,5	34,8±2,7	49,3±9,0	**<0,001**
FM (kg)	24,0±7,0	27,7±2,5	41,2±10,1	60,5±7,8	**<0,001**
FFM (kg)	47,1±9,0	44,8±6,4	54,2±11,0	54,8±12,8	**0,030**
Osteopontina (pg/mL)	5986±3037	5617±7131	28220±28475	42983±40674	**<0,001**

Los datos muestran media ± desviación estándar. El valor *p* se calculó con ANOVA. *El valor de *p* se calculó con Chi-cuadrado. IMC, índice de masa corporal; FM, masa grasa; FFM, masa libre de grasa.

Para evaluar el efecto de los tratamientos de pérdida de peso sobre la osteopontina, primero se evaluaron los niveles iniciales de osteopontina en relación con el exceso de adiposidad (**Figura 31B**). Los niveles basales de osteopontina fueron significativamente más altos ($p < 0,001$) en pacientes con obesidad que en sujetos con normopeso y sobrepeso, siendo más altos en obesidad severa que en obesidad (**Figura 31B**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

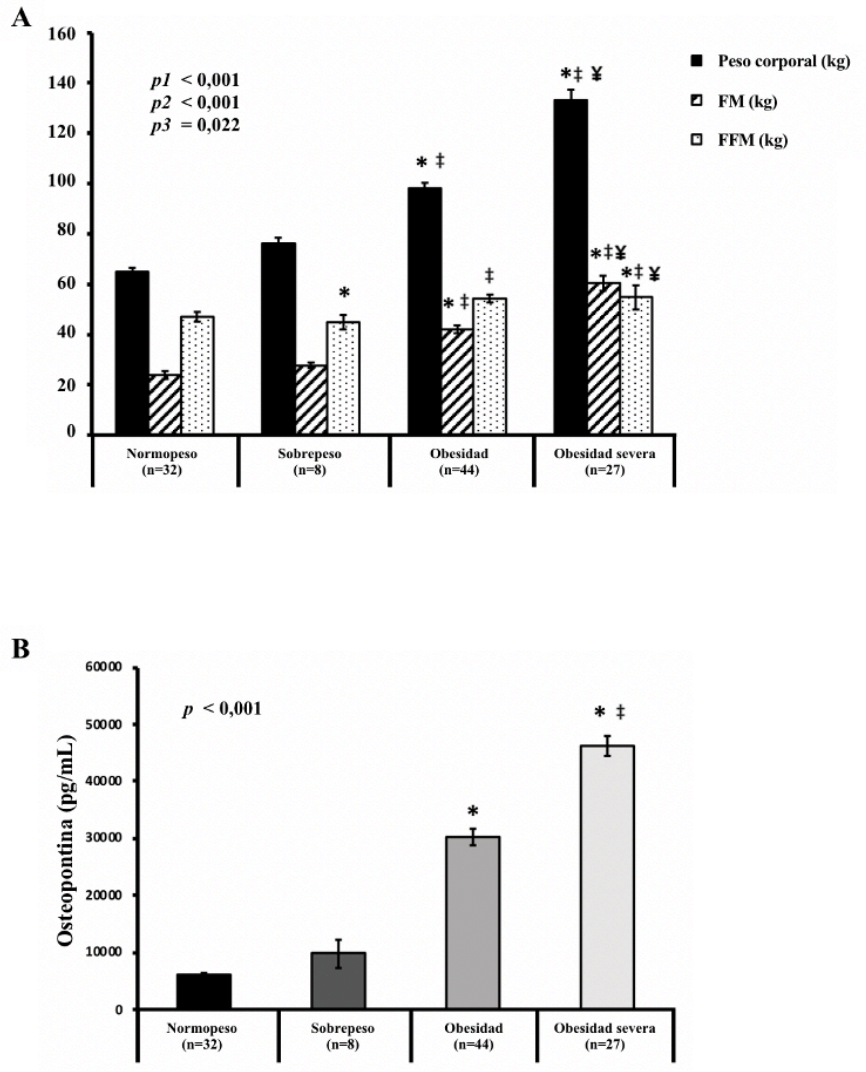


Figura 31. Comparación de la composición corporal y los niveles de osteopontina según la adiposidad basal. (**A**) Diferencias en el peso y la composición corporales entre individuos con normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad severa al inicio del estudio. (**B**) Diferencias en los niveles circulantes de osteopontina entre individuos con normopeso, sobrepeso, obesidad y obesidad severa al inicio del estudio. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. El valor *p* se calcula mediante ANOVA para (**A**) (*p1*) peso corporal, (*p2*) masa grasa (FM) y (*p3*) masa libre de grasa (FFM) y (**B**). El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con normopeso evaluados mediante la prueba *t* de Student. ‡ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con sobrepeso evaluados mediante la prueba *t* de Student. ¥ denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los individuos con obesidad evaluados mediante la prueba *t* de Student.

2.3. CAMBIOS EN LOS NIVELES CIRCULANTES DE OSTEOPONTINA DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS DE PÉRDIDA DE PESO EN HUMANOS

Todos los pacientes incluidos en este estudio alcanzaron una pérdida de peso estadísticamente significativa (**Figura 32A**) después de los tres tratamientos de pérdida de peso. Esta pérdida de peso corporal total inducida después de las terapias de pérdida de peso se debió tanto a una pérdida de masa grasa como a una pérdida de masa libre de grasa, aunque en el tratamiento con VLCKD la pérdida de peso se produjo principalmente a expensas de la masa grasa, con una

ligera pérdida de masa libre de grasa (**Figura 32A**). Los niveles de β-OHB también difirieron entre las terapias de pérdida de peso. Como se esperaba por el diseño, la VLCKD indujo un aumento en los niveles de β-OHB, mientras que no se observó cetosis después de la LCD. Por otro lado, la BS también indujo un aumento leve pero no significativo en los niveles de β-OHB. Además, los tres enfoques terapéuticos indujeron una mejora significativa de HOMA-IR con una mayor disminución inducida por VLCKD, como se describe previamente en la **Tabla 12**.

En relación con la evolución de la osteopontina circulante durante los tres tratamientos de pérdida de peso, se produjeron cambios en sus niveles, observándose diferencias estadísticamente significativas durante la VLCKD ($p = 0,024$) y la BS ($p = 0,005$). En VLCKD, los niveles de osteopontina disminuyeron en el punto de máxima cetosis (2 meses). Por el contrario, en el grupo de BS, los niveles de osteopontina aumentaron significativamente a los 3 meses (**Figura 32B**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de osteopontina en los diferentes puntos de seguimiento de la LCD.

En particular, los niveles circulantes de osteopontina en pacientes con sobrepeso u obesidad se asociaron con los parámetros de composición corporal (**Tabla 19**). Los niveles iniciales de osteopontina se correlacionaron positivamente con la masa grasa inicial ($r = 0,405$; $p = 0,003$) (**Figura 32C)** y la masa grasa en el punto de seguimiento ($r = 0,361$; $p = 0,010$) (**Figura 32D**). Por otra parte, los niveles de osteopontina en el punto de seguimiento se correlacionaron positivamente con la masa grasa inicial ($r = 0,610$; $p < 0,001$) (**Figura 32C**) y la masa grasa de seguimiento ($r = 0,542$; $p < 0,001$) (**Figura 32D**). Por último, los niveles de osteopontina en el punto final se correlacionaron positivamente con la masa grasa inicial ($r = 0,585$; $p < 0,001$) (**Figura 32C**) y la masa grasa de seguimiento ($r = 0,542$; $p < 0,001$) (**Figura 32D**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

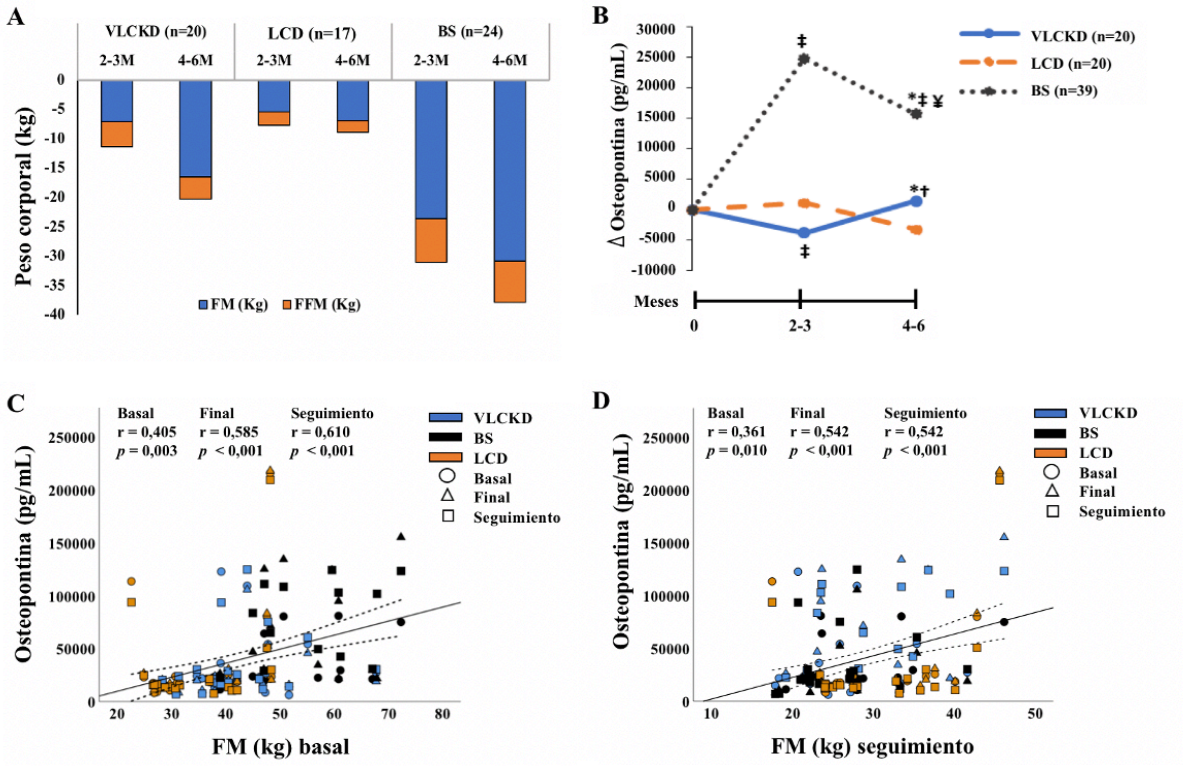


Figura 32. Cambios en la composición corporal y los niveles de osteopontina y asociación entre los niveles de osteopontina y la masa grasa durante los tratamientos de pérdida de peso. (**A**) Cambios en la composición corporal durante una dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD), una dieta baja en calorías (LCD) o cirugía bariátrica (BS). (**B**) Cambios en los niveles circulantes de osteopontina durante VLCKD, LCD o BS. (**C**) Asociación entre los niveles de osteopontina y la masa grasa (FM) basal durante la intervención. (**D**) Asociación entre los niveles de osteopontina y la FM de seguimiento durante la intervención. (**A, B**) Los datos muestran diferencias en comparación con el valor inicial durante el transcurso de la intervención. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con ANOVA o ANCOVA de medidas repetidas ajustado por edad, según correspondiera. Asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) durante la duración del programa nutricional (de 0 a 4-6 meses), ‡ denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en relación con el inicio, † denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en relación con el punto de 2-3 meses y ¥ denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre tratamientos en comparación con el valor inicial. (**C, D**) muestra un diagrama de dispersión que representa la asociación entre los niveles de osteopontina y la FM. La línea central representa la línea de tendencia de regresión lineal. Las líneas por encima y por debajo de la línea central representan los límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% alrededor de la línea de tendencia. r, coeficiente de correlación evaluado mediante la prueba de Spearman; p, valor p.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 19. Asociación entre los niveles circulantes de osteopontina y características, composición corporal, medidas antropométricas y parámetros bioquímicos en los pacientes con obesidad a nivel basal.

Variables	Coeficiente r de Spearman	*p*-valor
Edad (años)	-0,056	0,646
Peso corporal (kg)	-0,044	0,722
Altura (m)	0,348	**0,003**
IMC (kg/m^2)	0,368	**0,002**
FM (kg)	0,405	**0,003**
FFM (kg)	-0,134	0,349
β-OHB (mmol/L)	-0,060	0,726
HOMA-IR	0,006	0,962

IMC, índice de masa corporal; FM, masa grasa; FFM, masa libre de grasa; β-OHB, β-hidroxibutirato; HOMA-IR, índice de resistencia a la insulina.

2.4. DIFERENCIAS EN LA METILACIÓN DEL ADN DE *SPP1/OSTEOPONTINA* ASOCIADAS A LA CETOSIS NUTRICIONAL EN PACIENTES CON OBESIDAD

Cuando se analizó la metilación de *SPP1/osteopontina* en los pacientes con obesidad en comparación con los sujetos con normopeso, no se observaron diferencias significativas en los niveles de metilación del ADN (**Figura 33A**). Después de la pérdida de peso inducida por BS o VLCKD, la metilación del ADN no fue significativamente diferente en los sitios CpG evaluados (**Figura 33B**). Solo se observó una ligera disminución estadísticamente significativa en la metilación de cg11226901 después del tratamiento con VLCKD.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

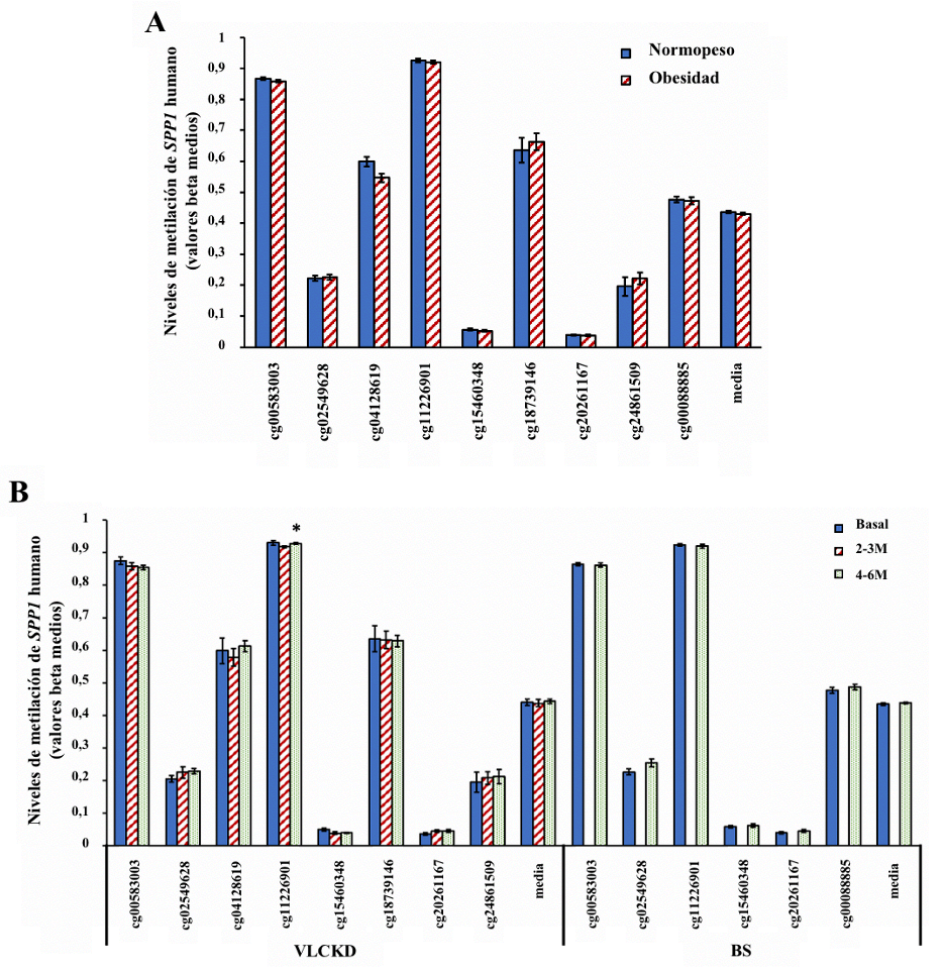


Figura 33. Diferencias en la metilación del ADN de *SPP1/osteopontina*. (**A**) Diferencias en la metilación del ADN de *SPP1/osteopontina* según la adiposidad basal. (**B**) Diferencias en la metilación del ADN de *SPP1/osteopontina* en pacientes con obesidad durante una dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD) o cirugía bariátrica (BS). Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. El asterisco (*) denota diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en relación con el valor inicial evaluado mediante la prueba *t* de Student.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. ESTUDIO DE LA CETOSIS NUTRICIONAL SOBRE LA METILACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CÁNCER

3.1. EFECTO DE LA CETOSIS NUTRICIONAL INDUCIDA POR UNA VLCKD SOBRE LA METILACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CÁNCER

Con el fin de evaluar el efecto de la cetosis nutricional sobre la regulación epigenética de genes relacionados con el cáncer en pacientes con obesidad, se realizó un reanálisis del metiloma asociado al tratamiento con VLCKD en 10 pacientes con obesidad previamente publicado por nuestro grupo de investigación (291). El análisis de GO obtenido a partir de los 1239 sitios CpGs diferencialmente metilados (920 genes únicos) en la fase de cetosis máxima, evidenció que 18 genes (20 CpGs; 17 hipometilados, 3 hipermetilados) pertenecían a rutas relacionadas con el cáncer (**Figura 34**).

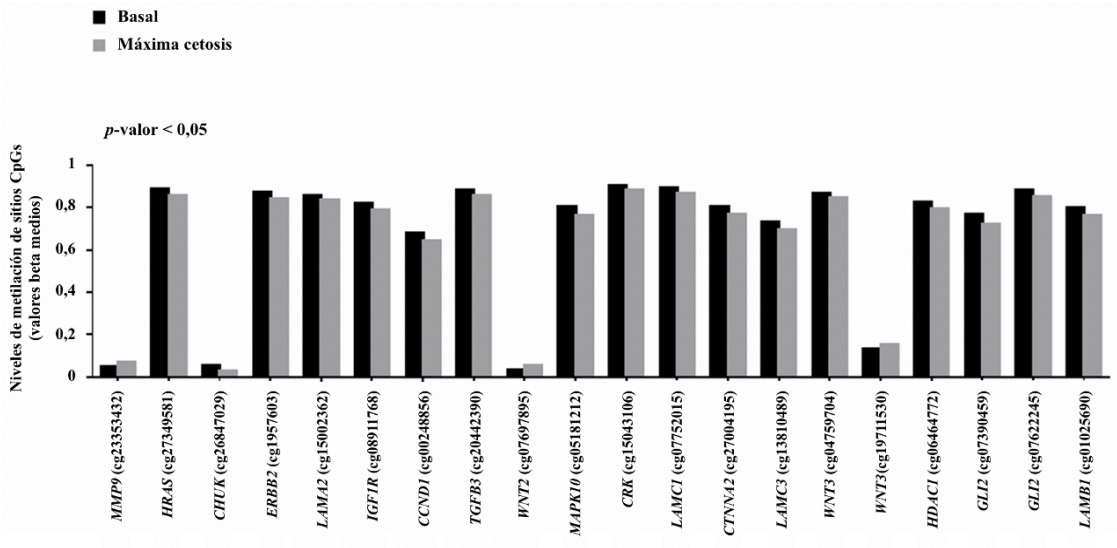


Figura 34. Cambios en la metilación en genes relacionados con el cáncer inducidos por la cetosis nutricional en una dieta cetogénica muy baja en calorías (VLCKD). *P*-valor calculado para cada CpG mediante la prueba *t* de Student. *MMP9*, gen que codifica la metaloproteinasa de matriz 9; *HRAS*, gen que codifica la proteína H-Ras; *CHUK*, gen de la quinasa ubicua hélice-bucle-hélice conservada; *ERBB2*, gen que codifica el receptor tirosina-quinasa; *LAMA2*, gen que codifica la subunidad alfa 2 de laminina; IGF1R, gen que codifica el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1; *CCND1*, gen que codifica la proteína ciclina D1; *TGFB3*, gen que codifica el factor de crecimiento transformante beta 3; *WNT2*, gen miembro de la familia WNT 2; *MAPK10*, gen que codifica la proteína quinasa 10 activada por mitógenos; *CRK*, protooncogén CRK, proteína adaptadora; *LAMC1*, gen que codifica la subunidad gamma 1 de laminina; *CTNNA2*, gen que codifica la catenina alfa 2; *LAMC3*, gen que codifica la subunidad gamma 3 de laminina; *WNT3*, gen que codifica al miembro de la familia WNT 3; *HDAC1*, gen que codifica la histona deacetilasa 1; *GLI2*, oncogén asociado a glioma 2; *LAMB1*, gen que codifica la subunidad beta 1 de laminina.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, se realizó un análisis STRING para comprobar las interacciones proteicas entre los genes regulados por metilación estudiados previamente. En este sentido, se observó que el 77% de los genes regulados por metilación pertenecían a una red enriquecida significativamente en interacciones proteicas ($p < 0{,}001$), mostrando el gen gen que codifica la proteína quinasa 10 activada por mitógenos (*MAPK10*) el mayor número de interacciones proteicas. Otros genes importantes en esta red que también presentaron un gran número de interacciones fueron gen que codifica el receptor tirosina-quinasa (*ERBB2*), gen que codifica la proteína ciclina D1 (*CCND1*), gen que codifica la proteína H-Ras (*HRAS*) y gen que codifica la histona deacetilasa 1 (*HDAC1*) (**Figura 35)**. Por otro lado, también se observó una red enriquecida independiente entre las lamininas, el gen que codifica la subunidad gamma 1 de laminina (*LAMC1*), el gen que codifica la subunidad alfa 2 de laminina (*LAMA2*), el gen que codifica la subunidad gamma 3 de laminina (*LAMC3*) y el gen que codifica la subunidad beta 1 de laminina (*LAMB1*).

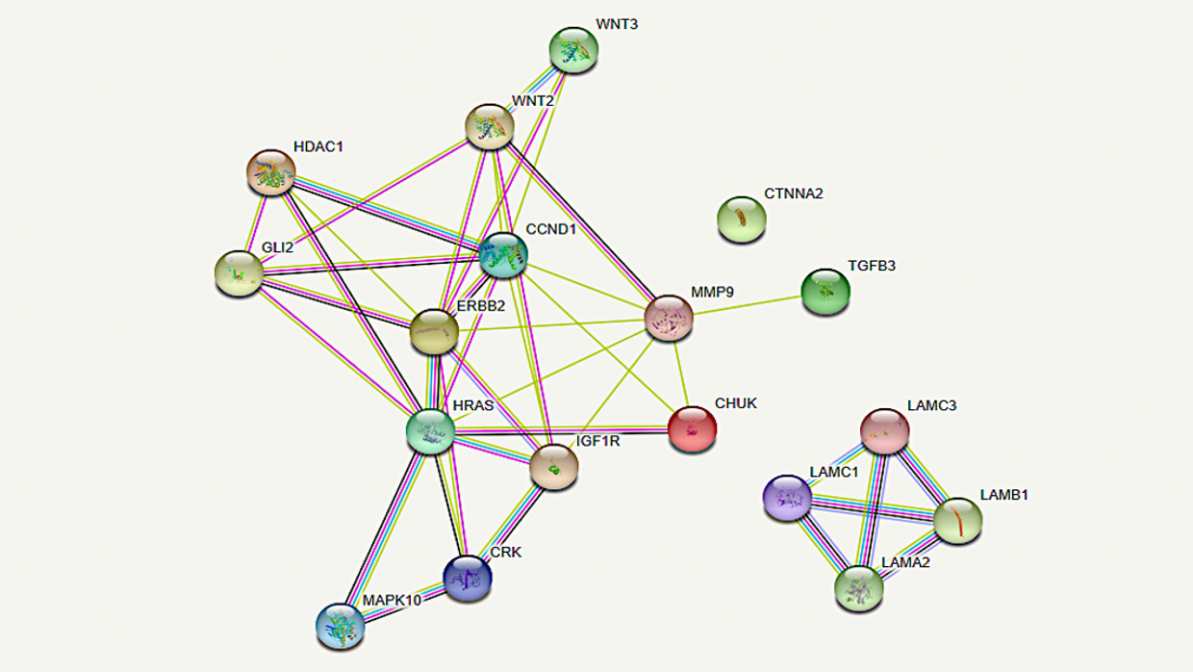


Figura 35. Red enriquecida en interacciones proteicas de los genes relacionados con cáncer regulados por metilación. *MMP9*, gen que codifica la metaloproteinasa de matriz 9; *HRAS*, gen que codifica la proteína H-Ras; *CHUK*, gen de la quinasa ubicua hélice-bucle-hélice conservada; *ERBB2*, gen que codifica el receptor tirosina-quinasa; *LAMA2*, gen que codifica la subunidad alfa 2 de laminina; IGF1R, gen que codifica el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1; *CCND1*, gen que codifica la proteína ciclina D1; *TGFB3*, gen que codifica el factor de crecimiento transformante beta 3; *WNT2*, gen miembro de la familia WNT 2; *MAPK10*, gen que codifica la proteína quinasa 10 activada por mitógenos; *CRK*, protooncogén CRK, proteína adaptadora; *LAMC1*, gen que codifica la subunidad gamma 1 de laminina; *CTNNA2*, gen que codifica la catenina alfa 2; *LAMC3*, gen que codifica la subunidad gamma 3 de laminina; *WNT3*, gen que codifica al miembro de la familia WNT 3; *HDAC1*, gen que codifica la histona deacetilasa 1; *GLI2*, oncogén asociado a glioma 2; *LAMB1*, gen que codifica la subunidad beta 1 de laminina.

Se realizó un análisis más exhaustivo donde se pudo identificar que 5 de estos genes presentaban los cambios más altos de metilación (> 4%). Estos genes fueron *CCND1*, *MAPK10*, el oncogén asociado a glioma 2 (*GLI2*), *LAMC3* y el gen que codifica la catenina alfa 2 (*CTNNA2*) (**Figura 36**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

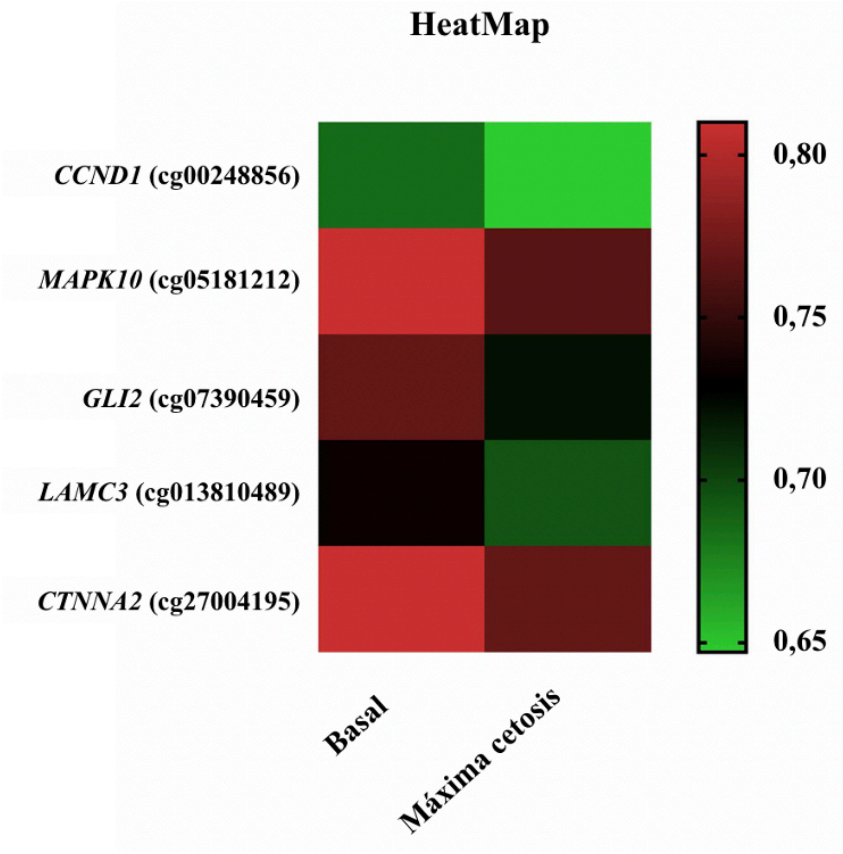


Figura 36. Análisis de los genes que presentan los cambios más altos de metilación. *CCND1*, gen que codifica la proteína ciclina D1; *MAPK10*, gen que codifica la proteína quinasa 10 activada por mitógenos; *GLI2*, oncogén asociado a glioma 2; *LAMC3*, gen que codifica la subunidad gamma 3 de laminina; *CTNNA2*, gen que codifica la catenina alfa 2.

3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VITRO* CON CUERPOS CETÓNICOS SOBRE LA METILACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CÁNCER EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

En este estudio se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF7, en las cuales se había evaluado el efecto de los cuerpos cetónicos sobre el fenotipo tumoral y la expresión de genes relacionados con el desarrollo tumoral. Ambas líneas celulares fueron tratadas durante 72 horas con β-OHB a una concentración de 200 mM. Los resultados de la metilación del ADN de las células tratadas con β-OHB se compararon con células no tratadas y con células tratadas con el secretoma de TAV y TAS de pacientes con obesidad a una concentración del 5%. Los resultados de metilación se obtuvieron del análisis de la metilación global resultante de la hibridación del ADN en un *array* de metilación que da información de los niveles de metilación de 850 mil sitios en el genoma. Se extrajeron de dicho análisis los datos de metilación (valores β) de los genes relacionados con cáncer en el ADN de los leucocitos de pacientes con obesidad tratados con una VLCKD para perder peso (*CCND1*, *MAPK10*, *GLI2*, *LAMC3* y *CTNNA2*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Respecto a los sitios CpGs diferencialmente metilados durante la fase de cetosis máxima en los pacientes con obesidad tratados con una VLCKD para perder peso, se observó un patrón de metilación similar en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 tratada con β-OHB, mientras que la línea célular MCF7 presentó un patrón inverso respecto al control (**Figura 37**). Este patrón se detectó particularmente en el sitio CpG asociado al gen *MAPK10*, el cual presentó la diferencia de metilación mayor y con mayor número de interrelaciones gen-gen, en pacientes. Similar a lo observado en los pacientes, las células MDA-MB-231 presentaron niveles de metilación más bajos respecto al control cuando eran tratadas con β-OHB y también aquellas tratadas con secretoma procedente de TAS. Sin embargo, las células MDA-MB-231 tratadas con secretoma de TAV presentaron niveles de metilación mayores que las células control para este gen. El sitio CpG asociado al gen *LAMC3* presentó un patrón de metilación similar al *MAPK10* en estas células. Sin embargo, en las células MCF7, se observó un incremento de la metilación cuando eran tratadas tanto con β-OHB como con los secretomas de ambos depósitos grasos (**Figura 37**).

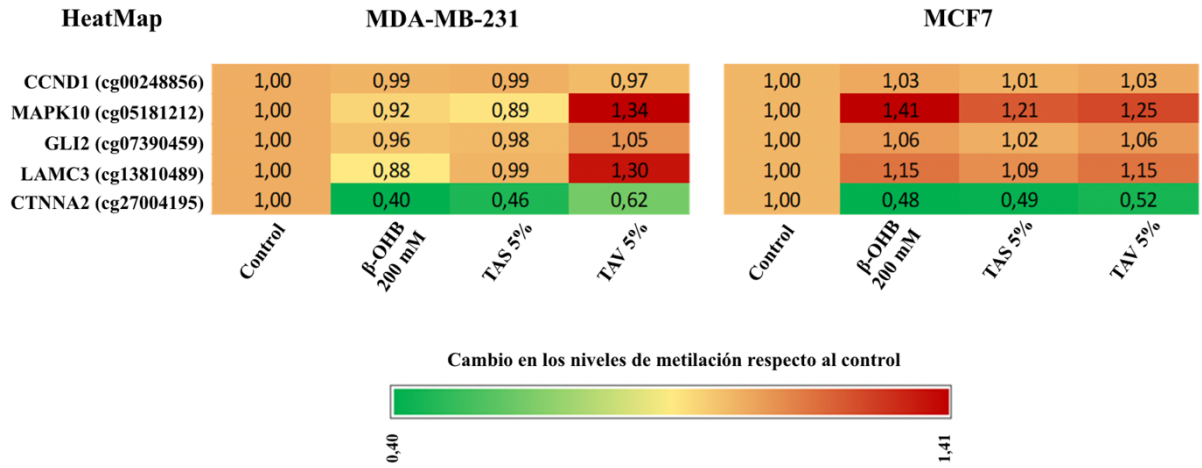


Figura 37. Patrón de metilación inducido por el tratamiento *in vitro* con ß-hidroxibutirato (ß-OHB) o secretoma de tejido adiposo subcutáneo (TAS) o visceral (TAV) en líneas celulares de cáncer de mama de los genes relacionados con cáncer previamente identificados en pacientes con obesidad tratados con una VLCKD. Los datos representan los cambios de los valores ß de metilación en las células tratadas respecto a las células control no tratatas. *CCND1*, gen que codifica la proteína ciclina D1; *MAPK10*, gen que codifica la proteína quinasa 10 activada por mitógenos; *GLI2*, oncogén asociado a glioma 2; *LAMC3*, gen que codifica la subunidad gamma 3 de laminina; *CTNNA2*, gen que codifica la catenina alfa 2.

El análisis global del *array* de metilación arrojó un total de 507 sitios CpG pertenecientes a los 5 genes previamente identificados, de los cuales 83 estaban localizados en el promotor de dichos genes. El análisis estadístico evidenció diferencias estadísticamente significativas respecto al control no tratado en varios de los sitios CpGs analizados. Dichas diferencias se presentaron con diferente patrón dependiendo de la línea celular y también dependiendo del tratamiento (**Tabla 20, Tabla 21).**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 20. Diferencias en los niveles de metilación en los 83 sitios CpG localizados en el promotor de los 5 genes previamente identificados en la línea celular MDA-MB-231.

MDA-MB-231						
Gen	**Sonda Array**	**Control**	**ß-OHB**	**TAV**	**TAS**	***p*-valor**
CCDN1	**cg00858899**	0,130±0,039	0,047±0,028	0,076±0,015	0,080±0,024	0,053
	cg01406280	0,047±0,230	0,036±0,003	0,058±0,008	0,035±0,014	0,264
	cg02255700	0,161±0,089	0,088±0,006	0,115±0,008	0,091±0,023	0,075
	cg02694676	0,042±0,035	0,013±0,002	0,024±0,003	0,014±0,010	0,168
	cg03364015	0,088±0,006	0,082±0,018	0,084±0,014	0,077±0,022	0,933
	cg03735308	0,039±0,034	0,020±0,004	0,030±0,008	0,018±0,011	0,478
	cg07149785	0,099±0,093	0,043±0,002	0,050±0,002	0,033±0,017	0,340
	cg07663571	0,010±0,014	0,001±0,001	0,008±0,005	0,006±0,004	0,212
	cg07781399	0,118±0,073	0,061*±0,012	0,075±0,005	0,043±0,025*	**0,044**
	cg08170622	0,110±0,087	0,053±0,002	0,051±0,002	0,048±0,023	0,270
	cg09551996	0,122±0,041	0,093±0,013	0,124±0,007	0,086±0,037	0,259
	cg10539418	0,125±0,079	0,085±0,001	0,103±0,026	0,070±0,027	0,392
	cg11190277	0,128±0,119	0,068±0,003	0,075±0,012	0,055±0,011	0,376
	cg11398323	0,128±0,099	0,046±0,004	0,057±0,045	0,030±0,013	0,135
	cg12825880	0,120±0,066	0,073±0,066	0,080±0,009	0,087±0,013	0,425
	cg13271751	0,092±0,020	0,040±0,017	0,056±0,010	0,053±0,033	0,108
	cg13720316	0,108±0,048	0,076±0,002	0,080±0,010	0,063±0,014	0,204
	cg14513281	0,038±0,052	0,011±0,006	0,013±0,003	0,011±0,005	0,863
	cg15233880	0,091±0,067	0,056±0,023	0,079±0,026	0,053±0,053	0,727
	cg15330584	0,140±0,052	0,100±0,016	0,128±0,015	0,080±0,051	0,209
	cg15954335	0,064±0,021	0,037±0,006	0,064±0,005	0,032±0,028	0,161
	cg16969182	0,041±0,023	0,009±0,003	0,022±0,011	0,011±0,007	0,075
	cg19209049	0,034±0,034	0,027±0,019	0,026±0,005	0,027±0,006	0,863
	cg21742931	0,050±0,017	0,040±0,003	0,040±0,011	0,033±0,019	0,668
	cg23753457	0,100±0,063	0,051±0,011	0,061±0,010	0,049±0,015	0,392
	cg24020398	0,145±0,120	0,075±0,007	0,095±0,010	0,066±0,019	0,183
	cg24203315	0,060±0,020	0,039±0,004	0,037±0,011	0,033±0,011	0,392
	cg24387864	0,054±0,008	0,044±0,005	0,057±0,008	0,027±0,025	0,223
	cg24419164	0,072±0,063	0,043±0,008	0,043±0,003	0,036±0,017	0,922
	cg25395653	0,037±0,033	0,020±0,007	0,022±0,007	0,035±0,025	0,814
	cg26399164	0,088±0,056	0,070±0,023	0,077±0,011	0,064±0,017	0,826
	Total	0,09±0,05	0,05±0,01*	0,06±0,01	0,05±0,02	0,154
CTNNA2	**cg00465284**	0,090±0,014	0,094±0,002	0,373±0,435	0,083±0,025	0,075
	cg00549910	0,037±0,004	0,043±0,006	0,170±0,215*	0,023±0,017	**0,041**

Continúa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 20. Continuación

MDA-MB-231						
Gen	**Sonda Array**	**Control**	**ß-OHB**	**TAV**	**TAS**	***p*-valor**
CTNNA2	**cg00811334**	0,355±0,058	0,346±0,0,011	0,523±0,299	0,309±0,018	0,516
	cg01536445	0,115±0,046	0,087±0,033	0,326±0,401	0,067±0,012	0,361
	cg01546568	0,414±0,051	0,465±0,011	0,518±0,068	0,487±0,046	0,135
	cg01955779	0,224±0,050	0,050±0,011	0,286±0,180	0,163±0,013	0,132
	cg02227623	0,028±0,011	0,003±0,002	0,092±0,095	0,035±0,019	0,424
	cg02856109	0,174±0,050	0,148±0,024	0,372±0,374	0,126±0,026	0,392
	cg04373435	0,403±0,033	0,037±0,020	0,476±0,074	0,391±0,030	0,057
	cg04670857	0,400±0,029	0,402±0,012	0,461±0,063	0,408±0,030	0,282
	cg08047376	0,052±0,032	0,051±0,010	0,155±0,155	0,037±0,016	0,200
	cg08107272	0,045±0,026	0,067±0,021	0,096±0,039	0,046±0,025	0,218
	cg08119884	0,064±0,026	0,070±0,007	0,194±0,142	0,064±0,027	0,094
	cg08154280	0,159±0,060	0,107±0,004	0,256±0,268	0,092±0,024	0,147
	cg11231249	0,123±0,010	0,124±0,012	0,269±0,290	0,090±0,021	0,218
	cg12078605	0,124±0,097	0,033±0,010*	0,329±0,442	0,044±0,017*	**0,034**
	cg12945120	0,178±0,148	0,078±0,002	0,327±0,385	0,075±0,030	0,147
	cg14348756	0,120±0,022	0,101±0,014	0,146±0,055	0,077±0,037	0,248
	cg15478597	0,306±0,014	0,261±0,008	0,361±0,125	0,266±0,021	0,082
	cg16882804	0,150±0,039	0,129±0,015	0,378±0,423	0,119±0,042	0,589
	cg18806140	0,391±0,074	0,453±0,007	0,574±0,253	0,437±0,016	0,294
	cg18913890	0,281±0,020	0,240±0,005	0,243±0,040	0,223±0,048	0,248
	cg19707040	0,417±0,106	0,462±0,016	0,475±0,014	0,457±0,009	0,433
	cg19925939	0,118±0,074	0,060±0,010	0,121±0,067	0,056±0,027	0,118
	cg21248007	0,296±0,023	0,277±0,027	0,413±0,181	0,289±0,037	0,376
	cg21621248	0,150±0,006	0,128±0,007*	0,380±0,392	0,118±0,019*	**0,033**
	cg22350070	0,665±0,041	0,652±0,002	0,582±0,130	0,656±0,003	0,715
	cg23699324	0,272±0,006	0,253±0,035	0,290±0,002	0,265±0,028	0,248
	cg26157270	0,126±0,009	0,117±0,009	0,171±0,073	0,095±0,018	0,064
	cg26355577	0,396±0,116	0,390±0,013	0,588±0,299	0,366±0,044	0,183
	cg27629977	0,073±0,048	0,037±0,016	0,216±0,291	0,031±0,018	0,392
	Total	0,21±0,01	0,19±0,01*	0,31±0,18	0,18±0,02	0,147
GLI2	**cg03555914**	0,628±0,004	0,657±0,008	0,654±0,042	0,622±0,007	0,066
	cg06226279	0,749±0,011	0,750±0,004	0,779±0,043	0,767±0,043	0,679
	cg06969469	0,845±0,089	0,938±0,021	0,937±0,034	0,883±0,041	0,168
	cg07488803	0,615±0,032	0,633±0,027	0,671±0,100	0,641±0,033	0,715
	cg10520924	0,822±0,029	0,838±0,009	0,747±0,093	0,832±0,029	0,248

Continúa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 20. Continuación

MDA-MB-231						
Gen	**Sonda Array**	**Control**	**ß-OHB**	**TAV**	**TAS**	***p*-valor**
GLI2	**cg19917787**	0,794±0,053	0,784±0,003	0,797±0,048	0,793±0,012	0,789
	cg22153527	0,879±0,028	0,864±0,011	0,868±0,010	0,877±0,028	0,887
	cg23681112	0,827±0,060	0,511±0,032	0,871±0,038	0,873±0,046	0,578
	Total	0,77±0,01	0,79±0,01*	0,78±0,02	0,79±0,02*	0,123
LAMC3	**cg00224671**	0,542±0,033	0,607±0,017	0,402±0,233	0,522±0,007	0,715
	cg02167710	0,510±0,138	0,671±0,010	0,461±0,187	0,594±0,021	0,154
	cg06353352	0,640±0,030	0,447±0,014	0,707±0,127	0,641±0,009	0,459
	cg07725394	0,458±0,012	0,528±0,019	0,572±0,180	0,454±0,015	0,129
	cg17024194	0,547±0,061	0,659±0,024	0,586±0,106	0,553±0,028	0,622
	cg22367771	0,668±0,024	0,504±0,016	0,495±0,299	0,692±0,032	0,578
	cg25883584	0,463±0,040	0,178±0,095	0,314±0,244	0,449±0,020	0,589
	cg26964989	0,189±0,022	0,178±0,019	0,172±0,011	0,156±0,030	0,433
	cg27268137	0,727±0,033	0,728±0,022	0,761±0,043	0,738±0,048	0,679
	Total	0,53±0,01	0,54±0,01	0,50±0,06	0,53±0,01	0,546
MAPK10	**cg02898821**	0,332±0,013	0,302±0,031	0,301±0,054	0,316±0,033	0,599
	cg11491436	0,330±0,040	0,295±0,042	0,259±0,154	0,305±0,062	0,838
	cg12845900	0,352±0,017	0,334±0,021	0,384±0,095	0,341±0,026	0,622
	cg13089369	0,302±0,018	0,317±0,017	0,251±0,070	0,256±0,024	0,110
	Total	0,33±0,02	0,31±0,01	0,30±0,05	0,30±0,03	0,668

Los datos se muestran media ± desviación estándar. El valor *p* se calculó con Kruskal Wallis. (*) Denota diferencias estadísticamente significativas en relación con el control evaluado mediante U de Mann-Whitnety. *CCND1*, gen que codifica la proteína ciclina D1; *CTNNA2*, gen que codifica la catenina alfa 2; *LAMC3*, gen que codifica la subunidad gamma 3 de laminina; *GLI2*, oncogén asociado a glioma 2; *MAPK10*, gen que codifica la proteína quinasa 10 activada por mitógenos.

Tabla 21. Diferencias en los niveles de metilación en los 83 sitios CpG localizados en el promotor de los 5 genes previamente identificados en la línea celular MCF7.

MCF7						
Gen	**Sonda Array**	**Control**	**ß-OHB**	**TAV**	**TAS**	***p*-valor**
CCDN1	**cg00858899**	0,083±0,061	0,074±0,071	0,081±0,030	0,081±0,050	0,954
	cg01406280	0,035±0,008	0,041±0,015	0,045±0,012	0,045±0,007	0,557
	cg02255700	0,127±0,098	0,085±0,003	0,075±0,006	0,081±0,018	0,578
	cg02694676	0,012±0,046	0,018±0,015	0,023±0,005	0,015±0,010	0,347
	cg03364015	0,0950,013	0,081±0,005	0,091±0,016	0,062±0,017	0,147
	cg03735308	0,022±0,015	0,018±0,007	0,028±0,009	0,017±0,007	0,516
	cg07149785	0,045±0,013	0,040±0,006	0,052±0,015	0,036±0,013	0,691
	cg07663571	0,007±0,002	0,006±0,002	0,008±0,001	0,008±0,005	0,679

Continúa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 21. Continuación

MCF7						
Gen	**Sonda Array**	**Control**	**ß-OHB**	**TAV**	**TAS**	***p*-valor**
CCDN1	**cg07781399**	0,062±0,007	0,052±0,016	0,069±0,009	0,061±0,022	0,578
	cg08170622	0,047±0,006	0,067±0,018	0,055±0,008	0,043±0,004	0,218
	cg09551996	0,117±0,029	0,105±0,036	0,236±0,177	0,086±0,032	0,200
	cg10539418	0,094±0,028	0,088±0,016	0,099±0,005	0,090±0,016	0,875
	cg11190277	0,064±0,005	0,063±0,020	0,069±0,005	0,051±0,017	0,679
	cg11398323	0,047±0,036	0,062±0,007	0,068±0,023	0,051±0,028	0,691
	cg12825880	0,074±0,040	0,069±0,026	0,071±0,012	0,090±0,015	0,578
	cg13271751	0,070±0,025	0,073±0,004	0,093±0,018	0,074±0,023	0,361
	cg13720316	0,076±0,012	0,069±0,014	0,094±0,003	0,060±0,018	0,082
	cg14513281	0,020±0,017	0,010±0,003	0,014±0,006	0,015±0,003	0,578
	cg15233880	0,055±0,037	0,044±0,020	0,066±0,017	0,050±0,020	0,622
	cg15330584	0,096±0,030	0,117±0,053	0,141±0,008	0,087±0,045	0,204
	cg15954335	0,045±0,025	0,034±0,021	0,050±0,004	0,028±0,010	0,200
	cg16969182	0,019±0,013	0,009±0,003	0,020±0,003	0,010±0,006	0,099
	cg19209049	0,023±0,012	0,016±0,014	0,028±0,008	0,028±0,017	0,727
	cg21742931	0,056±0,044	0,045±0,001	0,056±0,007	0,038±0,019	0,459
	cg23753457	0,051±0,002	0,052±0,013	0,066±0,003	0,045±0,017	0,183
	cg24020398	0,082±0,009	0,085±0,022	0,091±0,005	0,083±0,010	0,740
	cg24203315	0,030±0,012	0,040±0,011	0,053±0,005	0,040±0,009	0,168
	cg24387864	0,048±0,014	0,056±0,016	0,057±0,009	0,041±0,011	0,459
	cg24419164	0,052±0,013	0,051±0,024	0,068±0,013	0,038±0,017	0,238
	cg25395653	0,120±0,181	0,018±0,006	0,036±0,008	0,029±0,008	0,319
	cg26399164	0,071±0,014	0,088±0,019	0,093±0,013	0,067±0,019	0,218
	Total	0,06±0,02	0,05±0,01	0,07±0,013	0,05±0,01	0,204
CTNNA2	**cg00465284**	0,648±0,415	0,879±0,037	0,834±0,024	0,874±0,035	0,557
	cg00549910	0,328±0,202	0,386±0,030	0,350±0,048	0,411±0,021	0,433
	cg00811334	0,703±0,306	0,871±0,034	0,831±0,020	0,878±0,035	0,313
	cg01536445	0,606±0,398	0,820±0,052	0,842±0,306	0,839±0,031	0,633
	cg01546568	0,604±0,084	0,606±0,020	0,594±0,398	0,571±0,049	0,715
	cg01955779	0,423±0,140	0,432±0,060	0,505±0,084	0,486±0,015	0,392
	cg02227623	0,113±0,083	0,176±0,066	0,154±0,139	0,135±0,067	0,764
	cg02856109	0,657±0,030	0,783±0,030	0,760±0,083	0,811±0,030	0,557
	cg04373435	0,491±0,095	0,541±0,068	0,528±0,003	0,538±0,059	0,838
	cg04670857	0,456±0,053	0,483±0,037	0,471±0,035	0,450±0,047	0,826
	cg08047376	0,190±0,090	0,263±0,070	0,252±0,017	0,231±0,114	0,740

Continúa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 21. Continuación

MCF7						
Gen	**Sonda Array**	**Control**	**ß-OHB**	**TAV**	**TAS**	***p*-valor**
	cg08107272	0,093±0,033	0,138±0,032	0,128±0,034	0,131±0,030	0,436
	cg08119884	0,156±0,097	0,309±0,079	0,217±0,069	0,172±0,102	0,259
	cg08154280	0,521±0,253	0,555±0,034	0,625±0,008	0,636±0,035	0,248
	cg11231249	0,473±0,250	0,583±0,002	0,562±0,012	0,587±0,048	0,578
	cg12078605	0,662±0,437	0,866±0,058	0,811±0,015	0,877±0,023	0,319
	cg12945120	0,661±0,395	0,785±0,042	0,823±0,004	0,851±0,007	0,270
	cg14348756	0,162±0,044	0,163±0,054	0,148±0,021	0,138±0,076	0,972
	cg15478597	0,521±0,083	0,489±0,039	0,556±0,014	0,559±0,014	0,248
	cg16882804	0,655±0,400	0,877±0,016	0,840±0,022	0,869±0,032	0,468
	cg18806140	0,758±0,208	0,896±0,003	0,862±0,016	0,883±0,017	0,129
CTNNA2	**cg18913890**	0,150±0,063	0,197±0,070	0,180±0,023	0,114±0,024	0,223
	cg19707040	0,415±0,067	0,397±0,031	0,393±0,035	0,363±0,077	0,910
	cg19925939	0,158±0,056	0,179±0,080	0,169±0,024	0,161±0,032	0,972
	cg21248007	0,582±0,205	0,589±0,057	0,675±0,048	0,693±0,008	0,282
	cg21621248	0,653±0,399	0,850±0,045	0,821±0,023	0,861±0,032	0,764
	cg22350070	0,394±0,208	0,414±0,032	0,317±0,045	0,297±0,008	0,238
	cg23699324	0,376±0,074	0,295±0,015	0,376±0,052	0,396±0,024	0,838
	cg26157270	0,314±0,165	0,256±0,060	0,390±0,029	0,335±0,044	0,392
	cg26355577	0,785±0,327	0,962±0,027	0,903±0,052	0,959±0,026	0,248
	cg27629977	0,373±0,191	0,446±0,022	0,438±0,042	0,452±0,041	0,910
	Total	0,43±0,15	0,50±0,01	0,50±0,01	0,51±0,15	0,644
	cg03555914	0,648±0,046	0,687±0,027	0,651±0,042	0,673±0,001	0,578
	cg06226279	0,827±0,044	0,859±0,006	0,810±0,057	0,863±0,044	0,516
	cg06969469	0,913±0,007	0,939±0,026	0,923±0,031	0,911±0,057	0,536
	cg07488803	0,814±0,106	0,837±0,026	0,852±0,034	0,876±0,030	0,622
GLI2	**cg10520924**	0,536±0,156	0,566±0,101	0,492±0,011	0,492±0,025	0,922
	cg19917787	0,827±0,014	0,834±0,019	0,802±0,010	0,844±0,020	0,094
	cg22153527	0,912±0,014	0,880±0,018	0,851±0,026	0,896±0,045	0,192
	cg23681112	0,904±0,018	0,918±0,030	0,907±0,009	0,912±0,025	0,988
	Total	0,80±0,01	0,81±0,02	0,78±0,01	0,81±0,01	0,129
	cg00224671	0,267±0,240	0,139±0,050	0,191±0,038	0,127±0,021	0,392
	cg02167710	0,310±0,183	0,240±0,055	0,263±0,025	0,192±0,060	0,497
LAMC3	**cg06353352**	0,774±0,137	0,865±0,048	0,843±0,023	0,863±0,011	0,557
	cg07725394	0,726±0,151	0,786±0,030	0,785±0,022	0,802±0,024	0,826
	cg17024194	0,668±0,075	0,713±0,022	0,666±0,017	0,708±0,033	0,294

Continúa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 21. Continuación

MCF7						
Gen	**Sonda Array**	**Control**	**β-OHB**	**TAV**	**TAS**	***p*-valor**
LAMC3	**cg22367771**	0,295±0,250	0,125±0,034	0,181±0,032	0,131±0,057	0,248
	cg25883584	0,109±0,160	0,021±0,002	0,026±0,012	0,018±0,015	0,910
	cg26964989	0,167±0,011	0,163±0,016	0,204±0,016*	0,137±0,024	**0,041**
	cg27268137	0,794±0,073	0,822±0,034	0,792±0,015	0,841±0,014	0,238
	Total	0,46±0,04	0,43±0,01	0,44±0,01	0,20±0,03	0,622
MAPK10	**cg02898821**	0,223±0,061	0,195±0,030	0,226±0,025	0,178±0,040	0,408
	cg11491436	0,137±0,109	0,083±0,035	0,080±0,022	0,086±0,029	0,988
	cg12845900	0,435±0,073	0,462±0,018	0,446±0,026	0,432±0,063	0,972
	cg13089369	0,180±0,068	0,149±0,068	0,158±0,013	0,117±0,017	0,099
	Total	0,24±0,04	0,22±0,02	0,23±0,01	0,20±0,03	0,442

Los datos se muestran media ± desviación estándar. El valor *p* se calculó con Kruskal Wallis. (*) Denota diferencias estadísticamente significativas en relación con el control evaluado mediante U de Mann-Whitney. *CCND1*, gen que codifica la proteína ciclina D1; *CTNNA2*, gen que codifica la catenina alfa 2; *LAMC3*, gen que codifica la subunidad gamma 3 de laminina; *GLI2*, oncogén asociado a glioma 2; *MAPK10*, gen que codifica la proteína quinasa 10 activada por mitógenos.

De manera relevante, cuando se analizaron los niveles medios de los sitios CpGs localizados en el promotor de cada uno de los genes, se puso de manifiesto un cambio estadísticamente significativo en el oncogén *GLI2* (**Figura 38**), mostrando niveles de metilación mayores respecto al control cuando las células MDA-MB-231 fueron tratadas con β-OHB y tras el tratamiento con secretoma de TAS (**Figura 38**). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles medios de metilación tras los tratamientos en la línea celular MCF7 (**Figura 38**).

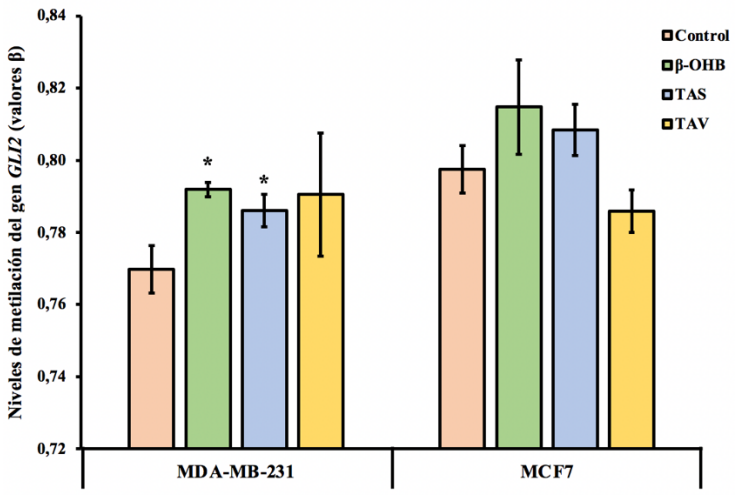


Figura 38. Niveles de metilación del gen *GLI2* en las células tumorales MDA-MB-231 y MCF7 tratadas. Los datos se presentan como la media; las barras de error representan el error estándar. (*) Denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con el control evaluado mediante U de Mann-Whitney. *GLI2*, oncogén asociado a glioma 2; β-OHB, β-hidroxibutirato; TAS, tejido adiposo subcutáneo; TAV, tejido adiposo visceral.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La obesidad es una enfermedad multifactorial grave y compleja que se caracteriza por una inflamación crónica de bajo grado y estrés oxidativo que producen una desregulación del sistema inmunológico. Además de una enfermedad por sí misma, la obesidad incrementa el riesgo del desarrollo de otras patologías, como algunos tipos de cáncer. De hecho, la obesidad es un factor de riesgo modificable del cáncer, como el cáncer de mama, y las marcas epigenéticas se han propuesto como un vínculo mecanicista relevante entre estas dos enfermedades. Relevantemente, tanto las alteraciones sobre el sistema inmunológico como las marcas epigenéticas inducidas por un estado de obesidad pueden remodelarse modificando factores del estilo de vida con intervenciones nutricionales para alcanzar un patrón dietético saludable y para la pérdida de peso, pudiendo ser una herramienta útil en el tratamiento del cáncer asociado a la obesidad en el contexto de la medicina de precisión.

CAPÍTULO I. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADIPOSIDAD Y DE LA DIETA SOBRE GENES RELACIONADOS CON LA CARCINOGÉNESIS LIGADA A OBESIDAD

El cáncer de mama es el tipo de cáncer que mayor incidencia tiene en las mujeres y es la quinta causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial. Uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, es la obesidad (95,96,292,293), que se asocia específicamente con el cáncer de mama postmenopáusico (292). En concreto, existe una clara asociación entre la obesidad central y un mayor riesgo de muerte por cáncer de mama. Es por ello por lo que cambios en el estilo de vida, como las intervenciones nutricionales para unos hábitos dietéticos más saludables y modificaciones sobre el peso corporal, parámetros antropométricos, metabólicos y de composición corporal, pueden ser estrategias prometedoras para la prevención y el tratamiento del cáncer de mama (293).

El cáncer de mama relacionado con la obesidad se ha asociado previamente con los niveles de metilación de la región promotora del gen *ZNF577*, un patrón de metilación específico identificado en una posible firma epigenética del cáncer de mama en mujeres con obesidad (100). En primer lugar, en este estudio, se midieron los niveles de metilación de *ZNF577* en leucocitos sanguíneos para evaluar si los niveles de metilación identificados en los tumores de mama pueden reflejarse en una muestra de ADN no invasiva y de fácil obtención. En este contexto, se demostró que los niveles de metilación de *ZNF577* también se observaron asociados con la adiposidad y el estado menopáusico, y la dirección de las diferencias en los niveles de metilación fue inversa a la de la expresión de este gen en los leucocitos sanguíneos. Los hábitos alimentarios también son un factor de riesgo para desarrollar cáncer y obesidad, además ambos factores estaban relacionados con la regulación del perfil de metilación (265,294,295). Así, cuando se evaluaron los niveles de metilación de *ZNF577* según los hábitos alimentarios, los pacientes con cáncer de mama que seguían una Dieta Mediterránea y que consumían específicamente mayores cantidades de verduras, legumbres y pescado mostraron

los niveles más altos de metilación en *ZNF577*, independientemente de la menopausia y estado de obesidad. Hasta donde conocemos, el trabajo actual es el primero en evaluar el efecto de un patrón de consumo de alimentos sobre el nivel de metilación de los genes ZNF en mujeres con cáncer de mama. Por tanto, serán necesarios más estudios para dilucidar si el efecto de los factores dietéticos sobre la modulación de los niveles de metilación de *ZNF577* también se refleja en la función de este gen y el papel de esta regulación en la progresión del cáncer de mama.

La adherencia a la Dieta Mediterránea se ha asociado con una menor incidencia de cáncer (296–298). De hecho, compuestos específicos contenidos en los alimentos incluidos en la Dieta Mediterránea son capaces de modular los niveles de metilación de varios genes en el contexto de trastornos como enfermedades cardiovasculares (299–301), accidentes cerebrovasculares (300–302) y cáncer (303,304). De acuerdo con estas investigaciones previas, en este análisis, la adherencia a la dieta mediterránea se asoció con niveles más altos de metilación de *ZNF577*. Cuando se evaluó la asociación entre los niveles de metilación de *ZNF577* según el consumo de grupos de alimentos específicos incluidos en la Dieta Mediterránea, los niveles de metilación más altos de *ZNF577* se mostraron en los pacientes con cáncer de mama que consumían las cantidades recomendadas de verduras, legumbres y pescado. Sin embargo, no se observaron diferencias en el perfil de metilación de *ZNF577* asociado con el consumo de carne y carnes procesadas.

La IARC clasificó el consumo de carne roja como "probablemente cancerígeno para los humanos" (305). Esta clasificación se basa principalmente en la evidencia encontrada en asociación con el cáncer de colon; sin embargo, estudios previos han observado que un alto consumo de carne roja también se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de mama y otros tipos de cáncer (306,307).

De manera relevante, el análisis de asociación demostró que el consumo de pescado fue el que más contribuyó a la modulación de los niveles de metilación de *ZNF577*. Estos resultados están de acuerdo con los efectos beneficiosos del consumo de pescado en la promoción de la salud. El pescado, uno de los alimentos más destacados en patrones dietéticos saludables, como la Dieta Atlántica (41), contiene compuestos bioactivos como los PUFAs omega-3, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Estos compuestos tienen múltiples actividades antitumorales importantes y se han utilizado como nutrientes que actúan sobre el sistema inmune, en el contexto de la inmunonutrición (308,309). Las modificaciones epigenéticas se encuentran entre los mecanismos por los cuales los compuestos bioactivos relacionados con el pescado inducen efectos saludables. Se han identificado sitios CpG diferencialmente metilados en los leucocitos sanguíneos de sujetos con sobrepeso y obesidad después de una suplementación de 6 semanas con PUFAs omega-3 (310) y también después de 6 meses de suplementación con PUFAs omega-3 en pacientes con enfermedad de Alzheimer (311).

Debido a que la Dieta Mediterránea y el consumo de pescado son un factor protector y la obesidad es un factor de riesgo de cáncer de mama, la asociación entre los altos niveles de metilación de *ZNF577* y la adherencia a la Dieta Mediterránea o el consumo de pescado junto con la obesidad y el estado menopáusico encontrada en el estudio actual podría considerarse una primera aproximación que requiere mayor investigación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La fuerza y la novedad del presente estudio ha estado representada por el uso de células sanguíneas, ya que los leucocitos circulantes constituyen una herramienta fácil y no invasiva para obtener ácidos nucleicos en un entorno clínico y realizar estudios nutrigenómicos o nutriepigenómicos, en lugar de biopsias invasivas del tejido diana. De hecho, los resultados previos observados en las biopsias de tumores de cáncer de mama, en asociación con la obesidad y el estado menopáusico (100), fueron similares a los resultados obtenidos en leucocitos en el presente estudio. La magnitud de las diferencias en la metilación del ADN entre los grupos puede considerarse pequeña. Se puede atribuir una explicación a la heterogeneidad celular de la muestra utilizada para evaluar los niveles de metilación de un gen en un solo tipo de célula. También, puede deberse a que los pacientes con una misma patología fueron agrupados únicamente según patrones de consumo de alimentos basados en recomendaciones establecidas, en lugar de evaluar el efecto de una intervención específica en un estudio longitudinal. Por otro lado, las características clínicas y patológicas de los tumores y las estrategias terapéuticas no se utilizaron para estratificar y explorar la población de estudio y estos parámetros podrían influir en los niveles de metilación. Sin embargo, las características clínicas de los tumores en la cohorte estudiada fueron en su mayoría homogéneas, siendo la mayoría de los tumores carcinoma ductal invasivo en primer estado, de tamaño pequeño, RE y RP positivos y prueba de Hercept negativa. Por lo tanto, los resultados del presente estudio son de suma relevancia porque se observaron diferencias en los niveles de metilación en un rango estrecho de diferencias intergrupales en el comportamiento nutricional.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación estudiaron otros genes relacionados con el cáncer y la obesidad en mujeres con cáncer de mama o sin cáncer (145). En esta línea, en este trabajo se buscó evaluar el gen *BRCA1*, un gen supresor de tumores especialmente relevante en el cáncer de mama para añadir más evidencia a la conclusión del anterior estudio del grupo. Las mutaciones en el gen *BRCA1* se asocian con mayor riesgo de desarrollo de cáncer de mama y de ovario (312). En este análisis se buscó evaluar los niveles de expresión de este gen en función del grado de adiposidad en mujeres con cáncer de mama, teniendo en cuenta el IMC, observando niveles inferiores de expresión en las mujeres que tenían sobrepeso y obesidad frente a las que presentaban normopeso, y una correlación negativa entre los niveles de expresión de *BRCA1* y el IMC. Estos datos concuerdan con los encontrados en estudios previos donde se demuestra una relación directa entre un IMC elevado y el desarrollo de cáncer de mama en pacientes que presentan mutaciones en los genes *BRCA* (313,314), siendo el exceso de grasa corporal probablemente el responsable del aumento del desarrollo de cáncer de mama en las portadoras de estas mutaciones (312). De hecho, cambios en los estilos de vida hacia patrones más saludables puede modular la expresión de este gen (315,316). En relación con el estudio de los hábitos alimentarios según la adherencia a la Dieta Mediterránea y el consumo de grupos de alimentos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen *BRCA1*.

Tras estos análisis sobre la expresión y metilación del gen *ZNF577* y sobre la expresión del gen *BRCA1*, se buscó evaluar el papel del tejido adiposo obeso y de compuestos nutricionales en el contexto de los tratamientos para la pérdida de peso sobre el cáncer asociado a la obesidad en un panel más amplio de genes relacionados con la carcinogénesis. Para este propósito, se realizaron experimentos *in vitro* en líneas celulares de mama de humanos tanto tumorales como no tumorales. En estos experimentos se expuso a las dos líneas celulares tumorales de mama al secretoma de TAV y TAS de pacientes con obesidad sometidos a procedimientos quirúrgicos con BS para observar el efecto de la obesidad sobre el cáncer de

USC DE COMPOSTELA

mama, que previamente se había evaluado en las células MCF10A en nuestro grupo de investigación (145), y a tratamientos con compuestos nutricionales para observar si esta exposición producía cambios sobre la proliferación celular y a continuación sobre la expresión de genes relacionados con etapas tempranas de la carcinogénesis. En concreto, los compuestos nutricionales empleados fueron sulforafano, un isotiocianato con potencial antioxidante y potentes funciones anticancerígenas, presente en vegetales crucíferos, (56,57,317) como el brócoli, las coles o los grelos (317), alimento típico de la Dieta Atlántica; y β-OHB, el principal cuerpo cetónico que se produce en la fase de cetosis nutricional en tratamientos dietéticos para la pérdida de peso como la VLCKD. Ambos compuestos nutricionales produjeron una disminución en la proliferación celular en las tres líneas celulares, así como una modulación en los niveles de expresión de los genes estudiados. Por el contrario, la exposición al secretoma de tejido adiposo produjo un incremento en la proliferación celular en las líneas celulares tumorales de mama, que se trasladó en una modulación en la expresión génica.

Actualmente, las orientaciones dietéticas para la pérdida de peso en obesidad enfatizan la necesidad e importancia de considerar dietas o patrones dietéticos con consumo completo de alimentos en lugar de centrarse en alimentos o nutrientes de forma individual (318). En este sentido cobran importancia los patrones dietéticos saludables, como la Dieta Mediterránea o la Dieta Atlántica, con efectos beneficiosos sobre la pérdida de peso y las comorbilidades asociadas a la obesidad (45–47). Estos patrones dietéticos tradicionales, que fomentan estilos de vida saludables propios de zonas geográficas concretas, además son ricos en compuestos bioactivos con potenciales beneficios adicionales sobre la salud. Este es el caso del sulfurafano, el isotiocianato mejor caracterizado, contenido en alimentos propios de la Dieta Atlántica, con gran poder antioxidante y potenciales beneficios anticancerígenos (41,56,57). En este contexto, la disminución en la proliferación celular observada tras la exposición a tratamientos con sulforafano encontrada en nuestros análisis, va en la misma dirección con lo encontrado en investigaciones previas, donde se mostró que el sulforafano inhibe el crecimiento de células cancerosas en el cáncer de mama (319), además de provocar la muerte de estas células en combinación con otros compuestos. En parte este efecto puede atribuirse a modificaciones epigenéticas que resultan en una modulación de la expresión de genes responsables de funciones clave en los procesos carcinogénicos (281,320). Estos datos sugieren que además de propiedades quimiopreventivas o como inhibidor de la metástasis (321), el sulforafano podría usarse como agente anticancerígeno en la prevención del cáncer (319,322).

En los últimos años, se han propuestos otras estrategias de intervención nutricional para el manejo de la obesidad, este es el caso de las VLCKD. Las VLCKD se caracterizan por una baja densidad energética y una reducción de la ingesta de carbohidratos que conduce a la cetosis nutricional, con la síntesis de cuerpos cetónicos (78,323). Este tipo de dietas se asocian con una reducción del peso corporal y mejora de la calidad de vida, medidas antropométricas y parámetros bioquímicos (68,71–75). En este sentido, la proliferación celular se vio reducida en las líneas celulares expuestas a β-OHB, el cuerpo cetónico más importante producido al seguir una VLCKD en su fase cetogénica. Estos resultados concuerdan con los encontrados recientemente en experimentos en ratones, donde se pudo comprobar que las dietas cetogénicas, además de no influir en la metástasis de tumores mamarios, la cetosis afectó a la proliferación de las células tumorales y también redujo temporalmente el crecimiento del tumor primario (324). En la misma línea, un estudio reciente realizado *in vitro* en líneas celulares tumorales expuestas a diferentes cuerpos cetónico mostró una inhibición en la proliferación celular (325), lo que sugiere que los cuerpos cetónicos y las dietas cetogénicas pueden ser agentes útiles para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

complementar las estrategias en la prevención y el tratamiento del cáncer en humanos (325–327). Además, debido a la eficacia mostrada también en la pérdida de peso en pacientes con obesidad, en concreto de las VLCKD, las hace potencialmente eficaces en el cáncer asociado a obesidad (75,328,329).

Un exceso de tejido adiposo, principalmente la adiposidad central caracterizada por un exceso de TAV, como ocurre en la obesidad, contribuye al desarrollo, la progresión y la resistencia al tratamiento de algunos tipos de cáncer (330,331). En este contexto, en este estudio se buscó observar el efecto de la obesidad *per se*, y para ello se expuso a las líneas celulares a secretomas de tejido adiposo de pacientes con obesidad sometidos a BS. Se produjo un aumento en la proliferación celular tanto en las MCF7 como en las MDA-MB-231 tanto con exposición a secretomas de TAV como a TAS.

En cuanto a los resultados observados en la expresión de los genes analizados en las líneas celulares expuestas a sulforafano, β-OHB y secretomas de tejido adiposo, se produjo una modulación en sus niveles de expresión. Por una parte, se ha visto un aumento en la expresión de genes supresores tumorales en las células expuestas a tratamientos con sulfurafano y β-OHB, en línea con lo esperado de acuerdo con investigaciones anteriores que demuestran que hábitos dietéticos saludables y compuestos de la dieta producen cambios positivos en genes supresores tumorales (315,316), así como un aumento en la expresión en genes relacionados con la protección antioxidante, algunos de ellos con funciones contradictorias según el tipo de célula o el tipo de cáncer (204,332,333), como *SIRT1* (204) o *SIRT6* (332,334,335). Sin embargo, en relación con la expresión de los genes que se consideran promotores tumorales se observa una mayor variabilidad en los resultados. La expresión del *BIRC5/survivina* aumenta en las tres líneas celulares expuestas a sulfurafano y en las MCF10A expuestas a β-OHB, disminuyendo en las MDA-MB-231. *BIRC5/survivina* es un gen promotor tumoral y su sobreexpresión se relaciona con resistencia a los tratamientos oncológicos (336,337). Del mismo modo, se produce un aumento de la expresión de *ALDH3A1* en las células tumorales expuestas a sulfurafano y β-OHB. Sin embargo, tanto la expresión de *MYC* como de *ALDH3A1* descendió en las MCF10A expuestas a sulfurafano y β-OHB. La ALDH3A1 se considera crucial para los mecanismos de defensa antioxidante y se expresa en tejido con altas necesidades de antioxidantes (338–340). Aunque en cáncer se considera un gen promotor tumoral (338), ALDH3A1 es una proteína multifacética con propiedades variables tanto en homeostasis como en el cáncer (340). Por su parte, MYC también es considerado un promotor tumoral y su expresión está relacionada con la malignidad de las células cancerígenas (341). Este aumento en la expresión de *BIRC/survivina* y *ALDH3A1* también se observa en las líneas tumorales expuestas a secretomas. Por el contrario, en las MCF10A se produce una disminución en sus niveles de expresión. En relación con la expresión de los genes supresores de tumores en las células expuestas a secretomas, en general se vio una disminución en su expresión, pero también se comprobó un aumento en la expresión en *BRCA1* o *TP53* en las líneas tumorales expuestas a TAS, al igual que en los genes responsables de la protección antioxidante.

Por último, en cuanto a los resultados sobre la expresión de *DNMTs*, las cuales desempeñan un papel esencial en la regulación epigenética mediando en los procesos de metilación del ADN, se observa un aumento generalizado de la expresión de *DNMT1* tantos en las células expuestas a compuestos nutricionales, como las expuestas a secretomas de tejido adiposo, la cual juega un papel importante en el mantenimiento de los patrones de metilación durante la replicación del ADN, indispensable en la preservación de la memoria epigenética durante la proliferación celular. DNMT1 desempeña funciones clave en la regulación de genes supresores

tumorales (342). Por otra parte, también se observa un aumento en los niveles de expresión de *DNMT3A* y *DNMT3B* en las células expuestas a tratamientos con sulforafano y β-OHB, las cuales catalizan la metilación del ADN *de novo* y su sobreexpresión se relaciona con varios tipos de cáncer y tumores primarios (343,344), entre ellos están implicadas en la oncogénesis y progresión del cáncer de mama (344). En concreto, la *DNMT3B* se relaciona con la metilación anormal de genes relacionados con el cáncer (345).

CAPÍTULO II. VALORACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR Y EPIGENÉTICO DE UNA DIETA CETOGÉNICA MUY BAJA EN CALORÍAS

La obesidad se considera la epidemia del siglo XXI y su prevalencia es cada vez mayor alrededor de todo el mundo (14–16). En obesidad se produce una remodelación patológica del tejido adiposo, conocida como disfunción del tejido adiposo (131,136). Esta disfunción del tejido adiposo, y más concreto el exceso de TAV provoca un estado proinflamatorio y prooxidativo, por lo que la inflamación crónica de bajo grado y el estrés oxidativo son características comunes de la obesidad (132). Los tratamientos de pérdida de peso mediante intervenciones nutricionales o procedimientos quirúrgicos son las estrategias más relevantes en el tratamiento de la obesidad. Por todo ello, es necesario encontrar estrategias efectivas para combatir la obesidad, que además de producir una pérdida de peso, también puedan mejorar el eje inflamatorio-estrés oxidativo que se genera en esta patología (11,25).

Este estudio demostró que cuando los pacientes con obesidad se sometieron a estrategias de pérdida de peso mediante tratamiento quirúrgico o con intervenciones nutricionales, los biomarcadores de inflamación y de estrés oxidativo mejoran. Estas observaciones se alcanzaron mediante la realización de un ensayo de multiplexación que incluyó 27 citoquinas junto con el análisis de marcadores de peroxidación lipídica en plasma sanguíneo. De manera relevante, el efecto fue más notable en los pacientes después de una VLCKD en comparación con una LCD o BS. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evaluó la evolución temporal de las citoquinas después de una VLCKD en comparación con una LCD y una BS estándar. Los resultados observados respaldan la necesidad de estudios longitudinales adicionales de gran tamaño para dilucidar el efecto inmunomodulador de la cetosis nutricional inducida por una VLCKD en el tratamiento de la obesidad como estrategia para mejorar la inmunidad innata y prevenir infecciones y el riesgo de carcinogénesis en pacientes con obesidad.

Investigaciones recientes han propuesto que el exceso de masa grasa, principalmente el exceso de grasa visceral, secreta un tipo de moléculas llamadas citoquinas que contribuyen al proceso inflamatorio (142,346,347). Estas moléculas proinflamatorias pueden disminuir con tratamientos dietéticos para bajar de peso en personas con obesidad (173). De esta forma, al reducir el estado inflamatorio, se pueden disminuir e incluso eliminar los factores de riesgo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

asociados a la obesidad. En los últimos años, se ha demostrado que ciertos componentes de la dieta modifican los niveles de citoquinas y estrés oxidativo, ejerciendo un efecto antiinflamatorio en el contexto de lo que ahora se conoce como inmunonutrición (175–177). Entre los efectos de los factores dietéticos, la cetosis nutricional se ha convertido en un modulador del sistema inmunológico ya que los cuerpos cetónicos actúan como efectores de señalización (348,349). En el presente estudio encontramos un efecto relevante de las terapias de pérdida de peso sobre varias citoquinas y marcadores de estrés oxidativo. A pesar de la pérdida de peso comparable inducida por BS y VLCKD, se observó un efecto más relevante en los pacientes que siguieron la VLCKD, lo que sugiere que la producción de cuerpos cetónicos inducida por esta dieta cetogénica podría ser el principal factor asociado con la mejoría de la inflamación observada. Una prueba de esta hipótesis fue que el efecto del tratamiento con VLCKD fue más evidente en la fase aguda de la intervención nutricional, donde los pacientes mostraron cerca de 3 mM de cuerpos cetónicos circulantes.

Los resultados actuales se alcanzaron mediante la realización de un ensayo de multiplexación que permite analizar las respuestas de inmunidad en enfermedades humanas de manera integral (350). En particular, los niveles de BAFF, CD163, IL-11, IL-12, IL-2, INF-γ, INF-β, Pentraxin-3 o MMP1 cambiaron después de VLCKD. La mayoría de estas citoquinas mostraron niveles diferenciales entre obesidad y normopeso a nivel basal. Después de la pérdida de peso, los niveles de estas citoquinas se restauraron a niveles similares a los observados en pacientes con normopeso, lo que sugiere una mejora en la inmunidad innata y en las respuestas inflamatorias como se observó anteriormente. Por ejemplo, Pentraxin-3 representa un poderoso biomarcador del estado inflamatorio inversamente asociado con el IMC, el cual aumenta después del ejercicio físico crónico (351,352). Además, estudios previos han mostrado niveles elevados de MMP1 en la obesidad (353).

De manera relevante destacan los cambios observados en IFN-γ, el cual se ha observado en estudios previos que aumenta después de la pérdida de peso y el ejercicio en individuos con obesidad (148), datos que concuerdan con los encontrados en estos análisis. En esta línea, trabajos anteriores han informado que en obesidad existen defectos en poblaciones celulares clave del sistema inmunológico, especialmente las células NK, células anticancerígenas de primera línea productoras de IFN-γ, que forman parte de la respuesta inmune innata y adaptativa. Las células NK son importantes debido a su rápida respuesta ante infecciones y la búsqueda de células cancerosas. Además, también pueden desempeñar funciones más duraderas con el entrenamiento de estas células en respuesta a la estimulación de citoquinas como la IL-12 (354,355), mostrando una mayor producción de IFN-γ (354) en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios e inmunes (356), junto con una mayor citotoxicidad hacia células tumorales (354). De hecho, se ha demostrado que el IFN-γ desempeña funciones relevantes en la inmunología del cáncer, por lo que su señalización puede contribuir a mejorar los diseños de los tratamientos con inmunoterapia (356,357) o interpretar mejor las variantes de la vía del IFN-γ en el cáncer (358). El mayor riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer en pacientes con obesidad puede deberse en parte a un sistema inmune desregulado, que con tratamientos para la pérdida de peso podría mejorar. De Barra y col. (2023) muestran que terapias con agonistas del receptor de GLP-1 para el tratamiento de la obesidad pueden restaurar la funcionalidad de las células NK en pacientes con obesidad (158). Estos datos van en línea con la modulación en los niveles de IFN-γ o IL-12 hacia valores similares a los encontrados en sujetos con normopeso en pacientes que siguieron la VLCKD encontrados en este estudio (159).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otro lado, los pacientes sometidos a BS mostraron un aumento en April, Tweak, osteocalcina e IL-28A. Entre estos factores se encuentran citoquinas proinflamatorias que orquestan la inflamación, la fibrosis y la remodelación de los tejidos como Tweak (359,360), o están implicados en la carcinogénesis como April (361). Ambos, Tweak y April son miembros de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF) y se han implicado en la patogénesis del cáncer (362). Además, April junto con BAFF forman el sistema BAFF-April, el cual tiene funciones sobre el mantenimiento de la inmunidad humoral con la regulación de la maduración y supervivencia de las células B. La evidencia científica sugiere que la producción aberrante del sistema BAFF-April altera la homeostasis inmune y por lo tanto agrava la proliferación e invasión de células cancerígenas (160), mostrando un papel relevante en la patogénesis de algunos tipos de cáncer, como se ha mostrado en el cáncer de mama (162). En concordancia con los resultados mostrados en este estudio, estudios previos mostraron que niveles más altos de BAFF-April se correlacionaban con una mayor disminución del IMC después de la cirugía bariátrica (161). Por el contrario, la osteocalcina (363) e IL-28A (364) se propone que tengan propiedades metabólicas y antiinflamatorias beneficiosas. Estos resultados concuerdan con un potencial estrés metabólico de bajo grado inducido por la BS en la primera fase tras la intervención quirúrgica como se propuso anteriormente (291,365–369) que mejora a largo plazo mediante el aumento de factores metabólicos beneficiosos (370).

La obesidad se asocia con un estado inflamatorio y oxidativo alterado, promovido principalmente por un tejido adiposo disfuncional que secreta proteínas inflamatorias y promueve la producción de ROS por alteraciones en las mitocondrias y el retículo endotelio (371). Se propuso que este estado fuera el principal vínculo mecanicista de la obesidad y sus comorbilidades (372). Se observó que después de los tratamientos de pérdida de peso, el estado inflamatorio y oxidativo en pacientes con obesidad mejora (136,173). En este sentido, cabe esperar encontrar mejoras en los biomarcadores de estrés oxidativo asociados con los estados del peso corporal. Sorprendentemente, en este estudio, se observó un aumento en MDA durante el transcurso de la VLCKD, mientras que se observó una disminución no significativa con respecto al valor inicial después de la BS. Además, los niveles de MDA, pero también de AOP en el seguimiento de las intervenciones se correlacionaron con los niveles circulantes de β-OHB inducidos durante la fase aguda de los tratamientos de pérdida de peso. Estos resultados podrían ser contrarios a lo esperado, sin embargo, estudios previos han evidenciado que una dieta baja en carbohidratos en humanos mejoró la capacidad de defensa contra ROS mediante un aumento del metabolismo oxidativo (373). Además, intervenciones como la restricción calórica, la restricción de glucosa o la actividad física moderada mejoraron la actividad mitocondrial con un aumento concomitante moderado en la producción de ROS que promueven una respuesta adaptativa, denominada mitohormesis, aumentando las defensas antioxidantes y luego mejorando la salud metabólica y la esperanza de vida (374). La mitohormesis se considera cada vez más como un aspecto fundamental de la fisiología normal y un modulador crítico de diversos procesos patológicos, que a través de respuestas celulares se busca restaurar el metabolismo celular y la homeostasis rédox. Estas respuestas a veces continúan después de aliviarse el estrés, dejando a la célula o tejido en un estado menos vulnerable (375). En este estudio no pudimos detectar un aumento estadísticamente significativo en la AOP, probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra, aunque la correlación positiva con los cuerpos cetónicos circulantes podría demostrar el efecto beneficioso de la cetosis nutricional inducida por la VLCKD sobre las defensas antioxidantes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Es importante destacar que, en los marcadores inflamatorios y biomarcadores de estrés oxidativo, el efecto se observó principalmente después de la VLCKD, mientras que la BS mostró un efecto lento principalmente en la fase más aguda (3 meses después de la cirugía). Esto sugiere que, a pesar de la importante pérdida de peso inducida por la VLCKD o BS, el estado metabólico inducido por ambas intervenciones en el corto plazo es diferente y es probable que la cetosis nutricional inducida durante la fase aguda de VLCKD pueda proteger a los pacientes con obesidad de otras enfermedades como la diabetes tipo 2 (82), enfermedad cardiovascular (376), cáncer (93,377–379) y la nueva infección COVID-19 (291). En línea con esta propuesta, previamente se planteó la hipótesis de que una VLCKD podría representar una terapia electiva para contrarrestar enfermedades dermatológicas relacionadas con la inflamación, como la psoriasis, que muestra un importante componente inflamatorio (380). Además, se observó previamente un efecto beneficioso sobre la inflamación asociada a la obesidad incluso después de un corto período de seguimiento de VLCKD (381).

El pequeño tamaño de la muestra podría ser una limitación en este estudio. Sin embargo, los pacientes fueron evaluados en tres puntos durante un procedimiento longitudinal que permitió realizar un análisis pareado considerando a cada paciente como su propio control. Este enfoque aumentó el poder estadístico del estudio. Además, se detectaron diferencias en los parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo tras un curso clínico corto, de 2 a 3 meses en las fases más agudas de los tratamientos de adelgazamiento, lo que refuerza los hallazgos. Por otro lado, la diferencia en el número de hombres y mujeres podría alterar los resultados, especialmente desde el punto de vista hormonal y podría considerarse otra limitación de este estudio. Sin embargo, el número de mujeres incluidas en este estudio fue mayor que el de hombres, particularmente en los grupos VLCKD y BS. Esto sugiere que los resultados pueden ser comparables entre ambos tratamientos de pérdida de peso. Aun así, destaca la necesidad de realizar más estudios longitudinales con una distribución de género más homogénea para explorar el efecto potencial del estado hormonal en este tema. Otra limitación de este estudio podría ser que los tres grupos parten de un IMC inicial diferente. Esto podría sugerir que los resultados no son independientes de la simple pérdida de peso, y no se podría concluir que la diferencia esté relacionada con la cetosis nutricional. Sin embargo, los cambios en el IMC inducidos por VLCKD (−12,4% del IMC) y BS (−14,0% del IMC) durante la fase más aguda de las intervenciones son comparables. La diferencia más relevante entre VLCKD y BS se centra en la cetosis nutricional inducida durante la fase más aguda de la VLCKD, pero no después de BS. Al final de las intervenciones, la pérdida de peso corporal inducida fue mayor después de la BS (35% de la pérdida de peso corporal) que después de VLCKD (20% de la pérdida de peso corporal). Con esta diferencia en la pérdida de peso corporal inducida, se esperaría un mayor efecto sobre los niveles de citoquinas después de la BS que después de la VLCKD. Como este no fue el caso, los resultados refuerzan que la cetosis nutricional podría inducir un efecto antiinflamatorio y antioxidante sinérgicamente con la pérdida de peso corporal. Además, cuando se evaluaron más a fondo las diferencias entre los grupos después de ajustar el IMC inicial y la pérdida de peso, la significación estadística se mantuvo en las citoquinas relevantes del sistema inmunológico innato, como INF-γ, INF-β e IL2.

Después de analizar los efectos de intervenciones para pérdida de peso sobre un panel de citoquinas o biomarcadores de estrés oxidativo, se buscó analizar de forma más concreta el papel de la osteopontina. La osteopontina es una citoquina multifactorial con valores elevados en el tejido adiposo (164,165), la cual tiene un papel fundamental en diversas enfermedades,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

entre ellas el cáncer (169), con funciones destacadas en la inflamación o la regulación de la respuesta inmune (171,172).

Este estudio demuestra que los pacientes con obesidad tratados para perder peso con la inducción de cetosis nutricional basada en una VLCKD mostraron una disminución en los niveles elevados circulantes de osteopontina, mientras que los pacientes sometidos a BS exhibieron un aumento en los niveles circulantes de osteopontina desde el inicio, sin ningún cambio observado después de la LCD. Considerando que ambas terapias de pérdida de peso indujeron una reducción de la masa grasa, el efecto diferencial podría estar asociado a la mejora de la masa magra (75,382) o promovido por las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de la cetosis nutricional inducida por la VLCKD (383). Los efectos de los cambios de la adiposidad en la expresión y secreción de osteopontina podrían regularse epigenéticamente mediante cambios en la metilación del ADN.

La osteopontina es una adipoquina cuyos niveles plasmáticos aumentan en la obesidad (384), y está implicada en varios procesos fisiopatológicos que incluyen la remodelación ósea, inmunidad, inflamación o transformación neoplásica (171). Observamos que los niveles plasmáticos de osteopontina eran más altos en individuos con obesidad en comparación con personas con normopeso y con sobrepeso. Este aumento de los niveles circulantes de osteopontina asociado a la obesidad podría producirse por su secreción por el tejido adiposo. Con el fin de mostrar si los hallazgos observados en humanos se debían a la secreción de osteopontina por parte del tejido adiposo o del músculo, se diseñó un modelo de obesidad en ratones que consistía en ratones hembra DIO que se dividieron a su vez en dos grupos, 4 se sometieron a restricción calórica de la dieta y los 10 restantes continuaron con una dieta *ad libitum* , y un grupo de 10 ratones hembra delgados como control, en los cuales se analizaron los niveles de expresión del gen *SPP1*/*osteopontina* tanto en TAV y TAS como en tejido muscular. En animales, de hecho, se observó un patrón similar en la expresión de SPP1/*osteopontina* en el tejido adiposo de ratones. Se pudieron ver niveles elevados de expresión de *SPP1/osteopontina* en ratones DIO en comparación con ratones delgados en TAV y TAS, mientras que disminuyeron en TAV de los ratones RC con respecto a los ratones DIO. Estos resultados están en línea con investigaciones previas que muestran que los niveles circulantes de osteopontina y su expresión en el TAV se encuentran elevados en obesidad (171,385).

Curiosamente, los niveles circulantes de osteopontina mostraron cambios diferenciales después del seguimiento de las tres terapias de pérdida de peso, VLCKD, LCD y BS en pacientes con obesidad. En cuanto a la VLCKD, los niveles de osteopontina disminuyeron en el punto de cetosis máxima, similar a estudios previos donde la pérdida de peso se acompaña de una disminución en los niveles plasmáticos de osteopontina en pacientes con obesidad (171), así como en respuesta al ejercicio agudo (386). Por el contrario, se observó un aumento pronunciado en los niveles de osteopontina después de la BS. Varias hipótesis podrían explicar el efecto contrario de las terapias de pérdida de peso sobre los niveles circulantes de osteopontina. Por un lado, ambas terapias son capaces de inducir una reducción importante de la masa grasa y sería de esperar una reducción concomitante de la osteopontina, que no fue así. Entre las diferencias entre ambas terapias está que la VLCKD es capaz de preservar la masa y la función muscular (382), al contrario de lo que ocurre en otras estrategias de pérdida de peso, como la BS, donde se produce una pérdida importante de masa muscular (387,388). La osteopontina en condiciones fisiológicas se encuentra en niveles muy bajos o incluso indetectables en el músculo esquelético; sin embargo, cuando se induce daño muscular, la

USC DE SANTIAGO

expresión del gen de osteopontina aumenta hasta 100 veces (389). Además, los niveles de osteopontina también se elevan cuando hay destrucción ósea. La casi inexistente pérdida de masa magra que se produce en los pacientes tras una VLCKD también podría explicar la disminución de los niveles de osteopontina. Sin embargo, en el modelo animal observamos que la expresión de osteopontina está aumentada en el tejido adiposo, principalmente visceral; mientras que fue menor en el músculo de DIO que en los ratones delgados. Sugiere que los niveles circulantes de osteopontina observados en el estado de obesidad podrían ser secretados particularmente por el tejido adiposo.

El tejido adiposo en la obesidad es disfuncional y esta situación crea un microambiente proinflamatorio que fue propuesto como el principal promotor de la fisiopatología de la obesidad (390). La BS induce estrés metabólico, pérdida de masa muscular y masa ósea en los primeros meses tras la cirugía (387,388), al contrario de lo que ocurre en pacientes tras una VLCKD (365,383), lo que podría explicar el aumento de los niveles circulantes de osteopontina observado en los pacientes que se sometieron a BS.

Por otro lado, estos resultados se observaron particularmente en la fase más aguda del tratamiento, lo que demuestra que la cetosis inducida por la VLCKD podría ser un aspecto clave en el efecto diferencial observado de ambas estrategias de pérdida de peso. Hasta donde sabemos, no hay evidencia sobre el efecto de los cuerpos cetónicos o la cetosis nutricional sobre la expresión y secreción de osteopontina. Refuerza aún más el efecto beneficioso de este tipo de intervención nutricional que podría sugerir que los pacientes con obesidad después de una VLCKD se encuentran en un buen estado de salud. Anteriormente se observó un patrón similar a los niveles circulantes de osteopontina considerando otras proteínas asociadas con la fisiopatología de la obesidad, como el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) (365).

Teniendo en cuenta que la regulación epigenética, específicamente la metilación del ADN, juega un papel en el desarrollo de la obesidad y también la expresión del gen *SPP1/osteopontina* está regulada epigenéticamente, planteamos la hipótesis de que el efecto de la adiposidad en la secreción de osteopontina podría regularse mediante mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN. En este estudio no observamos diferencias entre voluntarios con normopeso y pacientes con obesidad, ni después de BS en los niveles de metilación del ADN de *SPP1/osteopontina*, pero sí se observó un ligero cambio después de la VLCKD. Estos resultados sugieren que el efecto de la adiposidad o cetosis nutricional sobre la secreción de osteopontina podría regularse epigenéticamente mediante la metilación del ADN. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar esta hipótesis.

El diseño longitudinal es la fortaleza más relevante de este estudio, que permite evaluar los cambios de los niveles circulantes de osteopontina en paralelo con la distribución metabólica y de la composición corporal después de una terapia para perder peso. Este estudio proporciona, por primera vez, evidencia del perfil diferencial de osteopontina según el tipo de tratamiento de pérdida de peso, lo que sugiere que los niveles circulantes podrían ser un biomarcador del estado de salud de los pacientes después de una terapia para la pérdida de peso en obesidad. Además, en este estudio se revela por primera vez un efecto potencial de la cetosis nutricional sobre la secreción de osteopontina.

Por otro lado, el diseño de asociación observacional de este estudio podría ser una limitación porque no demuestra causalidad, pero propone hipótesis y mecanismos potencialmente subyacentes a la asociación entre la secreción de osteopontina y los cambios en

la adiposidad, el estrés metabólico y la cetosis nutricional. Por lo tanto, este estudio abre la puerta a realizar más investigaciones para determinar los mecanismos subyacentes y proporcionar evidencia del uso potencial de osteopontina como biomarcador del panorama relacionado con la obesidad, como se sugirió anteriormente (391).

Por último, tras evaluar el efecto inmunomodulador de la cetosis nutricional inducida por una VLCKD en pacientes con obesidad, y postularse por tanto como un tratamiento eficaz para la pérdida de peso, pero también para las enfermedades asociadas a la obesidad, como el cáncer, se quiso analizar el papel de la cetosis nutricional sobre la metilación de genes relacionados con procesos cancerígenos. Con el análisis GO se encontró que la VLCKD indujo cambios en la metilación en 920 genes, de los cuales 18 de ellos pertenecen a rutas relacionadas con el cáncer. En concreto, 5 de estos genes fueron los que presentaron mayores cambios de metilación, *CCND1*, *MAPK10*, *GLI2*, *LAMC3* y *CTNNA2*. Del mismo modo, este efecto también se pudo observar de manera similar *in vitro*, principalmente en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 tratada con β-OHB, el principal cuerpo cetónico producido en la cetosis nutricional inducida por tratamientos dietéticos como la VLCKD.

CCND1 es un regulador crítico del ciclo celular que juega un papel importante en la expresión de varios tipos de cáncer. Su sobreexpresión puede conducir a una proliferación celular descontrolada y a la progresión del cáncer, lo que puede ser relevante en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (392–394). Por su parte, *GLI2,* el cual de manera relevante presentó mayores cambios de metilación frente al control en la línea celular MDA-MB-231 tratada con β-OHB, es un factor de transcripción que regulan la expresión de genes que a su vez regulan el crecimiento tumoral. *GLI2* es un mediador de la vía de señalización de Hedgehog que desempeña funciones fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. La activación aberrante de esta vía de señalización se asocia con varios procesos neoplásicos malignos (395). Recientemente se ha asociado con peor supervivencia en general en pacientes con cáncer de mama (396) e interfiere en la proliferación celular en el cáncer colorrectal (397). *LAMC3* es uno de los genes más representativos de una firma que se ha validado para utilizarse como factor pronóstico independiente para el cáncer de mama en el tratamiento individualizado (398), y además su baja expresión se ha relacionado con peor pronóstico en el cáncer de ovario (399). Por su parte, *CTNNA2* es un gen supresor de tumores que frecuentemente se encuentra mutado en algunos tipos de cáncer, como los carcinomas de laringe, y estas mutaciones se asocian con peor pronóstico. Por último, se destaca el papel de *MAPK10*, que además de pertenecer a los 5 genes con mayores cambios en la metilación en este análisis, al comprobar las interacciones de los 18 genes metilados pertenecientes a rutas relacionadas con el cáncer, *MAPK10* fue el que mayor número de interacciones presentó. La acumulación de ROS estimula la producción de MAPK10 (400), la cual regula la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y la inflamación (401). Niveles de expresión disminuidos de *MAPK10* se asocian con peor supervivencia y peor pronóstico en el cáncer (400), encontrándose regulado negativamente en el cáncer de mama o ovario, entre otros (401). Asimismo, la desactivación de MAPK10 en las neuronas induce ganancia de peso y altera la señalización de insulina y leptina, características asociadas a la obesidad (402). Por lo tanto, la cetosis nutricional inducida por una VLCKD en el tratamiento de la obesidad induce cambios en la metilación de genes relacionados con rutas del cáncer, por lo que sería interesante estudiar más en profundidad este papel y postular esta opción de tratamiento de la obesidad como coadyuvante en el tratamiento del cáncer asociado a obesidad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En síntesis, el trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral evidencia que un exceso de adiposidad, como ocurre en estado de obesidad, se asocia con una desregulación de genes relacionados con el cáncer, en concreto en el cáncer de mama. Además, la adquisición de hábitos dietéticos saludables e intervenciones nutricionales para la pérdida de peso pueden modular la expresión de genes relacionados con etapas tempranas de la carcinogénesis. Esta modulación en la expresión génica se puede conseguir con una mayor adherencia a patrones dietéticos saludables, como la Dieta Mediterránea o la Dieta Atlántica, que incluyan el consumo de alimentos ricos en grasas saludables, como el omega-3, incluido en el pescado, y compuestos bioactivos, como el sulforafano, componente destacado de las verduras crucíferas, como los grelos, ambos alimentos típicos de la Dieta Atlántica, o con dietas adecuadas para la pérdida de peso que inducen cetosis nutricional, como en la VLCKD. Estos datos se obtuvieron a través del estudio de muestras de leucocitos de sangre periférica, un tipo de muestra no invasiva que refleja los resultados encontrados previamente en muestras de biopsias de tejido, en mujeres con cáncer de mama. Para completar y ampliar estos resultados, se realizaron estudios *in vitro* en células tumorales y no tumorales de mama de humanos exponiéndolas a compuestos de la dieta y secretomas de tejido adiposo de pacientes con obesidad.

Asimismo, en este trabajo también se evidencia que el exceso de adiposidad ligado a obesidad se caracteriza por un estado proinflamatorio y prooxidativo, el cual se asocia con una alteración del sistema inmunológico. Este eje oxidativo-inflamatorio se puede modular con estrategias adecuadas para la pérdida de peso en pacientes con obesidad, y en concreto, se pudo evidenciar el papel inmunomodulador de la pérdida de peso y la cetosis nutricional inducida por una VLCKD, observando una regulación de los niveles circulantes de citoquinas relacionadas con la respuesta inmune y biomarcadores de estrés oxidativo, mediante la inducción de mitohormesis. Además, se observaron cambios en los niveles de metilación de *osteopontina*, factor asociado al desarrollo de cáncer, así como una mejora en sus niveles circulantes, en pacientes que siguieron una VLCKD que evidencia que la adiposidad o la cetosis nutricional podrían regularse epigenéticamente. De manera relevante, también se pudo evidenciar que la VLCKD modula la metilación de genes implicados en rutas relacionadas con el cáncer. Por lo tanto, nuestros hallazgos ponen de manifiesto el potencial papel de la cetosis nutricional inducida por una VLCKD, más que la sola pérdida de peso, en el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades asociadas, concretamente como coadyuvante en el tratamiento del cáncer asociado a obesidad.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The present Doctoral Thesis work has allowed us to reach the following conclusions:

1. Methylation levels of the *ZNF577* gene, previously identified in biopsies of breast tumor tissue as an epigenetic signature of breast cancer associated with obesity, can be detected in peripheral blood leukocytes and this methylation pattern is associated with the state adiposity, menopausal status and adherence to the Mediterranean Diet, specifically the consumption of vegetables and fish.

2. The expression of the tumor suppressor gene, *BRCA1*, in peripheral blood leukocytes, is associated with the state of adiposity in patients with breast cancer, with lower levels of expression of this gene being observed in patients with obesity.

3. Weight loss treatment by monitoring VLCKD induces a modulation of factors involved in immunity and oxidative stress. This effect seems to be induced mainly by nutritional ketosis, rather than weight loss, suggesting a potential role of nutritional ketosis in protecting tumor development in patients with obesity.

4. Nutritional ketosis and weight loss induced by a VLCKD modulates the increased circulating levels of osteopontin in patients with obesity. *Osteopontin* expression could be induced in response to a metabolic stress and therefore, osteopontin circulating levels could be a biomarker of the obesity-related inflammation and metabolic stress resolution or health status after a weight loss treatment. Further studies are needed to elucidate if this effect is epigenetically regulated.

5. *In vitro* treatment of breast cancer cell lines with ketone bodies induces a decrease in cell proliferation and the regulation of genes involved in early processes of tumor development. This effect was partly similar to that observed after treatment with the bioactive compound, sulforaphane, and opposite to the effect exerted by the secretome of obese visceral adipose tissue.

6. Nutritional ketosis induced by VLCKD in the treatment of obesity seems to exert epigenetic effects manifested in changes in DNA methylation of genes involved in carcinogenesis, such as *MAPK10*, *CCND1*, *GLI2*, *LAMC3* and *CTNNA2*. This effect was further reflected *in vitro* in breast cancer cell lines.

Therefore, the inflammation and oxidative stress produced by adipose tissue dysfunction characteristic of obesity can be modulated by weight loss and nutritional ketosis induced by VLCKD, which has immunomodulatory capacity by regulating the levels of factors involved in the immunological response. This effect could be associated with a reduced risk of cancer development in obese patients. Ketone bodies have the ability to reduce the proliferation of breast tumor cells and regulate the genes expression involved in early cancer processes, similar to what was observed with sulforaphane, a bioactive compound associated with healthy dietary patterns. Likewise, VLCKD is capable of modulating the genes methylation related to carcinogenesis. Finally, all of this shows that treatment with nutritional therapy in obesity, in the context of healthy dietary patterns, capable of inducing ketosis, could be a useful strategy, not only for reducing body weight but also for preventing the development of cancer associated with obesity.

USC DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. Organización Mundial de la Salud. 2021.

2. Lathigara D, Kaushal D, Wilson RB. Molecular Mechanisms of Western Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Carcinogenesis-A Narrative Review. Metabolites. 2023;13(5):675.

3. Rohde K, Keller M, la Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. Metabolism. 2019;92:37–50.

4. Kawai T, Autieri M V, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. Am J Physiol Cell Physiol. 2021;320(3):C375–91.

5. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. Am J Manag Care. 2016;(7 Suppl):s176-85.

6. Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, Robakowska M, Mrugacz M. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. Int J Mol Sci. 2020;21(10).

7. Congdon P. Obesity and Urban Environments. Int J Environ Res Public Health. 2019;16(3).

8. Nicolaidis S. Environment and obesity. Metabolism. 2019;100S:153942.

9. Rinonapoli G, Pace V, Ruggiero C, Ceccarini P, Bisaccia M, Meccariello L, et al. Obesity and Bone: A Complex Relationship. Int J Mol Sci. 2021;22(24):13662.

10. Mahmoud AM. An Overview of Epigenetics in Obesity: The Role of Lifestyle and Therapeutic Interventions. Int J Mol Sci. 2022;23(3):1341.

11. Wiechert M, Holzapfel C. Nutrition Concepts for the Treatment of Obesity in Adults. Nutrients. 2021;14(1):169.

12. Gadde KM, Martin CK, Berthoud HR, Heymsfield SB. Obesity: Pathophysiology and Management. J Am Coll Cardiol. 2018;71(1):69–84.

13. Kokkorakis M, Katsarou A, Katsiki N, Mantzoros CS. Milestones in the journey towards addressing obesity; Past trials and triumphs, recent breakthroughs, and an exciting future in the era of emerging effective medical therapies and integration of effective medical therapies with metabolic surgery. Metabolism. 2023;148:155689.

14. Mayoral LPC, Andrade GM, Mayoral EPC, Huerta TH, Canseco SP, Rodal Canales FJ, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. Indian J Med Res. 2020;151(1):11–21.

15. Green M, Arora K, Prakash S. Microbial Medicine: Prebiotic and Probiotic Functional Foods to Target Obesity and Metabolic Syndrome. Int J Mol Sci. 2020;21(8):2890.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

16. Puljiz Z, Kumric M, Vrdoljak J, Martinovic D, Ticinovic Kurir T, Krnic MO, et al. Obesity, Gut Microbiota, and Metabolome: From Pathophysiology to Nutritional Interventions. Nutrients. 2023;15(10):2236.

17. World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2023. 2023.

18. Koenen M, Hill MA, Cohen P, Sowers JR. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. Circ Res. 2021;128(7):951–68.

19. Arrieta F, Pedro-Botet J. Recognizing obesity as a disease: A true challenge. Rev Clin Esp. 2021;221(9):544–6.

20. Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. Med Clin North Am. 2018;102(1):13–33.

21. Endalifer ML, Diress G. Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. J Obes. 2020;2020:6134362.

22. Weir CB, Jan A. BMI Classification Percentile And Cut Off Points. 2023.

23. Khanna D, Peltzer C, Kahar P, Parmar MS. Body Mass Index (BMI): A Screening Tool Analysis. Cureus. 2022;14(2):e22119.

24. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2013;309(1):71–82.

25. Ruban A, Stoenchev K, Ashrafian H, Teare J. Current treatments for obesity. Clin Med (Lond). 2019;19(3):205–12.

26. Oussaada SM, van Galen KA, Cooiman MI, Kleinendorst L, Hazebroek EJ, van Haelst MM, et al. The pathogenesis of obesity. Metabolism. 2019;92:26–36.

27. Holmes CJ, Racette SB. The Utility of Body Composition Assessment in Nutrition and Clinical Practice: An Overview of Current Methodology. Nutrients. 2021;13(8):2493.

28. Portincasa P, Frühbeck G. Phenotyping the obesities: reality or utopia? Rev Endocr Metab Disord. 2023;24(5):767–73.

29. Salmón-Gómez L, Catalán V, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Relevance of body composition in phenotyping the obesities. Rev Endocr Metab Disord. 2023;24(5):809–23.

30. Blaak EE, Goossens GH. Metabolic phenotyping in people living with obesity: Implications for dietary prevention. Rev Endocr Metab Disord. 2023;24(5):825–38.

31. García Almeida JM, García García C, Vegas Aguilar IM, Bellido Castañeda V, Bellido Guerrero D. Morphofunctional assessment of patient´s nutritional status: a global approach. Nutr Hosp. 2021;38(3):592–600.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

32. Brandfon S, Eylon A, Khanna D, Parmar MS. Advances in Anti-obesity Pharmacotherapy: Current Treatments, Emerging Therapies, and Challenges. Cureus. 2023;15(10):e46623.

33. Haq Ansari HU, Qazi SU, Sajid F, Altaf Z, Ghazanfar S, Naveed N, et al. Efficacy and safety of glucagon-like-peptide-1 receptor agonists on body weight and cardiometabolic parameters in individuals with obesity and without diabetes: A systematic review and meta-analysis. Endocr Pract. 2023;27:S1530.

34. Arillotta D, Floresta G, Guirguis A, Corkery JM, Catalani V, Martinotti G, et al. GLP-1 Receptor Agonists and Related Mental Health Issues; Insights from a Range of Social Media Platforms Using a Mixed-Methods Approach. Brain Sci. 2023;13(11).

35. Knop FK, Aroda VR, do Vale RD, Holst-Hansen T, Laursen PN, Rosenstock J, et al. Oral semaglutide 50 mg taken once per day in adults with overweight or obesity (OASIS 1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet. 2023;402(10403):705–19.

36. Tak YJ, Lee SY. Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand? Curr Obes Rep. 2021;10(1):14–30.

37. Dominguez LJ, Veronese N, Baiamonte E, Guarrera M, Parisi A, Ruffolo C, et al. Healthy Aging and Dietary Patterns. Nutrients. 2022;14(4):889.

38. Neuhouser ML. The importance of healthy dietary patterns in chronic disease prevention. Nutr Res. 2019;70:3–6.

39. Millen BE, Abrams S, Adams-Campbell L, Anderson CA, Brenna JT, Campbell WW, et al. The 2015 Dietary Guidelines Advisory Committee Scientific Report: Development and Major Conclusions. Adv Nutr. 2016;7(3):438–44.

40. Lorenzo PM, Izquierdo AG, Rodriguez-Carnero G, Fernández-Pombo A, Iglesias A, Carreira MC, et al. Epigenetic Effects of Healthy Foods and Lifestyle Habits from the Southern European Atlantic Diet Pattern: A Narrative Review. Adv Nutr. 2022;13(5):1725–47.

41. Cena H, Calder PC. Defining a healthy diet: Evidence for the role of contemporary dietary patterns in health and disease. Nutrients. 2020;12(2):334.

42. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. Am J Epidemiol. 1986;124(6):903–15.

43. Trichopoulou A, Martínez-González MA, Tong TY, Forouhi NG, Khandelwal S, Prabhakaran D, et al. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. BMC Med. 2014;12(1):112.

44. Eleftheriou D, Benetou V, Trichopoulou A, La Vecchia C, Bamia C. Mediterranean diet and its components in relation to all-cause mortality: meta-analysis. Br J Nutr. 2018;120(10):1081–97.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

45. Martínez-González MA, Gea A, Ruiz-Canela M. The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health. Circ Res. 2019;124(5):779–98.

46. Carlos S, De La Fuente-Arrillaga C, Bes-Rastrollo M, Razquin C, Rico-Campà A, Martínez-González MA, et al. Mediterranean Diet and Health Outcomes in the SUN Cohort. Nutrients. 2018;10(4):439.

47. Morze J, Danielewicz A, Przybyłowicz K, Zeng H, Hoffmann G, Schwingshackl L. An updated systematic review and meta-analysis on adherence to mediterranean diet and risk of cancer. Eur J Nutr. 2021;60(3):1561–86.

48. Divella R, Daniele A, Savino E, Paradiso A. Anticancer Effects of Nutraceuticals in the Mediterranean Diet: An Epigenetic Diet Model. Cancer Genomics Proteomics. 2020;17(4):335–50.

49. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. Epigenomics. 2011;3(4):503–18.

50. Velho MV, Pinheiro R, Rodrigues AS. The Atlantic diet - Origin and features. International Journal of Food Studies. 2016;5(1):106–19.

51. Tejera-Pérez C, Sánchez-Bao A, Bellido-Guerrero D, Casanueva FF. The southern European atlantic diet, a review. Minerva Endocrinol. 2021;46(2):145–60.

52. Calvo-Malvar MDM, Leis R, Benítez-Estévez AJ, Sánchez-Castro J, Gude F. A randomised, family-focused dietary intervention to evaluate the Atlantic diet: The GALIAT study protocol. BMC Public Health. 2016;16(1):820.

53. Trabazo RL, Pérez C de L, Castro Pérez X, Solla P. Atlantic diet. Nutrition and gastronomy in galicia. Nutr Hosp. 2019;36(Ext1):7–13.

54. Charron CS, Vinyard BT, Jeffery EH, Ross SA, Seifried HE, Novotny JA. BMI Is Associated With Increased Plasma and Urine Appearance of Glucosinolate Metabolites After Consumption of Cooked Broccoli. Front Nutr. 2020;7:575092.

55. Li W, Trieu J, Blazev R, Parker BL, Murphy KT, Swiderski K, et al. Sulforaphane attenuates cancer cell-induced atrophy of C2C12 myotubes. Am J Physiol Cell Physiol. 2023;324(2):C205–21.

56. Elkashty OA, Tran SD. Sulforaphane as a Promising Natural Molecule for Cancer Prevention and Treatment. Curr Med Sci. 2021;41(2):250–69.

57. Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang S, Rahman SM, Robert-McComb J, et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. J Nutr Biochem. 2018;58:1–16.

58. D'Angelo S, Motti ML, Meccariello R. ω-3 and ω-6 Polyunsaturated Fatty Acids, Obesity and Cancer. Nutrients. 2020;12(9):2751.

59. Instituto Galego de Estadística. Padrón municipal de habitantes. 2021.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

60. Ribeiro AI, Krainski ET, Carvalho MS, Pina M de F de. Where do people live longer and shorter lives? An ecological study of old-age survival across 4404 small areas from 18 European countries. J Epidemiol Community Health (1978). 2016;70(6):561–8.

61. Mathers CD, Stevens GA, Boerma T, White RA, Tobias MI. Causes of international increases in older age life expectancy. Lancet. 2015;385(9967):540–8.

62. Müller-Nordhorn J, Binting S, Roll S, Willich SN. An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. Eur Heart J. 2008;29(10):1316–26.

63. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. Eur Heart J. 2014;35(42):2950–9.

64. Campbell AP. DASH Eating Plan: An Eating Pattern for Diabetes Management. Diabetes Spectr. 2017;30(2):76–81.

65. Tertsunen HM, Hantunen S, Tuomainen TP, Virtanen JK. Adherence to a healthy Nordic diet and risk of type 2 diabetes among men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. Eur J Nutr. 2021;60(7):3927–34.

66. Krznarić Ž, Karas I, Kelečić DL, Bender DV. The Mediterranean and Nordic Diet: A Review of Differences and Similarities of Two Sustainable, Health-Promoting Dietary Patterns. Front Nutr. 2021;8:683678.

67. Napoleão A, Fernandes L, Miranda C, Marum AP. Effects of Calorie Restriction on Health Span and Insulin Resistance: Classic Calorie Restriction Diet vs. Ketosis-Inducing Diet. Nutrients. 2021;13(4):1302.

68. Welton S, Minty R, O'Driscoll T, Willms H, Poirier D, Madden S, et al. Intermittent fasting and weight loss: Systematic review. Can Fam Physician. 2020;66(2):117–25.

69. Vasim I, Majeed CN, DeBoer MD. Intermittent Fasting and Metabolic Health. Nutrients. 2022;14(3):631.

70. Gershuni VM, Yan SL, Medici V. Nutritional Ketosis for Weight Management and Reversal of Metabolic Syndrome. Curr Nutr Rep. 2018;7(3):97–106.

71. Moreno B, Crujeiras AB, Bellido D, Sajoux I, Casanueva FF. Obesity treatment by very low-calorie-ketogenic diet at two years: reduction in visceral fat and on the burden of disease. Endocrine. 2016;54(3):681–90.

72. Moreno B, Bellido D, Sajoux I, Goday A, Saavedra D, Crujeiras AB, et al. Comparison of a very low-calorie-ketogenic diet with a standard low-calorie diet in the treatment of obesity. Endocrine. 2014;47(3):793–805.

73. Cravings A, Activity S, Castro AI, Gomez-arbelaez D, Crujeiras AB, Granero R, et al. Effect of A Very Low-Calorie Ketogenic Diet on Food and Alcohol Cravings, Physical and Sexual Activity, Sleep Disturbances, and Quality of Life in Obese Patients. Nutrients. 2018; 10(10):1348.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

74. Gomez-Arbelaez D, Bellido D, Castro AI, Ordoñez-Mayan L, Carreira J, Galban C, et al. Body Composition Changes After Very-Low-Calorie Ketogenic Diet in Obesity Evaluated by 3 Standardized Methods. J Clin Endocrinol Metab. 2017;102(2):488–98.

75. Paoli A. Ketogenic diet for obesity: friend or foe? Int J Environ Res Public Health. 2014;11(2):2092–107.

76. Paoli A, Bosco G, Camporesi EM, Mangar D. Ketosis, ketogenic diet and food intake control: a complex relationship. Front Psychol. 2015;6:27.

77. Muscogiuri G, El Ghoch M, Colao A, Hassapidou M, Yumuk V, Busetto L, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults with a Very Low-Calorie Ketogenic Diet: A Systematic Review and Meta-Analysis. Obes Facts. 2021;14(2):222–45.

78. Cunha GM, Guzman G, Correa De Mello LL, Trein B, Spina L, Bussade I, et al. Efficacy of a 2-Month Very Low-Calorie Ketogenic Diet (VLCKD) Compared to a Standard Low-Calorie Diet in Reducing Visceral and Liver Fat Accumulation in Patients With Obesity. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:607.

79. Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Castro AI, Goday A, Mas-Lorenzo A, Bellon A, et al. Acid–base safety during the course of a very low-calorie-ketogenic diet. Endocrine. 2017;58(1):81–90.

80. Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Castro AI, Martinez-Olmos MA, Canton A, Ordoñez-Mayan L, et al. Resting metabolic rate of obese patients under very low calorie ketogenic diet. Nutr Metab (Lond). 2018;15(1):18.

81. Goday A, Bellido D, Sajoux I, Crujeiras AB, Burguera B, García-Luna PP, et al. Short-term safety, tolerability and efficacy of a very low-calorie-ketogenic diet interventional weight loss program versus hypocaloric diet in patients with type 2 diabetes mellitus. Nutr Diabetes. 2016 Sep 19;6(9):e230.

82. Hernández-Reyes A, Cámara-Martos F, Molina-Luque R, Romero-Saldaña M, Molina-Recio G, Moreno-Rojas R. Changes in body composition with a hypocaloric diet combined with sedentary, moderate and high-intense physical activity: a randomized controlled trial. BMC Womens Health. 2019;19(1):167.

83. Zulet MA, Bondia-Pons I, Abete I, de la Iglesia R, López-Legarrea P, Forga L, et al. The reduction of the metabolyc syndrome in Navarra-Spain (RESMENA-S) study: a multidisciplinary strategy based on chrononutrition and nutritional education, together with dietetic and psychological control. Nutr Hosp. 2011;26(1):16–26.

84. Tejera C, Porca C, Rodriguez-Carnero G, Andújar P, Casanueva FF, Bellido D, et al. Reducing Metabolic Syndrome through a Group Educational Intervention Program in Adults with Obesity: IGOBE Program. Nutrients. 2022;14(5):1066.

85. Porca C, Rodriguez-Carnero G, Tejera C, Andujar P, Casanueva FF, Crujeiras AB, et al. Effectiveness to promote weight loss maintenance and healthy lifestyle habits of a group

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

educational intervention program in adults with obesity: IGOBE program. Obes Res Clin Pract. 2021;15(6):570–8.

86. Wolfe BM, Kvach E, Eckel RH. Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery. Circ Res. 2016;118(11):1844–55.

87. Cava E, Yeat NC, Mittendorfer B. Preserving Healthy Muscle during Weight Loss. Adv Nutr. 2017;8(3):511–9.

88. Martínez MC, Meli EF, Candia FP, Filippi F, Vilallonga R, Cordero E, et al. The Impact of Bariatric Surgery on the Muscle Mass in Patients with Obesity: 2-Year Follow-up. Obes Surg. 2022;32(3):625–33.

89. Hopkins BD, Goncalves MD, Cantley LC. Obesity and Cancer Mechanisms: Cancer Metabolism. J Clin Oncol. 2016;34(35):4277–83.

90. Das M, Webster NJG. Obesity, cancer risk, and time-restricted eating. Cancer Metastasis Rev. 2022;41(3):697–717.

91. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. N Engl J Med. 2016;375(8):794–8.

92. Lorenzo PM, Crujeiras AB. Potential effects of nutrition-based weight loss therapies in reversing obesity-related breast cancer epigenetic marks. Food Funct . 2021;12(4):1402–14.

93. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. Nat Rev Clin Oncol. 2021;18(10):663–72.

94. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016;66(4):271–89.

95. Saadatmand S, Bretveld R, Siesling S, Tilanus-Linthorst MMA. Influence of tumour stage at breast cancer detection on survival in modern times: Population based study in 173 797 patients. BMJ (Online). 2015;351.

96. Brown KA. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer. Nat Rev Endocrinol. 2021;17(6):350–63.

97. Modesitt SC, Nagell JR Van. The Impact of Obesity on the Incidence A Review. Obstet Gynecol Surv. 2005;60(10):683–93.

98. Bousquenaud M, Fico F, Solinas G, Rüegg C, Santamaria-Martínez A. Obesity promotes the expansion of metastasis-initiating cells in breast cancer. Breast Cancer Res. 2018;20(1):104.

99. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Stefansson OA, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, Cueva J, et al. Obesity and menopause modify the epigenomic profile of breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2017;24(7):351–63.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

100. Crujeiras AB, Casanueva FF. Obesity and the reproductive system disorders: epigenetics as a potential bridge. Hum Reprod Update. 2015;21(2):249–61.

101. Weber DD, Aminazdeh-Gohari S, Kofler B. Ketogenic diet in cancer therapy. Aging. 2018;10(2):164–5.

102. Klement RJ, Brehm N, Sweeney RA. Ketogenic diets in medical oncology: a systematic review with focus on clinical outcomes. Medical Oncology. 2020;37(2):14.

103. Weber DD, Aminzadeh-Gohari S, Tulipan J, Catalano L, Feichtinger RG, Kofler B. Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand? Mol Metab. 2020;33:102–21.

104. Cohen CW, Fontaine KR, Arend RC, Alvarez RD, Leath CA, Huh WK, et al. A ketogenic diet reduces central obesity and serum insulin in women with ovarian or endometrial cancer. Journal of Nutrition. 2018;148(8):1253–60.

105. Trimboli P, Castellana M, Bellido D, Casanueva FF. Confusion in the nomenclature of ketogenic diets blurs evidence. Rev Endocr Metab Disord [Internet]. 2020;21(1):1–3.

106. Lorenzo PM, Izquierdo AG, Diaz-Lagares A, Carreira MC, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, et al. ZNF577 Methylation Levels in Leukocytes From Women With Breast Cancer Is Modulated by Adiposity, Menopausal State, and the Mediterranean Diet. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:245.

107. Castro AVB, Kolka CM, Kim SP, Bergman RN. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014;58(6):600–9.

108. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. Los colores del tejido adiposo. Gac Med Mex. 2020;156(2).

109. Norreen-Thorsen M, Struck EC, Öling S, Zwahlen M, Von Feilitzen K, Odeberg J, et al. A human adipose tissue cell-type transcriptome atlas. Cell Rep. 2022;40(2):111046.

110. Heenan KA, Carrillo AE, Fulton JL, Ryan EJ, Edsall JR, Rigopoulos D, et al. Effects of nutrition/diet on brown adipose tissue in humans: A systematic review and meta-analysis Nutrients. 2020;12(9):2752.

111. Fuse S, Endo T, Tanaka R, Kuroiwa M, Ando A, Kume A, et al. Effects of Capsinoid Intake on Brown Adipose Tissue Vascular Density and Resting Energy Expenditure in Healthy, Middle-Aged Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Nutrients. 2020;12(9):2676.

112. Saari TJ, Raiko J, U-Din M, Niemi T, Taittonen M, Laine J, et al. Basal and cold-induced fatty acid uptake of human brown adipose tissue is impaired in obesity. Sci Rep. 2020;10.

113. Agurs-Collins T, Ross SA, Dunn BK. The Many Faces of Obesity and Its Influence on Breast Cancer Risk. Front Oncol. 2019;9:765.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

114. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. Vol. 27, Annu Rev Nutr. 2007;27:79–101.

115. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. Front Endocrinol. 2016;7:30.

116. Hwang I, Kim JB. Two Faces of White Adipose Tissue with Heterogeneous Adipogenic Progenitors. Diabetes Metab J. 2019;43(6):752.

117. Cabia B, Andrade S, Carreira MC, Casanueva FF, Crujeiras AB. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis. Obesity Reviews. 2016;17(4):361–76.

118. Castellano-Castillo D, Morcillo S, Crujeiras AB, Sánchez-Alcoholado L, Clemente-Postigo M, Torres E, et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and global DNA methylation in visceral adipose tissue from colorectal cancer patients. BMC Cancer. 2019;19(1):93.

119. Amaia Rodriguez, Victoria Catalan, Javier Gomez-Ambrosi, Gema Fruhbeck. Visceral and Subcutaneous Adiposity: Are Both Potential Therapeutic Targets for Tackling the Metabolic Syndrome? Curr Pharm Des. 2007;13(21):2169–75.

120. Després JP. Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease. Circulation. 2012;126(10):1301–13.

121. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. Horm Mol Biol Clin Investig. 2015;21(1):57–74.

122. Huang LY, Chiu CJ, Hsing CH, Hsu YH. Interferon Family Cytokines in Obesity and Insulin Sensitivity. Cells. 2022 Dec 14;11(24):4041.

123. Sánchez-Jiménez F, Pérez-Pérez A, Cruz-Merino L de la, Sánchez-Margalet V. Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin. Front Oncol. 2019;9:596.

124. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. Clin Sci (Lond). 2021;135(6):731–52.

125. Zhao S, Kusminski CM, Elmquist JK, Scherer PE. Leptin: Less Is More. Diabetes. 2020;69(5):823–9.

126. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:585887.

127. Kim JE, Kim JS, Jo MJ, Cho E, Ahn SY, Kwon YJ, et al. The Roles and Associated Mechanisms of Adipokines in Development of Metabolic Syndrome. Molecules. 2022;27(2).

128. Straub LG, Scherer PE. Metabolic Messengers: Adiponectin. Nat Metab. 2019;1(3):334–9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

129. Pardo M, Roca-Rivada A, Seoane LM, Casanueva FF. Obesidomics: contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research. Endocrine. 2012;41(3):374–83.

130. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. J Clin Invest. 2011;121(6):2094–101.

131. Landecho MF, Tuero C, Valentí V, Bilbao I, de la Higuera M, Frühbeck G. Relevance of leptin and other adipokines in obesity-associated cardiovascular risk. Nutrients. 2019;11(11):2664.

132. Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. Inflamación y obesidad (Lipoinflamación). Nutr Hosp. 2015;31(6):2352–8.

133. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. Diabetologia. 2016;59(6):1075–88.

134. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. Int J Mol Sci. 2019;20(9):2358.

135. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. Metab Syndr Relat Disord. 2015;13(10):423–44.

136. Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. Int J Mol Sci. 2021;22(4):1786.

137. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. Antioxid Redox Signal. 2014;20(7):1126–67.

138. Wang Y, Qi H, Liu Y, Duan C, Liu X, Xia T, et al. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. Theranostics. 2021;11(10):4839–57.

139. Elisia I, Lam V, Cho B, Hay M, Li MY, Kapeluto J, et al. Exploratory examination of inflammation state, immune response and blood cell composition in a human obese cohort to identify potential markers predicting cancer risk. PLoS One. 2020;15(2):e0228633.

140. Dias-Audibert FL, Navarro LC, de Oliveira DN, Delafiori J, Melo CFOR, Guerreiro TM, et al. Combining Machine Learning and Metabolomics to Identify Weight Gain Biomarkers. Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:6.

141. Faria AP de, Ritter AMV, Gasparetti CS, Corrêa NB, Brunelli V, Almeida A, et al. A Proposed Inflammatory Score of Circulating Cytokines/Adipokines Associated with Resistant Hypertension, but Dependent on Obesity Parameters. Arq Bras Cardiol. 2019;112(4):383–9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

142. Atakan MM, Koşar ŞN, Güzel Y, Tin HT, Yan X. The Role of Exercise, Diet, and Cytokines in Preventing Obesity and Improving Adipose Tissue. Nutrients. 2021;13(5):1459.

143. Rubinstein MM, Brown KA, Iyengar NM. Targeting obesity-related dysfunction in hormonally driven cancers. Br J Cancer. 2021;125(4):495–509.

144. Crujeiras AB, Cabia B, Carreira MC, Amil M, Cueva J, Andrade S, et al. Secreted factors derived from obese visceral adipose tissue regulate the expression of breast malignant transformation genes. Int J Obes (Lond). 2016;40(3):514–23.

145. Rathmell JC. Obesity, Immunity, and Cancer. N Engl J Med. 2021;384(12):1160–2.

146. Woodall MJ, Neumann S, Campbell K, Pattison ST, Young SL. The Effects of Obesity on Anti-Cancer Immunity and Cancer Immunotherapy. Cancers (Basel). 2020;12(5):1230.

147. O'Shea D, Hogan AE. Dysregulation of Natural Killer Cells in Obesity. Cancers (Basel). 2019;11(4):573.

148. Traba J, Waldmann TA, Anton OM. Analysis of Human Natural Killer Cell Metabolism. J Vis Exp. 2020;(160).

149. Battula S, Papastoitsis G, Kaufman HL, Wittrup KD, Schmidt MM. Intratumoral aluminum hydroxide-anchored IL-12 drives potent antitumor activity by remodeling the tumor microenvironment. JCI Insight. 2023;8(23):e168224.

150. Abdi K, Laky K, Abshari M, Hill EM, Lantz L, Singh NJ, et al. Dendritic cells Trigger IFN-γ secretion by NK cells independent of IL-12 and IL-18. Eur J Immunol. 2022;52(9):1431–40.

151. Bae HR, Choi MS, Kim S, Young HA, Gershwin ME, Jeon SM, et al. IFNγ is a Key Link between Obesity and Th1-Mediated AutoImmune Diseases. Int J Mol Sci. 2020;22(1):208.

152. Zaidi MR. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. J Interferon Cytokine Res. 2019;39(1):30–8.

153. Burke JD, Young HA. IFN-γ: A cytokine at the right time, is in the right place. Semin Immunol. 2019 Jun;43:101280.

154. Huang LY, Chiu CJ, Hsing CH, Hsu YH. Interferon Family Cytokines in Obesity and Insulin Sensitivity. Cells. 2022;11(24).

155. Ding H, Wang G, Yu Z, Sun H, Wang L. Role of interferon-gamma (IFN-γ) and IFN-γ receptor 1/2 (IFNγR1/2) in regulation of immunity, infection, and cancer development: IFN-γ-dependent or independent pathway. Biomed Pharmacother. 2022;155:113683.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

156. Bradley D, Smith AJ, Blaszczak A, Shantaram D, Bergin SM, Jalilvand A, et al. Interferon gamma mediates the reduction of adipose tissue regulatory T cells in human obesity. Nat Commun. 2022;13(1):5606.

157. Puddu P, Carollo M, Pietraforte I, Spadaro F, Tombesi M, Ramoni C, et al. IL-2 induces expression and secretion of IFN-gamma in murine peritoneal macrophages. J Leukoc Biol. 2005;78(3):686–95.

158. De Barra C, Khalil M, Mat A, O'Donnell C, Shaamile F, Brennan K, et al. Glucagon-like peptide-1 therapy in people with obesity restores natural killer cell metabolism and effector function. Obesity (Silver Spring). 2023 Jul;31(7):1787–97.

159. Ullah MA, Mackay F. The BAFF-APRIL System in Cancer. Cancers (Basel). 2023 Mar 16;15(6):1791.

160. Chan CC, Harley ITW, Pfluger PT, Trompette A, Stankiewicz TE, Allen JL, et al. A BAFF/APRIL axis regulates obesogenic diet-driven weight gain. Nat Commun. 2021;12(1):2911.

161. Pelekanou V, Notas G, Athanasouli P, Alexakis K, Kiagiadaki F, Peroulis N, et al. BCMA (TNFRSF17) Induces APRIL and BAFF Mediated Breast Cancer Cell Stemness. Front Oncol. 2018;8:301.

162. Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. Cytokine Growth Factor Rev. 2013;24(3):203–15.

163. Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. Mol Metab. 2014;3(4):384–93.

164. Yim A, Smith C, Brown AM. Osteopontin/secreted phosphoprotein-1 harnesses glial-, immune-, and neuronal cell ligand-receptor interactions to sense and regulate acute and chronic neuroinflammation. Immunol Rev. 2022;311(1):224–33.

165. Vianello E, Kalousová M, Dozio E, Tacchini L, Zima T, Romanelli MMC. Osteopontin: The molecular bridge between fat and cardiac-renal disorders. Int J Mol Sci. 2020;21(15):5568.

166. Gómez-Santos B, Saenz de Urturi D, Nuñez-García M, Gonzalez-Romero F, Buque X, Aurrekoetxea I, et al. Liver osteopontin is required to prevent the progression of age-related nonalcoholic fatty liver disease. Aging Cell. 2020;19(8):e13183.

167. Nuñez-Garcia M, Gomez-Santos B, Buqué X, García-Rodriguez JL, Romero MR, Marin JJG, et al. Osteopontin regulates the cross-talk between phosphatidylcholine and cholesterol metabolism in mouse liver. J Lipid Res. 2017;58(9):1903–15.

168. Dai B, Xu J, Li X, Huang L, Hopkins C, Wang H, et al. Macrophages in epididymal adipose tissue secrete osteopontin to regulate bone homeostasis. Nat Commun. 2022;13(1):427.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

169. Nuñez-Garcia M, Gomez-Santos B, Saenz de Urturi D, Mestre D, Gonzalez-Romero F, Buque X, et al. Atorvastatin provides a new lipidome improving early regeneration after partial hepatectomy in osteopontin deficient mice. Sci Rep. 2018;8(1):14626.

170. Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Ramírez B, Rodríguez A, Colina I, Silva C, et al. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(9):3719–27.

171. Clemente N, Raineri D, Cappellano G, Boggio E, Favero F, Soluri MF, et al. Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases. J Immunol Res. 2016;2016:7675437.

172. Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, Goyenechea E, Larrarte E, Margareto J, et al. Differential Expression of Oxidative Stress and Inflammation Related Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Response to a Low-Calorie Diet: A Nutrigenomics Study. OMICS. 2008;12(4):251–61.

173. Reguero M, Gómez de Cedrón M, Wagner S, Reglero G, Quintela JC, Ramírez de Molina A. Precision Nutrition to Activate Thermogenesis as a Complementary Approach to Target Obesity and Associated-Metabolic-Disorders. Cancers (Basel). 2021;13(4).

174. Russell K, Zhang HG, Gillanders LK, Bartlett ASJR, Fisk HL, Calder PC, et al. Preoperative immunonutrition in patients undergoing liver resection: A prospective randomized trial. World J Hepatol. 2019;11(3):305–17.

175. Bjurlin MA, Smith AB, Huang WC. Impact of immunonutrition on radical cystectomy immunoresponse and outcomes; opportunity for peri-operative optimization. Transl Androl Urol. 2018;7(Suppl 6):S760–2.

176. Ruiz-León AM, Lapuente M, Estruch R, Casas R. Clinical advances in immunonutrition and atherosclerosis: A review. Front Immunol. 2019;10:837.

177. Tejera Pérez C, Guillín Amarelle C, Rodríguez Novo N, Lugo Rodríguez G, Mantiñán Gil B, Palmeiro Carballeira R, et al. [Immunonutrition, evidence and experiences]. Nutr Hosp. 2023;40(1):186–99.

178. Yu K, Zheng X, Wang G, Liu M, Li Y, Yu P, et al. Immunonutrition vs Standard Nutrition for Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis (Part 1). JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2020;44(5):742–67.

179. Cintoni M, Mele MC. The Role of Immunonutrition in Patients. Nutrients. 2023;15(3).

180. Wang L, Chen P, Xiao W. β-hydroxybutyrate as an Anti-Aging Metabolite. Nutrients. 2021;13(10):3420.

181. Kolb H, Kempf K, Röhling M, Lenzen-Schulte M, Schloot NC, Martin S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. BMC Med. 2021;19(1):313.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

182. Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, et al. The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. Nat Med. 2015;21(3):263–9.

183. Peters JM, Gonzalez FJ. The Evolution of Carcinogenesis. Toxicol Sci. 2018;165(2):272–6.

184. Halasa M, Adamczuk K, Adamczuk G, Afshan S, Stepulak A, Cybulski M, et al. Deacetylation of Transcription Factors in Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 2021;22(21):11810.

185. Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMBS, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. Cell Res. 2018;28(3):265–80.

186. Patterson AD, Gonzalez FJ, Perdew GH, Peters JM. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. Toxicol Sci. 2018;165(2):277–83.

187. Chung C, Seo W, Silwal P, Jo EK. Crosstalks between inflammasome and autophagy in cancer. J Hematol Oncol. 2020;13(1):100.

188. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. Redox Biol. 2019;25:101084.

189. Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. Environ Health Perspect. 1992;98:13–24.

190. Cowell JK. Tumour suppressor genes. Annals of Oncology. 1992;3(9):693–8.

191. Izquierdo AG, Carreira MC, Amil M, Mosteiro CS, Garcia-Caballero T, Fernandez-Quintela A, et al. An energy restriction-based weight loss intervention is able to reverse the effects of obesity on the expression of liver tumor-promoting genes. The FASEB Journal. 2020;34(2):2312–25.

192. Chen Y, Yan H, Yan L, Wang X, Che X, Hou K, et al. Hypoxia-induced ALDH3A1 promotes the proliferation of non-small-cell lung cancer by regulating energy metabolism reprogramming. Cell Death Dis. 2023;14(9):617.

193. Terzuoli E, Bellan C, Aversa S, Ciccone V, Morbidelli L, Giachetti A, et al. ALDH3A1 Overexpression in Melanoma and Lung Tumors Drives Cancer Stem Cell Expansion, Impairing Immune Surveillance through Enhanced PD-L1 Output. Cancers (Basel). 2019;11(12):1963.

194. Fäldt Beding A, Larsson P, Helou K, Einbeigi Z, Parris TZ. Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. BMC Cancer. 2022;22(1):322.

195. Warrier NM, Agarwal P, Kumar P. Emerging Importance of Survivin in Stem Cells and Cancer: the Development of New Cancer Therapeutics. Stem Cell Rev Rep. 2020;16(5):828–52.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

196. Lin TY, Chan HH, Chen SH, Sarvagalla S, Chen PS, Coumar MS, et al. BIRC5/Survivin is a novel ATG12-ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells. Autophagy. 2020;16(7):1296–313.

197. Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM, Felsher DW. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. Nat Rev Clin Oncol. 2022;19(1):23–36.

198. Duffy MJ, O'Grady S, Tang M, Crown J. MYC as a target for cancer treatment. Cancer Treat Rev. 2021;94:102154.

199. Donati G, Amati B. MYC and therapy resistance in cancer: risks and opportunities. Mol Oncol. 2022;16(21):3828–54.

200. Guo E, Wei H, Liao X, Wu L, Zeng X. Clinical significance and biological mechanisms of glutathione S-transferase mu gene family in colon adenocarcinoma. BMC Med Genet. 2020;21(1):130.

201. Zhang J, Li Y, Zou J, Lai CT, Zeng T, Peng J, et al. Comprehensive analysis of the glutathione S-transferase Mu (GSTM) gene family in ovarian cancer identifies prognostic and expression significance. Front Oncol. 2022;12:968547.

202. Zhang W, Shi Y, Niu S, Li L, Lin L, Gao X, et al. Integrated computer analysis and a self-built Chinese cohort study identified GSTM2 as one survival-relevant gene in human colon cancer potentially regulating immune microenvironment. Front Oncol. 2022;12:881906.

203. Alves-Fernandes DK, Jasiulionis MG. The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. Int J Mol Sci. 2019;20(13).

204. Yang Y, Liu Y, Wang Y, Chao Y, Zhang J, Jia Y, et al. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. Front Immunol. 2022;13:831168.

205. Ouyang S, Zhang Q, Lou L, Zhu K, Li Z, Liu P, et al. The Double-Edged Sword of SIRT3 in Cancer and Its Therapeutic Applications. Front Pharmacol. 2022;13:871560.

206. Torrens-Mas M, Oliver J, Roca P, Sastre-Serra J. SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer. Cancers (Basel). 2017;9(7):90.

207. Han Q, Xie QR, Li F, Cheng Y, Wu T, Zhang Y, et al. Targeted inhibition of SIRT6 via engineered exosomes impairs tumorigenesis and metastasis in prostate cancer. Theranostics. 2021;11(13):6526–41.

208. Li Y, Jin J, Wang Y. SIRT6 Widely Regulates Aging, Immunity, and Cancer. Front Oncol. 2022;12:861334.

209. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. Front Biosci (Landmark Ed). 2013;18(4):1358–72.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

210. De Luca P, De Siervi A. Critical role for BRCA1 expression as a marker of chemosensitivity response and prognosis. Front Biosci (Elite Ed). 2016;8(1):72–83.

211. Werner H. BRCA1: An Endocrine and Metabolic Regulator. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:844575.

212. Ngeow J, Eng C. PTEN in Hereditary and Sporadic Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020;10(4).

213. Ortega-Molina A, Serrano M. PTEN in cancer, metabolism, and aging. Trends Endocrinol Metab. 2013;24(4):184–9.

214. Silwal-Pandit L, Langerød A, Børresen-Dale AL. TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(1):a026252.

215. Donehower LA, Soussi T, Korkut A, Liu Y, Schultz A, Cardenas M, et al. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. Cell Rep. 2019;28(5):1370-1384.e5.

216. Severson PL, Tokar EJ, Vrba L, Waalkes MP, Futscher BW. Coordinate H3K9 and DNA methylation silencing of ZNFs in toxicant-induced malignant transformation. Epigenetics. 2013;8(10):1080–8.

217. Choi WI, Yoon JH, Song JY, Jeon BN, Park JM, Koh DI, et al. Zbtb7c is a critical gluconeogenic transcription factor that induces glucose-6-phosphatase and phosphoenylpyruvate carboxykinase 1 genes expression during mice fasting. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2019;1862(6):643–56.

218. Xiang H, Zhong ZX, Peng YD, Jiang SW. The Emerging Role of Zfp217 in Adipogenesis. Int J Mol Sci. 2017;18(7):1367.

219. Kang S, Akerblad P, Kiviranta R, Gupta RK, Kajimura S, Griffin MJ, et al. Regulation of Early Adipose Commitment by Zfp521. PLoS Biol. 2012 Nov;10(11):e1001433.

220. Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, et al. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. Nature. 2010;464(7288):619–23.

221. Waddington CH. Towards a theoretical biology. Nature [Internet]. 1968;218(5141):525–7.

222. Peixoto P, Cartron PF, Serandour AA, Hervouet E. From 1957 to Nowadays: A Brief History of Epigenetics. Int J Mol Sci. 2020;21(20):7571.

223. Wu Ct, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. Science. 2001;293(5532):1103–5:1103–5.

224. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature. 2004;429(6990):457–63.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

225. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. Cell Metab. 2019;29(5):1028–44.

226. Rosen ED, Kaestner KH, Natarajan R, Patti ME, Sallari R, Sander M, et al. Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity. Diabetes. 2018;67(10):1923–31.

227. Dąbek A, Wojtala M, Pirola L, Balcerczyk A. Modulation of Cellular Biochemistry, Epigenetics and Metabolomics by Ketone Bodies. Implications of the Ketogenic Diet in the Physiology of the Organism and Pathological States. Nutrients. 2020;12(3):788.

228. Li D, Li Y, Yang S, Lu J, Jin X, Wu M. Diet-gut microbiota-epigenetics in metabolic diseases: From mechanisms to therapeutics. Biomed Pharmacother. 2022;153:113290.

229. Sato T, Sassone-Corsi P. Nutrition, metabolism, and epigenetics: pathways of circadian reprogramming. EMBO Rep. 2022;23(5):e52412.

230. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. Inflamm Res. 2021;70(1):29–49.

231. AB C, A DL, J S, FI M, S NC, MC C, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. Sci Rep. 2017;7:41903.

232. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. Trends Genet. 2022;38(7):676–707.

233. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A. DNA Methylation in Obesity and Associated Diseases. En: Epigenetic Biomarkers and Diagnostics. Elsevier Inc.; 2016. p. 313–29.

234. Izquierdo AG, Crujeiras AB. Obesity-Related Epigenetic Changes After Bariatric Surgery. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10.:232

235. Mahmoud AM, Ali MM. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. Nutrients. 2019;11(3):608.

236. Sriraman A, Debnath TK, Xhemalce B, Miller KM. Making it or breaking it: DNA methylation and genome integrity. Essays Biochem. 2020;64(5):687–703.

237. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet. 2012;13(7):484–92.

238. Hamidi T, Singh AK, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. Epigenomics. 2015;7(2):247–65.

239. Jiang YH, Bressler J, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2004;5:479–510.

240. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. Genes Dis. 2018;5(1):1–8.

USC

241. Lin Y, Qiu T, Wei G, Que Y, Wang W, Kong Y, et al. Role of Histone Post-Translational Modifications in Inflammatory Diseases. Front Immunol. 2022;13:852272.

242. Li D, Zhang L, He Y, Zhou T, Cheng X, Huang W, et al. Novel histone post-translational modifications in diabetes and complications of diabetes: The underlying mechanisms and implications. Biomed Pharmacother. 2022;156:113984.

243. Jufvas A, Strålfors P, Vener A V. Histone variants and their post-translational modifications in primary human fat cells. PLoS One. 2011;6(1):e15960.

244. Slack FJ, Chinnaiyan AM. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. Cell. 2019;179(5):1033–55.

245. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. Essays Biochem. 2021;65(4):625–39.

246. Robertson KD. DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet. 2005;6(8):597–610.

247. Xia Y, Brewer A, Bell JT. DNA methylation signatures of incident coronary heart disease: findings from epigenome-wide association studies. Clin Epigenetics. 2021;13(1):186.

248. Mahmoud AM. An Overview of Epigenetics in Obesity: The Role of Lifestyle and Therapeutic Interventions. Int J Mol Sci. 2022;23(3):1341.

249. Stoll S, Wang C, Qiu H. DNA Methylation and Histone Modification in Hypertension. Int J Mol Sci. 2018;19(4):1174.

250. Ramzan F, Vickers MH, Mithen RF. Epigenetics, microRNA and Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review. Int J Mol Sci. 2021;22(9):5047.

251. Jonas W, Schürmann A. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. Mol Metab. 2021;50:101111.

252. Ge T, Gu X, Jia R, Ge S, Chai P, Zhuang A, et al. Crosstalk between metabolic reprogramming and epigenetics in cancer: updates on mechanisms and therapeutic opportunities. Cancer Commun (Lond). 2022;42(11):1049–82.

253. Olivier M, Asmis R, Hawkins GA, Howard TD, Cox LA. The Need for Multi-Omics Biomarker Signatures in Precision Medicine. Int J Mol Sci. 2019;20(19):4781.

254. Kato M, Natarajan R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. Nat Rev Nephrol. 2019;15(6):327–45.

255. Nakagawa H, Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. Cancer Sci. 2018;109(3):513–22.

256. Mari-Alexandre J, Diaz-Lagares A, Villalba M, Juan O, Crujeiras AB, Calvo A, et al. Translating cancer epigenomics into the clinic: focus on lung cancer. Translational Research. 2017;189:76–92.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

257. De Caterina R, Martínez JA, Kohlmeier M. Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics. Ed. Elsevier; 2020.

258. Arpón A, Milagro FI, Ramos-Lopez O, Mansego ML, Riezu-Boj JI, Martínez JA, et al. Methylome-Wide Association Study in Peripheral White Blood Cells Focusing on Central Obesity and Inflammation. Genes (Basel). 2019;10(6):444.

259. Kim AY, Park YJ, Pan X, Shin KC, Kwak SH, Bassas AF, et al. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. Nat Commun. 2015;6:7585.

260. Małodobra-Mazur M, Alama A, Bednarska-Chabowska D, Pawelka D, Myszczyszyn A, Dobosz T. Obesity-induced insulin resistance via changes in the DNA methylation profile of insulin pathway genes. Adv Clin Exp Med. 2019;28(12):1599–607.

261. Zaiou M. Transcriptional Factors and Epigenetic Mechanisms in Obesity and Related Metabolic Comorbidities. Cells. 2022;11(16):2520.

262. Donovan MG, Wren SN, Cenker M, Selmin OI, Romagnolo DF. Dietary fat and obesity as modulators of breast cancer risk: Focus on DNA methylation. Br J Pharmacol. 2020;177(6):1331–50.

263. Faldoni FLC, Rainho CA, Rogatto SR. Epigenetics in Inflammatory Breast Cancer: Biological Features and Therapeutic Perspectives. Cells. 2020;9(5):1164.

264. Donovan MG, Wren SN, Cenker M, Selmin OI, Romagnolo DF. Dietary fat and obesity as modulators of breast cancer risk: Focus on DNA methylation. Br J Pharmacol. 2020;177(6):1331–50.

265. Maleknia M, Ahmadirad N, Golab F, Katebi Y, Haj Mohamad Ebrahim Ketabforoush A. DNA Methylation in Cancer: Epigenetic View of Dietary and Lifestyle Factors. Epigenet Insights. 2023;16:25168657231199892.

266. Silva-Ochoa AD, Velasteguí E, Falconí IB, García-Solorzano VI, Rendón-Riofrio A, Sanguña-Soliz GA, et al. Metabolic syndrome: Nutri-epigenetic cause or consequence? Heliyon. 2023;9(11):e21106.

267. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. Mol Oncol. 2021;15(3):790–800.

268. Kenanoglu S, Gokce N, Akalin H, Ergoren MC, Beccari T, Bertelli M, et al. Implication of the Mediterranean diet on the human epigenome. J Prev Med Hyg. 2022;63(2 Suppl 3):E44–55.

269. Palma I, Farran A, Cantós D. Tabas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Barcelona: McGRAW-HILL; 2008.

270. Dapcich V, Salvador G, Ribas L, Pérez C, Aranceta J, Serra L. Guía de la alimentación saludable. SENC. 2004;105.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

271. Schröder H, Fitó M, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. A Short Screener Is Valid for Assessing Mediterranean Diet Adherence among Older Spanish Men and Women. J Nutr. 2011;141(6):1140–5.

272. Scientific Opinion on the essential composition of total diet replacements for weight control. EFSA Journal. 2015;13(1):3957.

273. Heber D, Greenway FL, Kaplan LM, Livingston E, Salvador J, Still C, et al. Endocrine and nutritional management of the post-bariatric surgery patient: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(11):4823–43.

274. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. Anticancer Res. 2015;35(6):3147–54.

275. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. Anticancer Res. 2015;35(6):3147–54.

276. Goh JJH, Goh CJH, Lim QW, Zhang S, Koh CG, Chiam KH. Transcriptomics indicate nuclear division and cell adhesion not recapitulated in MCF7 and MCF10A compared to luminal A breast tumours. Sci Rep. 2022;12(1):20902.

277. Razak NA, Abu N, Ho WY, Zamberi NR, Tan SW, Alitheen NB, et al. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. Sci Rep. 2019;9(1):1514.

278. Razak NA, Abu N, Ho WY, Zamberi NR, Tan SW, Alitheen NB, et al. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. Sci Rep. 2019;9(1):1514.

279. Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. PLoS One. 2015;10(7):e0131285.

280. Gianfredi V, Vannini S, Moretti M, Villarini M, Bragazzi NL, Izzotti A, et al. Sulforaphane and Epigallocatechin Gallate Restore Estrogen Receptor Expression by Modulating Epigenetic Events in the Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2017;10(3–4):126–35.

281. Puchalska P, Crawford PA. Metabolic and Signaling Roles of Ketone Bodies in Health and Disease. Annu Rev Nutr. 2021;41(1):49–77.

282. Rojas-Morales P, Pedraza-Chaverri J, Tapia E. Ketone bodies, stress response, and redox homeostasis. Redox Biol. 2020;29:101395.

283. Silvestrini A, Meucci E, Ricerca BM, Mancini A. Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. Int J Mol Sci. 2023;24(13).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

284. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. Anal Biochem. 2017;524:13–30.

285. Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. Free Radic Biol Med. 1991;10(3–4):211–6.

286. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. Adv Sci (Weinh). 2021;8(15):e2004433.

287. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. Epigenetics. 2011;6(6):692–702.

288. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. Epigenomics. 2016;8(3):389–99.

289. Diaz-Lagares A, Crujeiras AB, Lopez-Serra P, Soler M, Setien F, Goyal A, et al. Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(47):E7535–44.

290. Izquierdo AG, Carreira MC, Boughanem H, Moreno-Navarrete JM, Nicoletti CF, Oliver P, et al. Adipose tissue and blood leukocytes ACE2 DNA methylation in obesity and after weight loss. Eur J Clin Invest. 2021;e13685.

291. Busund M, Ursin G, Lund E, Wilsgaard T, Rylander C. Trajectories of body mass index in adulthood and risk of subtypes of postmenopausal breast cancer. Breast Cancer Res. 2023;25(1):130.

292. Crispo A, Augustin LSA, Luongo A, Calderaio C, Breda J, Coluccia S, et al. Central obesity, body mass index, metabolic syndrome and mortality in Mediterranean breast cancer patients. Sci Rep. 2023;13(1):21208.

293. Lima RPA, do Nascimento RAF, Luna RCP, Persuhn DC, da Silva AS, da Conceição Rodrigues Gonçalves M, et al. Effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation level of the ADRB3 gene, lipid profile and oxidative stress in overweight or obese women. Clin Epigenetics. 2017;9(1):110.

294. Campión J, Milagro F, Martínez JA. Epigenetics and Obesity. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2010. p. 291–347.

295. Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G. Adherence to mediterranean diet and risk of cancer: An updated systematic review and meta-analysis. Nutrients. 2017;9(10):1063.

296. Hernáez Á, Estruch R. The mediterranean diet and cancer: What do human and molecular studies have to say about it? Nutrients. 2019;11(9):2155.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

297. Turati F, Carioli G, Bravi F, Ferraroni M, Serraino D, Montella M, et al. Mediterranean diet and breast cancer risk. Nutrients. 2018;10(3):326.

298. Kalea AZ, Drosatos K, Buxton JL. Nutriepigenetics and cardiovascular disease. Vol. 21, Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2019;21(4)252–9.

299. Tuttolomondo A, Simonetta I, Daidone M, Mogavero A, Ortello A, Pinto A. Metabolic and vascular effect of the mediterranean diet. Int J Mol Sci. 2019;20(19):4716.

300. Arpón A, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Marti A, Razquin C, Martínez-González MA, et al. Adherence to Mediterranean diet is associated with methylation changes in inflammation-related genes in peripheral blood cells. J Physiol Biochem. 2016;73(3):445–55.

301. Corella D, Ordovás JM. How does the Mediterranean diet promote cardiovascular health? Current progress toward molecular mechanisms: gene-diet interactions at the genomic, transcriptomic, and epigenomic levels provide novel insights into new mechanisms. Bioessays. 2014;36(5):526–37.

302. Fasanelli F, Giraudo MT, Vineis P, Fiano V, Fiorito G, Grasso C, et al. DNA methylation, colon cancer and Mediterranean diet: results from the EPIC-Italy cohort. Epigenetics. 2019;14(10):977–88.

303. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Barone G, Mazzoleni P, Catalfo A, et al. Mediterranean Diet and Particulate Matter Exposure Are Associated With LINE-1 Methylation: Results From a Cross-Sectional Study in Women. Front Genet. 2018;9:514.

304. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi F El, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. The Lancet Oncol. 2015;16(16):1599–600.

305. Diallo A, Deschasaux M, Latino-Martel P, Hercberg S, Galan P, Fassier P, et al. Red and processed meat intake and cancer risk: Results from the prospective NutriNet-Santé cohort study. Int J Cancer. 2018;142(2):230–7.

306. Farvid MS, Stern MC, Norat T, Sasazuki S, Vineis P, Weijenberg MP, et al. Consumption of red and processed meat and breast cancer incidence: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. Int J Cancer. 2018;143(11):2787–99.

307. Huang Q, Mo M, Zhong Y, Yang Q, Zhang J, Ye X, et al. The Anticancer Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids was Closely Associated with the Increase in Genomic DNA Hydroxymethylation. Anticancer Agents Med Chem. 2019;19(3):330–6.

308. Eltweri AM, Thomas AL, Metcalfe M, Calder PC, Dennison AR, Bowrey DJ. Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. Clin Nutr. 2017;36(1):65–78.

309. Tremblay BL, Guénard F, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Epigenetic changes in blood leukocytes following an omega-3 fatty acid supplementation. Clin Epigenetics. 2017;9:43.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

310. Karimi M, Vedin I, Freund Levi Y, Basun H, Faxén Irving G, Eriksdotter M, et al. DHA-rich n-3 fatty acid supplementation decreases DNA methylation in blood leukocytes: the OmegAD study. Am J Clin Nutr. 2017;106(4):1157–65.

311. Iyengar NM, Zhou XK, Mendieta H, El-Hely O, Giri DD, Winston L, et al. Effects of obesity on breast aromatase expression and systemic metabo-inflammation in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. NPJ Breast Cancer. 2021;7(1):18.

312. Bhardwaj P, Iyengar NM, Zahid H, Carter KM, Byun DJ, Choi MH, et al. Obesity promotes breast epithelium DNA damage in women carrying a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. Sci Transl Med. 2023;15(684):eade1857.

313. Lo PK, Yao Y, Zhou Q. Single-Cell RNA-seq Reveals Obesity-Induced Alterations in the Brca1-Mutated Mammary Gland Microenvironment. Cancers (Basel). 2020;12(8):2235.

314. De Summa S, Traversa D, Daniele A, Palumbo O, Carella M, Stallone R, et al. miRNA deregulation and relationship with metabolic parameters after Mediterranean dietary intervention in BRCA-mutated women. Front Oncol. 2023;13:1147190.

315. Esser A, Neirich L, Grill S, Bischoff SC, Halle M, Siniatchkin M, et al. How Does Dietary Intake Relate to Dispositional Optimism and Health-Related Quality of Life in Germline BRCA1/2 Mutation Carriers? Nutrients. 2023;15(6):1396.

316. Sharma M, Tollefsbol TO. Combinatorial epigenetic mechanisms of sulforaphane, genistein and sodium butyrate in breast cancer inhibition. Exp Cell Res. 2022;416(1):113160.

317. Smethers AD, Rolls BJ. Dietary Management of Obesity: Cornerstones of Healthy Eating Patterns. Med Clin North Am. 2018;102(1):107–24.

318. Hung CM, Tsai TH, Lee KT, Hsu YC. Sulforaphane-Induced Cell Mitotic Delay and Inhibited Cell Proliferation via Regulating CDK5R1 Upregulation in Breast Cancer Cell Lines. Biomedicines. 2023;11(4):996.

319. Royston KJ, Paul B, Nozell S, Rajbhandari R, Tollefsbol TO. Withaferin A and sulforaphane regulate breast cancer cell cycle progression through epigenetic mechanisms. Exp Cell Res. 2018;368(1):67–74.

320. Zhang Y, Lu Q, Li N, Xu M, Miyamoto T, Liu J. Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway. NPJ Breast Cancer. 2022;8(1):40.

321. Cao S, Hu S, Jiang P, Zhang Z, Li L, Wu Q. Effects of sulforaphane on breast cancer based on metabolome and microbiome. Food Sci Nutr. 2023;11(5):2277–87.

322. Muscogiuri G, Barrea L, Laudisio D, Pugliese G, Salzano C, Savastano S, et al. The management of very low-calorie ketogenic diet in obesity outpatient clinic: A practical guide. J Transl Med. 2019;17(1):356.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

323. Grube M, Dimmler A, Schmaus A, Saup R, Wagner T, Garvalov BK, et al. Ketogenic diet does not promote triple-negative and luminal mammary tumor growth and metastasis in experimental mice. Clin Exp Metastasis. 2023.

324. Miller AI, Diaz D, Lin B, Krzesaj PK, Ustoyev S, Shim A, et al. Ketone Bodies Induce Unique Inhibition of Tumor Cell Proliferation and Enhance the Efficacy of Anti-Cancer Agents. Biomedicines. 2023;11(9):2515.

325. Murphy S, Rahmy S, Gan D, Zhu Y, Manyak M, Li J, et al. Overcome Prostate Cancer Resistance to Immune Checkpoint Therapy with Ketogenic Diet-Induced Epigenetic Reprogramming. bioRxiv. 2023.

326. Dmitrieva-Posocco O, Wong AC, Lundgren P, Golos AM, Descamps HC, Dohnalová L, et al. β-Hydroxybutyrate suppresses colorectal cancer. Nature. 2022;605(7908):160–5.

327. Bruci A, Tuccinardi D, Tozzi R, Balena A, Santucci S, Frontani R, et al. Very Low-Calorie Ketogenic Diet: A Safe and Effective Tool for Weight Loss in Patients With Obesity and Mild Kidney Failure. Nutrients. 2020;12(2):333.

328. Di Rosa C, Lattanzi G, Spiezia C, Imperia E, Piccirilli S, Beato I, et al. Mediterranean Diet versus Very Low-Calorie Ketogenic Diet: Effects of Reaching 5% Body Weight Loss on Body Composition in Subjects with Overweight and with Obesity-A Cohort Study. Int J Environ Res Public Health. 2022;19(20):13040.

329. Cheng E, Caan BJ, Chen WY, Irwin ML, Prado CM, Cespedes Feliciano EM. Adipose tissue radiodensity and mortality among patients with nonmetastatic breast cancer. Clin Nutr. 2022;41(12):2607–13.

330. Davern M, Bracken-Clarke D, Donlon NE, Sheppard AD, Connell FO, Heeran AB, et al. Visceral adipose tissue secretome from early and late-stage oesophageal cancer patients differentially affects effector and regulatory T cells. J Cancer Res Clin Oncol. 2023;149(9):6583–99.

331. Andreani C, Bartolacci C, Persico G, Casciaro F, Amatori S, Fanelli M, et al. SIRT6 promotes metastasis and relapse in HER2-positive breast cancer. Sci Rep. 2023;13(1):22000.

332. Manna PR, Yang S, Reddy PH. Epigenetic Dysregulation and Its Correlation with the Steroidogenic Machinery Impacting Breast Pathogenesis: Data Mining and Molecular Insights into Therapeutics. Int J Mol Sci. 2023;24(22):16488.

333. de Céu Teixeira M, Sanchez-Lopez E, Espina M, Garcia ML, Durazzo A, Lucarini M, et al. Sirtuins and SIRT6 in Carcinogenesis and in Diet. Int J Mol Sci. 2019;20(19):4945.

334. Becherini P, Caffa I, Piacente F, Damonte P, Vellone VG, Passalacqua M, et al. SIRT6 enhances oxidative phosphorylation in breast cancer and promotes mammary tumorigenesis in mice. Cancer Metab. 2021;9(1):6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

335. Rustamadji P, Wiyarta E, Anggreani I. Correlation of Before and After Invasive Breast Cancer Neoadjuvant Chemotherapy for NFkB, Cyclin D1, and Survivin Expression. Iran J Pathol. 2023;18(2):147–55.

336. Li H, Sun X, Li J, Liu W, Pan G, Mao A, et al. Hypoxia induces docetaxel resistance in triple-negative breast cancer via the HIF-1α/miR-494/Survivin signaling pathway. Neoplasia. 2022;32:100821.

337. Chen Y, Yan H, Yan L, Wang X, Che X, Hou K, et al. Hypoxia-induced ALDH3A1 promotes the proliferation of non-small-cell lung cancer by regulating energy metabolism reprogramming. Cell Death Dis. 2023;14(9):617.

338. Voulgaridou GP, Theologidis V, Venetikidou M, Tsochantaridis I, Tsolou A, Koffa M, et al. Investigating the Functional Roles of Aldehyde Dehydrogenase 3A1 in Human Corneal Epithelial Cells. Int J Mol Sci. 2023;24(6):5845.

339. Voulgaridou GP, Theologidis V, Xanthis V, Papagiannaki E, Tsochantaridis I, Fadouloglou VE, et al. Identification of a peptide ligand for human ALDH3A1 through peptide phage display: Prediction and characterization of protein interaction sites and inhibition of ALDH3A1 enzymatic activity. Front Mol Biosci. 2023;10:1161111.

340. Aoki Y, Han Q, Kubota Y, Masaki N, Obara K, Tome Y, et al. Oncogenes and Methionine Addiction of Cancer: Role of c-MYC. Cancer Genomics Proteomics. 2023;20(2):165–70.

341. Yan L, Geng Q, Cao Z, Liu B, Li L, Lu P, et al. Insights into DNMT1 and programmed cell death in diseases. Biomed Pharmacother. 2023;168:115753.

342. Zhang ZM, Lu R, Wang P, Yu Y, Chen D, Gao L, et al. Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation. Nature. 2018;554(7692):387–91.

343. Man X, Li Q, Wang B, Zhang H, Zhang S, Li Z. DNMT3A and DNMT3B in Breast Tumorigenesis and Potential Therapy. Front Cell Dev Biol. 2022;10:916725.

344. Gagliardi M, Strazzullo M, Matarazzo MR. DNMT3B Functions: Novel Insights From Human Disease. Front Cell Dev Biol. 2018;6:140.

345. M^{ac}Donald IJ, Liu SC, Huang CC, Kuo SJ, Tsai CH, Tang CH. Associations between Adipokines in Arthritic Disease and Implications for Obesity. Int J Mol Sci. 2019;20(6):1505.

346. Di Domenico M, Pinto F, Quagliuolo L, Contaldo M, Settembre G, Romano A, et al. The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:540.

347. Bradshaw PC, Seeds WA, Miller AC, Mahajan VR, Curtis WM. COVID-19: Proposing a Ketone-Based Metabolic Therapy as a Treatment to Blunt the Cytokine Storm. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:6401341.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

348. Hirschberger S, Strauß G, Effinger D, Marstaller X, Ferstl A, Müller MB, et al. Very-low-carbohydrate diet enhances human T-cell immunity through immunometabolic reprogramming. EMBO Mol Med. 2021;13(8):e14323.

349. Bonaroti J, Abdelhamid S, Kar U, Sperry J, Zamora R, Namas RA, et al. The Use of Multiplexing to Identify Cytokine and Chemokine Networks in the Immune-Inflammatory Response to Trauma. Antioxid Redox Signal. 2021;35(16):1393–406.

350. Witasp A, Carrero JJ, Michaëlsson K, Ahlström H, Kullberg J, Adamsson V, et al. Inflammatory biomarker pentraxin 3 (PTX3) in relation to obesity, body fat depots and weight loss. Obesity (Silver Spring). 2014;22(5):1373–9.

351. Tunc-Ata M, Turgut G, Mergen-Dalyanoglu M, Turgut S. Examination of levels pentraxin-3, interleukin-6, and C-reactive protein in rat model acute and chronic exercise. J Exerc Rehabil. 2017;13(3):279–83.

352. Jaoude J, Koh Y. Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. Vasc Health Risk Manag. 2016;12:287–95.

353. Kedia-Mehta N, Tobin L, Zaiatz-Bittencourt V, Pisarska MM, De Barra C, Choi C, et al. Cytokine-induced natural killer cell training is dependent on cellular metabolism and is defective in obesity. Blood Adv. 2021;5(21):4447–55.

354. Alspach E, Lussier DM, Schreiber RD. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019;11(3):a028480.

355. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. Cancer Med. 2018;7(9):4509–16.

356. Chen Y, Du M, Yuan Z, Chen Z, Yan F. Spatiotemporal control of engineered bacteria to express interferon-γ by focused ultrasound for tumor immunotherapy. Nat Commun. 2022;13(1):4468.

357. Coelho MA, Cooper S, Strauss ME, Karakoc E, Bhosle S, Gonçalves E, et al. Base editing screens map mutations affecting interferon-γ signaling in cancer. Cancer Cell. 2023;41(2):288-303.e6.

358. Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2017;13(4):217–33.

359. Altuna-Coy A, Ruiz-Plazas X, Alves-Santiago M, Segarra-Tomás J, Chacón MR. Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism In Vitro. Cancers (Basel). 2021;13(18):4688.

360. Andersen BL, Goyal NG, Weiss DM, Westbrook TD, Maddocks KJ, Byrd JC, et al. Cells, cytokines, chemokines, and cancer stress: A biobehavioral study of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer. 2018;124(15):3240–8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

361. Pombeiro I, Loosen SH, Roy S, Schueller F, Niewenhuisen L, Luedde M, et al. Differential Roles of Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Members as Biomarkers in Pancreatic Cancer. J Clin Med. 2018;7(7).

362. Arrieta F, Martinez-Vaello V, Bengoa N, Rosillo M, de Pablo A, Voguel C, et al. Stress Hyperglycemia and Osteocalcin in COVID-19 Critically Ill Patients on Artificial Nutrition. Nutrients. 2021;13(9):3010.

363. Meng X, Yang D, Yu R, Zhu H. EPSTI1 Is Involved in IL-28A-Mediated Inhibition of HCV Infection. Mediators Inflamm. 2015;2015:716315.

364. Crujeiras AB, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Carreira MC, Sajoux I, De Luis D, et al. Plasma FGF21 levels in obese patients undergoing energy-restricted diets or bariatric surgery: A marker of metabolic stress? Int J Obes. 2017;41(10):1570–8.

365. Nicoletti CF, Pinhel MAS, Noronha NY, de Oliveira BA, Salgado Junior W, Jácome A, et al. Altered pathways in methylome and transcriptome longitudinal analysis of normal weight and bariatric surgery women. Sci Rep. 2020;10(1):6515.

366. Nicoletti CF, Pinhel MAS, Diaz-Lagares A, Casanueva FF, Jácome A, Pinhanelli VC, et al. DNA methylation screening after roux-en Y gastric bypass reveals the epigenetic signature stems from genes related to the surgery per se. BMC Med Genomics. 2019;12(1):72.

367. Nicoletti CF, Nonino CB, de Oliveira BAP, Pinhel MA de S, Mansego ML, Milagro FI, et al. DNA Methylation and Hydroxymethylation Levels in Relation to Two Weight Loss Strategies: Energy-Restricted Diet or Bariatric Surgery. Obes Surg. 2016;26(3):603–11.

368. Fraszczyk E, Luijten M, Spijkerman AMW, Snieder H, Wackers PFK, Bloks VW, et al. The effects of bariatric surgery on clinical profile, DNA methylation, and ageing in severely obese patients. Clin Epigenetics. 2020;12(1):14.

369. Valenzano A, Tartaglia N, Ambrosi A, Tafuri D, Monda M, Messina A, et al. The Metabolic Rearrangements of Bariatric Surgery: Focus on Orexin-A and the Adiponectin System. J Clin Med. 2020;9(10):3327.

370. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Sci. 2011;12(5):3117–32.

371. Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. Cardiovasc Diabetol. 2017;16(1):120.

372. Nazarewicz RR, Ziolkowski W, Vaccaro PS, Ghafourifar P. Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. Rejuvenation Res. 2007;10(4):435–40.

373. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2011;51(2):327–36.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

374. Cheng YW, Liu J, Finkel T. Mitohormesis. Cell Metab. 2023;35(11):1872–86.

375. Sánchez E, Santos MD, Nuñez-Garcia M, Bueno M, Sajoux I, Yeramian A, et al. Randomized Clinical Trial to Evaluate the Morphological Changes in the Adventitial Vasa Vasorum Density and Biological Markers of Endothelial Dysfunction in Subjects with Moderate Obesity Undergoing a Very Low-Calorie Ketogenic Diet. Nutrients. 2021;14(1):33.

376. Barrea L, Caprio M, Tuccinardi D, Moriconi E, Di Renzo L, Muscogiuri G, et al. Could ketogenic diet "starve" cancer? Emerging evidence. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022;62(7):1800–21.

377. Bandera-Merchan B, Boughanem H, Crujeiras AB, Macias-Gonzalez M, Tinahones FJ. Ketotherapy as an epigenetic modifier in cancer. Rev Endocr Metab Disord. 2020;21(4):509–19.

378. Mundi MS, Mohamed Elfadil O, Patel I, Patel J, Hurt RT. Ketogenic diet and cancer: Fad or fabulous? JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2021;45(S2):26–32.

379. Barrea L, Megna M, Cacciapuoti S, Frias-Toral E, Fabbrocini G, Savastano S, et al. Very low-calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with psoriasis and obesity: an update for dermatologists and nutritionists. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022;62(2):398–414.

380. Monda V, Polito R, Lovino A, Finaldi A, Valenzano A, Nigro E, et al. Short-Term Physiological Effects of a Very Low-Calorie Ketogenic Diet: Effects on Adiponectin Levels and Inflammatory States. Int J Mol Sci. 2020;21(9):3228.

381. Sajoux I, Lorenzo PM, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Abete I, Castro AI, et al. Effect of a Very-Low-Calorie Ketogenic Diet on Circulating Myokine Levels Compared with the Effect of Bariatric Surgery or a Low-Calorie Diet in Patients with Obesity. Nutrients. 2019;11(10):2368.

382. Lorenzo PM, Sajoux I, Izquierdo AG, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Abete I, et al. Immunomodulatory effect of a very-low-calorie ketogenic diet compared with bariatric surgery and a low-calorie diet in patients with excessive body weight. Clin Nutr. 2022;41(7):1566–77.

383. Duggan C, Xiao L, Wang CY, McTiernan A. Effect of a 12-month exercise intervention on serum biomarkers of angiogenesis in postmenopausal women: A randomized controlled trial. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(4):648–57.

384. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Ramírez B, Becerril S, Salvador J, et al. Involvement of the leptin-adiponectin axis in inflammation and oxidative stress in the metabolic syndrome. Sci Rep. 2017;7(1):6619.

385. Raman A, Peiffer JJ, Hoyne GF, Lawler NG, Currie A, Fairchild TJ. Exercise-induced responses in matrix metalloproteinases and osteopontin are not moderated by exercise format in males with overweight or obesity. Eur J Appl Physiol. 2023;123(5):1115–24.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

386. Nuijten MAH, Eijsvogels TMH, Monpellier VM, Janssen IMC, Hazebroek EJ, Hopman MTE. The magnitude and progress of lean body mass, fat-free mass, and skeletal muscle mass loss following bariatric surgery: A systematic review and meta-analysis. Obes Rev. 2022;23(1):e13370.

387. Vaurs C, Diméglio C, Charras L, Anduze Y, Chalret du Rieu M, Ritz P. Determinants of changes in muscle mass after bariatric surgery. Diabetes Metab. 2015;41(5):416–21.

388. Barfield WL, Uaesoontrachoon K, Wu CS, Lin S, Chen Y, Wang PC, et al. Eccentric muscle challenge shows osteopontin polymorphism modulation of muscle damage. Hum Mol Genet. 2014;23(15):4043–50.

389. Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. Metabolism. 2015;64(1):131–45.

390. Cicekli I, Saglam D, Takar N. A New Perspective on Metabolic Syndrome with Osteopontin: A Comprehensive Review. Life (Basel). 2023;13(7).

391. Xu L, Zhang H, Shao Y, Fu Z. Bioinformatics analysis-based screening of circRNA gene with mainstream expression trend in colorectal cancer and construction of a coexpression regulatory network. PLoS One. 2023;18(12):e0295126.

392. Louw-du Toit R, Simons M, Africander D. Progestins and breast cancer hallmarks: The role of the ERK1/2 and JNK pathways in estrogen receptor positive breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2023;237:106440.

393. Valla M, Klæstad E, Ytterhus B, Bofin AM. CCND1 Amplification in Breast Cancer - associations With Proliferation, Histopathological Grade, Molecular Subtype and Prognosis. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2022;27(1):67–77.

394. Huang D, Wang Y, Xu L, Chen L, Cheng M, Shi W, et al. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells. J Exp Clin Cancer Res. 2018;37(1):247.

395. Gupta P, Gupta N, Fofaria NM, Ranjan A, Srivastava SK. HER2-mediated GLI2 stabilization promotes anoikis resistance and metastasis of breast cancer cells. Cancer Lett. 2019;442:68–81.

396. Cui H, Yu W, Yu M, Luo Y, Yang M, Cong R, et al. GPR126 regulates colorectal cancer cell proliferation by mediating HDAC2 and GLI2 expression. Cancer Sci. 2021;112(5):1798–810.

397. Cai J, Zhang X, Xie W, Li Z, Liu W, Liu A. Identification of a basement membrane-related gene signature for predicting prognosis and estimating the tumor immune microenvironment in breast cancer. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:1065530.

398. Lei SM, Liu X, Xia LP, Ke Y, Wei LW, Li L, et al. [Relationships between decreased LAMC3 and poor prognosis in ovarian cancer]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2021;56(7):489–97.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

399. Atyah M, Zhou C, Zhou Q, Chen W, Weng J, Wang P, et al. The Age-Specific Features and Clinical Significance of NRF2 and MAPK10 Expression in HCC Patients. Int J Gen Med. 2022;15:737–48.

400. Hu S, Chen Y, Liu L, Yin X, Yang Y, Tang L. PLZF and PLZF-MAPK10 can predict the prognosis of postoperative patients with hepatocellular carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2020;13(12):3158–66.

401. Nogueiras R, Sabio G. Brain JNK and metabolic disease. Diabetologia. 2021;64(2):265–74.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 1. CUESTIONARIO SOBRE HÁBITOS ALIMENTARIOS.

CUESTIONARIO SOBRE HÁBITOS ALIMENTARIOS

☐ Encuestado ☐ autoencuestado

Poner una cruz en el recuadro correspondiente, según con qué frecuencia consuma cada tipo de alimento:

	AL DÍA					A LA SEMANA			AL MES		NUNCA O CASI NUNCA
	5 o más veces	4 veces	3 veces	2 veces	1 vez	4-6 veces	2-3 veces	1 vez	2-3 veces	1 vez	
Cereales de desayuno											
Cereales de desayuno integrales											
Pan blanco											
Pan integral											
Arroz, pasta italiana, cous-cous											
Arroz, pasta italiana, cous-cous integrales											
Azúcar, miel, caramelos, mermelada											
Chocolate											
Dulces, pasteles, magdalenas, galletas, donuts, bollos											
Huevos											
Leche, yogurt, queso											
Batidos envasados, flan, natillas, helados											
Mantequilla, nata, manteca											
Margarina											
Mayonesa											
Frituras caseras											
Frituras precocinadas, congeladas											
Otros platos pre cocinados (incluyendo pizza)											

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	AL DÍA					A LA SEMANA			AL MES		NUNCA O CASI NUNCA
	5 o más veces	4 veces	3 veces	2 veces	1 vez	4-6 veces	2-3 veces	1 vez	2-3 veces	1 vez	
Ensaladas (verduras crudas)											
*Menestra o acompañamiento de verdura											
**Verdura en guisos											
Legumbres											
Patata, guisada, cocida o frita en casa, NO patatas fritas de bolsa											
Fruta/zumos naturales											
Frutos secos											
Aperitivos de bolsa tipo patatas, gusanitos, etc.											
Pescado/marisco frescos											
Conservas de pescado/marisco											
Conservas de pescado/marisco											
Carnes rojas (cerdo, ternera,...											
Embutidos											

* Menestra o acompañamiento= verdura u hortaliza que se toman como tales, como plato principal o acompañando al segundo plato, pero no las que se utilicen para preparar guisos (sofritos, etc.)

**Verdura en guisos= verdura que acompaña al cocinado (lentejas, estofados, etc.) y que supone una cantidad pequeña dentro de cada plato.

¿Qué tipo de aceite utiliza habitualmente?

	Aceite de oliva	Aceite de girasol	Girasol alto oleico	Otros
Para aliñar (ensaladas, etc.)				
Para guisar				
Para freír				
Para mayonesa				

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BEBIDAS ALCOHOLICAS	AL DÍA					A LA SEMANA			AL MES		NUNCA O CASI NUNCA
	5 o más veces	4 veces	3 veces	2 veces	1 vez	4-6 veces	2-3 veces	1 vez	2-3 veces	1 vez	
Vino tinto											
Vino blanco, cava											
Vino rosado											
Vino dulce											
Cerveza											
Licores destilados											

¿Cuando toma bebidas alcohólicas?

☐ Sólo en las comidas

☐ Sólo fuera de las comidas

☐ Ambas

☐ ns/nr

Frecuencia

☐ A diario o casi

☐ Los fines de semana

☐ Ocasionalmente

☐ Nunca

☐ ns/nr

¿Ha tomado alguna bebida alcohólica en las últimas 24h?

☐ Si Especificarla: .....

☐ No

☐ ns/nr

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BEBIDAS NO ALCOHOLICAS	AL DÍA					A LA SEMANA			AL MES		NUNCA O CASI NUNCA
	5 o más veces	4 veces	3 veces	2 veces	1 vez	4-6 veces	2-3 veces	1 vez	2-3 veces	1 vez	
Cerveza sin alcohol											
Refrescos con cafeína											
Otros refrescos con azúcar											
Refrescos sin azúcar (Light)											
Zumos envasados											
Café expreso (de máquina)											
Café filtrado											
Café instantáneo											
Café descafeinado de máquina											
Café descafeinado instantáneo											
Té (especificar)											
Otras infusiones (especificar)											

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO 2. CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA (MEDAS).

Cuestionario de adhesión a la Dieta Mediterránea (MEDAS)

Pregunta	Modo de valoración	Puntos
1. ¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?	Sí= 1 punto	
2. ¿Cuánto aceite consume en total al día?: (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)	4 o más cucharadas= 1 punto	
3. ¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día?: (las guarniciones o acompañamientos= ½ ración) 1 ración= 200 g	2 o más (al menos una de ellas en ensalada o crudas) = 1 punto	
4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día?	3 o más al día= 1 punto	
5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día): (ración= 100-150 g)	Menos de 1 al día= 1 punto	
6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día?: (porción individual)	Menos de 1 al día= 1 punto	
7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, bitter) consume al día?	Menos de 1 al día= 1 punto	
8. ¿Bebe usted vino? ¿Cuánto consume a la semana?	7 o más vasos a la semana= 1 punto	
9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana?: (1 plato o ración de 150 g)	3 o más a la semana= 1 punto	
10. ¿Cuántas raciones de pescado-mariscos consume a la semana?: (1 plato, pieza o ración= 100-150 g)	3 o más a la semana= 1 punto	
11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulces o pasteles a la semana?	Menos de 2 a la semana= 1 punto	
12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana?: (ración 30 g)	3 o más a la semana= 1 punto	
13. ¿Consume usted preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas?: (carne de pollo= 1 pieza o ración de 100-150 g)	Sí= 1 punto	
14. ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, arroz u otros platos aderezados con salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?	2 o más a la semana= 1 punto	
	PUNTUACIÓN TOTAL:	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 3. AUTORIZACIÓN DE PROYECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

XUNTA DE GALICIA
DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA
Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA
Data 28/12/2015 09:59:39
SAÍDA 174511 / RX 1755490

José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15005/2015/003
Interesado: Felipe Casanueva Breijo
Procedemento: resolución de autorización

Data de inicio: xaneiro de 2016
Forma de inicio: solicitude do interesado

Notifícolle que con data 23 de decembro de 2015, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural emitiu unha resolución de autorización do proxecto de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

O interesado, como representante do centro da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela presentou, con data 14.7.2015 e rexistro de entrada 83463 RX 1343433, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Modelos experimentais para o estudio da obesidade
Nome do centro usuario: Animalario da Facultade de Medicina
Persoa responsable do proxecto: Felipe Casanueva Freijo
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Departamento de Fisioloxía da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela
Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II ☐ Tipo III ☒

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as0 cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 4. CERTIFICADO DE CAPACITACIÓN PARA EL MANEJO DE ANIMALES CON FINES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los experimentos realizados con animales incluidos en la presente Tesis Doctoral fueron realizados por la Dra. Ana Belén Crujeiras Martínez.

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, ADMINISTRACIÓN LOCAL Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO
Comunidad de Madrid

Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC 566/2015, de 20 de marzo

D./D.ª **ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ,** con N.I.F. **52935842P**, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar, sin limitación de especie, las funciones de:

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS

Nº de certificado: CAP-T-1244-16

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

Dirección General de Agricultura y Ganadería

Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

Fecha	**Sello**
3 de junio de 2016	COMUNIDAD DE MADRID · CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, ADMINISTRACIÓN LOCAL Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO · DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Nombre y firma

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

(P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015)

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS

Fdo: Jesús Carpintero Hervás

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, ADMINISTRACIÓN LOCAL Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO
Comunidad de Madrid

Ref.: CAP-T-1244-16

RESOLUCIÓN DE RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN E INCLUSIÓN EN EL REGISTRO DE PERSONAL QUE MANEJA ANIMALES UTILIZADOS, CRIADOS O SUMINISTRADOS CON FINES DE EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS, INCLUYENDO LA DOCENCIA (Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo)

Vista la solicitud formulada por D./D.ª ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple con los requisitos para estimar su solicitud, de acuerdo a lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./D.ª ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, e incluirle en el correspondiente registro.

El mantenimiento de la capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, o ante el Director General de Agricultura y Ganadería, o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley.

Madrid, 07 de junio de 2016
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA
(P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015)
EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS

Fdo.: Jesús Carpintero Hervás

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, ADMINISTRACIÓN LOCAL Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO
Comunidad de Madrid

Ref.: CAP-T-1244-16

D./D.ª ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ
C/ MANUEL LUSTRES RIVAS, 3 - 1º
15706 RIVEIRA (CORUÑA)

Notifico a Vd. que el Sr. Director General de Agricultura y Ganadería, ha dictado la siguiente Resolución:

"Vista la solicitud formulada por D./D.ª ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple con los requisitos para estimar su solicitud, de acuerdo a lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./D.ª ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ, con N.I.F. 52935842P, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, e incluirle en el correspondiente registro.

El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, o ante el Director General de Agricultura y Ganadería o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley."

Se adjunta Certificado de Capacitación.

Madrid, 07 de junio de 2016
ÁREA DE PROTECCIÓN ANIMAL
LA JEFA DE SECCIÓN TÉCNICA I

Fdo.: Sonia García Gómez

REGISTRO DE SALIDA Fecha:10/06/2016 11:43
Ref:10/125507.9/16
Cons. Medio Amb. Admon. Local y O.T.(ALC)
Reg C.Medio Amb.Adm.Local y Ord.T.(ALC)
Destino: Dª. ANA BELÉN CRUJEIRAS MARTÍNEZ

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 5. AUTORIZACIONES DE LOS COMITÉS ÉTICOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral

Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia
Edificio Administrativo de San Lázaro
15781 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tlf: 881 546425 Fax: 881 541804
ceic@sergas.es

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 26/03/2013, la enmienda del estudio:

Título: Avaliación dos efectos diferenciais do tecido adiposo de doantes con fenotipo obeso e normal sobre a carcinoxénesis
Versión Enmienda: modificación del proyecto enero 2013
Promotor: Felipe Casanueva Freijo
Código de Registro CEIC de Galicia: 2009/076

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha enmienda sea incorporada al estudio de investigación que se está realizando en los centros aprobados.

En Santiago de Compostela a 10 de abril de 2013
La Secretaria



Paula M. López Vázquez

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

HOSPITAL UNIVERSITARIO
RÍO HORTEGA

Sacyl

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. FLORENTINO PINACHO PELAEZ, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Centro Hospitalario: Hospital Universitario del Río Hortega de Valladolid,

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado, en su reunión del día 10 de Abril de 2013, el Estudio de Intervención con alimentos titulado: **"Estudio para evaluar el efecto del DHA en los mediadores involucrados en la resolución de la inflamación en pacientes obesos sometidos a un programa de adelgazamiento".** C.P.: PNK-DHA-2013-01. Versión 4.0 de 22 de Marzo de 2013 Promotor: Protein Supplies S.L. Hoja de información al paciente y consentimiento informado Versión 4 del 26 de Marzo de 2013 y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Y que este Comité acepta que dicho Estudio sea realizado en el Hospital Universitario del Río-Hortega de Valladolid por el **Dr. D. de Luis Román** como Investigador Principal.

Lo que firmo en Valladolid, a 11 de Abril de 2013

Sacyl
HOSPITAL UNIVERSITARIO
"RIO HORTEGA"
COMITÉ ÉTICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Fdo. D Florentino Pinacho Peláez
Secretario CEIC

Junta de
Castilla y León

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 6. RELACIÓN DE PUBLICACIONES INCLUIDAS EN LA TESIS DOCTORAL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL (EDIUS)

PUBLICACIONES INCLUÍDAS EN LA TESIS

Dña. **Paula Mariño Lorenzo**

En condición de: **Doctoranda**

Título de la Tesis: **EFECTO INMUNOMODULADOR Y EPIGENÉTICO DE LA CETOSIS NUTRICIONAL Y COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA DIETA SOBRE EL RIESGO DE CÁNCER ASOCIADO A LA OBESIDAD**

INFORMA:

Que la presente tesis reproduce parcialmente la relación de publicaciones que se detallan a continuación, en las que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración, cuya contribución es como primer autor.

En Santiago de Compostela, 22 de abril de 2024

Firma electrónica

MARIÑO LORENZO PAULA - 44090716S

Firmado digitalmente por MARIÑO LORENZO PAULA - 44090716S
Fecha: 2024.04.22 19:20:38 +02'00'

Fdo. Paula Mariño Lorenzo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL (EDIUS)

Relación de publicaciones

Título de la Publicación
ZNF577 Methylation Levels in Leukocytes From Women With Breast Cancer Is Modulated by Adiposity, Menopausal State, and the Mediterranean Diet
Autores y filiaciones
Paula M Lorenzo[1], Andrea G Izquierdo[1,2], Angel Diaz-Lagares[3,4], Marcos C Carreira[2,5], Manuel Macias-Gonzalez[2,6], Juan Sandoval[7], Juan Cueva[8], Rafael Lopez-Lopez[4,8], Felipe F Casanueva[2,5], Ana B Crujeiras[1,2] [1]Laboratory of Epigenomics in Endocrinology and Nutrition (EpiEndoNut), Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain. [2]CIBER de Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBEOBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. [3]Cancer Epigenetics, Translational Medical Oncology (Oncomet), Health Research Institute of Santiago (IDIS), University Clinical Hospital of Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain. [4]CIBER de Oncologia (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. [5]Laboratory of Molecular and Cellular Endocrinology, Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain. [6]Department of Endocrinology and Nutrition, Virgen de la Victoria University Hospital, University of Malaga (IBIMA) and CIBEROBN, Málaga, Spain. [7]Biomarkers and Precision Medicine Unit and Epigenomics Core Facility, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain. [8]Translational Medical Oncology (Oncomet), Health Research Institute of Santiago (IDIS), University Clinical Hospital of Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain.
Fecha de la publicación
23 de abril de 2020
Revista
Frontiers in Endocrinology. ISSN: 1664-2392
Índice de impacto
5,555
Posición de la revista
Journal Impact Factor (JIF) Categoría Endocrinology & Metabolism: 36/145 Q1 Journal Citation Indicator (JCI) Categoría Endocrinology & Metabolism: 56/184 Q2
Contribución autor
Paula M Lorenzo contribuyó en el diseño y realización de los experimentos, análisis de los datos y redacción del manuscrito.
Contenido incluido en

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL (EDIUS)

RESULTADOS:

1. ESTUDIO DEL GEN ZNF577 EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA SEGÚN LA ADIPOSIDAD, EL ESTADO MENOPÁUSICO Y LA DIETA (pág. 103-113)

ID del artículo

DOI: 10.3389/fendo.2020.00245

Enlace a la publicación (Open Access)

https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2020.00245/full

Permisos y licencias

Artículo de acceso abierto bajo *Creative Commons Attribution License (CC BY)*

Título de la Publicación

Immunomodulatory effect of a very-low-calorie ketogenic diet compared with bariatric surgery and a low-calorie diet in patients with excessive body weight

Autores

Paula M Lorenzo[a,b], Ignacio Sajoux[a,c], Andrea G Izquierdo[a,b], Diego Gómez-Arbelaez[d], M Ángeles Zulet[b,e], Itziar Abete[b,e], Ana I Castro[b,k], Javier Baltar[f], María P Portillo[b,g,h], Francisco J Tinahones[b,i], J Alfredo Martinez[b,e,j], Felipe F Casanueva[b,k], Ana B Crujeiras[a,b]

[a] Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/
SERGAS), Spain
[b] CIBER de Fisiopatologia de La Obesidad y Nutricion (CIBERobn), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
[c] Medical Department Pronokal Group, Barcelona, Spain
[d] Faculty of Health Sciences, University of Santander (UDES), Bucaramanga, Colombia
[e] Department of Nutrition, Food Science and Physiology, Centre for Nutrition Research, University of Navarra (UNAV) and IdiSNA, Navarra Institute for
Health Research, Pamplona, Spain
[f] Division of General Surgery, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Spain
[g] Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, University of the Basque Country (UPV/EHU) and Lucio Lascaray Research
Institute, Spain
[h] Bioaraba Health Research Institute, Vitoria-Gasteiz, Spain
[i] Unidad de Gestion Clínica de Endocrinología y Nutricion, Instituto de Investigacion Biomedica de Malaga (IBIMA), Complejo Hospitalario de Malaga
(Virgen de La Victoria), Universidad de Malaga, Malaga, Spain
[j] Program for Precision Nutrition and Cardiometabolic Health, IMDEA, CSIC, Universidad Autonoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain
[k] Molecular Endocrinology Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Spain

Fecha de la publicación

18 de mayo de 2022

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL (EDIUS)

Revista
Clinical Nutrition. ISSN:1532-1983
Índice de impacto
6,3
Posición de la revista
Journal Impact Factor (JIF) Categoría Nutrition & Dietetics: 14/88 Q1 Journal Citation Indicator (JCI) Categoría Nutrition & Dietetics: 8/109 Q1
Contribución autor
Paula M Lorenzo contribuyó en el diseño y realización de los experimentos, análisis de los datos y redacción del manuscrito.
Contenido incluido en
RESULTADOS: 1. ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE UNA DIETA CETOGÉNICA MUY BAJA EN CALORÍAS EN PACIENTES CON OBESIDAD (pág. 127-142)
ID del artículo
DOI: 10.1016/j.clnu.2022.05.007
Enlace a la publicación (Open Access)
https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614(22)00157-1/fulltext
Permisos y licencias
Artículo de acceso abierto bajo *Creative Commons Attribution License (CC BY)*

Título de la Publicación
Potential effects of nutrition-based weight loss therapies in reversing obesity-related breast cancer epigenetic marks
Autores
Paula M Lorenzo[a], *Ana B Crujeiras*[a,b] [a]Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain [b]CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERobn), Madrid, Spain
Fecha de la publicación
19 de enero de 2021
Revista
Food & Function. ISSN: 2042-650X

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL (EDIUS)

Índice de impacto
6,317
Posición de la revista
Journal Impact Factor (JIF) Categoría Biochemistry & Molecular Biology: 59/285 Q1 Categoría Food Science & Technology: 22/142 Q1 Journal Citation Indicator (JCI) Categoría Biochemistry & Molecular Biology: 55/315 Q1 Categoría Food Science & Technology: 28/170 Q1
Contribución autor
Paula M Lorenzo contribuyó en la búsqueda bibliográfica y redacción del manuscrito.
Contenido incluido en
INTRODUCCIÓN (pág. 37-67)
ID del artículo
DOI: 10.1039/D0FO01984D
Enlace a la publicación
https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/fo/d0fo01984d/unauth
Permisos y licencias
Artículo con autorización para su reproducción en la Tesis de su autor.

Título de la Publicación
Epigenetic Effects of Healthy Foods and Lifestyle Habits from the Southern European Atlantic Diet Pattern: A Narrative Review
Autores
Paula M Lorenzo[1,2], Andrea G. Izquierdo[1,2], Gemma Rodriguez-Carnero[1,3], Antía Fernández-Pombo[3], Alba Iglesias[1], Marcos C Carreira[2,4], Cristina Tejera[1,5], Diego Belligo[1,5], Miguel A Martinez-Olmos[1,2,3], Rosaura Leis[2,6,7], Felipe F Casanueva[2,4,7], Ana B Crujeiras[1,2] [1]Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Epigenomics Unit, Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain. [2]CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERobn), Madrid, Spain. [3]Endocrinology and Nutrition Division, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain. [4]Molecular and Cellular Endocrinology Group. Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain. [5]Endocrinology and Nutrition Unit, Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol (CHUF/SERGAS), Ferrol, Spain.

[6]Department of Pediatrics, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS); Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain.
[7]Fundacion Dieta Atlántica, Santiago de Compostela, Spain.

Fecha de la publicación

2 de octubre de 2022

Revista

Advances in Nutrition. ISSN: 2161-8313

Índice de impacto

9,3

Posición de la revista

Journal Impact Factor (JIF)
Categoría Nutrition & Dietetics: 3/88 Q1
Journal Citation Indicator (JCI)
Categoría Nutrition & Dietetics: 9/109 Q1

Contribución autor

Paula M Lorenzo contribuyó en la búsqueda bibliográfica y redacción del manuscrito.

Contenido incluido en

INTRODUCCIÓN (pág. 37-67)

ID del artículo

DOI: 10.1093/advances/nmac038

Enlace a la publicación (Open Access)

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2161831323000364?via%3Dihub

Permisos y licencias

Artículo de acceso abierto bajo *Creative Commons Attribution License (CC BY)*

frontiers in Endocrinology

ORIGINAL RESEARCH
published: 23 April 2020
doi: 10.3389/fendo.2020.00245

ZNF577 Methylation Levels in Leukocytes From Women With Breast Cancer Is Modulated by Adiposity, Menopausal State, and the Mediterranean Diet

*Paula M. Lorenzo[1], Andrea G. Izquierdo[1,2], Angel Diaz-Lagares[3,4], Marcos C. Carreira[2,5], Manuel Macias-Gonzalez[2,6], Juan Sandoval[7], Juan Cueva[8], Rafael Lopez-Lopez[4,8], Felipe F. Casanueva[2,5] and Ana B. Crujeiras[1,2]**

[1] Laboratory of Epigenomics in Endocrinology and Nutrition (EpiEndoNut), Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain, [2] CIBER de Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBEOBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, [3] Cancer Epigenetics, Translational Medical Oncology (Oncomet), Health Research Institute of Santiago (IDIS), University Clinical Hospital of Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain, [4] CIBER de Oncologia (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, [5] Laboratory of Molecular and Cellular Endocrinology, Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain, [6] Department of Endocrinology and Nutrition, Virgen de la Victoria University Hospital, University of Malaga (IBIMA) and CIBEROBN, Málaga, Spain, [7] Biomarkers and Precision Medicine Unit and Epigenomics Core Facility, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain, [8] Translational Medical Oncology (Oncomet), Health Research Institute of Santiago (IDIS), University Clinical Hospital of Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:
Bruno Ramos-Molina, Biomedical Research Institute of Murcia (IMIB), Spain

Reviewed by:
Francine Durocher, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Canada
Linn Maria Ellinor Gillberg, Copenhagen University Hospital, Denmark

***Correspondence:**
Ana B. Crujeiras
anabelencrujeiras@hotmail.com

Specialty section:
This article was submitted to Obesity, a section of the journal Frontiers in Endocrinology

Received: *03 February 2020*
Accepted: *02 April 2020*
Published: *23 April 2020*

Citation:
Lorenzo PM, Izquierdo AG, Diaz-Lagares A, Carreira MC, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, Cueva J, Lopez-Lopez R, Casanueva FF and Crujeiras AB (2020) ZNF577 Methylation Levels in Leukocytes From Women With Breast Cancer Is Modulated by Adiposity, Menopausal State, and the Mediterranean Diet. Front. Endocrinol. 11:245. doi: 10.3389/fendo.2020.00245

The methylation levels of *ZNF577* in breast tumors has been previously identified as a possible epigenetic mark of breast cancer associated with obesity. The aim of the current study was to investigate differences in methylation levels of *ZNF577* depending on obesity, menopausal state and dietary pattern in blood leukocytes, a non-invasive sample. The methylation levels of *ZNF577* of two CpG sites (CpGs) located in promoter and island previously identified as differentially methylated according to adiposity and menopausal state by 450 k array (cg10635122, cg03562414) were evaluated by pyrosequencing in DNA from the blood leukocytes of breast cancer patients [$n = 90$; $n = 64$ (71.1%) overweight/obesity and $n = 26$ (28.9%) normal-weight] and paired tumor tissue biopsies ($n = 8$ breast cancer patients with obesity; $n = 3/5$ premenopausal/postmenopausal women). Differences in methylation levels were evaluated at each CpGs individually and at the mean of the two evaluated CpGs. Adherence to the Mediterranean diet was evaluated using the MEDAS-validated questionnaire, and the consumption of food groups of interest was also evaluated using the recommended intakes of the *Sociedad Española de Nutricion Comunitaria*. The methylation levels of *ZNF577* were correlated between paired leukocytes and breast tumor biopsies ($r = 0.62$; $p = 0.001$). Moreover, higher methylation was found in leukocytes from patients with obesity ($p = 0.002$) and postmenopausal patients ($p = 0.022$) than patients with normal-weight or premenopausal, respectively. After adjusting for the body mass index and age, higher levels of *ZNF577* methylation were also found in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

women with greater adherence to the Mediterranean diet ($p = 0.017$) or specific foods. Relevantly, the methylation levels of *ZNF577* showed a good ability for fish consumption detection [area under the ROC curve (AUC) = 0.72; $p = 0.016$]. In conclusion, the association between methylation of *ZNF577* and adiposity, menopausal state, and adherence to the Mediterranean diet can be detected in the blood leukocytes. The results guarantee the need of performing further studies in longer longitudinal cohorts in order to elucidate the role of *ZNF577* methylation in the association between breast cancer, adiposity and dietary patterns.

Keywords: epigenetics, obesity, cancer, nutrition, blood cells, biomarkers

INTRODUCTION

Breast cancer is the leading form of cancer diagnosed in women (1, 2). Excess adiposity and dietary habits occupy a prominent position among the most relevant risk factors of breast cancer (3–5). Increasing scientific evidence demonstrates that environmental factors modulate the expression of genes by regulating epigenetic mechanisms (6, 7). Therefore, the effect of excess body weight and dietary factors on the promotion of breast cancer may be mediated by epigenetic regulation (8).

Our previous studies have recently evaluated the associations between the body mass and DNA methylation in obesity-related diseases (9–12). In the context of breast cancer, an epigenetic signature of obesity-related breast cancer has been identified in breast tumor biopsies, being *ZNF577* the most represented gene (10).

The functional role of *ZNF577* is unknown; however, some members of the zinc finger proteins (ZNFs) family, which regulate gene transcription, have been found to be often hypermethylated and silenced in different types of tumors, suggesting that it may represent a commonly disrupted epigenetic pathway in cancer progression (13). In a metabolic and nutritional context, family members of the ZNFs have been associated with adipogenesis (14–16), type 2 diabetes, insulin resistance (17, 18), the regulation of hepatic lipogenesis (19, 20), and in the control of muscle function (21). Moreover, the expression of some ZNFs is regulated by nutritional status such as fasting (22) or under a high-fat diet (23, 24). Recently it was observed that the consumption of fruit and vegetables concentrates modulate the expression of a ZNFs gene in overweight/obese subjects (25). However, to the best of our knowledge, few studies have evaluated the effect of food consumption on the regulation of the expression of genes encoding ZNFs in humans.

Elucidating potential effect of adiposity and dietary patterns on the epigenetic regulation of breast cancer may lead to a better understanding of this disease. Epigenetic mechanisms are involved in the pathogenesis of breast cancer and considering that obesity is a risk factor of breast cancer, changes of diet or body weight might reduce the risk of disease remodelating epigenetic marks. This is especially important as the global prevalence of obesity continues to rise (26, 27). In the area of nutrigenomics/nutriepigenomics, recently published studies have provided evidence of the suitability of studying DNA methylation in the blood leukocytes (11, 28–37).

In this study we evaluate the methylation levels of *ZNF577* because it was among the genes of the episignature of obesity-related breast cancer previously identified (10) and it could be a potential player in the link between obesity and breast cancer. Therefore, this study was first aimed to evaluate the capacity of circulating leukocytes to reflect the DNA methylation pattern of *ZNF577* in the breast tumor tissue. Furthermore, this study also aimed to assess the relationship between the adherence to the Mediterranean diet and effects of its specific constituents on the methylation and expression pattern of *ZNF577*.

SUBJECTS AND METHODS

Study Participants

A total of 101 women newly diagnosed with histologically confirmed invasive breast cancer during 2010–2011 were included from the *Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela* (CHUS). Patients were excluded if they had other disease different of breast cancer such as cardiovascular, renal or infectious disease. Among these patients, samples, complete clinical data and information on dietary habits were obtained for 90 women, and they were included in this study. Leukocytes were obtained from blood samples in the 90 women. Moreover, paired samples from breast tumor tissue biopsies were obtained in 8 breast cancer women with obesity ($n = 3$ premenopausal women and $n = 5$ postmenopausal women). Breast cancer human paraffin embedded (FFPE) tissue blocks were obtained from the Biobank of the *Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela* (CHUS) (PT13/0010/0068), integrated in the Spanish National Biobanks Network and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees (ref 2009/076) (10).

Pre-diagnosis body weight, height, age, and menopausal status were retrieved from medical records for all participants in the study. Additionally, a questionnaire on the dietary habits was also obtained along with the blood samples in fasting. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kg divided by the squared height in meters and was further categorized using the World Health Organization (WHO) criteria: normal/under-weight, BMI < 25 kg/m^2; overweight, $25 \leq$ BMI < 30 kg/m^2;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and obese, BMI $\geq$ 30 kg/m^2 (38). Then, the overweight and obese patients were classified together as obese (BMI > 25 kg/m^2), and the others as non-obese (BMI $\leq$ 25 kg/m^2) to evaluate the effect of excess body weight on the methylation patterns.

All participants provided informed consent, and the informed consent and the study protocols were approved by the Institutional Review Boards of the participating institution (Comité Ético de Investigación Clínica, CEIC, de Galicia; Ref:2009/076).

Dietary Assessment

The dietary intake of patients was evaluated using a validated self-referenced Food Frequency Questionnaire (FFQ). The questionnaire included 49 food and beverage items, as well as a small questionnaire about the type of oil used for cooking and dressing. Subjects were asked to specify their frequency of consumption for each food item on a daily, weekly, or monthly basis.

Intakes were then converted to daily frequencies and a manual for household measures was used to convert intake frequencies to grams of food intake/day (39). Considering the recommendations of food intakes of the *Sociedad Española de Nutricion Comunitaria* (SENC) (40), two groups were established for each food item (lower consumption than recommended & higher consumption than recommended). Also, with the data obtained in the FFQ, adherence to the Mediterranean diet was assessed based on 12 questions from the MEDAS-validated questionnaire (41). Under this condition two groups were established. First, patients who secured higher than 7 points from the 12 questions of the MEDAS questionnaire were categorized as the group with high adherence to the Mediterranean diet. Second, patients who secured 7 points or less were included in the group with low adherence to the Mediterranean diet.

DNA Preparation and Bisulfite Conversion

Genomic DNA was isolated from fresh-frozen (FF) leukocytes (n = 90) and paired breast cancer human paraffin embedded (FFPE) tissue blocks (n = 8).

Genomic DNA was isolated from FF leukocytes by using the MasturePure^{TM} DNA purification kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA), while paraffin samples (FFPE) (10 sections of 14 μm) were processed using the E.Z.N.A. FFPE DNA kit (Omega Bio-Tek), with a xylene wash to remove the paraffin. For each sample of tumor tissue, subsequent sections were stained with hematoxylin and eosin for histologic confirmation of the presence (>50%) of tumor cells (10). The obtained DNA was treated with RNase A for 1 h at 45°C (Qiagen, Hilden, Germany). All DNA samples were quantified using the fluorometric method (Quan-iT PicoGreen DsDNA Assay, Life Technologies) and were assessed for purity using a NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) with 260/280 and 260/230 ratio measurements. High-quality DNA samples (500 ng of FF and 300 ng of FFPE) obtained were selected for bisulfite conversion using the EZ-96 DNA Methylation kit (Zymo Research Corp.) following the manufacturer's recommendations.

Pyrosequencing Analysis

Pyrosequencing was used to assess the methylation levels of *ZNF577*. The primer sequences used in this analysis were designed using Qiagen's PyroMark Assay Design 2.0 software to hybridize to CpG-free sites to ensure methylation-independent amplification. Briefly, polymerase chain reaction (PCR) was performed using standard conditions with biotinylated primers, and the Swift MaxPro thermalcycler (Esco Healthcare, Singapore) was used to prepare single-stranded PCR products according to the manufacturer's instructions. Pyrosequencing reactions and methylation quantification were performed in a PyroMark Q24 System version 2.0.7 (Qiagen), using appropriate reagents and recommended protocols. The primer sequences used were (all given 5′ > 3′): *ZNF577* prePCR forwad: GGGTAGAGGYGAGTGTTTAGAGAT, *ZNF577* pre-PCR reverse: [Btn] CTCCCTACCCCTAAAACAT; *ZNF577* seq: TTTAGTAGTGGAGATAGG). These primers allowed to quantify the methylation levels of two CpG corresponding to the target IDs cg03562414 and cg10635122 of the Infinium Human Methylation 450 BeadChip array (mapinfo 52391078 and 52391090, respectively, according to GRCh37/hg19 from UCSC Genome Browser). These CpG sites were previously identified as differentially methylated in breast tumor tissues depending on menopausal and adiposity state (10). Both CpG sites are located at the promoter region and island of *ZNF577* (**Figure 1A**). Promoter region was defined as the sequence from 1,500 bps upstream of transcription start site (TSS) to 1st exon (42, 43).

Gene Expression Assessment

For data analysis, gene expression levels were normalized *GAPDH* as internal control, and they were expressed as the average value for the control group according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. RT-qPCR experiments were performed in compliance with the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines (http://www.rdml.org/miqe).

RNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Extracted total RNA was purified with DNase treatment using a DNA-free kit as a template (Ambion) to generate first-strand cDNA synthesis using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The expression of *ZNF577* was assessed using TaqMan real-time PCR and a Step One Plus system (Applied Biosystems, USA) with specific primers and probes for the *ZNF577* gene that were obtained from inventoried TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA). All reactions were performed using the following cycling parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min. All experiments were performed in duplicate and gene expression levels were normalized using *GAPDH* as an internal control. The fold change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relative quantitation method according to the manufacturer's guidelines (Applied Biosystems), and data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM). RT-qPCR experiments

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

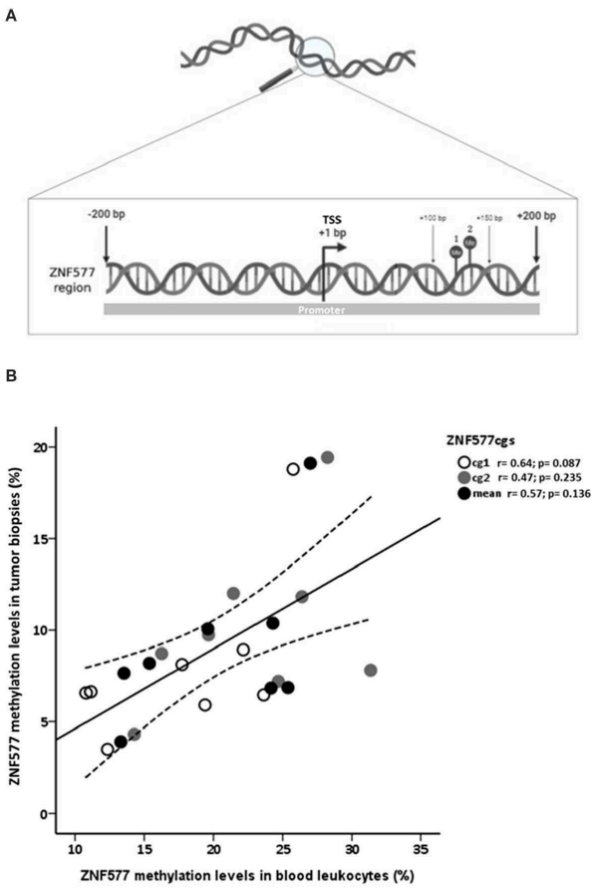


FIGURE 1 | Analysis of methylation levels of *ZNF577*. **(A)** Map of a DNA fragment from the promoter of *ZNF577* gene with 200 nucleotides upstream (–) and 200 nucleotides downstream (+) of transcription start site (TSS) containing the examined CpG sites. Points 1 and 2 represent CpG sites located at the mapinfo 52391078 and 52391090, respectively, according to GRCh37/hg19 from UCSC Genome Browser and correspond to the target IDs cg03562414 and cg10635122 of the Infinium Human Methylation 450 BeadChip array. These CpG sites were previously identified as differentially methylated in breast tumor tissues depending on menopausal and adiposity state (10). The promoter region was defined as the sequence from 1,500 bps upstream of TSS to 1st exon (42, 43) **(B)** Scatterplot representing the correlation of *ZNF577* methylation levels of CpG1, CpG2 and mean in leukocytes and breast tumor tissue biopsies. The center line represents the linear regression trendline. The lines above and below the center line represent the upper and lower bounds of the 95% confidence interval around the trendline. r, correlation coefficient evaluated by the Pearson test; *p*, *p*-value.

were performed in compliance with the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) guidelines (http://www.rdml.org/miqe). The commercially available and prevalidated TaqMan primer/probe sets used were as follows: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, Hs02758991_g1, Applied Biosystems) and zinc finger protein *ZNF577* (*ZNF577*, Hs00971281_m1; Applied Biosystems).

Statistical Analyses

The sample size of the current study was calculated to obtain differences in the methylation levels of *ZNF577*. It was calculated for an $\alpha = 0.05$, and a power (1-β) of 80%. The normal distribution of variables was explored using the Kolmogorov-Smirnov and the Shapiro-Wilk tests. The Chi-square (X^2) test was used to compare the prevalence of obesity in different food consumption groups. The Student's *t*-test was used to study the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 1 | Anthropometric and body composition according to adiposity and menopausal state.

	Normal-weight			Overweight/Obese		
	Premenopausal ($n = 13$)	Postmenopausal ($n = 13$)	*p*-value	Premenopausal ($n = 15$)	Postmenopausal ($n = 49$)	*p*-value
Body weight (kg)	58.0 ± 7.2	58.6 ± 7.0	0.827	73.5 ± 8.1	77.5 ± 12.6	0.253
Height (m)	1.62 ± 0.08	1.58 ± 0.06	0.171	1.63 ± 0.07	1.56 ± 0.05	**<0.001**
BMI (kg/m^2)	22.0 ± 1.9	23.4 ± 1.7	0.073	27.5 ± 1.9	31.7 ± 4.7	**0.001**
Age (years)	42.4 ± 4.8	59.9 ± 6.6	**<0.001**	43.5 ± 4.5	61.1 ± 8.5	**<0.001**
Waist circumference (cm)	75.3 ± 8.1	80.4 ± 9.4	0.175	90.8 ± 10.5	98.3 ± 12.7	0.061
Hip circumference (cm)	108.0 ± 14.5	99.2 ± 9.7	0.089	102.9 ± 10.7	103.6 ± 12.1	0.830
WHR	0.72 ± 0.11	0.81 ± 0.12	0.085	0.88 ± 0.13	0.96 ± 0.19	0.179
WHtR	0.46 ± 0.05	0.51 ± 0.04	**0.027**	0.55 ± 0.06	0.63 ± 0.08	**0.002**

Data show as the mean ± standard deviation. P-value is calculated by Student's t-test. BMI, body mass index; WHR, waist-hip ratio; WHtR, waist-height ratio. Bold means statistially significant results ($p < 0.05$).

differences between the groups and the differences were further evaluated by a univariant ANCOVA, adjusted for BMI and age.

The analysis of the difference in methylation levels of *ZNF577* between the different groups was performed with the two CpG sites separately and also with the mean value of the two CpG sites.

The potential association between the methylation levels of *ZNF577* with anthropometric- and body composition-parameters, and food consumption was evaluated using the Spearman coefficient test. Also, the Spearman coefficient test was performed to evaluate the correlation between *ZNF577* methylation levels in leukocytes and in breast tumor tissue biopsy. Multivariate linear regression models were fitted to assess the potential association between the methylation levels of *ZNF577* and food consumption, adjusted for BMI and age. Three regression models were performed. Model 1 included all variables of food groups consumption, model 2 included variables of vegetables, legumes and fish consumption, and model 3 included the variable of fish consumption. Additionally, a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to prove that the regression model including fish consumption alone is the best predictive tool to identify patients with high level of *ZNF577* methylation. These results are often interpreted as negligible efficiency (<20%), minimal (20–40%), moderate (41–60%), good (61–80%) and excellent (>80%).

Statistical analyses were performed using the SPSS version 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows XP (Microsoft, Redmond, WA, USA). A $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of Patients

Among the 90 patients with primary breast cancer included in this study, 64 patients (71.1%) were classified as overweight/obese and 26 (28.9%) were classified to have normal-weight and 62 (68.9%) patients were postmenopausal (**Table 1**). The mean BMI was 25.0 ± 3.4 in premenopausal patients and 30.0 ± 5.5 in postmenopausal patients. The mean waist perimeter was 83.7 ± 12.2 for premenopausal patients and 93.8 ± 14.2 for postmenopausal patients. Likewise, the mean WHR was 0.81 ± 0.14 for premenopausal patients and 0.92 ± 0.07 for postmenopausal patients. These differences according to the menopausal state were statistically significant ($p < 0.05$). In fact, the highest BMI and waist-to-height ratio (WHtR) was observed among overweight/obese postmenopausal women (**Table 1**). The characteristics of tumors were not found to be different depending on the adiposity (**Table 2**).

To evaluate the association between obesity-related features among breast cancer patients and dietary habits, the food frequency questionnaire was analyzed in the context of adherence to the Mediterranean diet and the consumption of the most important food groups (vegetables, legumes, fish and read meat and sausages) (**Table 3**). Statistical analysis post BMI adjustment yielded no significant differences in the context of adherence to the Mediterranean diet, and consumption of vegetables and legumes (**Table 3**). Significant differences were observed in the height, age, and waist circumference in relation to the consumption of red meat and sausages. Age of the patient and its association with fish consumption was also found to be statistically significant. Women with breast cancer who consumed higher than the recommended amounts of red meat and sausages were taller than patients who consumed lower than the recommended amounts of meat. Also, women with breast cancer who consumed higher than recommended amounts of fish were older than patients who consumed lower than the recommended amounts of fish.

Methylation and Expression Levels of *ZNF577* Based on Adiposity, Menopausal Status, and Food Consumption

A direct correlation was found between *ZNF577* methylation levels of paired leukocytes and breast tumor tissue biopsies from 8 breast cancer women considering data from CpG1, CpG2, and mean (**Figure 1B**; $r = 0.62$; $p = 0.001$). Accordingly, *ZNF577* methylation levels in the leukocytes from women with breast cancer were higher in patients with obesity than in patients with normal-weight ($p = 0.002$; **Figure 2A**), and in postmenopausal than in premenopausal women ($p = 0.022$; **Figure 2B**). The

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 2 | Tumor characteristics and associated *p*-value chi-square test according to body mass index (BMI).

	BMI		
	<25	≥25	*p* chi-square
Stage at diagnosis			0.636
I/II	15 (57.7)	43 (67.2)	
III/IV	5 (19.2)	8 (12.5)	
Unknown	6 (23.1)	13 (20.3)	
Receptor status			
Estrogen receptor (ER)			0.595
Positive	21 (80.8)	48 (75.0)	
Negative	2 (7.7)	10 (15.6)	
Unknown	3 (11.5)	6 (9.4)	
Progesterone receptor (PR)			0.604
Positive	19 (73.1)	42 (65.6)	
Negative	4 (15.4)	16 (25.0)	
Unknown	3 (11.5)	6 (9.4)	
Hercept test			0.893
Positive	2 (7.7)	7 (10.9)	
Negative	20 (76.9)	48 (75.0)	
Unknown	4 (15.4)	9 (14.1)	
Histology			0.966
Invasive ductal carcinoma	20 (76.9)	48 (75.0)	
Other	4 (15.4)	10 (15.6)	
Unknown	2 (7.7)	6 (9.4)	
Tumor size (cm)			0.343
≤2	13 (50.0)	41 (64.1)	
>2	11 (42.3)	17 (26.6)	
Unknown	2 (7.7)	6 (9.4)	

Data show as the sample size (percentage) of each group according to adiposity.

results were in a similar direction of that previously published in breast tumor tissue biopsy (10).

In order to evaluate the effect of promoter methylation on its function, the expression levels of *ZNF577* was assessed and an inverse correlation was found with statistical significance between transcript levels and methylation levels in CpG1 and mean of both CpGs (CpG1: $r = -0.28$; $p = 0.023$, CpG2: $r = -0.18$; $p = 0.143$, Mean: $r = -024$; $p = 0.05$). In fact, the expression of this gene in the leukocytes from women with breast cancer was lower in women with obesity than that in the women with normal-weight ($p = 0.039$; **Figure 2C**), and lower in postmenopausal women than that in the premenopausal women ($p = 0.007$; **Figure 2D**).

Upon analysis of the methylation levels of *ZNF577* in relation to adherence to the Mediterranean diet, it was observed that women who have greater adherence to the diet showed higher levels of methylation, as evidenced by the statistically significant differences in CpG1 and in the mean of the two evaluated CpG sites (**Figure 3A**). Notably the differences in methylation levels according to the adherence to the Mediterranean diet was inversely correlated with differences in the gene expression of *ZNF577*. These

TABLE 3 | Association between obesity-related features among breast cancer patients and dietary habits.

	Adherence Mediterranean diet		Vegetables consumption		Legumes consumption		Fish consumption		Read meat and sausages consumption	
	≤7 points (*n* = 49)	>7 points (*n* = 18)	<recommended (*n* = 50)	≥recommended (*n* = 19)	<recommended (*n* = 41)	≥recommended (*n* = 28)	<recommended (*n* = 51)	≥recommended (*n* = 18	<recommended (*n* = 35)	≥recommended (*n* = 33)
Prevalence (%)	73.1	29.9	72.5	27.5	59.4	40.6	73.9	26.1	51.2	48.5
Body weight (kg)	72.3 ± 14.1	68.9 ± 8.9	71.0 ± 13.8	71.6 ± 10.4	70.8 ± 13.9	71.7 ± 11.4	70.5 ± 13.6	73.5 ± 10.2	69.1 ± 11.4	73.4 ± 14.5
Height (m)	1.60 ± 0.07	1.47 ± 0.05	1.59 ± 0.07	1.58 ± 0.07	1.59 ± 0.07	1.58 ± 0.06	1.59 ± 0.07	1.58 ± 0.04	1.57 ± 0.06	1.61 ± 0.07*
BMI (kg/m^2)	28.3 ± 5.7	27.8 ± 3.2	28.1 ± 5.6	28.6 ± 3.6	28.0 ± 5.5	28.6 ± 4.5	27.9 ± 5.5	29.4 ± 3.6	28.0 ± 4.7	28.3 ± 5.8
Age (years)	53.7 ± 11.4	57.9 ± 7.3	55.0 ± 11.4	56.5 ± 9.4	54.6 ± 11.3	56.6 ± 10.3	53.6 ± 11.1	61.3 ± 7.7*	58.7 ± 10.5	51.3 ± 10.0*
Waist circumference (cm)	91.7 ± 15.3	87.8 ± 9.1	91.1 ± 14.5	89.4 ± 12.6	90.8 ± 14.3	90.1 ± 13.4	90.8 ± 15.3	89.9 ± 9.2	88.6 ± 12.7	92.1 ± 14.9‡
Hip circumference (cm)	104.7 ± 11.7	106.3 ± 11.7	106.1 ± 12.2	100.8 ± 10.2	105.0 ± 12.3	103.8 ± 11.1	105.0 ± 11.6	102.9 ± 12.6	102.5 ± 11.7	106.5 ± 11.8
WHR	0.87 ± 0.18	0.82 ± 0.14	0.84 ± 0.15	0.89 ± 0.19	0.85 ± 0.13	0.87 ± 0.21	0.86 ± 0.17	0.87 ± 0.14	0.86 ± 0.15	0.86 ± 0.18
WHtR	0.57 ± 0.10	0.56 ± 0.06	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.08	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.09	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.06	0.56 ± 0.09	0.57 ± 0.10
Prevalence of obesity†	68.9% (31)	80.0% (12)	67.4% (31)	81.3% (13)	65.8% (25)	79.2% (19)	66.7% (32)	85.5% (12)	69.7% (23)	71.4% (20)

*Data show the mean ± standard deviation. †Data show the percentage (sample size). *Statistically significant (p<0.05) differences respect to <recommended evaluated by Student's t-test within the consumption of each food group. ‡Statistically significant (p < 0.05) differences were evaluated with univarant ANCOVA adjusted for body mass index (BMI) and age. WHR, waist to hip ratio; WHtR, waist-to-height ratio.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

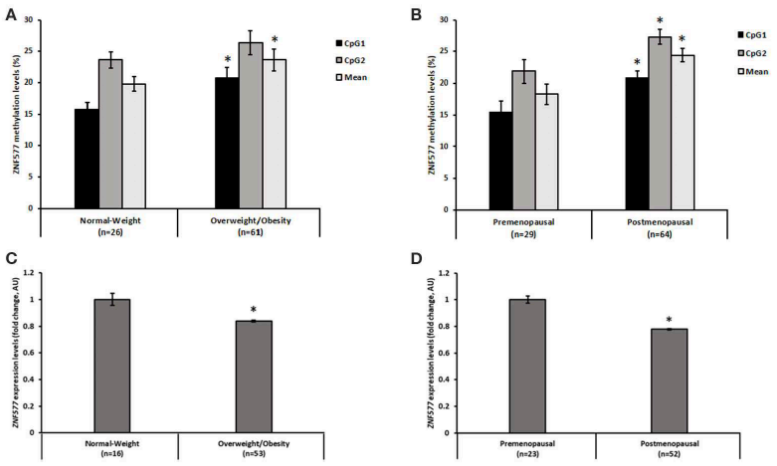


FIGURE 2 | Methylation and gene expression of *ZNF577* according to adiposity and menopausal state. Methylation levels of *ZNF577* in leukocytes from patients in this study according to **(A)** adiposity, and **(B)** menopausal state. Gene expression of *ZNF577* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) according to **(C)** adiposity, and **(D)** menopausal state. Data are presented as the mean; error bars represent the standard error. Asterisk (*) denotes statistically significant differences ($p < 0.05$) in relation to normal-weight or premenopausal state evaluated by Student's *t*-test.

differences were observed with statistical significance ($p = 0.007$, **Figure 3B**).

Further analysis was performed by individual evaluation of the food groups of the Mediterranean diet in relation to the methylation levels of *ZNF577*. Statistically significant differences were observed in specific items (**Figure 3C**). The methylation levels of *ZNF577* were higher in women who consumed more than the recommended amounts of vegetables and fish. The results obtained were statistically significant in CpG2 and in the mean of the two evaluated CpGs in vegetable consumption, in CpG1 and in the mean of CpGs adjusted for age and BMI in the consumption of legumes, and in CpG1, CpG2 and in the mean of CpGs in fish consumption. No statistically significant results were obtained in relation to the consumption of red meat and sausages (**Figure 3C**). Despite the differences in methylation levels according to specific foods, differences in the expression of *ZNF577* depending on specific foods were not detected with statistical significance (**Supplementary Table 1**).

Particularly, methylation levels of *ZNF577* correlated directly with fish consumption (**Figure 4A**), while no statistically significant correlation was found between methylation levels and consumption of vegetables, legumes, and meat. Moreover, linear regression models revealed that 16% of the variability in the *ZNF577* methylation levels, adjusted for age and BMI, was conjointly explained by the consumption of vegetables, legumes, and fish (**Table 4**). In fact, a receiver operating characteristic (ROC) curve determine the ability of *ZNF577* methylation levels in leukocytes to discriminate patients according to the consumption of fish with an area under the ROC curve (AUC) of 0.72 ($p < 0.001$) (**Figure 4B**).

DISCUSSION

Obesity-related breast cancer has been previously associated with the methylation levels of the promoter region of *ZNF577*, a specific methylation pattern identified among a potential epi-signature of breast cancer in obese women (10). In the current study, the methylation levels of *ZNF577* were measured in the blood leukocytes, to evaluate if the identified methylation levels in breast tumors can be reflected in a non-invasive and easily obtained source of DNA. In this context, it was demonstrated that the methylation levels of *ZNF577* were also observed in association with adiposity and menopausal status, and the direction of differences in methylation levels were inverse to that in expression of this gene in the blood leukocytes. Dietary habits are also a risk factor for developing cancer and obesity, as well as both factors were related to the regulation of the methylation profile (44–46). Thus, when the methylation levels of *ZNF577* were evaluated according to the dietary habits, breast cancer patients who adhered to a Mediterranean diet and who specifically consumed higher amounts of vegetables, legumes, and fish showed the highest levels of methylation in *ZNF577*, independently of menopausal and obesity status. As far as we know, the current work is the first to evaluate the effect of a food consumption pattern on the methylation level of the ZNF genes in women with breast cancer. Therefore, further studies will be needed to elucidate if the effect of dietary factors on the modulation of methylation levels of *ZNF577* is also reflected in the function of this gene, and the role of this regulation on breast cancer progression.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

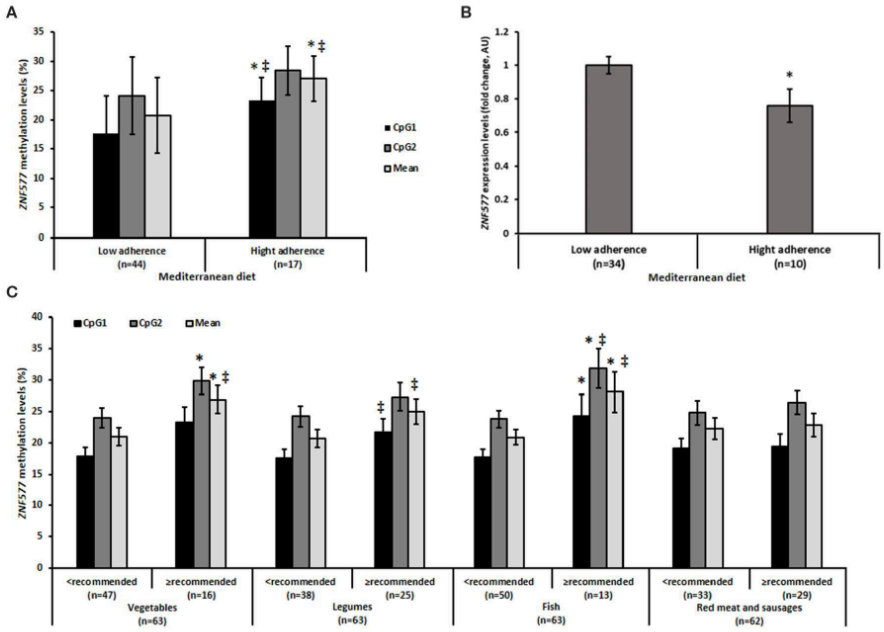


FIGURE 3 | Methylation and gene expression of *ZNF577* according to dietary patterns. **(A)** Mehylation levels of *ZNF577* in leukocytes from patients in this study according to adherence to the Mediterranean diet. **(B)** Gene expression of *ZNF577* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients in this study according to adherence to the Mediterranean diet. **(C)** Methylation levels of *ZNF577* in leukocytes from patients in this study according to food groups of the Mediterranean diet. Data are presented as the mean; error bars represent the standard error. Asterisk (*) denotes statistically significant differences ($p < 0.05$) in relation to low adherences to the Mediterranean diet or lower consumption than recommended of Mediterranean diet food groups evaluated by Student's *t*-test. ‡denotes statistically significant differences ($p < 0.05$) in relation to low adherence to the Mediterranean diet or lower consumption than recommended of Mediterranean diet food groups evaluated by univariant ANCOVA adjusted for body mass index (BMI) and age.

Adherence to Mediterranean diet has been associated with a lower incidence of cancer (47–49). In fact, specific compounds contained in foods included in the Mediterranean diet are able to modulate the methylation levels of several genes in the context of disorders like cardiovascular disease (50–52), stroke (51, 53), and cancer (54, 55). In agreement with these previous reports, the adherence to Mediterranean diet has been related to higher methylation levels of *ZNF577*. When the association between methylation levels of *ZNF577* were evaluated according to the consumption of specific foods included in the Mediterranean diet, the highest methylation levels of *ZNF577* were shown in the breast cancer patients who consumed the recommended amounts of vegetables, legumes, and fish. However, differences were not observed in the *ZNF577* methylation profile in association with meat consumption.

The International Agency for Research on Cancer (WHO-IARC) classified consumption of red meat as "probably carcinogenic to humans" (56). This classification is based mainly on the evidence found with colon cancer; however, previous studies have observed that a high consumption of red meat has been also associated with an increased risk of breast cancer and other types of cancer (57, 58).

Relevantly, the association analysis demonstrated that the consumption of fish was the highest contributor to the modulation of the *ZNF577* methylation levels. These results are in agreement with the beneficial effects of fish consumption on the promotion of health. Fish contain bioactive compounds such as omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 FAs), specially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). These compounds have significant multiple antitumor activities and have been used as immune-nutrients (59, 60). Epigenetic modifications are among the mechanisms by which the fish-related bioactive compounds induce healthy effects. Differentially methylated CpG sites have been identified in the blood leukocytes from overweight and obese subjects after a 6-week supplementation with n-3 FAs (61) and also after 6 months of n-3 FAs supplementation in patients with Alzheimer's disease (62).

Because Mediterranean diet and fish consumption is a protective factor and obesity is a risk factor of breast cancer, the association between high *ZNF577* methylation levels and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

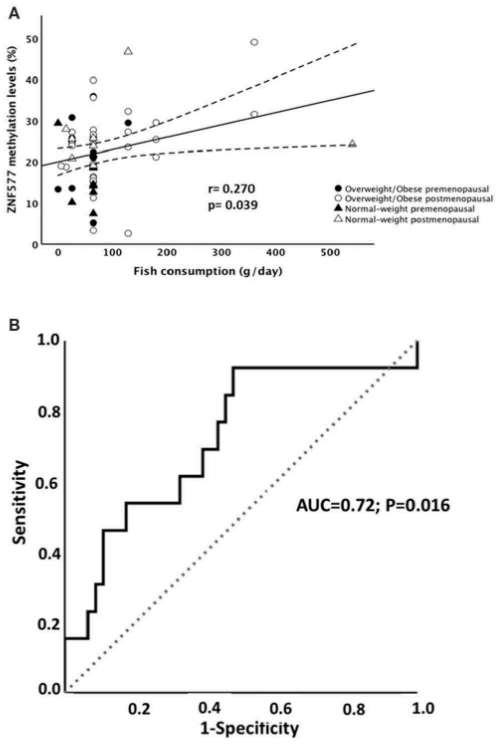


FIGURE 4 | Association between methylation levels of *ZNF577* and fish consumption. **(A)** Scatterplot representing the association between *ZNF577* methylation levels in leukocytes from patients in this study and fish consumption in grams per day. The center line represents the linear regression trendline. The lines above and below the center line represent the upper and lower bounds of the 95% confidence interval around the trendline. *r*, correlation coefficient evaluated by the Pearson test; *p*, *p*-value. **(B)** Receiver operating characteristic (ROC) curves for *ZNF577* methylation levels to discriminate the patients according to the fish consumption.

Mediterranean diet adherence or fish consumption together with obesity and menopausal state found in the current study could be considered counterintuitive and requires further investigation.

The strength and novelty of the current work has been represented by the use of blood cells, since circulating leukocytes constitute an easy and non-invasive tool to obtain nucleic acids in a clinical setting and perform nutrigenomic/nutriepigenomic studies, instead of invasive biopsies of the target tissue. In fact, previous results observed in the biopsies from breast cancer tumors, in association with obesity and menopausal state (10), were similar to the results obtained in leukocytes in the present study. The magnitude of the DNA methylation differences between the groups may be considered small. An explanation may be attributed to the cellular heterogeneity of the sample used for evaluating the methylation levels of a gene in a single cell

TABLE 4 | Independent effects of vegetables, legumes, fish and read met consumption on Methylation levels of ZNF577 in leukocytes from breast cancer women at the moment of diagnosis.

	Standardized coefficients β (95% CI)	*P-value*
Model 1		
Vegetables consumption	0.159 (−2.4;9.21)	0.246
Legumes consumption	0.201 (−1.25;8.88)	0.137
Fish consumption	0.183 (−2.21;10.43)	0.197
Read meat and sausage consumption	0.148 (−2.38;7.95)	0.284
Corrected $R^2 = 0.15$		0.027
Model 2		
Vegetables consumption	0.168 (−2.18;9.33)	0.218
Legumes consumption	0.187 (−1.44;8.50)	0.160
Fish consumption	0.189 (−1.99;10.48)	0.178
Corrected $R^2 = 0.16$		0.019
Model 3		
Fish consumption	0.278 (0.18;12.34)	0.044
Corrected $R^2 = -0.11$		0.029

Adjusted for age and body mass index (BMI).

type. Also, it may be because patients with the same pathology were grouped only according to food consumption patterns based on established recommendations, instead of evaluating the effect of a specific intervention in a longitudinal study. On the other hand, clinical and pathological characteristics of tumors and therapeutic strategies were not used to stratify and explore the population study and these parameters could influence the methylation levels. However, the clinical characteristics of tumors in the studied cohort were mostly homogeneous with most of tumors were invasive ductal carcinoma in first state, small size, positive RE and PR and negative hercept test. Therefore, the results of the present study are of the foremost relevance because differences in the methylation levels were observed under a narrow range of intergroup differences in the nutritional behavior.

In conclusion, the current work demonstrates that the methylation pattern of *ZNF577* previously identified in breast cancer tissue according to the adiposity and menopausal status (10), can be also detected in leukocytes from the peripheral blood. Relevantly, a specific dietary habit such as adherence to Mediterranean diet specifically fish consumption appears to modulate the methylation levels of *ZNF577* in blood leukocytes independently of the BMI and age. Therefore, *ZNF577* may be a biomarker for the effect of environmental factors such as adiposity, age, and diet on breast cancer, and a suitable therapeutic target in precision nutrition and medicine.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité Ético de Investigación Clínica, CEIC, de Galicia; Ref:2009/076. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: PL, FC, and AC. Patients recruitment and sample collection: JC and RL-L. Bioinformatics analysis of the methylation data: AD-L, JS, and MM-G. Gene expression experiments and analysis: AI and MC. Data curation: PL. Formal analysis: PL. Investigation: PL, FC, and AC. Methodology and supervision: AC. Writing—original draft: PL and AC. Writing—review and editing: PL, AI, AD-L, MC, MM-G, JS, JC, RL-L, FC, and AC.

FUNDING

This study was supported by the Centro de Investigacion Biomedica en Red de Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERobn) and grants from the Instituto de Salud Carlos III-ISCIII (PI17/01287 and CP17/00088) co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). AD-L was funded by a research contract Juan Rodés (JR17/00016) from ISCIII. Manuel Macias-Gonzalez was the recipient of the Nicolas Monardes Programme from the Servicio Andaluz de Salud, Junta de Andalucia, Spain (RC-0001-2018 and C-0029-2023), AC was funded by a research contract Miguel Servet (CP17/00088) from the ISCIII.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Maribel Rendo from the Molecular and Cellular Endocrinology group of IDIS for her support on the management of research data and we thank Diana Garcia from the Health Research Institute la Fe for her technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00245/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*. (2017) 13:1387–97. doi: 10.7150/ijbs.21635
2. Garcia-Estevez L, Moreno-Bueno G. Updating the role of obesity and cholesterol in breast cancer. *Breast Cancer Res*. (2019) 21:35. doi: 10.1186/s13058-019-1124-1
3. Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. (2006) 13:279–92. doi: 10.1677/erc.1.00729
4. van Gemert WA, Lanting CI, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Grooters HG, Kampman E, et al. The proportion of postmenopausal breast cancer cases in the Netherlands attributable to lifestyle-related risk factors. *Breast Cancer Res Treat*. (2015) 152:155–62. doi: 10.1007/s10549-015-3447-7
5. Crujeiras AB, Cueva J, Vieito M, Curiel T, López-López R, Pollán M, et al. Association of breast cancer and obesity in a homogeneous population from Spain. *J Endocrinol Invest*. (2012) 35:681–5. doi: 10.3275/8370
6. Bultman SJ. Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*. (2017) 61:10. doi: 10.1002/mnfr.201500902
7. Kubota T. Epigenetic effect of environmental factors on neurodevelopmenal disorders. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. (2016) 71:200–7. doi: 10.1265/jjh.71.200
8. Baxter E, Windloch K, Gannon F, Lee JS. Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell Biosci*. (2014) 4:45. doi: 10.1186/2045-3701-4-45
9. Crujeiras AB, Morcillo S, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Castellano-Castillo D, Torres E, et al. Identification of an episignature of human colorectal cancer associated with obesity by genome-wide DNA methylation analysis. *Int J Obes*. (2019) 43:176–88. doi: 10.1038/s41366-018-0065-6
10. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Stefansson OA, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, Cueva J, et al. Obesity and menopause modify the epigenomic profile of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. (2017) 24:351–63. doi: 10.1530/ERC-16-0565
11. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira MC, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep*. (2017) 7:41903. doi: 10.1038/srep41903
12. 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. doi: 10.1016/j.trsl.2016.07.002
13. Severson PL, Tokar EJ, Vrba L, Waalkes MP, Futscher BW. Coordinate H3K9 and DNA methylation silencing of ZNFs in toxicant-induced malignant transformation. *Epigenetics*. (2013) 8:1080–88. doi: 10.4161/epi.25926
14. Xiang H, Zhong Z-X, Peng Y-D, Jiang S-W. The emerging role of Zfp217 in Adipogenesis. *Int J Mol Sci*. (2017) 18:1367. doi: 10.3390/ijms18071367
15. Kang S, Akerblad P, Kiviranta R, Gupta RK, Kajimura S, Griffin MJ, et al. Regulation of early adipose commitment by Zfp521. *PLoS Biol*. (2012) 10:e1001433. doi: 10.1371/journal.pbio.1001433
16. Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, et al. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*. (2010) 464:619–23. doi: 10.1038/nature08816
17. Jia Y, Yuan L, Hu W, Luo Y, Suo L, Yang M, et al. Zinc-finger BED domain-containing 3 (Zbed3) is a novel secreted protein associated with insulin resistance in humans. *J Intern Med*. (2014) 275:522–33. doi: 10.1111/joim.12170
18. Scherneck S, Vogel H, Nestler M, Kluge R, Schürmann A, Joost HG. Role of zinc finger transcription factor Zfp69 in body fat storage and diabetes susceptibility of mice. *Results Probl Cell Differ*. (2010) 52:57–68. doi: 10.1007/978-3-642-14426-4_6
19. Liu G, Zhou L, Zhang H, Chen R, Zhang Y, Li L, et al. Regulation of hepatic lipogenesis by the zinc finger protein Zbtb20. *Nat Commun*. (2017) 8:14824. doi: 10.1038/ncomms14824
20. Fernandes GW, Bocco BMLC, Fonseca TL, McAninch EA, Jo S, Lartey LJ, et al. The Foxo1-inducible transcriptional repressor Zfp125 causes hepatic steatosis and hypercholesterolemia. *Cell Rep*. (2018) 22:523–34. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.053
21. Fujita R, Yoshioka K, Seko D, Suematsu T, Mitsuhashi S, Senoo N, et al. Zmynd17 controls muscle mitochondrial quality and whole-body metabolism. *FASEB J*. (2018) 32:5012–25. doi: 10.1096/fj.201701264R
22. Choi WI, Yoon JH, Song JY, Jeon BN, Park JM, Koh DI, et al. Zbtb7c is a critical gluconeogenic transcription factor that induces glucose-6-phosphatase and phosphoenylpyruvate carboxykinase 1 genes expression during mice fasting. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. (2019) 1862:643–56. doi: 10.1016/j.bbagrm.2019.04.001

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

23. Clinkenbeard EL, Turpin C, Jiang J, Peterson ML, Spear BT. Liver size and lipid content differences between BALB/c and BALB/cJ mice on a high-fat diet are due, in part, to Zhx2. *Mamm Genome.* (2019) 30:226–36. doi: 10.1007/s00335-019-09811-6
24. Caracciolo V, Young J, Gonzales D, Ni Y, Flowers SJ, Summer R, et al. Myeloid-specific deletion of Zfp36 protects against insulin resistance and fatty liver in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2018) 315:E676–93. doi: 10.1152/ajpendo.00224.2017
25. Williams EJ, Baines KJ, Berthon BS, Wood LG. Effects of an encapsulated fruit and vegetable juice concentrate on obesity-induced systemic inflammation: a randomised controlled trial. *Nutrients.* (2017) 9:116. doi: 10.3390/nu9020116
26. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* (2019) 15:288–98. doi: 10.1038/s41574-019-0176-8
27. Bray GA, Heisel WE, Afshin A, Jensen MD, Dietz WH, Long M, et al. The science of obesity management: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev.* (2018) 39:79–132. doi: 10.1210/er.2017-00253
28. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, et al. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet.* (2014) 383:1990–8. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62674-4
29. Nicoletti CF, Pinhel MS, Noronha NY, Jácome A, Crujeiras AB, Nonino CB. Association of MFSD3 promoter methylation level and weight regain after gastric bypass: assessment for 3 y after surgery. *Nutrition.* (2020) 70:110499. doi: 10.1016/j.nut.2019.04.010
30. Ollikainen M, Ismail K, Gervin K, Kyllönen A, Hakkarainen A, Lundbom J, et al. Genome-wide blood DNA methylation alterations at regulatory elements and heterochromatic regions in monozygotic twins discordant for obesity and liver fat. *Clin Epigenetics.* (2015) 7:39. doi: 10.1186/s13148-015-0073-5
31. 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. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00127-8
32. Zheng LD, Linarelli LE, Liu L, Wall SS, Greenawald MH, Seidel RW, et al. Insulin resistance is associated with epigenetic and genetic regulation of mitochondrial DNA in obese humans. *Clin Epigenetics.* (2015) 7:60. doi: 10.1186/s13148-015-0093-1
33. Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Zhang S, Fulda KG, Gonzalez K, et al. Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. *Epigenetics.* (2011) 6:293–9. doi: 10.4161/epi.6.3.14378
34. Zhang FF, Morabia A, Carroll J, Gonzalez K, Fulda K, Kaur M, et al. Dietary patterns are associated with levels of global genomic DNA methylation in a cancer-free population. *J Nutr.* (2011) 141:1165–71. doi: 10.3945/jn.110.134536
35. Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Fulda KG, Kaur M, Gonzalez K, et al. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics.* (2011) 6:623–9. doi: 10.4161/epi.6.5.15335
36. Crujeiras AB, Campion J, Díaz-Lagares A, Milagro FI, Goyenechea E, Abete I, et al. Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: a translational study. *Regul Pept.* (2013) 186:1–6. doi: 10.1016/j.regpep.2013.06.012
37. Milagro FI, Campión J, Cordero P, Goyenechea E, Gómez-Uriz AM, Abete I, et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J.* (2011) 25:1378–89. doi: 10.1096/fj.10-170365
38. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultarion. *World Health Organ Tech Rep Ser.* (2000) 894:1–253.
39. Palma I, Farran A, Cantós D. Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. *Barcelona: McGRAW-HILL.* (2008).
40. Dapcich V, Salvador G, Ribas L, Pérez C, Aranceta J, Serra L. Guía de la alimentación saludable. *Senc..* (2004).
41. Schröder H, Fitó M, Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, et al. A short screener is valid for assessing mediterranean diet adherence among older Spanish men and women. *J Nutr.* (2011) 141:1140–45. doi: 10.3945/jn.110.135566
42. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics.* (2011) 6:692–702. doi: 10.4161/epi.6.6.16196
43. Diaz-Lagares A, Crujeiras AB, Lopez-Serra P, Soler M, Setien F, Goyal A, et al. Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016) 113:E7535–44. doi: 10.1073/pnas.1608585113
44. Lima RPA, do Nascimento RAF, Luna RCP, Persuhn DC, da Silva AS, da Conceição Rodrigues Gonçalves M, et al. Effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation level of the ADRB3 gene, lipid profile and oxidative stress in overweight or obese women. *Clin Epigenetics.* (2017) 9:110. doi: 10.1186/s13148-017-0407-6
45. Campión J, Milagro F, Martínez JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci.* (2010) 291–347. doi: 10.1016/B978-0-12-375003-7.00011-X
46. Donovan MG, Wren SN, Cenker M, Selmin OI, Romagnolo DF. Dietary fat and obesity as modulators of BC risk: focus on DNA methylation. *Br J Pharmacol.* (2019) 177:1331–50. doi: 10.1111/bph.14891
47. Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G. Adherence to mediterranean diet and risk of cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* (2017) 9:1063. doi: 10.3390/nu9101063
48. Hernáez Á, Estruch R. The mediterranean diet and cancer: what do human and molecular studies have to say about it? *Nutrients.* (2019) 11:2155. doi: 10.3390/nu11092155
49. Turati F, Carioli G, Bravi F, Ferraroni M, Serraino D, Montella M, et al. Mediterranean diet and breast cancer risk. *Nutrients.* (2018) 10:326. doi: 10.3390/nu10030326
50. Kalea AZ, Drosatos K, Buxton JL. Nutriepigenetics and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* (2018) 21:252–9. doi: 10.1097/MCO.0000000000000477
51. Tuttolomondo A, Simonetta I, Daidone M, Mogavero A, Ortello A, Pinto A. Metabolic and vascular effect of the mediterranean diet. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:326. doi: 10.3390/ijms20194716
52. Arpón A, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Marti A, Razquin C, Martínez-González MA, et al. Adherence to Mediterranean diet is associated with methylation changes in inflammation-related genes in peripheral blood cells. *J Physiol Biochem.* (2016) 73:445–55. doi: 10.1007/s13105-017-0552-6
53. Corella D, Ordovás JM. How does the Mediterranean diet promote cardiovascular health? Current progress toward molecular mechanisms: gene-diet interactions at the genomic, transcriptomic, and epigenomic levels provide novel insights into new mechanisms. *Bioessays.* (2014) 36:526–37. doi: 10.1002/bies.201300180
54. Fasanelli F, Giraudo MT, Vineis P, Fiano V, Fiorito G, Grasso C, et al. DNA methylation, colon cancer and Mediterranean diet: results from the EPIC-Italy cohort. *Epigenetics.* (2019) 14:977–88. doi: 10.1080/15592294.2019.1629230
55. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Barone G, Mazzoleni P, Catalfo A, et al. Mediterranean diet and particulate matter exposure are associated with LINE-1 methylation: results from a cross-sectional study in women. *Front Genet.* (2018) 9:514. doi: 10.3389/fgene.2018.00514
56. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi F El, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* (2015) 1599–600. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00444-1
57. Diallo A, Deschasaux M, Latino-Martel P, Hercberg S, Galan P, Fassier P, et al. Red and processed meat intake and cancer risk: results from the prospective nutriNet-santé cohort study. *Int J Cancer.* (2018) 142:230–7. doi: 10.1002/ijc.31046
58. Farvid MS, Stern MC, Norat T, Sasazuki S, Vineis P, Weijenberg MP, et al. Consumption of red and processed meat and breast cancer incidence: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer.* (2018) 143:2787–99. doi: 10.1002/ijc.31848
59. Huang Q, Mo M, Zhong Y, Yang Q, Zhang J, Ye X, et al. Anticancer role of omega-3 polyunsaturated fatty acids was closely associated with the increase

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

in genomic DNA hydroxymethylation. *Anticancer Agents Med Chem.* (2019) 19:330–6. doi: 10.2174/1871520618666181018143026

60. Eltweri AM, Thomas AL, Metcalfe M, Calder PC, Dennison AR, Bowrey DJ. Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. *Clin Nutr.* (2017) 36:65–78. doi: 10.1016/j.clnu.2016.01.007
61. Tremblay BL, Guénard F, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl M-C. Epigenetic changes in blood leukocytes following an omega-3 fatty acid supplementation. *Clin Epigenetics.* (2017) 9:43. doi: 10.1186/s13148-017-0345-3
62. Karimi M, Vedin I, Freund Levi Y, Basun H, Faxén Irving G, Eriksdotter M, et al. DHA-rich n-3 fatty acid supplementation decreases DNA methylation in blood leukocytes: the OmegAD study. *Am J Clin Nutr.* (2017) 106:1157–65. doi: 10.3945/ajcn.117.155648

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling Editor declared a past co-authorship with the author MM-G.

Copyright © 2020 Lorenzo, Izquierdo, Diaz-Lagares, Carreira, Macias-Gonzalez, Sandoval, Cueva, Lopez-Lopez, Casanueva and Crujeiras. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Clinical Nutrition 41 (2022) 1566–1577

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/clnu

Original article

Immunomodulatory effect of a very-low-calorie ketogenic diet compared with bariatric surgery and a low-calorie diet in patients with excessive body weight

Paula M. Lorenzo [a, b, 1], Ignacio Sajoux [a, c, 1], Andrea G. Izquierdo [a, b], Diego Gomez-Arbelaez [d], M Angeles Zulet [b, e], Itziar Abete [b, e], Ana I. Castro [b, k], Javier Baltar [f], María P. Portillo [b, g, h], Francisco J. Tinahones [b, i], J Alfredo Martinez [b, e, j], Felipe F. Casanueva [b, k, **, 2], Ana B. Crujeiras [a, b, *, 2]

[a] Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Spain
[b] CIBER de Fisiopatologia de La Obesidad y Nutricion (CIBERobn), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
[c] Medical Department Pronokal Group, Barcelona, Spain
[d] Faculty of Health Sciences, University of Santander (UDES), Bucaramanga, Colombia
[e] Department of Nutrition, Food Science and Physiology, Centre for Nutrition Research, University of Navarra (UNAV) and IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain
[f] Division of General Surgery, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Spain
[g] Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, University of the Basque Country (UPV/EHU) and Lucio Lascaray Research Institute, Spain
[h] Bioaraba Health Research Institute, Vitoria-Gasteiz, Spain
[i] Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Complejo Hospitalario de Málaga (Virgen de La Victoria), Universidad de Málaga, Málaga, Spain
[j] Program for Precision Nutrition and Cardiometabolic Health, IMDEA, CSIC, Universidad Autonoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain
[k] Molecular Endocrinology Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 January 2022
Accepted 10 May 2022

Keywords:
Inflammation
Immunonutrition
Nutritional ketosis
Obesity
Oxidative stress
PnK method

SUMMARY

Background & aim: Inflammation and oxidative stress are the most probable mechanistic link between obesity and its co-diseases with cancer among them. The aim of this study was to evaluate whether the nutritional ketosis and weight loss induced by a very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) modulates the inflammatory and oxidative stress profile, compared with a standard, balanced hypocaloric diet (LCD) or bariatric surgery (BS) in patients with obesity.

Methods: The study was performed in 79 patients with overweight or obesity and 32 normal-weight volunteers as the control group. Patients with obesity underwent a weight reduction therapy based on VLCKD, LCD or BS. The quantification of the circulating levels of a multiplexing test of cytokines and carcinogenesis/aging biomarkers, as well as of lipid peroxides and total antioxidant power, was carried out.

Results: First, we observed that pro-inflammatory cytokines increase, while anti-inflammatory cytokines decrease under excessive body weight. Relevantly, when patients underwent weight loss strategies, it was shown that energy-restricted and surgical strategies of weight loss induced changes in circulating cytokine and lipid peroxides. This effect was more notable in patients following the VLCKD than the LCD or BS and it was observed mainly in the ketosis phase of the intervention. Particularly, IL-11, IL-12, IL-2, INF-γ, INF-β, Pentraxin-3 or MMP1 changed after VLCKD. Whereas, APRIL, TWEAK, osteocalcin and IL-28A increased after BS.

Conclusion: As far as we know, this is the first study that evaluate the time-course of cytokines and oxidative stress markers after a VLCKD as compared with a standard LCD and BS. The observed results

* Corresponding author. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), Travesía da Choupana Street s/n, 15706, Santiago de Compostela, La Coruña, Spain.
** Corresponding author. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), Travesía da Choupana Street s/n, 15706, Santiago de Compostela, La Coruña, Spain.
E-mail addresses: endocrine@usc.es (F.F. Casanueva), anabelencrujeiras@hotmail.com (A.B. Crujeiras).
[1] These authors contributed equally to this work and should be considered co-first authors.
[2] Both authors contributed equally to this work and should be considered co-main authors.

https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.05.007
0261-5614/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

support the immunomodulatory effect of nutritional ketosis induced by a VLCKD synergistically with weight loss as a strategy to improve innate-immunity and to prevent infections and carcinogenesis in patients with obesity.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

Obesity is a worldwide health problem being considered a global epidemic [1–3]. Given that, the prevalence of this metabolic disease is increasing and accelerating the onset of several diseases such as cardiometabolic events, type 2 diabetes and liver steatosis [1–3]. Moreover, obesity is now considered to be the most important modifiable risk factor of cancer, after smoking. In 2016 the IARC working group concluded that there was sufficient evidence for a cancer-preventive effect of avoidance of weight gain for thirteen types of cancers and there was convincing evidence that intentional body-weight loss positively affects the mechanistic links involved in the effect of excess body fat on carcinogenesis [4]. Therefore, it is important to elucidate those weight loss strategies with more potential to prevent and counteract putative neoplastic mechanistic links.

Several mechanisms were proposed to be involved in the effect of excess body fat and carcinogenesis, but the most investigated and the most scientifically supported by experimental studies is the role of dysfunctional adipose tissue observed in the obesity setting [5,6]. Under conditions of obesity, approximately 70–80% of individuals undergo adipose tissue remodeling both structurally and functionally, causing an inflammatory cascade [7]. When this acute inflammation does not subside, a low-grade chronic inflammation ensues [7–9]. Excess visceral fat is a source of cytokines, that creates an inflammatory-oxidative stress axis [10]. These mediators secreted by dysfunctional obese adipose tissue are associated with the onset of obesity comorbidities, including the increased risk of cancer and ageing [5]. Outstandingly, in the new era of COVID-19, obesity again emerged as a relevant risk factor for poor prognosis and high mortality of patients infected with Sars-Cov-2 virus [11]. It was proposed that the relationship between obesity and COVID-19 is promoted by inflammation and oxidative stress induced by the obesity-related dysfunctional adipose tissue [12,13]. Exacerbated inflammatory and oxidative stress biomarkers decrease with dietary intervention and weight loss [14], ameliorating or attenuating metabolic risk factors related to obesity and its comorbidities.

Previous studies from our research group have shown that very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD), a type of diet characterized by the restriction of carbohydrates intake to the point of inducing changes in metabolism and the generation of plasma ketone bodies, is effective for the management of obesity and also for the preservation of muscle mass, because weight loss was achieved mainly at the expense of total fat mass and visceral fat [15]. Muscle tissue, an organ that secretes proteins called myokines, is responsible for the improvement of many diseases associated with the inflammatory state [16,17]. In a previous study, it was found that after treatment with VLCKD, myokine levels increased, relating these changes to body composition, especially fat-free mass [18]. Moreover, this nutritional intervention improves the autonomic nervous system activity [19] and is associated with good food control and improvements in the psychological well-being parameters in obese subjects [20]. These beneficial effects of VLCKD could be mediated by epigenetic mechanisms such as was recently demonstrated in an epigenome-wide study [21]. In contrast, bariatric surgery (BS), resulting in rapid and massive weight loss (>20% of total body weight), in addition to producing fat loss, accelerates fat-free mass loss [22]. Fat-free body mass is an important component of body mass loss after BS, especially during the first six months after surgery [23]. Moreover, BS by itself induces metabolic stress, producing a state of inflammation during the first 6 months after the intervention [24,25].

Currently, the role of nutrition to modulate immune system function is been investigated as an adjuvant to conventional therapies in several disease such as cancer [26] and the emergent COVID-19 [27]. It is because, it has been observed that some nutritional components in particular may improve the concentrations of various pro-inflammatory and pro-oxidative biomarkers [28–30]. Thus, in the context of immunonutrition, ketone bodies have been proposed to exert an anti-inflammatory and antioxidant action in the organism and they could lighten age-related diseases or viral infections such as COVID-19 [31,32]. The molecular mechanisms by which ketone bodies prevent oxidative stress and inflammation is pending to be totally elucidated. In this regard, based on the current existing preclinical and clinical studies, it was recently proposed that ketone bodies could promote a moderate mitochondrial stress that induce the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), sirtuins 1 and 3 and AMP-activated kinases which results in an adaptive response that lead to an anti-oxidative and anti-inflammatory state, improved mitochondrial function, cell repair, and regeneration mechanisms [33].

These findings suggest that dietary therapies where ketone bodies are enlarged can reduce inflammation and its negative effects [34] in pathologies such as obesity and its related diseases.

Therefore, the aim of this study was to evaluate whether the nutritional ketosis and weight loss induced by a VLCKD modulates the inflammatory and oxidative stress profile, compared with a standard, balanced hypocaloric diet or BS in patients with obesity. This aim was achieved by quantifying the circulating levels of a number of cytokines and carcinogenesis/ageing biomarkers as well as lipid peroxides and total antioxidant power.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The study was performed in 79 patients with overweight or obesity (n = 59 women) and 32 normal-weight volunteers (n = 20 women) who served as the control group. Patients with obesity underwent a weight reduction therapy based on two different energy-restriction programs or BS (Supplementary Fig. 1). Thus, a group of patients completed treatment with a VLCKD (PnK method®). The other group was a subsample of the study for the Reduction of the Metabolic Syndrome in Navarra (RESMENA), Spain, a randomized control trial based on a low-calorie diet (LCD). A third group underwent BS treatment. Written informed consent to participate in the study was obtained before the start of the study in agreement with the Helsinki Declaration and followed national and European Union guidelines. The study was approved by the respective Institutional Ethics Committee for clinical research of Galicia (ref. 2009/076), Navarra (ref. 065/2009) and Andalucia (ref CP1600163).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2. Study design

2.2.1. Very low-calorie ketogenic diet (VLCKD)

A cohort of patients subjected to the VLCKD was enrolled in this study. This cohort included 20 patients with obesity (body mass index (BMI) 35.5 ± 4.4; n = 12 women; 47.1 ± 10.2 years) attending the Obesity Unit at the Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Spain. The VLCKD was designed according to a commercial weight-loss program (PnK method®), which includes lifestyle and behavioral modification support as described elsewhere [15,35–37]. This method is based on high-biological-value protein preparations obtained from cow's milk, soya, avian eggs, green peas and cereals. Each preparation contained 15 g protein, 4 g carbohydrates, 3 g fat, and 50 mg docosahexaenoic acid, which provided 90–100 kcal of energy [15]. The weight loss program had three phases (Supplementary Fig. 1A). The first phase consisted of a VLCKD (600–800 kcal/day), low in carbohydrates (<50 g/day from vegetables) and lipids (10 g/day from olive oil). The percentage of total energy intake (E%) from macronutrients during this phase was distributed as 57–60 E% from proteins, 14–20 E% from carbohydrates, 23–26 E% from lipids. The amount of high biological-value proteins ranged between 0.8 and 1.2g per kg of ideal body weight to ensure that patients were meeting their minimum bodily requirements and to prevent the loss of lean mass. Throughout this ketogenic phase, supplements of vitamins and minerals such as K, Na, Mg, Ca, and omega-3 fatty acids were provided. When the target amount of weight was lost, the ketogenic phase ended, and patients started a low-calorie diet (800–1500 kcal/day; 43 E% proteins, 30 E% carbohydrates, 26 E% lipids) followed by a maintenance diet of 1500–2000 kcal/day (34 E % proteins, 35 E% carbohydrates, 31 E% lipids). The weight loss program adhered to the 2015 guidelines of the European Food Safety Authority regarding total carbohydrate intake [38].

Patients followed the different steps of the program for up to a maximum period of 4–6 months, although patients remained under medical supervision for the following 12 months [15]. The intervention included an evaluation by the specialist physician conducting the study and an assessment by an expert dietician. All patients underwent a structured program of physical exercise, with external supervision [15].

Throughout the study, the patients completed a maximum of 10 visits with the research team (every 15 ± 2 days); four visits involved a complete physical, anthropometric, and biochemical assessment, while the remaining visits involved control of adherence to the program and evaluation of potential side effects. The four assessment visits were scheduled according to the development of ketosis for each patient as follows: normal level of ketone bodies (baseline), maximum ketosis (1–2 months), reduction of the ketotic approach because of partial reintroduction of normal nutrition (approximately 3 months), no ketosis (4–6 months, end of the study) [15]. The total ketosis state lasted for 60–90 days. In all visits, patients received dietary instructions, individual supportive counseling, and encouragement to exercise on a regular basis using a formal exercise program. The compliance of this advice was not registered. The body weight, body composition, and circulating levels of cytokines and oxidative stress biomarkers were evaluated at baseline (0 months), at maximum ketosis (2–3 months), and at no ketosis (4–6 months).

2.2.2. Low-calorie diet (LCD)

A group of patients with obesity (n = 20, BMI 35.8 ± 4.5; n = 10 women; 49.9 ± 9.3 years) followed a therapy program based on a nutritional intervention controlled by trained dieticians from the Department of Nutrition, Food Sciences and Physiology of the University of Navarra, Spain. Briefly, the study lasted six months in two sequential periods; one intervention period of two months (30% energy restriction, i.e., a reduction of 600–800 kcal/day), during which patients received nutritional assessment every 15 days, followed by a self-control period of four months, during which individuals were advised to follow the lifestyle adopted in the first period (Supplementary Fig. 1B). The energy-restricted diets prescribed were based on the American Heart Association guidelines and included 3–5 meals per day and a macronutrient distribution of 50–55% of the total caloric value from carbohydrates, 15% from proteins and 30% from lipids. Moreover, all participants were asked to maintain their normal physical activity during the study. Anthropometric and body composition measurements and venous blood samples were collected at baseline (week 0), at the end of the diet intervention (endpoint, 2 months), and four months after the end of the treatment (follow-up, 6 months).

2.2.3. Bariatric surgery (BS)

A group of morbidly obese patients (n = 39, BMI 45.6 ± 6.2; n = 37 women; 40.8 ± 10.4 years) underwent BS by laparoscopic techniques at the Hospital Clínico Virgen de la Victoria from Malaga and Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Spain.

After surgical intervention, patients were encouraged to follow a special diet that consisted of liquid diet for 1-month, soft diet for 1-month, and subsequently a normal consistency diet providing about 800 kcal/day with a macronutrient distribution of 48–55 E% of the total caloric value from carbohydrates, 23–27 E% from proteins and 21–27 E% from lipids (Supplementary Fig. 1C). Patients subjected to BS were provided with a daily vitamin-mineral supplement, beginning on the day of the surgical procedure, to reduce the risk of developing nutritional deficiencies. The post-surgery nutritional management was according to the Endocrine Society guidelines and it is prescribed in order to prevent complications, weight regain, and progression of obesity-associated comorbidities [39]. Patients involved in this study returned to the clinic for all follow-up visits. The follow-up regimen included visits at baseline, at three and 6 months at which time anthropometric and body composition measurements were performed, and venous blood samples were collected. Body composition data at three visits were available from n = 24 patients included in this group.

2.3. Anthropometric and body composition measurements

All anthropometric measurements were performed with patients wearing only their underwear and after an overnight fast (8–12 h) according to validated procedures. Body weight and height measurements were performed using a wall-mounted stadiometer (Seca 220 scale, Medical Resources, EPI Inc., OH, USA). The BMI was calculated by dividing body weight by the square of the height (kg/m^2). Total body composition was measured by dual-energy X-ray Absorptiometry (GE Healthcare Lunar, Madison, WI, USA) as described elsewhere [15].

2.4. Biochemical analysis

Venous blood samples were collected after a 12-h overnight fast, and ethylenediaminetetraacetic acid-treated plasma and serum were separated from whole blood and immediately frozen at −80 °C until used.

Cytokines plasma levels were quantified using a commercial multiplex enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Bio-Plex custom assay, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. The minimum detectable values specified in the kit were used, where no data was obtained for each cytokine. Under this procedure, the following cytokines were analyzed: April, B cell activator factor

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(BAFF), cluster of differentiation (CD)163, CD30, Chitanase, glycoprotein (Gp)130, interferon (IFN)-α2, IFN-β, IFN-γ, interleukin (IL)-2, IL-6R, IL-11, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-22, IL-26, IL-28A, IL-29, IL-35, matrix metalloproteinase (MMP)1, MMP3, Osteocalcin, Pentraxin-3, tumor necrosis factor receptor (TNF)-R1, TNF-R2, Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and Tweak.

Among the oxidative stress biomarkers, the levels of malondialdehyde (MDA) and total antioxidative power (AOP) and 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG) were evaluated in serum. MDA and AOP were quantified using colorimetric assay kits (OXIS International, Portland, OR, USA). An enzyme immunoassay kit was used for the quantification of 8-OHdG; Japan Institute for the Control of Aging (JaICA), Fukuroi, Japan) in the serum.

Absorbance of each sample was measured in duplicate using a spectrophotometric microplate reader at a wavelength of 450 nm (Versamax Microplate Reader, Associates of Cape Cod Inc., MA, USA).

Ketosis was determined by measuring ketone bodies, specifically β-hydroxybutyrate (β-OHB), in capillary blood using a portable meter (GlucoMen LX Sensor, A. Menarini Diagnostics, Neuss, Germany) before measurements of anthropometric parameters. As with anthropometric and biochemical assessments, all of the determinations of capillary ketonemia were made after an overnight fast of 8–10 h. These measurements were performed daily by each patient during the entire VLCKD, and the corresponding values were reviewed on the machine's memory by the research team for managing adherence. Additionally, β-OHB levels were determined at each complete visit by the physician in charge of the patient. In the LCD and BS groups, ketosis was measured in the three points of analysis by the physician; baseline, endpoint and follow-up.

2.5. Statistical analysis

The sample size of the current study was calculated to detect differences in cytokines levels considering published values of cytokines and standard deviation [40,41]. It was calculated for an $\alpha = 0.05$, and a power (1-β) of 80%. The normal distribution of variables was explored using the Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests.

An analysis of variance (ANOVA) or analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for age and gender were used to study differences between groups according to adiposity at baseline. A repeated-measures ANOVA were used to study the effects of time-course of the nutritional therapy program and groupings of body composition, biochemical parameters, cytokines and oxidative stress levels in patients with obesity.

Differences respect to baseline (0 months) and between follow-up respect to endpoint were calculated within each weight loss treatment. Differences between weight loss treatments were evaluated with univariant ANCOVA adjusted for age and baseline levels of cytokines. An additional analysis was performed adjusting for initial BMI and body weight loss to compare the weight loss treatments.

The statistical analysis in all variables was performed in patients who had valid data in all three time-points of the treatment follow-up (1: baseline, 2: follow-up, 3: endpoint of the treatment).

Statistical analyses were performed using SPSS version 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows XP (Microsoft, Redmond, WA, USA). A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Differences in circulating levels of cytokines according to adiposity

To evaluate the effect of the weight loss treatments on cytokines, the levels of cytokines were first evaluated relative to excess adiposity (Table 1). Thus, the cohort of excess body weight patients were classified according to their BMI as overweight (BMI 25–29.9), obese (BMI 30–39.9), morbid obese (BMI ≥40) and compared with a group of normal-weight (BMI <25) individuals. In relation to body composition, statistically significant differences were observed between the groups (Table 1, Fig. 1A). Under these conditions, cytokines related to inflammation and carcinogenesis showed increased levels in obesity compared with normal-weight individuals (Table 1), such as April (Fig. 1B), MMP3 (Fig. 1D), TNF-R1, and TNF-R2. By contrast, cytokines which show anti-inflammatory and metabolic homeostasis properties such as GP130, IL-12(p40) (Fig. 1C) and Tweak (Fig. 1E) were higher in normal weight than obese individuals. In relation to the other evaluated cytokines, no statistically significant differences were found between the adiposity-related groups (Table 1). Figure 1 represents those cytokines whose circulating concentration showed differences according to obesity phenotype and also were further modified after weight loss therapies.

3.2. Changes in circulating levels of cytokines after the weight loss therapies

Basal characteristics and changes induced by the weight loss treatments in body weight, body composition and biochemical parameters are shown in Supplementary Table 1.

After the effect of the different weight loss treatments, significant changes were observed in several cytokines (Table 2). These changes were statistically significant in circulating levels of April, CD163, CD30, IFN-β, IFN-γ, IL-2, IL-11, IL-12(p40), IL-28A, MMP1, Osteocalcin, Pentraxin-3 and Tweak. Circulating Osteocalcin levels showed an interaction between groups. Also, statistically significant differences were found between studies in circulating MMP3 and Pentraxin-3. In addition to the previous cytokines, statistically significant changes were obtained in the circulating levels of BAFF and TSLP after VLCKD, in IL-29 after LCD, and in Osteocalcin after BS (Table 2, Table 3). The modulation in circulating cytokines induced by VLCKD was particularly evident at maximum ketosis (Table 2). When the analysis of the differences from baseline in cytokine levels between the weight loss treatments was adjusted for baseline BMI and weight loss, statistically significant differences between treatments remained in the changes of IFN-β, IFN-γ and IL-2 (Table 3).

Figure 2 represents the differences from baseline after weight loss treatments in those cytokines that showed differences according to excess adiposity groups. Thus, it can be observed that circulating levels of April increases after the two phases of treatments, obtaining significant changes in BS, but no statistically significant changes was observed after VLCKD and LCD (Fig. 2A). Circulating levels of IL-12(p40) (Fig. 2B) increase after the first phase of weight loss treatments in the three therapies, finding statistically significant differences only in VLCKD and BS. No statistically significant differences were found in MMP3 levels through the treatments, but differences between weight loss therapies were observed, where VLCKD produces a statistically significant decrease in MMP3 levels compared with the other treatments (Fig. 2C). Tweak levels (Fig. 2D) increase through the three therapies, producing a tendency to return to baseline levels in VLCKD and LCD. However, in BS the increase was maintained until the end of the follow-up, obtaining statistically significant differences with respect to the baseline levels in both points.

In addition, other statistically significant changes in circulating cytokine levels were observed and their changes respect to baseline are shown in Fig. 3. CD163 levels tended to decrease after treatments, with a drift to return to baseline levels at the end of the study in BS (Fig. 3A). Circulating CD30 (Fig. 3B), IFN-β (Fig. 3C), IFN-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 1
Basal characteristics and cytokines levels of study subjects according to adiposity.

	Normal-weight	Overweight	Obese	Morbidly obese	*P*-value
N	32	8	44	27	
Gender (male/female)	12/20	6/2	13/31	2/25	**<0.001**‡
Age (years)	35.9 ± 9.67	37.9 ± 9.41	45.3 ± 9.88*	41.5 ± 8.10	**0.001**
Height (m)	1.68 ± 0.09	1.66 ± 0.11	1.64 ± 0.09	1.63 ± 0.10	0.252
Body weight (kg)	64.7 ± 9.20	78.1 ± 8.18	96.5 ± 13.1*†	133.1 ± 21.5*†¥	**<0.001**
BMI (kg/m^2)	22.7 ± 1.68	27.9 ± 1.46*	34.7 ± 2.58*†	49.3 ± 8.96*†¥	**<0.001**
FM (kg)[a]	24.0 ± 7.01	27.7 ± 2.50	40.9 ± 9.52*†	60.5 ± 7.83*†¥	**<0.001**
FFM (kg)[a]	47.1 ± 8.99	44.8 ± 6.44	54.4 ± 11.1	54.8 ± 12.8	0.062
April (ng/mL)	37.9 ± 21.4	65.3 ± 40.3	90.4 ± 37.9*	110 ± 64.7*	**<0.001**
BAFF (pg/mL)	3703 ± 1161	3617 ± 1083	4215 ± 1879	3950 ± 2207	0.886
CD163 (ng/mL)	63.3 ± 49.6	34.4 ± 12.4	56.2 ± 33.0	64.0 ± 47.3	0.125
CD30 (pg/mL)	157 ± 66.5	128 ± 43.0	197 ± 99.7	199 ± 136	0.224
Chitanase (pg/mL)	4837 ± 2053	3974 ± 1387	5835 ± 4421	7060 ± 4977	0.142
Gp130 (ng/mL)	38.2 ± 16.3	34.7 ± 19.7	22.2 ± 8.09*	22.4 ± 13.2*	**<0.001**
IFN-α2 (pg/mL)	–	–	14.4 ± 4.40	16.4 ± 4.77	0.228
IFN-β (pg/mL)	30.0 ± 11.1	–	30.4 ± 16.3	32.1 ± 17.7	0.459
IFN-γ (pg/mL)	22.1 ± 39.7	3.15 ± 5.92	12.4 ± 10.9	13.6 ± 14.3	0.279
IL-2 (pg/mL)	–	–	7.39 ± 3.06	8.68 ± 4.96	0.240
IL-6R (pg/mL)	3454 ± 1340	3733 ± 1296	4064 ± 2777	4315 ± 3340	0.793
IL-11 (pg/mL)	3.32 ± 1.41	2.40 ± 0.35	3.90 ± 2.48	3.67 ± 2.17	0.065
IL-12(p40) (pg/mL)	62.8 ± 58.7	23.4 ± 29.7*	24.1 ± 24.5*	27.7 ± 24.0*	**0.006**
IL-12(p70) (pg/mL)	–	–	1.09 ± 0.35	0.97 ± 0.42	0.439
IL-22 (pg/mL)	47.9 ± 147	3.29 ± 6.19	7.98 ± 11.4	5.38 ± 8.25	0.071
IL-26 (pg/mL)	–	–	–	–	–
IL-28A (pg/mL)	–	–	20.3 ± 8.27	17.8 ± 8.89	0.349
IL-29 (pg/mL)	–	–	–	–	–
IL-35 (pg/mL)	–	–	104 ± 84.5	109 ± 147	0.830
MMP1 (pg/mL)	242 ± 385	77.8 ± 87.0	307 ± 470	181 ± 226	0.458
MMP3 (pg/mL)	4991 ± 2876	7885 ± 8224	11015 ± 7815*	6675 ± 5525	**0.025**
Osteocalcin (pg/mL)	1222 ± 610	1165 ± 581	1438 ± 914	1155 ± 1049	0.811
Pentraxin-3 (pg/mL)	955 ± 749	549 ± 218	630 ± 360	839 ± 684	0.302
TNF-R1 (pg/mL)	650 ± 204	599 ± 244	1030 ± 572*	1159 ± 790*†	**0.011**
TNF-R2 (pg/mL)	208 ± 56.4	258 ± 89.8	541 ± 388*	642 ± 601*	**0.003**
TSLP (pg/mL)	59.8 ± 21.3	52.8 ± 29.6	72.8 ± 32.8	62.9 ± 30.2	0.372
Tweak (pg/mL)	174 ± 69.3	158 ± 50.2	221 ± 122	130 ± 76.0¥	**0.013**

Biomarker data is included when levels were detected in a number of samples n ≥ 8. Data show mean ± standard deviation. *P*-value was calculated ANCOVA adjusted for age and gender. ‡ *P*-value was calculated with Chi-square. Asterisk (*) denotes statistically significant differences ($p < 0.05$) in relation to normal-weight individuals. † denotes statistically significant differences ($p < 0.05$) in relation to overweight individuals. ¥ denotes statistically significant differences ($p < 0.05$) in relation to obese individuals.
[a] Body composition data were not obtained from all participants included in the study. BMI, body mass index; FM, fat mass; FFM, fat free mass; BAFF, B cell activator factor; CD, cluster of differentiation; Gp, glycoprotein; IFN, interferon; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; TNF-R, tumor necrosis factor receptor; TSLP, Thymic stromal lymphopoietin.

γ (Fig. 3D), IL-2 (Fig. 3E), IL-11 (Fig. 3F), MMP1 (Fig. 3H), Osteocalcin (Fig. 3I) and Pentraxin-3 (Fig. 3J) tended to increase after the first phase of weight loss treatments in the three therapies, with a drift to return to baseline levels at the end of the study in VLCKD and LCD, and in CD30 for BS. This increase was statistically significant after VLCKD in circulating levels of IFN-γ and MMP1, and in BS in CD30, IFN-γ and MMP1. Also, getting to find statistically significant differences between the treatments in the differences between follow-up to baseline in the levels of Osteocalcin, and between endpoint to baseline in the levels of IFN-γ, IFN-β, IL-2 and IL-11, and follow-up to endpoint in the levels of IFN-γ and Osteocalcin (Table 3). In the same way IL-28A (Fig. 3G) increase after the first phase of weight loss treatments in the VLCKD and BS, with a decrease in levels at the end of the follow-up in VLCKD.

3.3. Changes in circulating levels of oxidative stress biomarkers after the weight loss therapies

Oxidative stress markers were evaluated after VLCKD or BS. No statistically significant changes were observed following the weight loss treatments in AOP or 8-OHdG, but a statistically significant increase was observed in MDA in patients following the VLCKD (Table 2). Moreover, an interaction was observed in MDA between both weight loss treatments (Table 2) which was translated into an increase after VLCKD and a decrease after BS respect to baseline. These differences were statistically significant (Table 3).

Importantly, a positive correlation was observed between circulating levels of ketone bodies (β-OHB) at the 2–3 months of the interventions and MDA ($r = 0.56$; $p = 0.001$) (Fig. 4A) and AOP ($r = 0.47$; $p = 0.009$) levels at endpoint (Fig. 4B). Also, ketone bodies at the 2–3 months of intervention were correlated with the changes at 2–3 months with respect to baseline induced by the intervention in MDA ($r = 0.37$; $p = 0.042$) and AOP ($r = 0.40$; $p = 0.029$), and the changes at 4–6 months with respect to at baseline in MDA ($r = 0.72$; $p = <0.001$) and AOP ($r = 0.37$; $p = 0.047$).

4. Discussion

The current study demonstrated that when patients with obesity underwent energy-restricted or surgical weight loss strategies, inflammatory and oxidative stress biomarkers are improved. It was reached by performing a multiplexing assay that included 27 cytokines together with the analysis of lipid peroxidation markers in plasma. Relevantly, the effect was more notable in patients following the VLCKD than the LCD or BS. As far as we know, this is the first study that evaluated the time-course of cytokines after a VLCKD as compared with a standard LCD and BS. The observed results support the need for additional long-size, longitudinal studies to elucidate the immunomodulatory effect of nutritional ketosis induced by a VLCKD in the management of obesity as a strategy to improve innate-inmmunity and to prevent infections and carcinogenesis risk in patients with obesity.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

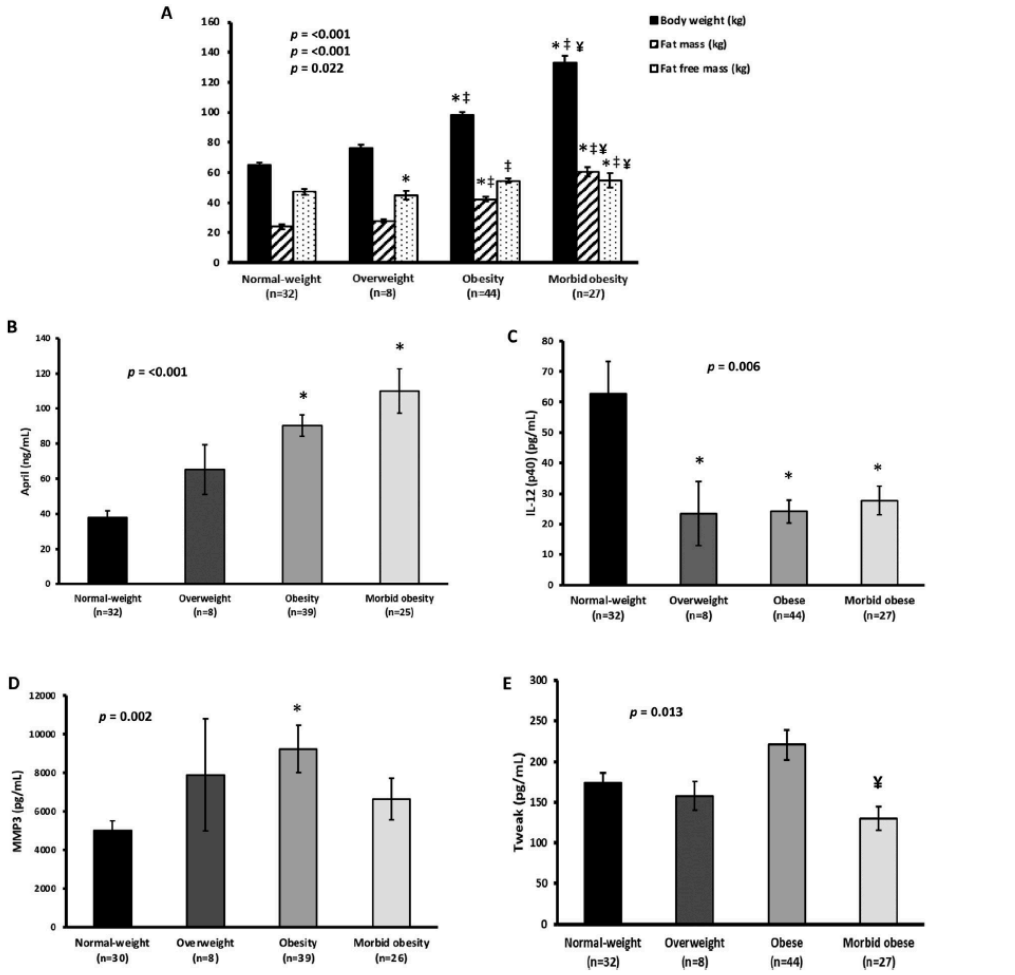


Fig. 1. Comparison of body composition and circulating levels of cytokines according to adiposity at baseline. A) Differences in body weight, fat mass and fat free mass between normal-weight, overweight, obese and morbid obese individuals. B) Differences in April levels between normal-weight, overweight, obese and morbid obese individuals. C) Differences in interkeukin-12(p40) (IL-12(p40)) levels between normal-weight, overweight, obese and morbid obese individuals. D) Differences in matrix metalloproteinase-3 (MMP3) levels between normal-weight, overweight, obese and morbid obese individuals. E) Differences in Tweak levels between normal-weight, overweight, obese and morbid obese individuals. The data are presented as the mean (SE). *P*-value is calculated with ANOVA or ANCOVA adjusted for age and gender, as applicable. Asterisk (*) denotes statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to normal-weight individuals. ‡ denotes statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to overweight individuals. ¥ denotes statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to obesity individuals.

Recent research has proposed that excess fat mass, mainly visceral fat, secretes a type of molecule called cytokines that contribute to the inflammatory process [10,42,43]. These pro-inflammatory molecules can decrease with dietary weight loss treatments in people with obesity [14]. In this way, by reducing the inflammatory state, the risk factors associated with obesity can decrease and even be eliminated. In recent years, certain components of diet have been shown to change in cytokine and oxidative stress levels, exerting an anti-inflammatory effect in the context of what is now known as immunonutrition [28–30]. Among the effect of dietary factors, nutritional ketosis has emerged as a modulator of immune system since ketone bodies acts as signaling effectors [32,44]. In the current study we found a relevant effect of weight loss therapies on several cytokines and oxidative stress markers. Despite the comparable weight loss induced by BS and VLCKD, a more relevant effect was observed in patients who follow the VLCKD, suggesting that ketone bodies production induced by this ketogenic diet could be the main factor associated with the improvement in the inflammation observed. A prove of this hypothesis was that the effect of the VLCKD treatment was more evident in the acute phase of the nutritional intervention where patients showed next to 3 mM of circulating ketone bodies. The current results were reached by performing a multiplexing assay which allows to analyze immunity responses in human diseases in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 2
Changes induced by the weight loss treatments in cytokines and oxidative stress biomarkers.

Biomarkers	VLCKD (n = 20)			LCD (n = 20)			BS (n = 39)			ANOVA *p*-value		
	Baseline (0 months)	Endpoint (2–3 months)	Follow-up (4–6 months)	Baseline (0 months)	Endpoint (2–3 months)	Follow-up (4–6 months)	Baseline (0 months)	Endpoint (2–3 months)	Follow-up (4–6 months)	Time	Study	Time* Study
April (n = 17; n = 16; n = 26)	89.3 ± 35.1	93.8 ± 29.7	96.7 ± 35.6	88.7 ± 31.5	90.7 ± 31110	90.6 ± 34.6	104.5 ± 66.8	123.4 ± 79.4	129.2 ± 77.5†*	**0.039**	0.136	0.171
BAFF (n = 17; n = 16; n = 26)	3913 ± 1472	3815 ± 1435	3552 ± 1402‡*	4299 ± 1327	3980 ± 1228	4117 ± 1995	4025 ± 2284	4000 ± 1981	4084 ± 2231	0.511	0.779	0.755
CD163 (n = 17; n = 16; n = 26)	51.1 ± 21.7	43.4 ± 22.4	40.8 ± 19.9‡*	68.3 ± 30.5	57.8 ± 24.6‡	56.2 ± 26.4‡*	62.2 ± 49.0	58.2 ± 39.6	62.0 ± 35.4	**0.047**	0.200	0.328
CD30 (n = 17; n = 16; n = 26)	191 ± 88.6	238 ± 185	239 ± 240	178 ± 80.9	204 ± 120	166 ± 59.8	198 ± 132	290 ± 274	284 ± 154†*	**0.018**	0.266	0.056
Chitanase (n = 17; n = 16; n = 26)	6186 ± 5432	4767 ± 1942	4415 ± 2230	6084 ± 3563	5452 ± 2757	5310 ± 2969	6591 ± 5167	6940 ± 4811	6590 ± 3660	0.125	0.290	0.388
Gp130 (n = 15; n = 16; n = 26)	21.8 ± 59.1	26.4 ± 14.2	24.0 ± 8.2	23.7 ± 7.1	22.6 ± 7.1	21.3 ± 6.6	20.3 ± 13.0	20.8 ± 9.9	21.9 ± 9.1	0.706	0.479	0.276
IFN-α2 (n = 9; n = 0 -; n = 8)	15.07 ± 4.32	26.67 ± 19.66	24.90 ± 22.36	–	–	–	15.33 ± 5.62	15.30 ± 2.19	16.40 ± 4.35	–	–	–
IFN-β (n = 11; n = 13; n = 22)	33.60 ± 16.20	48.80 ± 24.20†	44.28 ± 17.86†*	30.40 ± 16.30	31.04 ± 19.60	29.11 ± 15.90	35.14 ± 17.53	37.57 ± 21.98	41.43 ± 24.01	**0.017**	0.250	0.099
IFN-γ (n = 12; n = 10; n = 16)	16.50 ± 10.53	38.78 ± 21.39†	20.35 ± 13.35†*	14.60 ± 6.80	19.32 ± 5.71	16.56 ± 8.68	21.79 ± 11.22	26.72 ± 15.03†	30.10 ± 16.44†*	**0.006**	0.122	0.241
IL-2 (n = 14; n = 13; n = 19)	7.13 ± 3.34	22.65 ± 13.72†	11.73 ± 7.68††*	6.85 ± 2.14	13.19 ± 15.46	8.48 ± 2.76†*	9.08 ± 3.96	11.76 ± 4.95†	12.27 ± 5.04†*	**<0.001**	0.090	0.283
IL-6R (n = 17; n = 16; n = 26)	4436 ± 3801	4973 ± 3059	3817 ± 1158	4181 ± 1237	4215 ± 1045	3895 ± 1230	3993 ± 3316	3840 ± 1734	3738 ± 1535	0.282	0.575	0.282
IL-11 (n = 17; n = 16; n = 23)	3.32 ± 1.75	5.59 ± 3.71†	4.39 ± 1.99††*	2.97 ± 0.94	4.00 ± 1.62†	3.50 ± 1.36†*	4.34 ± 3.32	4.74 ± 2.75	6.05 ± 5.58	**0.004**	0.209	0.412
IL-12(p40) (n = 12; n = 10; n = 21)	30.42 ± 28.59	50.14 ± 36.15†	40.51 ± 35.51†*	25.25 ± 20.08	32.64 ± 20.81	29.84 ± 19.41	40.26 ± 20.31	54.16 ± 32.46†	50.95 ± 29.57†*	**0.011**	0.142	0.711
IL-12(p70) (n = 10; n = 6; n = 6)	1.19 ± 0.40	1.41 ± 0.64	1.16 ± 0.35	0.91 ± 0.13	0.97 ± 0.44	1.05 ± 0.30	0.96 ± 0.28	0.99 ± 0.42	0.96 ± 0.29	0.534	0.173	0.470
IL-22 (n = 6; n = 7; n = 7)	15.61 ± 2.90	22.84 ± 17.57	18.41 ± 5.34	16.40 ± 6.76	18.66 ± 8.95	19.29 ± 10.72	16.49 ± 9.26	19.18 ± 8.89	18.64 ± 10.68	0.071	0.980	0.970
IL-26 (n = 16; n = 15; n = 20)	27.70 ± 18.66	29.57 ± 17.93	27.57 ± 18.18	25.69 ± 16.69	27.67 ± 18.29	25.34 ± 16.88	30.07 ± 14.13	36.38 ± 20.15	36.67 ± 24.92	0.376	0.340	0.344
IL-28A (n = 13; n = 10; n = 14)	18.37 ± 7.30	23.05 ± 11.77	21.11 ± 10.16	20.28 ± 9.19	19.82 ± 7.34	21.76 ± 8.44	20.02 ± 8.50	22.62 ± 10.01	25.10 ± 9.54†*	**0.017**	0.805	0.487
IL-29 (n = 14; n = 11; n = 3)	39.69 ± 28.30	57.42 ± 50.38	43.24 ± 23.49	46.18 ± 24.26	57.36 ± 30.89	60.76 ± 34.08†*	–	–	–	–	–	–
IL-35 (n = 10; n = 9; n = 11)	91.32 ± 69.98	145.60 ± 123.68	115.81 ± 99.27	97.99 ± 103.38	117.82 ± 164.75	132.20 ± 188.70	133.26 ± 148.12	150.38 ± 135.76	139.46 ± 105.44	0.099	0.879	0.655
MMP1 (n = 15; n = 13; n = 13)	318 ± 320	611 ± 569‡	415 ± 357*	194 ± 75.15	261 ± 111	249 ± 117	268 ± 222	417 ± 245‡	407 ± 257†*	**<0.001**	0.120	0.289
MMP3 (n = 16; n = 16; n = 25)	12745 ± 10139	10377 ± 5408	8528 ± 3679	11539 ± 7393	11654 ± 8152	11648 ± 7894	6766 ± 5652	6859 ± 3631	6684 ± 3985	0.090	**0.017**	0.074
Osteocalcin (n = 17; n = 16; n = 25)	1515 ± 959	1843 ± 1459	1775 ± 1236	1477 ± 1480	1661 ± 1586	1556 ± 1165	1323 ± 1089	1751 ± 1146‡	2183 ± 1299†‡*	**<0.001**	0.880	**0.006**
Pentraxin-3 (n = 17; n = 16; n = 26)	627 ± 426	1567 ± 1617‡	922 ± 593‡*	488 ± 185	750 ± 481‡	631 ± 313‡*	904 ± 662	1239 ± 751‡	1430 ± 1155‡*	**<0.001**	**0.029**	0.123
TNF-R1(n = 17; n = 16; n = 26)	890 ± 506	965 ± 641	755 ± 465	973 ± 650	911 ± 559	844 ± 405	1208 ± 809	1245 ± 701	1242 ± 667	0.244	0.078	0.432
TNF-R2 (n = 17; n = 16; n = 26)	539 ± 423	656 ± 511	438 ± 309	538 ± 323	541 ± 360	475 ± 314	655 ± 627	752 ± 563	710 ± 494	0.513	0.280	0.433
TSLP (n = 17; n = 16; n = 25)	77.42 ± 36.72	96.24 ± 44.39	76.59 ± 26.12†*	69.40 ± 31.94	75.59 ± 30.53	73.93 ± 37.24	61.95 ± 30.21	68.59 ± 32.20	72.84 ± 39.56	0.155	0.275	0.334
Tweak (n = 17; n = 16; n = 26)	214 ± 132	265 ± 148	236 ± 140	177 ± 102	225 ± 124	194 ± 89.1	160 ± 83.41	183 ± 100	200 ± 100†*	**0.008**	0.210	0.556
MDA (n = 19; n = 0; n = 12)	0.68 ± 0.08	0.70 ± 0.08	0.75 ± 0.11†*	–	–	–	0.70 ± 0.15	0.63 ± 0.07	0.64 ± 0.12	0.754	0.101	**0.003**
AOP (n = 19; n = 0; n = 12)	0.53 ± 0.21	0.59 ± 0.24	0.52 ± 0.12	–	–	–	0.38 ± 0.14	0.38 ± 0.18	0.33 ± 0.09	0.381	**0.001**	0.604
8-OHdG (n = 18; n = 0; n = 12)	1.89 ± 0.34	1.88 ± 0.87	2.06 ± 0.63	–	–	–	2.04 ± 0.49	2.10 ± 0.73	2.10 ± 0.58	0.332	0.495	0.627

Data represent mean ± standard deviation. *Statistically significant ($p < 0.05$) changes across time evaluated by a repeated-measures ANOVA within each weight loss treatment. ‡Statistically significant ($p < 0.05$) differences respect to baseline (0 months) evaluated by Student's *t*-test within each weight loss treatment. †Statistically significant ($p < 0.05$) differences respect to endpoint (2–3 months) evaluated by Student's *t*-test within each weight loss treatment. All biomarkers are measured in pg/mL except April, CD163, Gp130 and 8-OHdG that are in ng/mL and MDA, AOP that are in mM. VLCK, very-low-calorie ketogenic diet; LCD, low-calorie diet; BS, bariatric surgery; BAFF, B cell activator factor; CD, cluster of differentiation; Gp, glycoprotein; IFN, interferon; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; TNF-R, tumor necrosis factor receptor; TSLP, Thymic stromal lymphopoietin; MDA, malondialdehyde; AOP, total antioxidative power; 8-OHdG, 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine.

Table 3
Comparison of differences in cytokines levels and oxidative stress biomarkers during time course weight loss between very-low-calorie ketogenic diet, low-calorie diet and bariatric surgery.

Biomarkers	Difference Endpoint to Baseline			*p*-value Study	Difference Follow-up to Baseline			*p*-value Study	Difference Follow-up to Endpoint			*p*-value Study
	VLCKD	LCD	BS		VLCKD	LCD	BS		VLCKD	LCD	BS	
April	4.47 ± 31.54	1.96 ± 13.32	13.78 ± 57.25	0.184	4.35 ± 24.17	2.86 ± 18.35	24.67 ± 55.59[‡]	**0.040**	2.89 ± 28.92	−0.04 ± 18.10	2.17 ± 41.50	0.961
BAFF	−98.20 ± 900	−319 ± 616	−88.79 ± 1211	0.697	−853 ± 1635	−201 ± 1072	38.72 ± 2479	0.381	−263 ± 759	137 ± 1091	−33.50 ± 2414	0.669
CD163	−7.57 ± 23.41	−10.46 ± 17.46	−4.62 ± 27.95	0.768	−16.15 ± 25.67	−8.22 ± 14.96	0.14 ± 36.79	0.076	−2.64 ± 17.85	−1.62 ± 8.83	5.67 ± 26.77	0.717
CD30	46.92 ± 135	25.50 ± 105	73.92 ± 217	0.609	17.30 ± 184	−10.45 ± 51.84	86.22 ± 116	0.128	0.76 ± 130	−37.48 ± 90.74	12.81 ± 231	0.868
Chitanase	−1419 ± 5981	−631 ± 2211	175 ± 2829	**0.047**	−2094 ± 5722	−685 ± 1689	−113 ± 3465	0.055	−352 ± 2236	−142 ± 2191	−207 ± 3672	0.709
Gp130	4.55 ± 15.34	−1.07 ± 4.99	−0.67 ± 11.08	0.170	0.69 ± 6.76	−1.11 ± 5.67	0.66 ± 12.24	0.546	−2.39 ± 16.50	−1.31 ± 4.94	4.33 ± 19.75	0.636
IFN-α2	11.60 ± 17.77	1.84 ± 3.34	0.28 ± 5.78	0.067	7.51 ± 19.25	–	1.07 ± 3.85	0.434	−2.30 ± 7.23	–	−1.32 ± 8.39	0.488
IFN-β	15.90 ± 18.79	0.65 ± 11.10[†]	1.00 ± 13.63[†]	**0.006***	9.87 ± 10.23	0.47 ± 7.97	6.58 ± 16.77	0.184	−4.83 ± 12.78	−1.94 ± 8.53	5.09 ± 19.63	0.572
IFN-γ	22.28 ± 19.74	4.72 ± 7.76[†]	4.03 ± 7.32[†]	**<0.001***	4.94 ± 10.87	1.75 ± 3.37	10.01 ± 13.99	0.655	−22.30 ± 21.82	−2.43 ± 7.76[†]	3.11 ± 10.48[†]	**<0.001***
IL-2	15.53 ± 13.53	6.34 ± 15.37	2.02 ± 4.63[†]	**0.005***	4.37 ± 6.06	1.79 ± 1.89	3.30 ± 4.56	0.334	−14.09 ± 18.01	−4.71 ± 15.69	0.75 ± 5.44	0.067
IL-6R	538 ± 4908	34.40 ± 835	−274 ± 2425	0.213	−593 ± 3439	−122 ± 824	−361 ± 2608	0.810	−1156 ± 3681	−320 ± 851	544 ± 2863	0.325
IL-11	2.28 ± 2.98	1.03 ± 1.05	0.39 ± 1.73[†]	**0.027**	1.12 ± 1.43	0.64 ± 0.93	1.71 ± 4.01	0.761	−1.20 ± 2.30	−0.50 ± 1.00	1.12 ± 3.99	0.130
IL-12p40	19.72 ± 28.97	7.39 ± 14.69	11.75 ± 25.88	0.263	10.01 ± 21.50	4.84 ± 7.63	10.98 ± 20.20	0.772	−9.06 ± 15.46	−1.85 ± 14.03	−0.25 ± 27.82	0.423
IL-12p70	0.22 ± 0.48	−0.06 ± 0.47	0.03 ± 0.26	0.352	−0.004 ± 0.32	0.07 ± 0.29	0.005 ± 0.21	0.884	−0.25 ± 0.68	0.07 ± 0.16	−0.03 ± 0.21	0.548
IL-22	3.16 ± 17.72	2.26 ± 8.32	2.39 ± 4.36	0.923	3.86 ± 4.12	2.60 ± 6.54	−2.44 ± 13.80	0.522	−7.16 ± 13.67	0.62 ± 6.09	12.68 ± 37.52	0.332
IL-26	1.87 ± 6.50	1.97 ± 6.00	4.61 ± 13.25	0.256	0.96 ± 9.83	−0.44 ± 3.41	6.24 ± 23.97	0.188	−1.97 ± 7.54	−2.32 ± 5.27	0.97 ± 12.22	0.779
IL-28A	4.68 ± 8.65	−0.46 ± 6.41	3.30 ± 7.90	0.360	3.08 ± 6.98	0.61 ± 7.24	5.95 ± 8.17	0.533	−1.93 ± 8.42	1.94 ± 6.01	3.26 ± 7.35	0.255
IL-29	17.73 ± 49.27	11.18 ± 16.89	−8.13 ± 21.73	0.612	1.89 ± 19.67	16.42 ± 17.85	−2.39 ± 13.53[†]	**0.047**	−17.30 ± 44.56	3.81 ± 21.00	5.28 ± 31.68	0.380
IL-35	54.28 ± 75.40	19.83 ± 69.62	15.22 ± 54.87	0.283	24.84 ± 41.54	34.40 ± 81.94	6.20 ± 67.79	0.912	−29.79 ± 52.14	14.38 ± 31.24	−10.92 ± 36.88	0.094
MMP1	293 ± 440	66.24 ± 99.35	135 ± 199	0.139	−41.83 ± 465	49.78 ± 94.39	139 ± 172	0.430	−196 ± 351	−11.36 ± 115	−3.45 ± 198	0.091
MMP3	−2368 ± 9328	115 ± 4452	111 ± 4234	0.140	−3574 ± 7641	269 ± 2774[†]	−81.37 ± 5065	**0.020**	−1849 ± 2929	−5.99 ± 4236[†]	233 ± 3552[†]	0.285
Osteocalcin	328 ± 912	184 ± 394	384 ± 906	0.890	303 ± 809	92.38 ± 554[†]	864 ± 833[†]	**0.006**	−67.98 ± 1082	−105 ± 550	749 ± 1478	**0.030**
Pentraxin-3	939 ± 1568	263 ± 347	300 ± 628	0.069	329 ± 596	162 ± 195	500 ± 767	0.680	−645 ± 1462	−120 ± 281	246 ± 873	0.080
TNF-R1	75.47 ± 629	−62.87 ± 200	−3.28 ± 513	0.579	−189 ± 466	−127 ± 332	34.74 ± 732	**0.019**	−210 ± 608	−66.75 ± 242	11.55 ± 493	0.340
TNF-R2	118 ± 595	2.60 ± 126	57.37 ± 403	0.666	−112 ± 417	−58.18 ± 146	55.34 ± 487	0.226	−218 ± 421	−65.75 ± 125	−18.05 ± 389	0.242
TSLP	18.82 ± 42.36	6.20 ± 20.03	6.35 ± 21.33	0.140	1.52 ± 26.52	4.52 ± 17.79	10.89 ± 28.27	0.876	−19.65 ± 34.03	−1.67 ± 23.04	5.06 ± 30.88	0.059
Tweak	51.24 ± 103	47.91 ± 90.49	19.60 ± 75.25	0.472	7.79 ± 78.78	14.73 ± 33.92	39.80 ± 84.52	0.414	−29.69 ± 67.93	−30.61 ± 79.66	28.41 ± 87.52	0.083
MDA	0.02 ± 0.08	–	−0.07 ± 0.14	**0.031**	0.07 ± 0.12	–	−0.06 ± 0.10	**0.003**	0.05 ± 0.12	–	0.007 ± 0.10	**0.031**
AOP	0.06 ± 0.24	–	0.004 ± 0.12	0.435	−0.01 ± 0.23	–	−0.05 ± 0.10	0.604	−0.08 ± 0.21	–	−0.05 ± 0.13	0.759
8-OHdG	−0.02 ± 0.80	–	0.05 ± 0.40	0.778	0.17 ± 0.72	–	0.05 ± 0.33	0.627	0.18 ± 0.70	–	0.0008 ± 0.40	0.422

Data represent mean ± standard deviation. *P*-value is calculated with ANCOVA adjusted by age and baseline levels of cytokines. * Statistically significant ($p < 0.05$) differences evaluated by ANCOVA adjusted by baseline body mass index (BMI) and body weight loss. † Statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) and ‡ statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to bariatric surgery (BS). Baseline (0 months), Endpoint (2–3 months) and Follow-up (4–6 months). All biomarkers are measured in pg/mL except April, CD163, Gp130 and 8-OHdG that are in ng/mL and MDA, AOP that are in mM. LCD, low-calorie diet; BAFF, B cell activator factor; CD, cluster of differentiation; Gp, glycoprotein; IFN, interferon; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; TNF-R, tumor necrosis factor receptor; TSLP, Thymic stromal lymphopoietin; MDA, malondialdehyde; AOP, total antioxidative power; 8-OHdG, 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

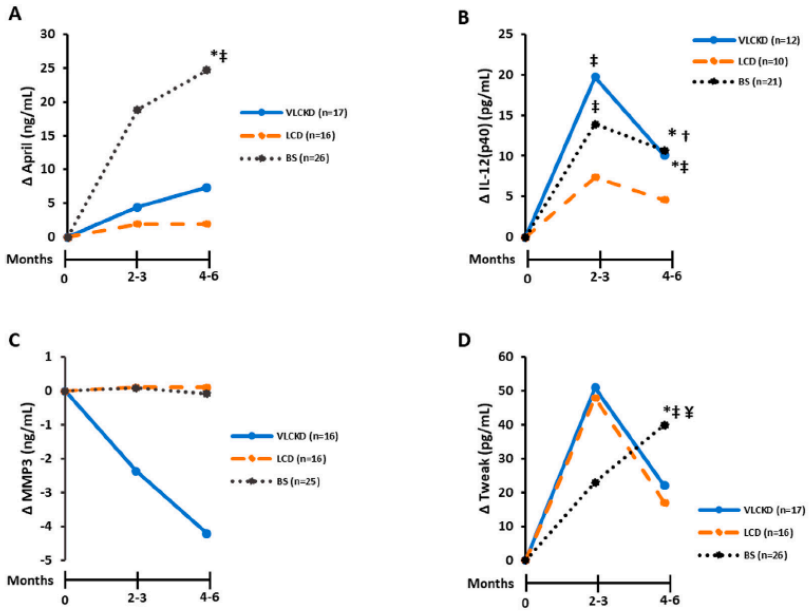


Fig. 2. Changes in circulating levels of cytokines during very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD), a low-calorie diet (LCD) or bariatric surgery (BS). A) Changes compared to baseline in April during the weight loss treatments. B) Changes compared to baseline in circulating interleukin-12(p40) (IL-12(p40)) levels during the weight loss treatments. C) Changes compared to baseline in circulating metalloproteinase-3 (MMP3) levels during the weight loss treatments. D) Changes compared to baseline in circulating Tweak levels during the weight loss treatments. Data show differences compared to baseline during the time-course of the intervention. Statistically significant differences were evaluated with repeated-measures ANCOVA adjusted for age and baseline levels of cytokines. * Statistically significant ($p < 0.05$) differences over the duration of the nutritional program (from 0 to 4–6 months), ‡ statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to baseline, † statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to 2–3 months and ¥ statistically significant ($p < 0.05$) differences between treatments compared to baseline.

a comprehensive way [45]. Particularly, levels of IL-11, IL-12, IL-2, INF-γ, INF-β, Pentraxin-3 or MMP1 changed after VLCKD. Most of them showed differential levels between obesity and normal-weight. After weight loss, levels of these cytokines were restored to levels similar to that observed in normal-weight patients, suggesting an improvement in innate-immunity and inflammatory responses as it was previously observed for example in IFN-γ which increases after weight loss and exercise in obese individuals [46] or Pentraxin-3 which represents a powerful biomarker of inflammatory status inversely associated with BMI and increase after chronic exercise [47,48]. Also, previous studies have shown increased levels of MMP1 with obesity [49].

On the other hand, patients underwent BS showed an increase in April, Tweak, osteocalcin and IL-28A. All of them are proinflammatory factors that orchestrates inflammation, fibrosis and tissue remodelling such as Tweak [50,51], or are involved in carcinogenesis such as April [52]. By contrast, osteocalcin [53] and IL-28A [54] were proposed to have beneficial metabolic and anti-inflammatory properties. These results agree with a potential low-grade metabolic stress induced by BS in the first phase of the intervention as it was previous proposed [24,25,55–58] that is improved in the long-term by the increase in beneficial metabolic factors [59].

Obesity is associated with a disturbed inflammatory and oxidative status, mainly promoted by a dysfunctional adipose tissue that secretes inflammatory proteins and promote the production of reactive oxygen species (ROS) by disturbances in mitochondria and endothelium reticulum [60]. This status was proposed to be the main mechanistic link of obesity and its comorbidities [61]. It was observed that after weight loss treatments, the inflammatory and oxidative status in patients with obesity improved [14,62]. In this regard, it should be expected to found improvements in oxidative stress biomarkers in association with body weight states. Surprisingly, in this study, an increase in lipid peroxide biomarker was observed during the time-course of the VLCKD while a decrease respect to baseline was observed after BS. Moreover, levels of MDA but also AOP at the follow-up of the interventions correlated with circulating levels of β-OHB induced during the acute phase of weight loss treatments. These results could be counterintuitive, however previous studies have evidenced that low-carbohydrate diet in humans enhanced ROS defence capacity by increased oxidative metabolism [63]. Moreover, interventions such as caloric restriction, glucose restriction or moderate physical activity enhanced mitochondrial activity with a concomitant increase in ROS production that promote and adaptive response, termed mitohormesis, increasing antioxidant defences and then improving metabolic health and lifespan [64]. In this study we were unable to detect a statistically significant increase in AOP, probably due to the small sample size, even though, the positive correlation with circulating ketone bodies could demonstrate the beneficial effect of the nutritional ketosis induced by the VLCKD on antioxidant defences.

Importantly, on inflammatory markers and oxidative stress biomarkers, the effect was mainly observed after VLCKD, while BS showed a slow effect mainly in the more acute phase (3 months after surgical). It suggests that, despite the important weight loss induced by VLCKD or BS, the metabolic status induced by both interventions in a short-term is different and it is probable that the nutritional ketosis induced during de acute phase of VLCKD could protect patients with obesity from other diseases such as type 2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

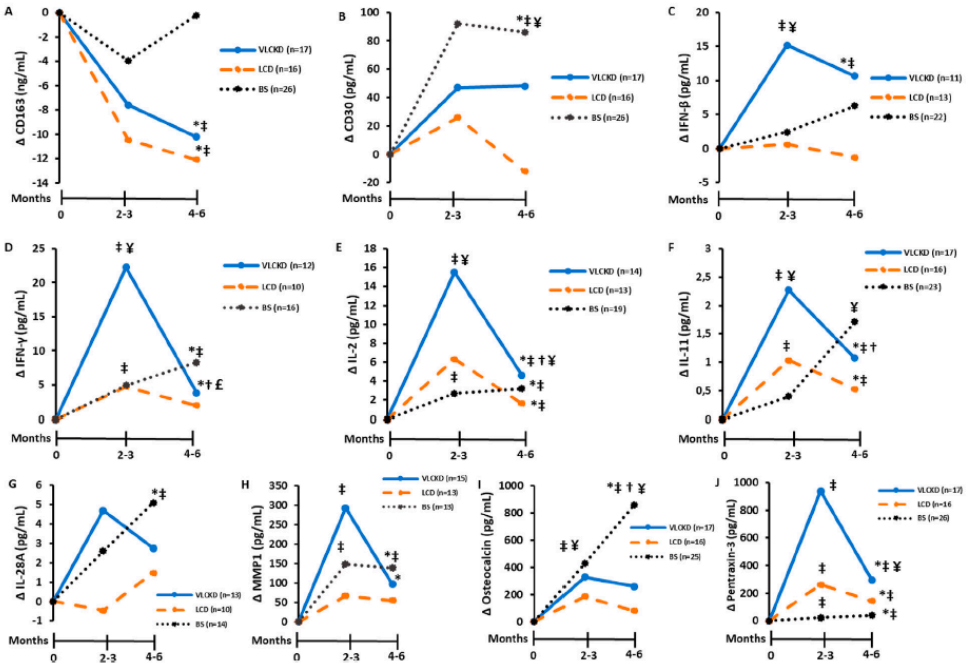


Fig. 3. Changes in circulating levels of cytokines during very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD), a low-calorie diet (LCD) or bariatric surgery (BS). A) Changes compared to baseline in cluster of differentiation 163 (CD163) during the weight loss treatments. B) Changes compared to baseline in cluster of differentiation 30 (CD30) during the weight loss treatments. C) Changes compared to baseline in circulating interferon-β (IFN-β) levels during the weight loss treatments. D) Changes compared to baseline in inferferon-γ (IFN-γ) during the weight loss treatments. E) Changes compared to baseline in circulating interleukin-2 (IL-2) levels during the weight loss treatments. F) Changes compared to baseline in circulating interleukin-11 (IL-11) levels during the weight loss treatments. G) Changes compared to baseline in circulating interleukin-28A (IL-28A) levels during the weight loss treatments. H) Changes compared to baseline in metalloproteinase-1 (MMP1) during the weight loss treatments. I) Changes compared to baseline in circulating Osteocalcin levels during the weight loss treatments. J) Changes compared to baseline in circulating Pentraxin-3 levels during the weight loss treatments. Data show differences compared to baseline during the time-course of the intervention. Statistically significant differences were evaluated with repeated-measures ANCOVA adjusted for age and baseline levels of cytokines. *Statistically significant ($p < 0.05$) differences over the duration of the nutritional program (from 0 to 4–6 months), ‡ statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to baseline, † statistically significant ($p < 0.05$) differences in relation to 2–3 months. ¥ statistically significant ($p < 0.05$) differences between treatments compared to baseline and £ statistically significant ($p < 0.05$) differences between treatments compared to endpoint.

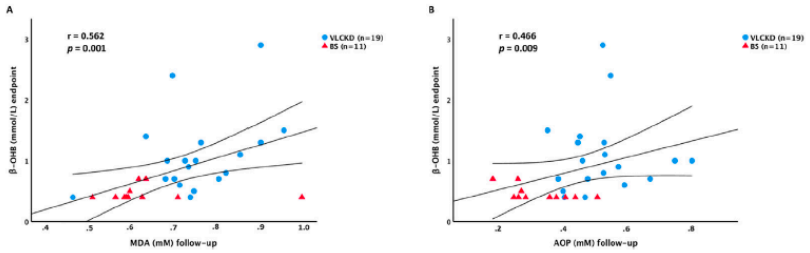


Fig. 4. Association between circulating levels of ketone bodies at the 2–3 months of the interventions and oxidative stress biomarkers at follow-up. Scatterplot representing the association between β-hydroxybutyrate (β-OHB) circulating levels at the 2–3 months and (A) malondialdehyde (MDA) levels at follow-up and (B) total antioxidative power (AOP) levels at follow-up. The center line represents the linear regression trendline. The lines above and below the center line represent the upper and lower bounds of the 95% confidence interval around the trendline. r, correlation coefficient evaluated by the Rho Spearman test; *p*, *p*-value.

diabetes [65], cardiovascular disease [66], cancer [67–70] and the newly emerged infection COVID-19 [55]. In line with this proposal, it was previously hypothesized that a VLCKD could represent an elective therapy to counteract inflammation-related dermatological diseases such as psoriasis, which shows an important inflammatory component [71]. Moreover, beneficial effect on inflammation associated to obesity was previously observed even after a short period of VLCKD follow-up [72].

The small sample size could be a limitation in this study. However, patients were evaluated in three points during a longitudinal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

procedure which allowed to carry out a paired analysis considering each patient as his own control. This approach increased the statistical power of the study. In addition, differences in the inflammatory and oxidative stress parameters were detected after a short clinical course, such as 2–3 months in the more acute phases of the weight loss treatments, which reinforce the findings. On the other hand, the difference in the number of males and females could alter the results, especially from a hormonal point of view and it could be considered other limitation of this study. However, the number of women included in this study was higher than men particularly in VLCKD and BS groups. It suggests that the results can be comparable between both weight loss treatments. Even thought, it highlights the need to perform further longitudinal studies with a more homogeneous gender distribution to explore the potential effect of hormonal status on this topic. Other limitation of this study could be that the three groups start from different baseline BMI. It could suggest that the results are not independent of simple weight loss, and one could not conclude that the difference is related to nutritional ketosis. However, the changes in BMI induced by the VLCKD (−12.4% of BMI) and BS (−14.0% of BMI) during the most acute phase of the interventions are comparable. The most relevant difference between VLCKD and BS is focused on the nutritional ketosis induced during the most acute phase of the VLCKD, but not after BS. At the end of the interventions, the induced body weight loss was higher after BS (35% of body weight loss) than after VLCKD (20% of body weight loss). With this difference in the induced body weight loss, higher effect on cytokine levels would be expected after BS than after VLCKD. As this was not the case, the results reinforce that nutritional ketosis could induce an anti-inflammatory and antioxidative effect synergistically with body weight loss. Moreover, when differences between groups were further evaluated after adjusting for baseline BMI and weight loss, the statistical significance remained in relevant cytokines of innate immune system such as INF-γ, INF-β and IL2.

In conclusion, this study demonstrates differential effects of weight lowering therapeutic approaches on remodelling the inflammatory and oxidative status of patients with obesity, being a VLCKD the most effective, while patients that underwent BS were in an acute metabolic stress status during the first three months. Differences between VLCKD and BS could be explained by the nutritional ketosis induced during the ketogenic diet, besides of the effect of weight loss. Further longitudinal studies are needed to demonstrate the effect of nutritional ketosis or therapies that induce an increase in ketone bodies of patients with obesity to improve the immune function and oxidative stress status and counteract the risk of obesity-related diseases such as infections, cancer and ageing.

Funding statement

This work was supported by the PronoKal Group® and grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Subdireccion General de Evaluacion y Fomento de la Investigacion; European Regional Development Fund (FEDER) (PI20/00650, PI20/00628 and CP17/00088 research projects and CIBERobn) and by Xunta de Galicia-GAIN (IN607B2020/09). Ana B Crujeiras is funded by a research contract "Miguel Servet" (CP17/00088) from the ISCIII, co-financed by FEDER. PML is funded by a predoctoral grant from Xunta de Galicia (IN606-2020/013). The funders were not involved in the study design or interpretation of the results.

Author contributions

PML, IS and AGI, performed experiments and analysed data; PML and ABC wrote the manuscript; IS and DG-A, MAZ, IA, AIC, JB performed the recruitment and following of the patients; MPP, FJT and JAM contributed to the interpretation of data and discussion; FFC and ABC obtained funding, designed and coordinated research. FFC and ABC are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and accuracy of the data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest

D. G-A., A.I.C., A.B.C. and F.F.C. received advisory board fees and/or research grants from Pronokal Protein Supplies, Spain. I.S. is the Medical Director of Pronokal, Spain.

Acknowledgments

The authors thank all participants in this study and the research group involved in the project, as well as the individuals who performed the field work, such as the technician Jesus Iglesias and the Data Manager Maribel Rendo.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.05.007.

References

[1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) NRFC. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet (London, England) 2017;390:2627–42.
[2] Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, McDonnell ME, Murad MH, Pagotto U, et al. Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 2015;100:342–62.
[3] Bray GA, Heisel WE, Afshin A, Jensen MD, Dietz WH, Long M, et al. The science of obesity management: an endocrine society scientific statement. Endocr Rev 2018;39:79–132.
[4] Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body fatness and cancer–viewpoint of the IARC working group. N Engl J Med 2016;375:794–8.
[5] Crujeiras AB, Cabia B, Carreira MC, Amil M, Cueva J, Andrade S, et al. Secreted factors derived from obese visceral adipose tissue regulate the expression of breast malignant transformation genes. Int J Obes 2016;40:514–23.
[6] Rubinstein MM, Brown KA, Iyengar NM. Targeting obesity-related dysfunction in hormonally driven cancers. Br J Cancer 2021;125:495–509.
[7] Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. Inflamación y obesidad (Lipoinflamación). Nutr Hosp 2015;31:2352–8.
[8] Dias-Audibert FL, Navarro LC, de Oliveira DN, Delafiori J, Melo CFOR, Guerreiro TM, et al. Combining machine learning and metabolomics to identify weight gain biomarkers. Front Bioeng Biotechnol 2020;8.
[9] Elisia I, Lam V, Cho B, Hay M, Li MY, Kapeluto J, et al. Exploratory examination of inflammation state, immune response and blood cell composition in a human obese cohort to identify potential markers predicting cancer risk. PLoS One 2020;15:e0228633.
[10] Faria AP de, Ritter AMV, Gasparetti CS, Corrêa NB, Brunelli V, Almeida A, et al. A proposed inflammatory score of circulating cytokines/adipokines associated with resistant hypertension, but dependent on obesity parameters. Arq Bras Cardiol 2019;112:383–9.
[11] Yang J, Hu J, Zhu C. Obesity aggravates COVID-19: a systematic review and meta-analysis. J Med Virol 2021;93:257–61.
[12] El-Missiry MA, El-Missiry ZMA, Othman AI. Melatonin is a potential adjuvant to improve clinical outcomes in individuals with obesity and diabetes with coexistence of Covid-19. Eur J Pharmacol 2020;882:173329.
[13] Pugliese G, Liccardi A, Graziadio C, Barrea L, Muscogiuri G, Colao A. Obesity and infectious diseases: pathophysiology and epidemiology of a double pandemic condition. Int J Obes 2022;46:449–65.
[14] Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, Goyenechea E, Larrarte E, Margareto J, et al. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. OMICS A J Integr Biol 2008;12:251–61.
[15] Gomez-Arbelaez D, Bellido D, Castro AI, Ordoñez-Mayan L, Carreira J, Galban C, et al. Body composition changes after very low-calorie-ketogenic diet in obesity evaluated by three standardized methods. J Clin Endocrinol Metab 2016;102:2016–385. jc.
[16] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles , exercise and obesity : skeletal muscle. Nat Rev Endocrinol 2012;8:457–65.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[17] Leal LG, Lopes MA, Batista Jr ML. Physical exercise-induced myokines and muscle-adipose tissue crosstalk: a review of current knowledge and the implications for health and metabolic diseases. Front Physiol 2018;9:1307.
[18] Sajoux I, Lorenzo PM, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Abete I, Castro AI, et al. Effect of a very-low-calorie ketogenic diet on circulating myokine levels compared with the effect of bariatric surgery or a low-calorie diet in patients with obesity. Nutrients 2019;11:2368.
[19] Polito R, Valenzano A, Scarinci A, Villano I, Monda M, Messina A, et al. Very low-calorie ketogenic diet modulates the autonomic nervous system Activity through salivary amylase in obese population subjects. Int J Environ Res Publ Health 2021;18(16).
[20] Castro AI, Gomez-Arbelaez D, Crujeiras AB, Granero R, Aguera Z, Jimenez-Murcia S, et al. Effect of A Very low-calorie ketogenic diet on food and alcohol cravings, physical and sexual activity, sleep disturbances, and quality of life in obese patients. Nutrients 2018;10.
[21] Crujeiras AB, Izquierdo AG, Primo D, Milagro FI, Sajoux I, Jácome A, et al. Epigenetic landscape in blood leukocytes following ketosis and weight loss induced by a very low calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with obesity. Clin Nutr 2021;40:3959–72.
[22] Cava E, Yeat NC, Mittendorfer B. Preserving healthy muscle during weight loss. Adv Nutr 2017;8(3):511–9.
[23] Martínez MC, Meli EF, Candia FP, Filippi F, Vilallonga R, Cordero E, et al. The impact of bariatric surgery on the muscle mass in patients with obesity: 2-year follow-up. Obes Surg 2022;32(3):625–33.
[24] Crujeiras AB, Gomez-Arbelaez D, Zulet MA, Carreira MC, Sajoux I, de Luis D, et al. Plasma FGF21 levels in obese patients undergoing energy-restricted diets or bariatric surgery: a marker of metabolic stress? Int J Obes 2017;41:1570–8.
[25] Nicoletti CF, Pinhel MAS, Diaz-Lagares A, Casanueva FF, Jácome A, Pinhanelli VC, et al. DNA methylation screening after roux-en Y gastric bypass reveals the epigenetic signature stems from genes related to the surgery per se. BMC Med Genom 2019;12(1):72.
[26] Reguero M, Gómez de Cedrón M, Wagner S, Reglero G, Quintela JC, Ramírez de Molina A. Precision nutrition to activate thermogenesis as a complementary approach to target obesity and associated-metabolic-disorders. Cancers 2021;13(4).
[27] Dos Santos Ferreira R, Dos Santos C, Maranhão Mendonça LAB, Espinola Carvalho CM, Franco OL. Immunonutrition effects on coping with COVID-19. Food Funct 2021;12:7637–50.
[28] Ruiz-León AM, Lapuente M, Estruch R, Casas R. Clinical advances in immunonutrition and atherosclerosis: a review. Front Immunol 2019;10.
[29] Bjurlin MA, Smith AB, Huang WC. Impact of immunonutrition on radical cystectomy immunoresponse and outcomes; opportunity for peri-operative optimization. Transl Androl Urol 2018;7:S760–2.
[30] Russell K, Zhang HG, Gillanders LK, Bartlett ASJR, Fisk HL, Calder PC, et al. Preoperative immunonutrition in patients undergoing liver resection: a prospective randomized trial. World J Hepatol 2019;11:305–17.
[31] Wang L, Chen P, Xiao W. β-Hydroxybutyrate as an anti-aging metabolite. Nutrients 2021;13.
[32] Bradshaw PC, Seeds WA, Miller AC, Mahajan VR, Curtis WM. COVID-19: proposing a ketone-based metabolic therapy as a treatment to blunt the cytokine storm. Oxid Med Cell Longev 2020;2020:6401341.
[33] Kolb H, Kempf K, Röhling M, Lenzen-Schulte M, Schloot NC, Martin S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. BMC Med 2021;19:313.
[34] Youm Y-H, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, et al. The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. Nat Med 2015;21:263–9.
[35] de Luis D, Domingo JC, Izaola O, Casanueva FF, Bellido D, Sajoux I. Effect of DHA supplementation in a very low-calorie ketogenic diet in the treatment of obesity: a randomized clinical trial. Endocrine 2016;54:111–22.
[36] Moreno B, Bellido D, Sajoux I, Goday A, Saavedra D, Crujeiras AB, et al. Comparison of a very low-calorie-ketogenic diet with a standard low-calorie diet in the treatment of obesity. Endocrine 2014;47:793–805.
[37] Moreno B, Crujeiras AB, Bellido D, Sajoux I, Casanueva FF. Obesity treatment by very low-calorie-ketogenic diet at two years: reduction in visceral fat and on the burden of disease. Endocrine 2016;54:681–90.
[38] Scientific Opinion on the essential composition of total diet replacements for weight control. EFSA J 2015;13:3957.
[39] Heber D, Greenway FL, Kaplan LM, Livingston E, Salvador J, Still C, et al. Endocrine and nutritional management of the post-bariatric surgery patient: an endocrine society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:4823–43.
[40] Abete I, Goyenechea E, Crujeiras AB, Martínez JA. Inflammatory state and stress condition in weight-lowering Lys109Arg LEPR gene polymorphism carriers. Arch Med Res 2009;40:306–10.
[41] Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Abete I, Martínez JA. Tachyphylaxis effects on postprandial oxidative stress and mitochondrial-related gene expression in overweight subjects after a period of energy restriction. Eur J Nutr 2009;48:341–7.
[42] MacDonald IJ, Liu SC, Huang CC, Kuo SJ, Tsai CH, Tang CH. Associations between adipokines in arthritic disease and implications for obesity. Int J Mol Sci 2019;20.
[43] Di Domenico M, Pinto F, Quagliuolo L, Contaldo M, Settembre G, Romano A, et al. The role of oxidative stress and hormones in controlling obesity. Front Endocrinol 2019;10.
[44] Hirschberger S, Strauß G, Effinger D, Marstaller X, Ferstl A, Müller MB, et al. Very-low-carbohydrate diet enhances human T-cell immunity through immunometabolic reprogramming. EMBO Mol Med 2021;13:e14323.
[45] Bonaroti J, Abdelhamid S, Kar U, Sperry J, Zamora R, Namas RA, et al. The use of multiplexing to identify cytokine and chemokine networks in the immune-inflammatory response to trauma. Antioxidants Redox Signal 2021;35:1393–406.
[46] O'Shea D, Hogan AE. Dysregulation of natural killer cells in obesity. Cancers 2019;11.
[47] Witasp A, Carrero JJ, Michaëlsson K, Ahlström H, Kullberg J, Adamsson V, et al. Inflammatory biomarker pentraxin 3 (PTX3) in relation to obesity, body fat depots and weight loss. Obesity 2014;22:1373–9.
[48] Tunc-Ata M, Turgut G, Mergen-Dalyanoglu M, Turgut S. Examination of levels pentraxin-3, interleukin-6, and C-reactive protein in rat model acute and chronic exercise. J Exerc Rehabil 2017;13:279–83.
[49] Jaoude J, Koh Y. Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. Vasc Health Risk Manag 2016;12:287–95.
[50] Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol 2017;13:217–33.
[51] Altuna-Coy A, Ruiz-Plazas X, Alves-Santiago M, Segarra-Tomás J, Chacón MR. Serum levels of the cytokine TWEAK are associated with metabolic status in patients with prostate cancer and modulate cancer cell lipid metabolism in vitro. Cancers 2021;13.
[52] Andersen BL, Goyal NG, Weiss DM, Westbrook TD, Maddocks KJ, Byrd JC, et al. Cells, cytokines, chemokines, and cancer stress: a biobehavioral study of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer 2018;124:3240–8.
[53] Arrieta F, Martinez-Vaello V, Bengoa N, Rosillo M, de Pablo A, Voguel C, et al. Stress hyperglycemia and osteocalcin in COVID-19 critically ill patients on artificial nutrition. Nutrients 2021;13.
[54] Meng X, Yang D, Yu R, Zhu H. EPSTI1 is involved in IL-28a-mediated inhibition of HCV infection. Mediat Inflamm 2015;2015:716315.
[55] Izquierdo AG, Carreira MC, Boughanem H, Moreno-Navarrete JM, Nicoletti CF, Oliver P, et al. Adipose tissue and blood leukocytes ACE2 DNA methylation in obesity and after weight loss. Eur J Clin Invest 2021:e13685.
[56] Nicoletti CF, Pinhel MAS, Noronha NY, de Oliveira BA, Salgado Junior W, Jácome A, et al. Altered pathways in methylome and transcriptome longitudinal analysis of normal weight and bariatric surgery women. Sci Rep 2020;10:6515.
[57] Nicoletti CF, Nonino CB, de Oliveira BAP, Pinhel MA de S, Mansego ML, Milagro FI, et al. DNA methylation and hydroxymethylation levels in relation to two weight loss strategies: energy-restricted diet or bariatric surgery. Obes Surg 2016:603–11.
[58] Fraszczyk E, Luijten M, Spijkerman AMW, Snieder H, Wackers PFK, Bloks VW, et al. The effects of bariatric surgery on clinical profile, DNA methylation, and ageing in severely obese patients. Clin Epigenet 2020;12(1):14.
[59] Valenzano A, Tartaglia N, Ambrosi A, Tafuri D, Monda M, Messina A, et al. The metabolic rearrangements of bariatric surgery: focus on orexin-A and the adiponectin system. J Clin Med 2020;9.
[60] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Sci 2011;12:3117–32.
[61] Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. Cardiovasc Diabetol 2017;16:120.
[62] Manna P, Jain SK. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. Metab Syndr Relat Disord 2015;13:423–44.
[63] Nazarewicz RR, Ziolkowski W, Vaccaro PS, Ghafourifar P. Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. Rejuvenation Res 2007;10:435–40.
[64] Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. Free Radic Biol Med 2011;51:327–36.
[65] Goday A, Bellido D, Sajoux I, Crujeiras AB, Burguera B, García-Luna PP, et al. Short-term safety, tolerability and efficacy of a very low-calorie-ketogenic diet interventional weight loss program versus hypocaloric diet in patients with type 2 diabetes mellitus. Nutr Diabetes 2016;6:e230.
[66] Sánchez E, Santos MD, Nuñez-Garcia M, Bueno M, Sajoux I, Yeramian A, et al. Randomized clinical trial to evaluate the morphological changes in the adventitial vasa vasorum density and biological markers of endothelial dysfunction in subjects with moderate obesity undergoing a very low-calorie ketogenic diet. Nutrients 2021;14.
[67] Barrea L, Caprio M, Tuccinardi D, Moriconi E, Di Renzo L, Muscogiuri G, et al. Could ketogenic diet "starve" cancer? Emerging evidence. Crit Rev Food Sci Nutr 2020:1–22.
[68] Bandera-Merchan B, Boughanem H, Crujeiras AB, Macias-Gonzalez M, Tinahones FJ. Ketotherapy as an epigenetic modifier in cancer. Rev Endocr Metab Disord 2020;21:509–19.
[69] Lorenzo PM, Crujeiras AB. Potential effects of nutrition-based weight loss therapies in reversing obesity-related breast cancer epigenetic marks. Food Funct 2021;12:1402–14.
[70] Mundi MS, Mohamed Elfadil O, Patel I, Patel J, Hurt RT. Ketogenic diet and cancer: fad or fabulous? JPEN - J Parenter Enter Nutr 2021;45:26–32.
[71] Barrea L, Megna M, Cacciapuoti S, Frias-Toral E, Fabbrocini G, Savastano S, et al. Very low-calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with psoriasis and obesity: an update for dermatologists and nutritionists. Crit Rev Food Sci Nutr 2022;62:398–414.
[72] Monda V, Polito R, Lovino A, Finaldi A, Valenzano A, Nigro E, et al. Short-term physiological effects of a very low-calorie ketogenic diet: effects on adiponectin levels and inflammatory states. Int J Mol Sci 2020;21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Food & Function

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

REVIEW

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: Food Funct., 2021, 12, 1402

Potential effects of nutrition-based weight loss therapies in reversing obesity-related breast cancer epigenetic marks

Paula M. Lorenzo [a] and Ana B. Crujeiras *[a,b]

Obesity is a modifiable risk factor of breast cancer and epigenetic marks were proposed as a relevant mechanistic link. These mechanisms can be remodelled by modifying lifestyle factors and this fact could be useful in the treatment of obesity-related breast cancer. This review aimed to reveal the current evidence on the effects of differences in body composition and lifestyle factors on the risk, treatment, and survival of breast cancer with a focus on the effects of weight loss therapies based on different nutrients, bioactive compounds, and Mediterranean and ketogenic diets to counteract obesity-related breast cancer epigenetic marks. This review was framed on the most relevant and recently published articles and abstracts selected in PubMed using key words related to epigenetics, lifestyle, dietary habits, nutrients, bioactive compounds, ketone bodies, and weight loss treatments in obesity and breast cancer. Several studies have demonstrated that lifestyle interventions, including dietary modifications towards a healthy diet pattern, are effective therapies to prevent the onset of breast cancer and to improve the survival after treatment. These therapies reduce the main factors associated with obesity that are links between adiposity and cancer, including oxidative stress, inflammation and epigenetic mechanisms. However, although sufficient evidence exists regarding the effects of nutrients, dietary patterns, and weight loss therapies to prevent breast cancer or to improve survival, the effects of these strategies on the oncological treatment response were less studied. This review summarises the current scientific evidence regarding these nutritional strategies as adjuvant therapies in the management of obesity-related breast cancer by remodelling epigenetic marks related to carcinogenesis.

Received 29th July 2020,
Accepted 7th January 2021

DOI: 10.1039/d0fo01984d

rsc.li/food-function

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

1. Introduction

Breast cancer is a type of malignant cancer that severely affects the health of women. It is the most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer death among females;[1] however, as treatments have improved, the number of breast cancer survivors has grown.[2,3] Several factors increase the risk of breast cancer, obesity and lifestyle habits being among the most relevant modifiable factors (Fig. 1). Thus, due to the increased prevalence of obesity, the incidences and poor prognoses of breast cancer may increase in the future. Furthermore, survival in obese women with breast cancer has decreased. This drop in the survival may be due to the disease itself, associated comorbidities, or due to a response to cancer treatment. Obese women present with greater surgery- and radiation-related complications, and there is currently no consensus regarding the adequate dose of chemotherapy in obese patients. Thus, obesity is found to be a serious health problem having significant effects on the incidence and treatment of gynaecological malignancies.[4]

Obesity affects more than half a billion adults worldwide and is a recognised risk factor for some cancers, including breast cancer.[5,6] In addition, childhood obesity is a major public health problem that is prevalent worldwide. The number of infants and young children (0 to 5 years old) suffering from overweight or obesity has increased from 32 million in 1990 to 41 million in 2016. Without timely intervention, obese infants and young children would remain obese through their childhood, adolescence, and adulthood.[7] The prevalence of overweight and obesity in children aged 0 to 5 years was 4.2% in 1990, 6.7% in 2010, and the World Health Organisation (WHO) has estimated that it would be 9.1% in 2020.[8] After smoking, obesity is now considered to be the most important modifiable risk factor of cancer.[9,10] The increasing prevalence of adolescent obesity might increase the burden of obesity-related cancers in the future.[11]

Despite the epidemiological evidence, the molecular mechanisms underlying the association between obesity and breast cancer risk are currently unclear.[12] Systemic compli-

[a]Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Instituto de Investigacion Sanitaria (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain. E-mail: anabelencrujeiras@hotmail.com
[b]CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERobn), Madrid, Spain

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

View Article Online

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

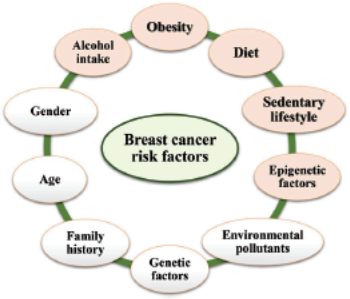


Fig. 1 Breast cancer risk factors. There are several risk factors for breast cancer such as female sex, advanced age, alcohol intake, family history, or genetic/epigenetic factors, but lifestyle is considered the most important modifiable risk factor. Obesity is a well-known risk factor for breast cancer, mainly in postmenopausal women. Diet is associated with a significant percentage of cases of breast cancer, and a healthy diet is associated with preventing its occurrence. The highlighted factors are modifiable breast cancer risk factors.

cations from obesity, including inflammation, insulin resistance, and hyperglycaemia, have been investigated as possible causes or contributors to increased breast cancer risk and progression.[5] Additionally, epigenetic mechanisms were proposed to be a potential mechanistic link between the obesity features and breast cancer.[13,14]

Epigenetics is the study of inheritable and reversible changes in DNA that modulate gene expression but do not produce changes in the DNA sequence.[15,16] The main mechanisms involved in epigenetic regulation are DNA methylation, histone post-translational modification, and regulation by non-coding RNAs.[17] DNA methylation is undoubtedly the most studied mechanism[17,18] and is known to be modulated by environmental and lifestyle factors[17] such as diet, body weight, and physical activity. DNA methylation is a relatively stable and dynamic epigenetic marker that is inherited across several generations and is tissue specific.[19] In mammalian cells, methylation occurs when a methyl group is added to DNA bases. The family of DNA methyltransferase enzymes catalyses this process that occurs chiefly in cytosine–guanine dinucleotides with a phosphate group between the two nucleotides (CpG). The dense CpG clusters, which are often found in the promoter region, are called CpG islands.[16,17]

Epigenetic modulation can affect various cellular processes such as gene expression; these changes are associated with pathologies such as cancer.[20] Specifically, there is clear evidence to suggest that epigenetic changes are involved in the onset and progression of breast cancer.[21] Epigenetic modifications in cancer are crucial because they contribute to cell proliferation, differentiation, and tumour development and progression.[22] Modifications of DNA methylation can occur through hypermethylation or hypomethylation of methylation marks relative to the normal methylome. In cancer, hypermethylation in the CpG islands of gene promoters is associated with the repression of tumour suppressor gene expression, and hypomethylation of the entire genome in cancer cells has been associated with the expression of proto-oncogenes, genomic instability, and malignant transformation of tumours. Moreover, epigenetic marks have a high clinical relevance as they are proposed to be possible biomarkers for the development and progression of diseases such as cancer.[18]



Paula M. Lorenzo

Paula M Lorenzo, Bsch., is Predoctoral Researcher at Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS) and CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN). She is a Nutritionist (University of Santiago de Compostela, 2016), European Master's degree in Food Science, Nutrition and Metabolism (University of Navarra, 2017). Currently, she is performing her Doctoral Thesis on nutriepigenomics in obesity and breast cancer. Her research interest is focused on nutritional strategies able to modulate epigenetic mechanisms involved in the link between obesity and breast cancer. In her developed research so far, she evidenced an association between Mediterranean dietary pattern or fish consumption in breast cancer patients and an episignature of obesity-related breast cancer (https://orcid.org/0000-0003-2704-2879).



Ana B. Crujeiras

Ana B Crujeiras, Ph.D., is Senior Researcher at Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS) and CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN). Currently, she is director of the Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group and co-director of the Epigenomics Unit at IDIS. She is a Biologist (University of Santiago de Compostela, 2002) and Doctor in physiology and nutrition (University of Navarra, 2008). During her postdoctoral position, she gained expertise on epigenetics and cancer at Health Research Institute of Bellvitge (IDIBELL-PEBC, 2014). Her current research interests include the epigenetic mechanisms involved in the pathobiology of obesity and cancer with special focus on DNA methylation and its modulation by nutritional factors, counting with more than one hundred publications in this field (https://orcid.org/0000-0003-4392-0301).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

The great relevance of epigenetic modifications is their reversibility through treatment with drugs or dietary interventions. Certain nutrients and bioactive compounds in the diet have been proposed to prevent diseases due to their potential health benefits, some of them due to their anticancer properties. These dietary components can modulate gene expression through epigenetic mechanisms acting on the onset and progression of carcinogenesis.[22] Furthermore, recent evidence has shown that obesity and diet modify the DNA methylation patterns of the genes involved in the development of breast cancer, and the DNA methylation levels in the genes involved in cell growth and DNA repair tend to increase with obesity.[23]

These mechanisms linking obesity and cancer can be remodelled by weight loss therapy for obesity.[24] Therefore, weight loss therapies could be a good strategy to counteract the risk and prognosis of obesity-related cancer in general, and obesity-related breast cancer in particular.

This review was focused on the current evidence of the effect of body composition and lifestyle factors on the risk, treatment, and survival of breast cancer with a special attention on the effect of weight loss therapies based on different bioactive compounds, nutrients, and the Mediterranean and ketogenic diets on epigenetic marks as an adjuvant therapy in the treatment of obesity-related breast cancer.

2. Body composition and risk and prognosis of breast cancer

Adipose tissue is a complex organ with endocrine, metabolic, and immune regulatory functions. Adipose depots release hormones and signalling molecules termed as "adipokines" that work locally and peripherally.[25] The most important adipokines associated with the development of obesity-related breast cancer are leptin and adiponectin.[26] Moreover, new adipokines are now being discovered with the new high-throughput techniques in proteomics.[27]

Fat tissue is composed of white and brown adipose tissues.[28] Brown adipose tissue (BAT) is found in the clavicular, abdominal, spinal, and neck areas.[29] The function of BAT is to produce heat through tremor-free thermogenesis,[29–31] and among its beneficial effects are the reduction of body fat, participation in glucose homeostasis, and improvement of the lipid profile of blood.[30] White adipose tissue (WAT) is considered as the largest endocrine organ in the body,[28,32] whose main function is to store energy and maintain energy homeostasis,[33] and it depends on the nutritional state[34,35] and comprises subcutaneous and visceral adipose tissues.[28,36] Visceral tissue generates free fatty acids, and inflammatory mediators,[37,38] and is the main reason for comorbidities associated with obesity.[37,39] Women with more visceral fat are more likely to develop breast cancer.[40] Additionally, the loss of fat at different body locations in healthy overweight postmenopausal women was associated with changes in the different types of biomarkers related to the risk of breast cancer.[41]

In obesity, the adipose tissue expands, leading to an enlargement of adipocytes after which it starts producing chemotactic factors. Subsequently, there is an increased production of adipokines and inflammatory cytokines[12,26,42,43] and a decreased production of adiponectin.[12,37] The inability of adipose tissue to store excess free fatty acids is considered as adipose tissue dysfunction.[12,42] Thus, obesity is associated with a state of low-grade, chronic, systemic inflammation[12,37,44,45] that consequently presents as increased systemic levels of proinflammatory cytokines.[12,46] It has been reported that decreased circulating adiponectin levels and increased leptin, IL-6, IL-8, and TNF-α levels are significantly associated with the risk of breast cancer.[47] An increase in adipose tissue affects the balance between pro and anti-inflammatory adipokine production, resulting in an excess of proinflammatory adipokines.[48] In addition, the leptin/adiponectin ratio may be a good marker for postmenopausal breast cancer risk.[49]

The adipose tissue dysfunction that occurs in obesity generates metabolic and inflammatory changes that increase the oxidative stress and, consequently, the production of reactive oxygen species (ROS).[50,51] These species are carcinogenic and they cause further DNA damage (Fig. 2). Therefore, ROS are implicated in the aetiology and progression of breast cancer since some markers of oxidative stress are frequently identified in the patients diagnosed with breast cancer.[52]

Furthermore, breast cancer develops in several stages due to changes in gene expression. These changes are caused by chromosomal alterations, gene mutations, and epigenetic alterations of DNA. Obesity might promote a dysregulation in carcinogenesis-related genes even before the formation of a

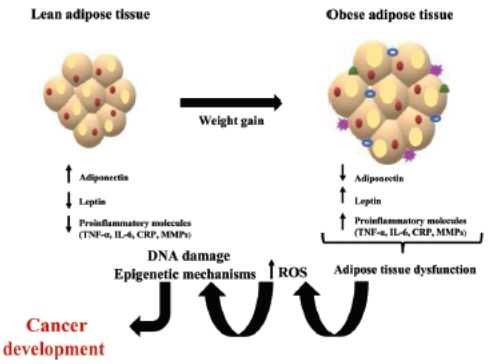


Fig. 2 Differences between lean adipose tissue and obese adipose tissue. In lean adipose tissue, there is a balance in leptin, adiponectin and proinflammatory molecules levels. With weight gain, adipose tissue expands in obesity producing an increase in the production of proinflammatory molecules and leptin, and a decreased production of adiponectin. This produces an adipose tissue disfunction increasing the production of reactive oxygen species (ROS), which are carcinogenic, increasing DNA damage and modulating epigenetic mechanisms favourable of tumoral transformation. MMPs, metalloproteinases.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

tumorous lesion. This effect may be due to the molecules secreted by the visceral adipose tissue.[53] Genes subject to epigenetic regulation obesity-associated, sensitive to DNA methylation are termed epiobesigenic genes; they have important roles in the development of obesity as they control adipogenesis, inflammation, appetite, and glucose tolerance.[54] Excess adiposity, as a consequence of excess food consumption or a sedentary lifestyle, is a regulator of epigenetic modification in the adipose tissue. These modifications in the DNA methylation pattern in adipose tissue have been found to be related to the development of cancer, among other pathologies.[55]

In contrast, the maintenance of skeletal muscle mass is essential for the proper functioning of the musculoskeletal system, as well as for the proper absorption and storage of nutrients.[56] Skeletal muscle is an organ that produces molecules known as myokines that counteract the harmful effects of proinflammatory adipokines.[57] Several studies have shown that higher levels of muscle mass in obese individuals correlate with a better metabolic profile.[58] A deterioration in the synthesis of muscle proteins may lead to a loss of muscle mass or atrophy, which is characteristic of cancer cachexia,[56,59] heart disease, and obesity.[56] Obesity-associated with decreased muscle mass and function and increased fat mass is known as sarcopenic obesity.[60,61] Regarding skeletal muscle, epigenetic modifications are known to interfere with myogenesis. Therefore, because the loss of muscle mass is frequent in patients with cancer, epigenetic changes can be effective therapeutic targets in patients with cancer and muscle loss.[62] Therefore, both fat and muscle mass compositions are relevant factors to be considered in the tumoural pathogenesis associated with obesity. Hence, therapeutic interventions to counteract this association should consider decreasing the fat mass, especially visceral fat mass, and preserving or enhancing the muscular mass.

3. Lifestyle and risk and prognosis of breast cancer

Regarding the risk factors of breast cancer, whether the effect of excess body weight on breast cancer is due to adiposity *per se* or because of lifestyle factors such as diet, is currently an open question.

In this regard, experimental studies in animal models have reported that despite following the same diet, animals sensitive to the obesogenic diet showed a dysregulation of carcinogenic pathways that was not observed in animals resistant to the obesogenic diet.[37]

Conversely, some studies have indicated that diet may exert an influence in approximately 35% of breast cancer cases.[63] In the NutriNet-Santé cohort study, a 10% increase in the proportion of ultra-processed foods in the diet was associated with significant increases of 12% and 11% in the overall cancer and breast cancer risks, respectively. As noted, this may be due to the poor nutritional quality of diets rich in ultra-processed foods, the wide range of additives contained in ultra-processed foods, and the processing of the food, primarily the contaminants added during heat treatment of ultra-processed products.[64] Likewise, a prospective cohort study conducted in women showed that the breast cancer risk was associated with grilled meat intake, high-cholesterol food intake, and irregular meals.[65] In relation to fat intake, women who consumed high levels of fat were at greater risks of developing breast cancer; additionally, Shetty and Sreedharan showed that there is a strong correlation between fat consumption and the crude breast cancer incidence rate.[66]

Epigenetic mechanisms could possibly be involved in the development of breast cancer. It was evidenced that some compounds found in the diet, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, bisphenol A, and arsenic, induce epigenetic signatures that can lead to sporadic breast cancer.[67] Interestingly, it has been observed that certain bioactive compounds in the diet with anticancer potential can regulate gene expression through epigenetic mechanisms.[22,68]

4. Effect of weight loss therapies on breast cancer outcomes

Irrespective of the breast cancer-promoting factors associated with excess body weight, it is accepted that obesity is a risk factor for initiation and promotion of breast cancer. Therefore, is important to elucidate the strategies to prevent and counteract this risk factor (Table 1).

A. Prevention of breast cancer

Lifestyle interventions are novel non-pharmacological treatments.[69] In this context, a case-control study that explored and identified the risk factors for breast cancer observed that sufficient physical activity and adequate fruit and vegetable intakes are protective against breast cancer.[70] Likewise, preclinical studies in mammalian animal models have reported that caloric restriction extends life, improves the risk factors, and delays the onset of age-related diseases including cancer.[71]

Current dietary recommendations for maintaining a healthy diet which is low in fat, primarily saturated fat, have considered several recent studies on the health benefits of the Mediterranean diet.[72] In this context, findings from a recent study from the Women's Health Initiative Observational Study that included 88 805 postmenopausal women, suggest that a low-fat diet may promote weight gain whereas a low-carbohydrate diet may decrease the risk of obesity in postmenopausal women.[73] Contrastingly, in the Women's Health Initiative Dietary Modification trial, where 48 835 postmenopausal women were randomly assigned to a diet modification group and a usual diet group to assess the effects of a low-fat diet on breast cancer incidence, the results of the follow-up after 8.5 years showed that diet modification reduced the incidence of breast cancers associated with an

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

Table 1 Weight loss therapies and breast cancer outcomes

Category	References	Effects
Prevention	Al Qadire *et al.* (2018)[70]	Physical activity and fruit and vegetable intake are associated with a lower risk of breast cancer
	O'Flanagan *et al.* (2017)[71]	Caloric restriction is associated with a delay in the onset of cancer
	Chlebowski *et al.* (2017)[74]	Dietary modification is associated with a reduction in breast cancers associated with a greater risk of death
	Turati *et al.* (2018)[78]	Mediterranean diet pattern can protect against cancer
	Skouroliakou *et al.* (2018);[79] Shivey *et al.* (2018)[80]	Mediterranean diet pattern is associated with lower breast cancer risk
	Skouroliakou *et al.* (2018)[79]	Mediterranean diet pattern is associated with lower overall cancer mortality
	Aravani *et al.* (2018)[97]	Weight loss associated with bariatric surgery is associated with a lower risk of breast cancer
Treatments response	Hagen *et al.* (2018)[98]	Personalized diets produce health benefits and improve the quality of life of women with breast cancer
	Saleh *et al.* (2013)[100]	Caloric restriction is associated with a decrease metastases from breast cancer
	Chung *et al.* (2017)[101]	Caloric restriction reduces pro-grown signalling, which is associated with cancer. Manipulation of molecular pathways by caloric restriction makes cancer cells susceptible to radiation and chemotherapy treatment in breast cancer
	Weber *et al.* (2018);[102] Klement *et al.* (2020)[103]	Ketogenic diet has been proposed as an adjuvant therapy in treatment of cancer
	O'Flanagan *et al.* (2017)[71]	Ketogenic diet promotes response to adjuvant radiation therapy
Breast cancer survival	Stolley *et al.* (2015)[116]	Weight loss in breast cancer survivors has a positive impact on intermediate markers of breast cancer
	Sedlacek *et al.* (2011)[117]	Weight loss improves the chances of long-term survival
	Arikawa *et al.* (2018)[119]	Caloric restriction plus exercise improves biomarkers that entails lower recurrence, morbidity, and mortality risk in obese
	Greenlee *et al.* (2016)[120]	Improvements in fruit and vegetable intake improve biomarkers of interest

increased risk of death.[74] In addition, the Nurses' Health Study II observed an association between an adolescent and early adulthood inflammatory dietary pattern and the risk of premenopausal breast cancer.[75]

Recent studies have suggested that a Mediterranean dietary pattern can protect against diabetes,[76] cardiovascular diseases,[77] and cancers.[78] The reported consumptions of the Mediterranean diet were associated with lower breast cancer risks in women with all subtypes of breast cancer,[79,80] as well as lower overall cancer-related mortality.[79] The Mediterranean diet comprises food rich in bioactive compounds with potential cancer-fighting effects,[81] such as resveratrol present in grapes and red wine, which has shown *in vitro* anticancer potential in various tissues and cell lines including breast cancer.[82] Furthermore, polyphenols are bioactive compounds that have been studied for their protective effect against cancer. In this way, important protective effects against breast cancer have been attributed to dietary patterns with high intakes of foods rich in polyphenols, mainly phytoestrogens and isoflavones. In addition, other phenolic compounds such as epigallocatechin gallate, quercetin, lignans, and curcumin also seem to have protective effects against breast cancer development.[83] Moreover, the associations between food intake and cancer may not be due to a single nutrient, but due to the synergistic effect of the various components in the diet.[80,84] The EPIC study showed that an increase of the Mediterranean diet score by two points can reduce the risk of primary breast cancer by up to 22% in postmenopausal women and prevent approximately 10% of new breast cancer incidences.[79] In line with the effect of excess body weight and dietary factors in promoting breast cancer by epigenetic regulation,[85] the Mediterranean diet, specifically fish consumption, was associated with the methylation level of an epigenetic signature identified in obesity-related breast cancer.[86] The n-3 fatty acids, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, contained in fish have shown beneficial effects in the prevention of breast cancer through mechanisms that inhibit cell proliferation, metastasis, and inflammation.[87] These results suggest that this epigenetic signature may be a biomarker of interest for the effect of environmental factors such as diet on breast cancer, as well as a therapeutic goal in precision nutrition.[86] Therefore, because the Mediterranean diet or fish consumption prevents breast cancer development, we hypothesised that the increase in methylation levels of the epigenetic signature of obesity-related breast cancer could be an adaptation mechanism to counteract the carcinogenesis process in obesity and requires further investigation.

The quality of nutrients should also be considered with respect to the prevention of diseases such as cancer.[88] For instance, it was also demonstrated that high fat diets, particularly those rich in saturated fat, can promote cancer development.[89] Conversely, a high intake of carbohydrates was associated with an increase in cancer risk;[90,91] however, some studies have suggested that the quality of carbohydrates is more important than the quantity.[92] An association has been observed between the consumption of refined sugars and a high glycaemic index diet with an increased risk of developing cancers including breast cancer.[91] In contrast, there is sufficient scientific evidence on the role of dietary fibre in reducing cancer risk. Although most studies have observed

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

these benefits in colon cancer,[93] recent research has shown that dietary fibre intake also lowers the risk of other cancers such as breast cancer.[91]

Therefore, it is hypothesised that a diet low in fat and carbohydrates could be a good option to prevent cancer development by counteracting obesity. Previous studies have shown that a very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) characterised by fat and carbohydrate restriction, an adequate amount of protein, and the resultant generation of ketone bodies in the plasma are effective for the management of obesity and also for the preservation of muscle mass, because weight loss was achieved mainly at the expense of total fat mass and visceral fat[94] in addition to improving the circulating levels of certain myokines, that is, cytokines produced in the muscle.[95] Recently, the ketogenic diet has been proposed as a potential adjuvant epigenetic therapy to cancer treatment, since ketone bodies are known to affect epigenetic marks by modulating the expression of proteins that interfere with carcinogenic processes.[96]

Bariatric surgery is also an effective treatment for weight reduction, and weight loss associated with bariatric surgery was associated with a lower risk of breast cancer.[97] It provided metabolic and cardiovascular benefits that could be mediated by epigenetic regulation. In fact, weight loss treatments such as bariatric surgery appear to be able to reverse the obesity-related epigenome.[17]

B. Oncological therapy response

Several studies suggest that personalised dietary models should be available for all women with breast cancer due to their health benefits and quality of life-improving mechanisms.[98] Breast cancer health professionals have observed that patients do not like to be contacted regarding lifestyle interventions at the time of diagnosis; moreover, the data from the B-AHEAD randomised controlled trial contradicts the theory that patients with breast cancer are keen on lifestyle interventions at the time of diagnosis and at the beginning of adjuvant treatment.[99]

Caloric restriction has been shown to decrease metastases of breast cancer.[100] It has been observed to reduce pro-growth signalling by temporarily reducing glucose and insulin-like circulating growth factor 1, which is associated with cancer. Additionally, it has been shown that the manipulation of molecular pathways by caloric restriction makes cancer cells, which are especially resilient in breast cancer, susceptible to cytotoxic treatment with radiation and chemotherapy.[101]

In this regard, the ketogenic diet has recently been proposed as an adjuvant therapy for the treatment of cancer.[102–105] Scientific evidence on the use of this diet in cancer therapy focuses on the fact that it reduces circulating glucose levels and induces ketosis, depriving cancer cells of energy while normal cells adapt their metabolism to use ketone bodies to survive. Additionally, lowering blood glucose also decreases the levels of insulin levels and insulin-like growth, which are relevant drivers of cancer cell proliferation.[102] In this context, several preclinical studies have shown promising results for the ketogenic diet in reducing tumour growth in breast cancer models, proving that it promotes response to adjuvant radiation therapy.[71] However, it is important to differentiate between the dietary patterns used to induce ketosis as the ketosis induced under low-carbohydrate and high fat intakes differs from that under low-carbohydrate and low-fat intakes.[106] As mentioned above, high fat intake could be dangerous for cancer progression.[89] In the context of obesity-related breast cancer, a VLCKD could be a successful co-adjuvant for oncological treatment. However, despite the evidence on the potential effects of ketogenic diets on cancer treatment, no studies have evaluated the combined effect of weight loss induced by a VLCKD during the oncological treatment.

Notably, certain epigenetic modifications, in addition to promoting tumour development, can create tumours resistant to chemotherapy.[107] Therefore, adjuvant treatments with lifestyle modifications intended to modulate gene expression through epigenetic mechanisms can be of great clinical relevance.

Another concern is the weight gain during chemotherapy. In this context, weight gain and obesity are common in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer.[108] Recent studies have suggested that the mean weight gain during chemotherapy ranges from 1–5 kg; however, roughly 20% of women gain 10–20 kg.[109] Many studies have indicated that weight gain during chemotherapy not only adversely affected the cardiovascular health and quality of life of the patients, but also increased the risk of breast cancer recurrence and death.[108,110] In a recent cohort study, every 5 kg weight gain post a breast cancer diagnosis increased cardiovascular- (19%) and breast cancer-specific (13%) mortality.[109] Additionally, weight gain was highly prevalent among premenopausal patients receiving adjuvant chemotherapy,[109,111] showing that women gained more weight with chemotherapy than with hormonal and radiation therapies. In this context, Arpino *et al.* observed significant metabolic disturbances, such as increases in body weight, waist and hip circumferences, low density lipoproteins, triglycerides, and total cholesterol levels in patients receiving adjuvant therapy.[112] Likewise, most studies have observed sarcopenic obesity, that is, decreases in muscle mass and increases in body weight with increased fat mass.[109,111–113] Moreover, a study showed that, after 6 months of antineoplastic treatment, there was a decrease in the bone mineral density and an increase in the body weight characterised by an increase in the fat mass and a decrease in the muscle mass and strength.[111] Recent studies have demonstrated a significant increase in the fat mass and a change in the body fat distribution during chemotherapy treatment. Interestingly, chemotherapy-induced weight gain and body composition changes have been observed to occur in specific body areas, predominantly the legs, trunk, and arms; further, the lean body mass losses mainly affect the legs and the lower part of the trunk.[112] Regarding the changes in the fat distribution, it has been observed that the location of the fat is of the android type, which is related to the risk of recurrence. This may be because some of the chemotherapeutic agents cause ovarian failure.[113] In addition, the weight gain in breast

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

cancer survivors may be due to decreased physical activity, increased caloric intake, and obesogenic medications such as steroids, and the weight is unlikely to be reduced after the treatment is stopped. Interestingly, women with normal BMIs have been shown to have a higher risk of weight gain through treatment than women with higher BMIs.[114] Again, this concern guarantees the necessity to implement a clinical protocol that encourages patients to follow healthy dietary patterns or even to undergo weight loss therapy.

C. Survival in breast cancer

Due to indications for longer survival after breast cancer, both the American Institute for Cancer Research (AICR) and the American Cancer Society (ACS) are currently propose the maintenance of a healthy body weight and a dietary pattern rich in vegetables, fruits, and whole grains to live longer without diseases.[72] Interestingly, menopausal status, BMI, and estrogen receptor status may play a role in the relationship between diet and survival in breast cancer.[115]

Weight loss trials with breast cancer survivors support the positive impact of weight loss on intermediate markers of breast cancer including sex hormones, chronic inflammation, and hyperinsulinemia.[116] A non-randomised controlled trial in postmenopausal breast cancer survivors showed that weight loss improves the chances of long-term survival.[119] Additionally, the Yale Exercise and Survivorship Study found that baseline inflammatory markers were associated with higher adiposities and lower levels of exercise.[118]

Likewise, in a randomised controlled trial where 21 overweight and obese breast cancer survivors were randomised into one of two intervention groups, a calorie-restricted feeding plus exercise group and a weight management counselling group, showed a 10% decrease in the body weight, a 16% decrease in the fat mass, and improvements in several biomarkers in the calorie-restricted feeding plus exercise group that entailed lower recurrence, morbidity, and mortality risks.[119] Similarly, another randomised controlled trial with Hispanic breast cancer survivors succeeded in improving the fruit and vegetable intake, but not the total fat intake, obtaining modest but important effects of biomarkers of interest.[120]

Therefore, the adherence to a healthy diet could maintain a correct pattern of epigenetic marks for preventing future recidivism in breast cancer survivors.[121]

5. Conclusions

A better understanding of the relationship between diet, obesity, and breast cancer in health care and scientific professionals may have important public health implications and might encourage the applications of weight-reduction strategies both in patients with breast cancer and in the general population.[98] These factors could induce epigenetic modulations involved in the prevention, therapy response, and survival of patients with breast cancer (Fig. 3). However, it is still unclear as to what overall dietary advice should be provided to this population for the maintenance of a healthy weight.[98] As the prevalence of breast cancer increases, the need for dietary advice and nutritional intervention is expected to increase the pursuit of healthy eating, weight control, and optimal health after diagnosis,[122] and it is necessary to create comprehensive guidelines to help guide the recommendations of oncologists regarding weight control and diet during and after cancer treatment.[123] Following a healthy eating pattern based on the Mediterranean or the ketogenic diet as well as reducing the saturated fat and enriching the diet with bioactive compounds or nutrients such as resveratrol or n-3 fatty acids could be recommended. In particular, large interventional studies are needed to assess whether a weight loss therapy or a specific healthy dietary pattern could improve the treatment and prognosis of breast cancer in patients with obesity by reducing obesity-related features such as hormonal, inflammation, and oxidative stress factors and, as a consequence, remodelling epigenetic marks that promote carcinogenesis.

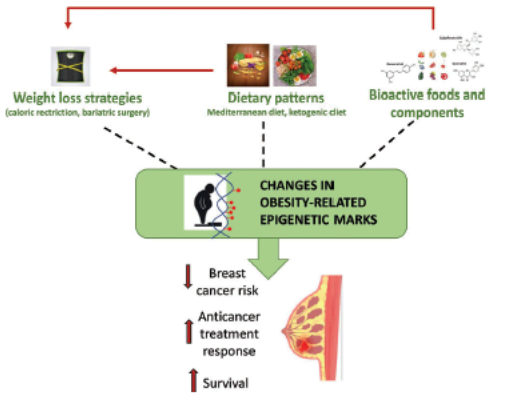


Fig. 3 Changes in obesity-related epigenetic marks. Weight loss strategies with healthy dietary patterns and specific nutrients contained in foods produce changes in obesity-related epigenetic marks. These changes in epigenetic regulation may reduce the occurrence of breast cancer, improve the response to chemotherapy treatments, and increase long-term survival in patients with breast cancer.

Author contributions

PL and AC prepared the first draft of the manuscript. PL was involved in the literature search. AC critically revised and wrote the final version of the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Funding

The study was supported by Centro de Investigación Biomedica en Red fisiopatología de la obesidad y nutricion

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(CIBERobn) and the Miguel Servet project, initiatives of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, CP17/0008) co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). PL is funded by predoctoral grant from the Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago (IDIS; IDIS2018) Agencia Gallega de Innovación (GAIN)-Xunta de Galicia (IN606A-2020/013). AC is a Miguel Servet researcher (ISCIII; CP17/0008).

Conflicts of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1 F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *Cancer J. Clin.*, 2018, **68**, 394–424.

2 K. D. Miller, R. L. Siegel, C. C. Lin, A. B. Mariotto, J. L. Kramer, J. H. Rowland, K. D. Stein, R. Alteri and A. Jemal, Cancer treatment and survivorship statistics, 2016, *Cancer J. Clin.*, 2016, **66**, 271–289.

3 S. Saadatmand, R. Bretveld, S. Siesling and M. M. A. Tilanus-Linthorst, Influence of tumour stage at breast cancer detection on survival in modern times: Population based study in 173 797 patients, *Br. Med. J.*, 2015, **351**, h4901.

4 S. C. Modesitt and J. R. Van Nagell, The Impact of Obesity on the Incidence A Review, *Obstet. Gynecol. Surv.*, 2005, **60**, 683–693.

5 M. Bousquenaud, F. Fico, G. Solinas, C. Rüegg and A. Santamaria-Martínez, Obesity promotes the expansion of metastasis-initiating cells in breast cancer, *Breast Cancer Res.*, 2018, **20**, 104.

6 B. L. Ecker, J. Y. Lee, C. J. Sterner, A. C. Solomon, D. K. Pant, F. Shen, J. Peraza, L. Vaught, S. Mahendra, G. K. Belka, T. Pan, K. H. Schmitz and L. A. Chodosh, Impact of obesity on breast cancer recurrence and minimal residual disease, *Breast Cancer Res.*, 2019, **21**, 41.

7 WHO World Health Organization, *Datos y cifras sobre obesidad infantil*, 2020, available online: https://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/es/ (accessed on 26 October 2018).

8 AECOSAN Agencia Española de Consumo, *Seguridad Alimentaria y Nutrición. Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España*, 2015, available online: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/Estudio_ALADINO_2015.pdf (accessed on 15 January 2020).

9 A. Manni, K. El-Bayoumy and H. Thompson, Docosahexaenoic Acid in Combination with Dietary Energy Restriction for Reducing the Risk of Obesity Related Breast Cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **19**, 28.

10 A. B. Crujeiras, J. Cueva, M. Vieito, T. Curiel, R. López-López, M. Pollán and F. F. Casanueva, Association of breast cancer and obesity in a homogeneous population from Spain, *J. Endocrinol. Invest.*, 2012, **35**, 681–685.

11 A. Furer, A. Afek, A. Sommer, L. Keinan-Boker, E. Derazne, Z. Levi, D. Tzur, S. Tiosano, A. Shina, Y. Glick, J. D. Kark, A. Tirosh and G. Twig, Adolescent obesity and midlife cancer risk: a population-based cohort study of 2·3 million adolescents in Israel, *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2020, **8**, 216–225.

12 A. B. Crujeiras, A. Díaz-Lagares, M. C. Carreira, M. Amil and F. F. Casanueva, Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer, *Free Radic. Res.*, 2013, **47**, 243–256.

13 A. B. Crujeiras, A. Diaz-Lagares, O. A. Stefansson, M. Macias-Gonzalez, J. Sandoval, J. Cueva, R. Lopez-Lopez, S. Moran, J. G. Jonasson, L. Tryggvadottir, E. Olafsdottir, F. J. Tinahones, M. C. Carreira, F. F. Casanueva and M. Esteller, Obesity and menopause modify the epigenomic profile of breast cancer, *Endocr.-Relat. Cancer*, 2017, **24**, 351–363.

14 A. B. Crujeiras and F. F. Casanueva, Obesity and the reproductive system disorders: Epigenetics as a potential bridge, *Hum. Reprod. Update*, 2015, **21**, 249–261.

15 H. L. Park, Epigenetic Biomarkers for Environmental Exposures and Personalized Breast Cancer Prevention, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, **17**, 1181.

16 L. Parrillo, R. Spinelli, A. Nicolò, M. Longo, P. Mirra, G. A. Raciti, C. Miele and F. Beguinot, Nutritional Factors, DNA Methylation, and Risk of Type 2 Diabetes and Obesity: Perspectives and Challenges, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 2983.

17 A. G. Izquierdo and A. B. Crujeiras, Obesity-Related Epigenetic Changes After Bariatric Surgery, *Front. Endocrinol.*, 2019, **10**, 232.

18 J. Mari-Alexandre, A. Diaz-Lagares, M. Villalba, O. Juan, A. B. Crujeiras, A. Calvo and J. Sandoval, Translating cancer epigenomics into the clinic: focus on lung cancer, *Transl. Res.*, 2017, **189**, 76–92.

19 A. G. Izquierdo and A. B. Crujeiras, Role of epigenomic mechanisms in the onset and management of insulin resistance, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2019, **20**, 89–102.

20 B. Pineda, A. Diaz-Lagares, J. A. Pérez-Fidalgo, O. Burgués, I. González-Barrallo, A. B. Crujeiras, J. Sandoval, M. Esteller, A. Lluch and P. Eroles, A two-gene epigenetic signature for the prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients, *Clin. Epigenet.*, 2019, **11**, 33.

21 F. L. C. Faldoni, C. A. Rainho and S. R. Rogatto, Epigenetics in Inflammatory Breast Cancer: Biological

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

Features and Therapeutic Perspectives, *Cells*, 2020, **9**, 1164.
22 A. B. Crujeiras and D. de Lorenzo, in *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, Elsevier, 2020, vol. 63, pp. 483–488.
23 F. L. C. Faldoni, C. A. Rainho and S. R. Rogatto, Epigenetics in Inflammatory Breast Cancer: Biological Features and Therapeutic Perspectives, *Cells*, 2020, **9**, 1164.
24 A. G. Izquierdo, M. C. Carreira, M. Amil, C. S. Mosteiro, T. Garcia-Caballero, A. Fernandez-Quintela, M. P. Portillo, F. F. Casanueva and A. B. Crujeiras, An energy restriction–based weight loss intervention is able to reverse the effects of obesity on the expression of liver tumor–promoting genes, *FASEB J.*, 2020, **34**, 2312–2325.
25 A. Booth, A. Magnuson, J. Fouts and M. Foster, Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, 2015, **21**, 57–74.
26 F. Sánchez-Jiménez, A. Pérez-Pérez, L. de la Cruz-Merino and V. Sánchez-Margalet, Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin, *Front. Oncol.*, 2019, **9**, 596.
27 M. Pardo, A. Roca-Rivada, L. M. Seoane and F. F. Casanueva, Obesidomics: contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research, *Endocrine*, 2012, **41**, 374–383.
28 A. V. B. Castro, C. M. Kolka, S. P. Kim and R. N. Bergman, Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 2014, **58**, 600–609.
29 K. A. Heenan, A. E. Carrillo, J. L. Fulton, E. J. Ryan, J. R. Edsall, D. Rigopoulos, M. M. Markofski, A. D. Flouris and P. C. Dinas, Effects of nutrition/diet on brown adipose tissue in humans: A systematic review and meta-analysis, *Nutrients*, 2020, **12**, 1–23.
30 S. Fuse, T. Endo, R. Tanaka, M. Kuroiwa, A. Ando, A. Kume, A. Yamamoto, K. Kuribayashi, S. Somekawa, M. Takeshita, M. Hashimoto, R. Kime, Y. Kurosawa and T. Hamaoka, Effects of Capsinoid Intake on Brown Adipose Tissue Vascular Density and Resting Energy Expenditure in Healthy, Middle-Aged Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study, *Nutrients*, 2020, **12**, 2676.
31 T. J. Saari, J. Raiko, M. U-Din, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. Savisto, M. Haaparanta-Solin, P. Nuutila and K. A. Virtanen, Basal and cold-induced fatty acid uptake of human brown adipose tissue is impaired in obesity, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 14373.
32 V. Francisco, J. Pino, M. A. Gonzalez-Gay, A. Mera, F. Lago, R. Gómez, A. Mobasheri and O. Gualillo, Adipokines and inflammation: is it a question of weight?, *Br. J. Pharmacol.*, 2018, **175**, 1569–1579.
33 T. Agurs-Collins, S. A. Ross and B. K. Dunn, The Many Faces of Obesity and Its Influence on Breast Cancer Risk, *Front. Oncol.*, 2019, **9**, 765.
34 R. E. Duncan, M. Ahmadian, K. Jaworski, E. Sarkadi-Nagy and H. S. Sul, Regulation of lipolysis in adipocytes, *Annu. Rev. Nutr.*, 2007, **27**, 79–101.
35 S. S. Choe, J. Y. Huh, I. J. Hwang, J. I. Kim and J. B. Kim, Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders, *Front. Endocrinol.*, 2016, **7**, 1.
36 I. Hwang and J. B. Kim, Two Faces of White Adipose Tissue with Heterogeneous Adipogenic Progenitors, *Diabetes Metab. J.*, 2019, **43**, 752.
37 B. Cabia, S. Andrade, M. C. Carreira, F. F. Casanueva and A. B. Crujeiras, A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis, *Obes. Rev.*, 2016, **17**, 361–376.
38 D. Castellano-Castillo, S. Morcillo, A. B. Crujeiras, L. Sánchez-Alcoholado, M. Clemente-Postigo, E. Torres, F. J. Tinahones and M. Macias-Gonzalez, Association between serum 25-hydroxyvitamin D and global DNA methylation in visceral adipose tissue from colorectal cancer patients, *BMC Cancer*, 2019, **19**, 93.
39 J.-P. Després, Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease, *Circulation*, 2012, **126**, 1301–1313.
40 J. C. M. Godinho-Mota, K. A. Martins, L. Vaz-Gonçalves, J. F. Mota, L. R. Soares and R. Freitas-Junior, Visceral adiposity and insulin resistance increase the risk of breast cancer: a case-control study, *Nutr. Hosp.*, 2018, **35**, 576–581.
41 W. A. van Gemert, E. M. Monninkhof, A. M. May, S. G. Elias, J. van der Palen, W. Veldhuis, M. Stapper, R. K. Stellato, J. A. Schuit and P. H. Peeters, Association between changes in fat distribution and biomarkers for breast cancer, *Endocr.-Relat. Cancer*, 2017, **24**, 297–305.
42 M. F. Landecho, C. Tuero, V. Valentí, I. Bilbao, M. de la Higuera and G. Frühbeck, Relevance of leptin and other adipokines in obesity-associated cardiovascular risk, *Nutrients*, 2019, **11**, 2664.
43 G. O. Uyar and N. Sanlier, Association of adipokines and insulin, which have a role in obesity, with colorectal cancer, *Eurasian J. Med.*, 2019, **51**, 190–194.
44 J. Nicolau, R. Simó, P. Sanchís, L. Ayala, R. Fortuny, R. Rivera and L. Masmiquel, Efectos de los síntomas depresivos sobre los parámetros clínicos, marcadores inflamatorios y calidad de vida en una muestra bariátrica tras una pérdida de peso significativa, *Nutr. Hosp.*, 2017, **34**, 81–87.
45 A. Samara, T. Murphy, J. Strain, J. Rutlin, P. Sun, O. Neyman, N. Sreevalsan, J. S. Shimony, B. M. Ances, S.-K. Song, T. Hershey and S. A. Eisenstein, Neuroinflammation and White Matter Alterations in Obesity Assessed by Diffusion Basis Spectrum Imaging, *Front. Hum. Neurosci.*, 2019, **13**, 464.
46 S. S. Doerstling, C. H. O'Flanagan and S. D. Hursting, Obesity and Cancer Metabolism: A Perspective on Interacting Tumor-Intrinsic and Extrinsic Factors, *Front. Oncol.*, 2017, **7**, 216.
47 Y. Gui, Q. Pan, X. Chen, S. Xu, X. Luo and L. Chen, The association between obesity related adipokines and risk of breast cancer: a meta-analysis, *Oncotarget*, 2017, **8**, 75389–75399.
48 I. M. Schrover, Y. van der Graaf, W. Spiering, F. L. Visseren and SMART study group, The relation between body fat

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

distribution, plasma concentrations of adipokines and the metabolic syndrome in patients with clinically manifest vascular disease, *Eur. J. Prev. Cardiol.*, 2018, 25, 1548–1557.

49 R. M. Esper, M. Dame, S. McClintock, P. R. Holt, A. J. Dannenberg, M. S. Wicha and D. E. Brenner, Leptin and Adiponectin Modulate the Self-renewal of Normal Human Breast Epithelial Stem Cells, *Cancer Prev. Res.*, 2015, 8, 1174–1183.

50 R. Sateesh, A. Rao Bitla, S. Budugu, Y. Mutheeswariah, H. Narendra, B. Phaneedra and A. Lakshmi, Oxidative stress in relation to obesity in breast cancer, *Indian J. Cancer*, 2019, 56, 41.

51 P. Manna and S. K. Jain, Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies, *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 2015, 13, 423–444.

52 C. Panis, V. J. Victorino, A. C. S. A. Herrera, L. F. Freitas, T. De Rossi, F. C. Campos, A. N. Colado Simão, D. S. Barbosa, P. Pinge-Filho, R. Cecchini and A. L. Cecchini, Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, 133, 881–888.

53 A. B. Crujeiras, B. Cabia, M. C. Carreira, M. Amil, J. Cueva, S. Andrade, L. M. Seoane, M. Pardo, A. Sueiro, J. Baltar, T. Morais, M. P. Monteiro, R. Lopez-Lopez and F. F. Casanueva, Secreted factors derived from obese visceral adipose tissue regulate the expression of breast malignant transformation genes, *Int. J. Obes.*, 2016, 40, 514–523.

54 W. B. Coleman, Obesity and the breast cancer methylome, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2016, 31, 104–113.

55 Y. Cheng, C. Monteiro, A. Matos, J. You, A. Fraga, C. Pereira, V. Catalán, A. Rodríguez, J. Gómez-Ambrosi, G. Frühbeck, R. Ribeiro and P. Hu, Epigenome-wide DNA methylation profiling of periprostatic adipose tissue in prostate cancer patients with excess adiposity-a pilot study, *Clin. Epigenet.*, 2018, 10, 54.

56 C. Lipina and H. S. Hundal, Lipid modulation of skeletal muscle mass and function, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017, 8, 190–201.

57 B. K. Pedersen and M. A. Febbraio, Muscles, exercise and obesity : skeletal muscle, *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2012, 8, 457–465.

58 R. Fornari, D. Francomano, E. A. Greco, C. Marocco, C. Lubrano, F. Wannenes, V. Papa, V. M. Bimonte, L. M. Donini, A. Lenzi, A. Aversa and S. Migliaccio, Lean mass in obese adult subjects correlates with higher levels of vitamin D, insulin sensitivity and lower inflammation, *J. Endocrinol. Invest.*, 2015, 38, 367–372.

59 J. Lee, Y. Cho, S. Park, J. W. Kim and I. J. Lee, Skeletal Muscle Depletion Predicts the Prognosis of Patients With Hepatocellular Carcinoma Treated With Radiotherapy, *Front. Oncol.*, 2019, 9, 1075.

60 R. Barazzoni, S. Bischoff, Y. Boirie, L. Busetto, T. Cederholm, D. Dicker, H. Toplak, A. Van Gossum, V. Yumuk and R. Vettor, Sarcopenic Obesity: Time to Meet the Challenge, *Obes. Facts*, 2018, 11, 294–305.

61 Y. M. Kim, J.-H. Kim, S. J. Baik, J. Chun, Y. H. Youn and H. Park, Sarcopenia and Sarcopenic Obesity as Novel Risk Factors for Gastric Carcinogenesis: A Health Checkup Cohort Study, *Front. Oncol.*, 2019, 9, 1249.

62 R. M. Carr, E. Enriquez-Hesles, R. Lo Olson, A. Jatoi, J. Doles and M. E. Fernandez-Zapico, Epigenetics of cancer-associated muscle catabolism, *Epigenomics*, 2017, 9, 1259–1265.

63 M. de La Puente-Yagüe, M. A. Cuadrado-Cenzual, M. J. Ciudad-Cabañas, M. Hernández-Cabria and L. Collado-Yurrita, Vitamin D: And its role in breast cancer, *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 2018, 34, 423–427.

64 T. Fiolet, B. Srour, L. Sellem, E. Kesse-Guyot, B. Allès, C. Méjean, M. Deschasaux, P. Fassier, P. Latino-Martel, M. Beslay, S. Hercberg, C. Lavalette, C. A. Monteiro, C. Julia and M. Touvier, Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort, *Br. Med. J.*, 2018, 360, k322.

65 J. H. Kim, J. Lee, S.-Y. Jung and J. Kim, Dietary Factors and Female Breast Cancer Risk: A Prospective Cohort Study, *Nutrients*, 2017, 9, 1331.

66 P. J. Shetty and J. Sreedharan, Breast Cancer and Dietary Fat Intake: A correlational study, *Nepal J. Epidemiol.*, 2019, 9, 812–816.

67 D. F. Romagnolo, K. D. Daniels, J. T. Grunwald, S. A. Ramos, C. R. Propper and O. I. Selmin, Epigenetics of breast cancer: Modifying role of environmental and bioactive food compounds, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2016, 60, 1310–1329.

68 M. M. Rahman, A. C. Brane and T. O. Tollefsbol, MicroRNAs and Epigenetics Strategies to Reverse Breast Cancer, *Cells*, 2019, 8, 1214.

69 A. A. Kirkham, D. I. Paterson, C. M. Prado, J. M. Mackey, K. S. Courneya, E. Pituskin and R. B. Thompson, Rationale and design of the Caloric Restriction and Exercise protection from Anthracycline Toxic Effects (CREATE) study: a 3-arm parallel group phase II randomized controlled trial in early breast cance, *BMC Cancer*, 2018, 18, 864.

70 M. Al Qadire, M. Alkhalaileh and H. Hina, Risk Factors for Breast Cancer among Jordanian Women: A Case-control Study, *Iran. J. Public Health*, 2018, 47, 49–56.

71 C. H. O'Flanagan, L. A. Smith, S. B. McDonell and S. D. Hursting, When less may be more: calorie restriction and response to cancer therapy, *BMC Med.*, 2017, 15, 106.

72 A. Braakhuis, P. Campion and K. Bishop, The Effects of Dietary Nutrition Education on Weight and Health Biomarkers in Breast Cancer Survivors, *Med. Sci.*, 2017, 5, 12.

73 C. Ford, S. Chang, M. Z. Vitolins, J. I. Fenton, B. V. Howard, J. J. Rhee, M. Stefanick, B. Chen, L. Snetselaar, R. Urrutia and A. C. Frazier-Wood,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

Evaluation of diet pattern and weight gain in postmenopausal women enrolled in the Women's Health Initiative Observational Study, *Br. J. Nutr.*, 2017, **117**, 1189–1197.

74 R. T. Chlebowski, A. K. Aragaki, G. L. Anderson, C. A. Thomson, J. E. Manson, M. S. Simon, B. V. Howard, T. E. Rohan, L. Snetselar, D. Lane, W. Barrington, M. Z. Vitolins, C. Womack, L. Qi, L. Hou, F. Thomas and R. L. Prentice, Low-Fat Dietary Pattern and Breast Cancer Mortality in the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial, *J. Clin. Oncol.*, 2017, **35**, 2919–2926.

75 H. R. Harris, W. C. Willett, R. L. Vaidya and K. B. Michels, An Adolescent and Early Adulthood Dietary Pattern Associated with Inflammation and the Incidence of Breast Cancer, *Cancer Res.*, 2017, **77**, 1179–1187.

76 J. Salas-Salvadó, M. Guasch-Ferré, C.-H. Lee, R. Estruch, C. B. Clish and E. Ros, Protective Effects of the Mediterranean Diet on Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome, *J. Nutr.*, 2015, **146**, 920S–927S.

77 R. Estruch, E. Ros, J. Salas-Salvadó, M.-I. Covas, D. Corella, F. Arós, E. Gómez-Gracia, V. Ruiz-Gutiérrez, M. Fiol, J. Lapetra, R. M. Lamuela-Raventos, L. Serra-Majem, X. Pintó, J. Basora, M. A. Muñoz, J. V. Sorlí, J. A. Martínez and M. A. Martínez-González, Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet, *N. Engl. J. Med.*, 2013, **368**, 1279–1290.

78 F. Turati, G. Carioli, F. Bravi, M. Ferraroni, D. Serraino, M. Montella, A. Giacosa, F. Toffolutti, E. Negri, F. Levi and C. La Vecchia, Mediterranean Diet and Breast Cancer Risk, *Nutrients*, 2018, **10**, 326.

79 M. Skouroliakou, D. Grosomanidis, P. Massara, C. Kostara, P. Papandreou, D. Ntountaniotis and G. Xepapadakis, Serum antioxidant capacity, biochemical profile and body composition of breast cancer survivors in a randomized Mediterranean dietary intervention study, *Eur. J. Nutr.*, 2018, **57**, 2133–2145.

80 C. A. Shively, T. C. Register, S. E. Appt, T. B. Clarkson, B. Uberseder, K. Y. J. Clear, A. S. Wilson, A. Chiba, J. A. Tooze and K. L. Cook, Consumption of Mediterranean versus Western Diet Leads to Distinct Mammary Gland Microbiome Populations, *Cell Rep.*, 2018, **25**, 47–56.e3.

81 B. Martínez-Poveda, J. A. Torres-Vargas, M. D. C. Ocaña, M. García-Caballero, M. Á. Medina and A. R. Quesada, The mediterranean diet, a rich source of angiopreventive compounds in cancer, *Nutrients*, 2019, **11**, 2036.

82 B. Rizeq, I. Gupta, J. Ilesanmi, M. AlSafran, M. D. M. Rahman and A. Ouhtit, The power of phytochemicals combination in cancer chemoprevention, *J. Cancer*, 2020, **11**, 4521–4533.

83 M. Á. Ávila-Gálvez, J. A. Giménez-Bastida, J. C. Espín and A. González-Sarrías, Dietary phenolics against breast cancer. A critical evidence-based review and future perspectives, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 1–33.

84 E. Toledo, J. Salas-Salvadó, C. Donat-Vargas, P. Buil-Cosiales, R. Estruch, E. Ros, D. Corella, M. Fitó, F. B. Hu, F. Arós, E. Gómez-Gracia, D. Romaguera, M. Ortega-Calvo, L. Serra-Majem, X. Pintó, H. Schröder, J. Basora, J. V. Sorlí, M. Bulló, M. Serra-Mir and M. A. Martínez-González, Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial, *JAMA Intern. Med.*, 2015, **175**, 1752.

85 E. Baxter, K. Windloch, F. Gannon and J. S. Lee, Epigenetic regulation in cancer progression, *Cell Biosci.*, 2014, **4**, 45.

86 P. M. Lorenzo, A. G. Izquierdo, A. Diaz-Lagares, M. C. Carreira, M. Macias-Gonzalez, J. Sandoval, J. Cueva, R. Lopez-Lopez, F. F. Casanueva and A. B. Crujeiras, *ZNF577* Methylation Levels in Leukocytes From Women With Breast Cancer Is Modulated by Adiposity, Menopausal State, and the Mediterranean Diet, *Front. Endocrinol.*, 2020, **11**, 245.

87 C. Giordano, P. Plastina, I. Barone, S. Catalano and D. Bonofiglio, N-3 polyunsaturated fatty acid amides: New avenues in the prevention and treatment of breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 2279.

88 D. S. Ludwig, W. C. Willett, J. S. Volek and M. L. Neuhouser, Dietary fat: From foe to friend, *Science*, 2018, **362**, 764–770.

89 G. Pascual, A. Avgustinova, S. Mejetta, M. Martín, A. Castellanos, C. S.-O. Attolini, A. Berenguer, N. Prats, A. Toll, J. A. Hueto, C. Bescós, L. Di Croce and S. A. Benitah, Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36, *Nature*, 2017, **541**, 41–45.

90 S. Schlesinger, D. S. M. Chan, S. Vingeliene, A. R. Vieira, L. Abar, E. Polemiti, C. A. T. Stevens, D. C. Greenwood, D. Aune and T. Norat, Carbohydrates, glycemic index, glycemic load, and breast cancer risk: a systematic review and dose–response meta-analysis of prospective studies, *Nutr. Rev.*, 2017, **75**, 420–441.

91 C. A. Maino Vieytes, H. M. Taha, A. A. Burton-Obanla, K. G. Douglas and A. E. Arthur, Carbohydrate Nutrition and the Risk of Cancer, *Curr. Nutr. Rep.*, 2019, **8**, 230–239.

92 M. Matsushita, K. Fujita and N. Nonomura, Influence of Diet and Nutrition on Prostate Cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 1447.

93 S. B. R. do Prado, V. C. Castro-Alves, G. F. Ferreira and J. P. Fabi, Ingestion of Non-digestible Carbohydrates From Plant-Source Foods and Decreased Risk of Colorectal Cancer: A Review on the Biological Effects and the Mechanisms of Action, *Front. Nutr.*, 2019, **6**, 72.

94 D. Gomez-Arbelaez, D. Bellido, A. I. Castro, L. Ordoñez-Mayan, J. Carreira, C. Galban, M. A. Martinez-Olmos, A. B. Crujeiras, I. Sajoux and F. F. Casanueva, Body composition changes after very low-calorie-ketogenic diet in obesity evaluated by three standardized methods, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2016, **102**, 488–498.

95 I. Sajoux, P. M. Lorenzo, D. Gomez-Arbelaez, M. A. Zulet, I. Abete, A. I. Castro, J. Baltar, M. P. Portillo, F. J. Tinahones, J. A. Martinez, A. B. Crujeiras and F. F. Casanueva, Effect of a Very-Low-Calorie Ketogenic Diet on Circulating Myokine Levels Compared with the

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

Effect of Bariatric Surgery or a Low-Calorie Diet in Patients with Obesity, *Nutrients*, 2019, **11**, 2368.

96 B. Bandera-Merchan, H. Boughanem, A. B. Crujeiras, M. Macias-Gonzalez and F. J. Tinahones, Ketotherapy as an epigenetic modifier in cancer, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2020, **21**, 509–519.

97 A. Aravani, A. Downing, J. D. Thomas, J. Lagergren, E. J. A. Morris and M. A. Hull, Obesity surgery and risk of colorectal and other obesity-related cancers: An English population-based cohort study, *Cancer Epidemiol.*, 2018, **53**, 99–104.

98 K. B. Hagen, T. Aas, J. T. Kvaløy, H. Søiland and R. Lind, Diet in women with breast cancer compared to healthy controls – What is the difference, *Eur. J. Oncol. Nurs.*, 2018, **32**, 20–24.

99 M. Pegington, J. E. Adams, N. J. Bundred, A. M. Campbell, A. Howell, S. J. Howell, S. Speed, J. Wolstenholme and M. N. Harvie, Recruitment to the Breast-Activity and Healthy Eating After Diagnosis; (B-AHEAD) Randomized Controlled Trial, *Integr. Cancer Ther.*, 2018, **17**, 131–137.

100 A. D. Saleh, B. A. Simone, J. Palazzo, J. E. Savage, Y. Sano, T. Dan, L. Jin, C. E. Champ, S. Zhao, M. Lim, F. Sotgia, K. Camphausen, R. G. Pestell, J. B. Mitchell, M. P. Lisanti and N. L. Simone, Caloric restriction augments radiation efficacy in breast cancer, *Cell Cycle*, 2013, **12**, 1955–1963.

101 H.-Y. Chung and Y. K. Park, Rationale, Feasibility and Acceptability of Ketogenic Diet for Cancer Treatment, *J. Cancer Prev.*, 2017, **22**, 127–134.

102 D. D. Weber, S. Aminazdeh-Gohari and B. Kofler, Ketogenic diet in cancer therapy, *Aging*, 2018, **10**, 164–165.

103 R. J. Klement, N. Brehm and R. A. Sweeney, Ketogenic diets in medical oncology: a systematic review with focus on clinical outcomes, *Med. Oncol.*, 2020, **37**, 14.

104 D. D. Weber, S. Aminzadeh-Gohari, J. Tulipan, L. Catalano, R. G. Feichtinger and B. Kofler, Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand?, *Mol. Metab.*, 2020, **33**, 102–121.

105 C. W. Cohen, K. R. Fontaine, R. C. Arend, R. D. Alvarez, C. A. Leath, W. K. Huh, K. S. Bevis, K. H. Kim, J. M. Straughn and B. A. Gower, A ketogenic diet reduces central obesity and serum insulin in women with ovarian or endometrial cancer, *J. Nutr.*, 2018, **148**, 1253–1260.

106 P. Trimboli, M. Castellana, D. Bellido and F. F. Casanueva, Confusion in the nomenclature of ketogenic diets blurs evidence, *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2020, **21**, 1–3.

107 A. Diaz-Lagares, A. B. Crujeiras, P. Lopez-Serra, M. Soler, F. Setien, A. Goyal, J. Sandoval, Y. Hashimoto, A. Martinez-Cardús, A. Gomez, H. Heyn, C. Moutinho, J. Espada, A. Vidal, M. Paúles, M. Galán, N. Sala, Y. Akiyama, M. Martínez-Iniesta, L. Farré, A. Villanueva, M. Gross, S. Diederichs, S. Guil and M. Esteller, Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, E7535–E7544.

108 Q. Fang, L. Gan, Y.-Y. Chen, K.-W. Shen and B.-W. Wu, Percent Body Fat Change in Chinese Women After Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer, *Med. Sci. Monit.*, 2018, **24**, 5988–5995.

109 W. Demark-Wahnefried, L. D. Case, K. Blackwell, P. K. Marcom, W. Kraus, N. Aziz, D. C. Snyder, J. K. Giguere and E. Shaw, Results of a diet/exercise feasibility trial to prevent adverse body composition change in breast cancer patients on adjuvant chemotherapy, *Clin. Breast Cancer*, 2008, **8**, 70–79.

110 M. C. Playdon, M. B. Bracken, T. B. Sanft, J. A. Ligibel, M. Harrigan and M. L. Irwin, Weight Gain After Breast Cancer Diagnosis and All-Cause Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2015, **107**, djv275.

111 A. T. Limon-Miro, V. Lopez-Teros and H. Astiazaran-Garcia, Dietary Guidelines for Breast Cancer Patients: A Critical Review, *Adv. Nutr.*, 2017, **8**, 613–623.

112 G. Arpino, C. De Angelis, G. Buono, A. Colao, M. Giuliano, S. Malgieri, S. Cicala, M. De Laurentiis, A. Accurso, A. Crispo, G. Limite, R. Lauria, B. M. Veneziani, V. Forestieri, D. Bruzzese and S. De Placido, Metabolic and anthropometric changes in early breast cancer patients receiving adjuvant therapy, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, **154**, 127–132.

113 K. M. Cisneros, J. E. Romero, A. Genaro Guevara Torres, M. E. Valencia, R. Olivia Méndez Estrada, O. T. Ortiz, B. I. Pacheco Moreno and H. A. García, Impacto del tratamiento antineoplásico en el estado nutricional en pacientes con cáncer de mama, *Nutr. Hosp.*, 2014, **30**, 876–882.

114 Z. Djuric, J. S. Ellsworth, A. L. Weldon, J. Ren, C. R. Richardson, K. Resnicow, L. A. Newman, D. F. Hayes and A. Sen, A Diet and Exercise Intervention during Chemotherapy for Breast Cancer, *Open Obes. J.*, 2011, **3**, 87–97.

115 T. Dierssen-Sotos, I. Gómez-Acebo, N. Gutiérrez-Ruiz, N. Aragonés, P. Amiano, A. J. Molina, M. Guevara, J. Alonso-Molero, M. Obon-Santacana, G. Fernández-Tardón, A. Molina-Barceló, J. Alguacil, R. Marcos-Gragera, P. Rodríguez-Cundín, G. Castaño-Vinyals, R. Canseco, J. Castilla, A. Molinuevo, B. Pérez-Gómez, M. Kogevinas, M. Pollán and J. Llorca, Dietary constituents: relationship with breast cancer prognostic (MCC-SPAIN follow-up), *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, **18**, E84.

116 M. R. Stolley, L. K. Sharp, G. Fantuzzi, C. Arroyo, P. Sheean, L. Schiffer, R. Campbell and B. Gerber, Study design and protocol for moving forward: a weight loss intervention trial for African-American breast cancer survivors, *BMC Cancer*, 2015, **15**, 1018.

117 S. M. Sedlacek, M. C. Playdon, P. Wolfe, J. N. McGinley, M. R. Wisthoff, E. A. Daeninck, W. Jiang, Z. Zhu and H. J. Thompson, Effect of a low fat versus a low carbohydrate weight loss dietary intervention on biomarkers of long term survival in breast cancer patients ('CHOICE'): study protocol, *BMC Cancer*, 2011, **11**, 287.

118 S. B. Jones, G. A. Thomas, S. D. Hesselsweet, M. Alvarez-Reeves, H. Yu and M. L. Irwin, Effect of exercise on markers of inflammation in breast cancer survivors: the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Yale exercise and survivorship study, *Cancer Prev. Res.*, 2013, **6**, 109–118.

119 A. Y. Arikawa, B. C. Kaufman, S. K. Raatz and M. S. Kurzer, Effects of a parallel-arm randomized controlled weight loss pilot study on biological and psychosocial parameters of overweight and obese breast cancer survivors, *Pilot Feasibility Stud.*, 2018, **4**, 17.

120 H. Greenlee, A. Ogden Gaffney, A. C. Aycinena, P. Koch, I. Contento, W. Karmally, J. M. Richardson, Z. Shi, E. Lim, W.-Y. Tsai, R. M. Santella, W. S. Blaner, R. D. Clugston, S. Cremers, S. Pollak, I. Sirosh, K. D. Crew, M. Maurer, K. Kalinsky and D. L. Hershman, Physical activity and breast cancer survivors: Importance of adherence, motivational interviewing and psychological health, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2016, 25, 1491–1502.

121 L. E. McCullough, J. Chen, Y. H. Cho, N. K. Khankari, P. T. Bradshaw, A. J. White, S. L. Teitelbaum, M. B. Terry, A. I. Neugut, H. Hibshoosh, R. M. Santella and M. D. Gammon, Modification of the association between recreational physical activity and survival after breast cancer by promoter methylation in breast cancer-related genes, *Breast Cancer Res.*, 2017, **19**, 19.

122 V. Vance, S. Campbell, L. McCargar, M. Mourtzakis and R. Hanning, Dietary changes and food intake in the first year after breast cancer treatment, *Appl. Physiol., Nutr., Metab.*, 2014, 39, 707–714.

123 J. A. Ligibel, L. W. Jones, A. M. Brewster, S. K. Clinton, L. A. Korde, K. C. Oeffinger, C. M. Bender, W. Tan, J. K. Merrill, S. Katta and C. M. Alfano, Oncologists' Attitudes and Practice of Addressing Diet, Physical Activity, and Weight Management With Patients With Cancer: Findings of an ASCO Survey of the Oncology Workforce, *J. Oncol. Pract.*, 2019, 15, e520–e528.

Published on 19 January 2021. Downloaded by RSC Internal on 11/26/2021 9:53:28 AM.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

REVIEW

Epigenetic Effects of Healthy Foods and Lifestyle Habits from the Southern European Atlantic Diet Pattern: A Narrative Review

Paula M Lorenzo,[1,2] Andrea G Izquierdo,[1,2] Gemma Rodriguez-Carnero,[1,3] Antía Fernández-Pombo,[3] Alba Iglesias,[1] Marcos C Carreira,[2,4] Cristina Tejera,[1,5] Diego Bellido,[1,5] Miguel A Martinez-Olmos,[1,2,3] Rosaura Leis,[2,6,7] Felipe F Casanueva,[2,4,7] and Ana B Crujeiras[1,2]

[1]Epigenomics in Endocrinology and Nutrition Group, Epigenomics Unit, Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain; [2]CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion (CIBERobn), Madrid, Spain; [3]Endocrinology and Nutrition Division, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS/SERGAS), Santiago de Compostela, Spain; [4]Molecular and Cellular Endocrinology Group. Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain; [5]Endocrinology and Nutrition Unit, Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol (CHUF/SERGAS), Ferrol, Spain; [6]Department of Pediatrics, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS); Instituto de Investigacion Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) and Santiago de Compostela University (USC), Santiago de Compostela, Spain; and [7]Fundacion Dieta Atlántica, Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT

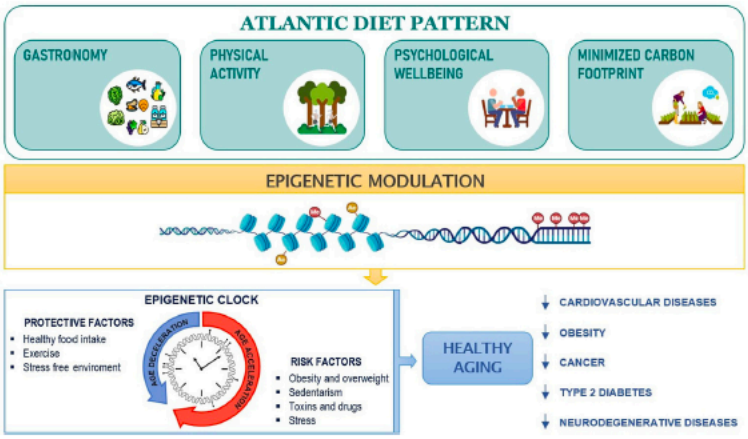
Recent scientific evidence has shown the importance of diet and lifestyle habits for the proper functioning of the human body. A balanced and healthy diet, physical activity, and psychological well-being have a direct beneficial effect on health and can have a crucial role in the development and prognosis of certain diseases. The Southern European Atlantic diet, also named the Atlantic diet, is a unique dietary pattern that occurs in regions that present higher life expectancy, suggesting that this specific dietary pattern is associated with positive health effects. In fact, it is enriched with nutrients of high biological value, which, together with its cooking methods, physical activity promotion, reduction in carbon footprint, and promoting of family meals, promote these positive effects on health. The latest scientific advances in the field of nutri-epigenetics have revealed that epigenetic markers associated with food or nutrients and environmental factors modulate gene expression and, therefore, are involved with both health and disease. Thus, in this review, we evaluated the main aspects that define the Southern European Atlantic diet and the potential epigenetic changes associated with them based on recent studies regarding the main components of these dietary patterns. In conclusion, based on the information existing in the literature, we postulate that the Southern European Atlantic diet could promote healthy aging by means of epigenetic mechanisms. This review highlights the necessity of performing longitudinal studies to demonstrate this proposal. *Adv Nutr* 2022;13:1725–1747.

Statement of Significance: The Southern European Atlantic diet (SEAD) has features that are able to modulate epigenetic mechanisms, which could, in turn, promote healthy aging through the consumption of nutritional bioactive compounds, physical activity, promotion of psychological well-being, and reduction in the environmental production of endocrine disruptors. Therefore, this review provides evidence that the beneficial effect of the SEAD could be promoted by epigenetic mechanisms. This evidence strongly warrants further scientific studies to demonstrate the epigenetic value of the SEAD in promoting healthy aging by slowing down the molecular or physiological aging process, which is of the foremost relevance in the nutritional field of disease prevention.

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of the American Society for Nutrition. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact Journals.permissions@oup.com *Adv Nutr* 2022;13:1725–1747; doi: https://doi.org/10.1093/advances/nmac038.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

GRAPHICAL ABSTRACT



Keywords: Atlantic diet, biomarkers, bioactive compounds, epigenetics, healthy foods, lifestyle, nutri-epigenetics, prevention, precision nutrition

Introduction

For centuries, it has been known that food can interfere with the health status of an individual and, hence, it has been used to treat different conditions and diseases throughout history (1). Currently, the scientific community shows a growing interest in how our genes respond to the different foods human beings consume. However, at present, the molecular basis by which dietary nutrients or dietary patterns modify the expression of genes has not yet been fully described. The most widely accepted hypothesis suggests that epigenetic regulation is responsible for these processes (2). Epigenetics involves the study of how environmental factors, such as lifestyle, physical activity, exposure to toxins, and diet, are capable of modulating the expression of genes without altering our DNA sequence (3–5). Epigenetic modifications are common in many diseases, such as obesity (6–8), type 2 diabetes (9, 10), metabolic syndrome (4, 11), insulin resistance (12, 13), and cancer (14–17). Importantly, these epigenetic markers can be reversed by different therapeutic strategies such as occur after following a low-calorie diet (18, 19), bariatric surgery (20, 21), or physical activity (22, 23) during obesity management. Nutrients can also act as a source of epigenetic modifications and reverse specific epigenetic markers associated with disease (24). Thus, nutritional epigenetics has emerged as a novel mechanism underlying gene–diet interactions, providing evidence of the modulating role of nutrition in aging and the development of age-related diseases (25–27).

Knowing what dietary components or dietary patterns influence the molecular regulatory mechanisms involved in gene expression would help advance research related to the prevention, prognosis, and treatment of pathologies such as obesity, diabetes, and cardiovascular diseases (CVDs) or cancer (28), and finally, to guarantee survival into old age.

Healthy dietary patterns are generally based on including health-promoting foods, such as plant-based foods, fresh fruits and vegetables, half-grain or whole-grain cereals, nuts, which are sources of omega-3 fatty acids and low in saturated fat and *trans* fat and refined added sugars, as well as different bioactive compounds. Examples of healthy dietary patterns are the Mediterranean diet and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH). A Mediterranean diet occurs naturally in certain regions and is ingrained in local tradition, and is not only perceived as a healthy diet but also as a lifestyle (29). The DASH diet was created as a result of studies to improve certain pathologies, such as blood pressure and other CVDs (30). Both dietary patterns have been extensively assessed in relation to chronic diseases and were associated with beneficial effects on preventing several diseases. In the last few years other potentially healthy diets have been highlighted among traditional dietary patterns,

Supported by Centro de Investigación Biomedica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutricion (CIBERobn), the Miguel Servet Project (CP17/0008), and research projects (PI20/00650; PI20/00628), under the Initiative of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and co-financed by the European Regional Development Fund (FEDER). PML is funded by a predoctoral grant from Xunta de Galicia (IN606-2020/013). ABC is a Miguel Servet researcher (ISCIII; CP17/0008).
Author disclosures: The authors report no conflicts of interest.
Address correspondence to ABC (e-mail: ana.belen.crujeiras.martinez@sergas.es; anabelencrujeiras@hotmail.com).
Abbreviations used: AD group, Southern European Atlantic diet group; COVID-19, coronavirus disease 2019; CRF, cardiorespiratory fitness; CVD, cardiovascular disease; DASH, Dietary Approaches to Stop Hypertension; EDC, endocrine disruptor; GHG, greenhouse gas; MF, muscular fitness; ncRNA, noncoding RNA; SEAD, Southern European Atlantic diet.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

such as the Nordic diet and Southern European Atlantic diet (SEAD).

The Nordic diet, based on typical Finnish foods (31), shares nutritional recommendations with the Mediterranean diet: both emphasize local seasonal foods and promote sustainability and preservation of the environment; their main difference is the type of oil used for cooking, where the Nordic diet preferably uses canola oil. In relation to the Nordic diet, epidemiological studies are still lacking to demonstrate its effects on health, as shown with the Mediterranean diet (32).

Particularly, in the northwestern Iberian Peninsula, mainly Galicia and northern Portugal, there is another dietary pattern, the SEAD (33). Although there are few scientific studies to date, the SEAD is also associated with health benefits similar to the Mediterranean diet.

The SEAD regions by themselves present higher life expectancy linked to a group of interconnected factors (socioeconomic, health, environmental, and genetic). Particularly in the Galicia region, higher survival rates were observed, with 1823 centenarians registered in 2020 according to the National Institute of Statistics (34–36). These data demonstrate that the SEAD regions have a high prevalence of survival into old age, which is strongly determined by mortality after 85 y of age, mainly caused by CVD. In fact, Europe accounts for 49% of the deaths which implies a great public health importance (37). Whereas, in the northwest of Spain low rates of CVD mortality were found, which is linked to significantly high rates of survival in recent years (34, 38, 39). This old-age survival observed in the SEAD region may be related to a healthy dietary pattern.

The aim of this review was to collect scientific evidence demonstrating the beneficial properties of the main components included in the SEAD pattern, such as foods, physical activity, healthy habits and behaviors and environmental sustainability, and the potential epigenetic changes associated with them based on recent studies regarding the main components of this dietary pattern.

Comparison between the SEAD and Other Studied Healthy Dietary Patterns

Although the Mediterranean diet, DASH, Nordic diet, and SEAD have common bases, there are also certain aspects that differentiate them and make each one a unique and independent dietary pattern. **Table 1** shows the consumption of food servings and food groups in 4 dietary patterns.

In SEAD, as in the Nordic diet, the consumption of fish and shellfish is higher than in the Mediterranean diet (44–46); moreover, in the SEAD, the consumption of seaweed is gaining interest in the last few years (28). On the other hand, in DASH, the consumption of fish and shellfish is lower due to the low consumption of protein of animal origin (2). With regard to meat consumption, it is higher with the SEAD, mainly pork and veal (28, 29). On the contrary, in the Mediterranean diet, Nordic diet, and DASH diet, less meat is consumed, and the consumption of lean meat is encouraged (29, 30, 45, 46).

The consumption of fruits, vegetables, and legumes is high in these above-mentioned dietary patterns (45–47). Remarkably, the variety of vegetables consumed differs, however, with vegetables of the *Brassicas* genus being the predominant variety of vegetables consumed in SEAD (44). The same occurs with fruits, where, in SEAD, more apples, pears, or citrus fruits are consumed than in the Mediterranean diet (47) and the Nordic diet (45, 46). With regard to nuts, in the SEAD more chestnuts are consumed, which is a low-calorie nut; in the Mediterranean diet, more hazelnuts, almonds, or pistachios are consumed (44); and in the Nordic diet, more almonds are consumed (45, 46). However, high amounts of fruits and vegetables are consumed, as well as legumes and nuts to provide plant-based protein in the DASH diet (30).

Although bread is present as the basis of both SEAD and the Mediterranean diet, there are differences in the consumption of the sources of complex carbohydrates. The bread consumed in the SEAD is mostly unrefined flour. In SEAD and Nordic diets, the consumption of potatoes predominates, compared with rice and pasta that predominate in the Mediterranean diet (44–46). Also, the consumption of whole grains is highly consumed in the SEAD, Nordic diet, and DASH diets (30, 44–46).

Dairy products are highly consumed in the SEAD, particularly cheeses, compared with the Mediterranean diet and Nordic diet, where their consumption is low and moderate, respectively (29, 44–46), or in the DASH diet, where cheeses consumed are low in fat or without fat and consumed moderately (30).

The main source of fat is olive oil for cooking and dressing in the SEAD and the Mediterranean diet (29, 44). However, canola oil is the main source of fat for cooking and dressing in the Nordic diet (45, 46). Alcohol consumption is moderate in the 4 dietary patterns, based mainly on wine in the SEAD (44) and the Mediterranean diet (29) and in beer in Nordic diet (45, 46). In addition, in the SEAD, the Mediterranean diet, and the Nordic diet there is a moderate consumption of eggs (29, 44–46), and in the DASH diet, sodium consumption is limited to 2300 mg/d (30).

In addition to the differences in the food-group consumption, the SEAD, the Mediterranean diet, and the Nordic diet emphasize sustainable and seasonal foods (29, 45, 46, 48). Moreover the SEAD regions are found in rural areas where pollution is low. (34). The SEAD and Mediterranean diet promote a healthy lifestyle with daily physical activity and enjoying meals as a social act (29, 48).

Specific Properties of the SEAD

The SEAD, also called the "Atlantic diet," represents a dietary pattern associated with the countries in Western Europe that border the Atlantic Ocean: Ireland, Scotland, Wales, southern England, Isle of Man, French Brittany, northern Portugal, and northwestern Spain (Galicia, Leon, and Asturias). Specifically, the SEAD is the characteristic eating pattern of the northwestern parts of the Iberian Peninsula, including Galicia (Spain) and northern Portugal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 1 Differences between servings in the SEAD, Mediterranean diet, DASH diet, and Nordic diet[1]

Components	SEAD (40)	Mediterranean diet (41)	DASH diet (30)	Nordic diet (42, 43)
Whole-grain bread	≥1 servings/d	≥1 servings/d	Not specified	3–4 servings/d
Rice and cereals	≥1 servings/d, whole grain	1–2 servings/main meal	Grains: 6–8 servings/d	Lunch cereals: 1.5 servings/d (muesli, oat bran, barley flakes) Whole grain: 3 servings/wk
Potatoes	≥1 servings/d	≤3 servings/wk	Not specified	>2.5 servings/d
Vegetable oil	Frequent use of olive oil	Frequent use of olive oil	Fat and oils: 2–3 servings/d	Frequent use of canola oil
Fresh fruit	≥2 servings/d	1–2 servings/main meal	4–5 servings/d	>3 servings/d
Vegetables	≥2 servings/d Brassicas, ≥3 servings/wk	≥2 servings/main meal	4–5 servings/d	>3 servings/d
Legumes	≥2 servings/wk	≥2 servings/wk	4–5 servings/wk	High consumption but not a concrete recommendation
Fish	≥3 servings/wk	≥2 servings/wk	≤ 2 servings/d	3–5 servings/wk
Sea food	≥1 servings/wk	Not specified	Not specified	High consumption but not a concrete recommendation
Meat	Pork, ≥1 servings/wk Poultry/game, ≥1 servings/wk Veal, ≥1 servings/wk	White meat, 2 servings/wk Red meat, <2 servings/wk	Lean meat, poultry: ≤ 2 servings/d	Meat, ≤5 servings/wk Poultry, ≤3 servings/wk
Dairy products	≥2 servings/d	2 servings/d	2–3 servings/d (fat-free or low-fat)	1–2 servings/wk
Eggs	≥3 servings/wk	2–4 servings/wk	≤4 servings/wk	Without exceeding total cholesterol intake recommendation
Nuts	Preferably chestnuts, walnuts, and almonds, ≥2 servings/wk	1–2 servings/d	4–5 servings/wk	0.5 servings/d (preferably almonds)
Sweets	Never or hardly ever	≤2 servings/wk	≤5 servings/wk	For weekends
Alcohol[2]	Wine, ≥1 servings/d	Fermented beverages, 1–2 glass/d	≤2 drinks/d for men and ≤1 drink/d for women	Beer in moderation

[1] DASH, Dietary Approaches to Stop Hypertension; SEAD, Southern European Atlantic diet.
[2] Glass/drink: wine, 100 mL; beer, 200 mL.

(33, 49). In 2006, the "Baione Declaration of the Atlantic Diet" was signed by different institutions, which marked the first step towards the generation of the SEAD criteria. Currently, this declaration is known as the "Atlantic Diet Decalogue" and includes a high consumption of fish and seafood; high intake of cereals, potatoes, and legumes; high consumption of fruits and vegetables; olive oil as the primary source of fat; daily consumption of dairy products; moderate consumption of meat; water as the main beverage; simple cooking processes; maintenance of traditional Atlantic food habits; and daily exercise (**Figure 1**) (44, 50).

Food and nutrition

Seafood and fish.

The high intake of fish and seafood (mollusks and crustaceans) in this dietary pattern provides high biological value as proteins and omega-3 fatty acids have a protective effect on cardiovascular health (51), and the high-quality protein could have an important role in delaying sarcopenia (52), which is a frequent cause of poor quality of life and disability in older adults (53). In addition, fish, seafood and shellfish contain important amounts of minerals such as iodine, calcium, or selenium (54).

Meat.

The moderate consumption of meat in the SEAD comes mainly from autochthonous bovine and porcine breeds from extensive livestock farms, where the animals are fed based on grass and milk, in the case of veal (Galician blonde calves and Cachena breed calves), and with chestnuts in the case of pork (Galician Celtic pig) (55, 56). This traditional and sustainable farming system gives the meat certain properties such as a rich content of proteins of high biological value and easy digestion (57), the high content of MUFAs and PUFAs (58, 59), and are an important source of minerals (iron, phosphorus, potassium, calcium, and zinc) and vitamins (mainly from group B) (44).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

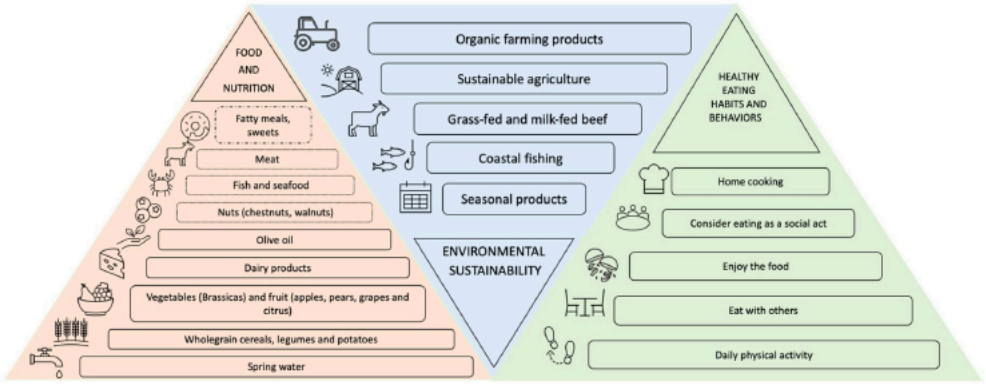


FIGURE 1 Representation of the 3 main features of the SEAD pyramid corresponding to food and nutrition, environmental sustainability, and healthy eating habits and behavior. (*Left*) This triangle illustrates the typical SEAD based on a balanced, varied, healthy diet, including foods that are consumed daily (continuous line), 2–3 times/wk (dashed box)), and occasionally (dotted-dashed box). The recommended frequency for the intakes of the most important groups of foods is illustrated in ascending order, from the most to the least frequent. (*Center*) This triangle describes the typical habits and behaviors in the northwestern parts of the Iberian Peninsula that favor environmental sustainability. (*Right*) This triangle emphasizes the typical eating habits and behaviors of the SEAD that favor healthy living: cooking at home and family meals promote a stress-free environment. Daily physical activity is a part of daily routine in the northwestern parts of the Iberian Peninsula. SEAD, Southern European Atlantic diet.

Vegetables and fruits.
In the SEAD region, there is a high production of *Brassica* vegetables, a genus of plants that includes broccoli, cabbage, collard greens, and *grelos* (*Brassica rapa* L. var. *rapa*, broccoli raab, "nabizas," and turnip). These vegetables are usually consumed cooked or prepared in a broth with pork. It is known that members of the *Brassica* are high in antioxidants and phytochemicals that contribute to the prevention of CVDs (49) and cancer (60).

The apple is the fruit with the highest production in the region and is part of a large number of staple dishes of the SEAD. Pears, grapes, and citrus fruits are also important in this dietary pattern. All of these fruits contain high amounts of fiber, and high fiber intake has known cardiovascular, metabolic (44), and constipation-preventing benefits (61).

Nuts.
Although the consumption of walnuts is important, chestnuts are the most widely nut consumed under the SEAD. They have been used as a food source in Europe since the Middle Ages and in northwestern Spain; in communities that had low access to cereal flour, chestnuts were used as the main source of carbohydrates (62). Currently, chestnuts are consumed alone as snacks or used to prepare creams and soups. These nuts are rich in PUFAs (63) and tocopherols, and also have the highest concentrations of phytosterols compared with other nuts (62). In a recent study, mice that were supplemented with chestnuts had reduced abdominal adipose tissue and lower serum cholesterol concentration than those that were fed a standard diet (64). These results suggest that chestnuts may have an important role in regulating adipose tissue deposition and maintaining good health.

Cereals, complex carbohydrates.
Carbohydrates contribute 50% of the caloric intake, with whole grains, legumes, and potatoes being the main sources of carbohydrates (49). In fact, the consumption of baked and cooked potatoes [nonfried potatoes, even with skin (*cachelos*)] in the northwest is the highest in the Iberian Peninsula and bread (mainly with unrefined flour) intake is higher than in other regions, which have a higher consumption of rice and pasta. It is known that baked potatoes have a lower glycemic index than rice and fried potatoes, and in a recent meta-analysis of prospective cohort studies diets with high glycemic indices and glycemic loads were predictive of the development of type 2 diabetes (65).

Dairy products.
Dairy products, especially cheese, which occupy a relevant place in the SEAD in addition to milk, are consumed daily in the SEAD and are sources of high-value protein, calcium, and vitamins. Fermented milk products are probiotic foods that contain beneficial live microbiota (66). Also, dairy products increase bone mineral content during childhood (67).

Olive oil.
The main source of fat in the SEAD is olive oil, which is used for seasoning and grilling. It provides MUFAs, antioxidants,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and other bioactive components (phytosterols, tocopherols, and pigments) with known health benefits (44).

Healthy habits and behaviors

Exercise is an important component of a healthy lifestyle, and complements diet in this dietary pattern. In the SEAD geographical area, there are many factors that promote physical activity, such as warm weather, trails, rivers, and multiple spaces for hiking. Thus, the climate and geography make it a region where physical activity can be undertaken outdoors for most of the year (44).

As mentioned above, the SEAD is a dietary pattern; thus, in addition to the types of food that make up the SEAD, how the food is eaten is also important. Traditional Atlantic food habits include home cooking, eating meals together, enjoying the food, and considering eating food as a social act. In fact, gastronomic festivals are typical in this region and they are a main topic in the tourism policy of the Galician government (68, 69). All of these features contribute to improving well-being, which is becoming increasingly important as mental illness increases in a society subjected to many types of economic, social, and environmental stress.

General health and mental well-being are closely related to healthy behaviors, where SEAD plays an important role by including healthy and sustainable nutritional habits together with other lifestyles and social factors that have a direct and beneficial impact on health and society. A stress-free environment may be relevant for mental health disorders (70) and this fact highlights the need for further exploration of the link between SEAD and well-being in order to unravel the potential collateral benefits of this relationship, so that they can be implemented to improve the well-being of society.

Environmental sustainability

Food sustainability is a relevant topic in future policies on food production and consumption. It is quite important to promote sustainable consumption patterns in society. In this regard, it has been demonstrated that the SEAD can be considered as an example of a sustainable diet despite being a diet that includes animal-based foods at its core, including meats (71, 72). A recent analysis of the SEAD has shown that this dietary pattern has a significant effect on climate change. An evaluation was carried out by quantifying the carbon footprint following the Life Cycle Analysis methodology and identifying its nutritional quality, according to the value of the Nutrient-Rich Dietary index (NRD9.3). The carbon footprint of the SEAD was 3.01 kg CO_2 eq · person^{-1} · d^{-1}, and the SEAD had a high nutritional score (72). Esteve-Llorens et al. (72) reported that the SEAD had a better environmental and nutritional impact than the current diet in the region, concluding that the SEAD has a low environmental impact and promotes food safety and quality. This fact could be counterintuitive considering that higher consumption of meat has a higher impact on climate change through higher production of greenhouse gas (GHG) emissions (71). However, although the SEAD is an omnivorous diet with a significant presence of foods of animal origin, it has environmental indices such as the water footprint and carbon footprint that are in line with those corresponding to other diets with a lower intake of this type of food. One of the main reasons for these results is the characteristic of this diet that promotes the consumption of seasonal, local foods and a balanced intake of different food categories. This fact is especially favored by the size of the cities in the SEAD region, since the number of inhabitants living in 50% of them is less than 100,000 inhabitants and the population density in this region is 125.8 inhabitants/km^2 (73, 74). Therefore, in times of global environmental change, there is an urgent need for a sustainable agricultural and livestock policy, such as the one based on traditional breeding schemes (75, 76). Extensive livestock farms based on autochthonous breeds promote this specialization of traditional, rural, and ecological production systems typical of the SEAD regions.

Scientific Evidence for the Beneficial Health Effects of the SEAD

To show the scientific evidence for the beneficial health effects of the SEAD, a systematic review based on the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) protocol was conducted. For this purpose, an electronic search of PubMed was carried out using appropriate keywords, as follows: "Atlantic Diet" OR "Southern European Atlantic Diet." The database was searched up to September 2021, without a time limitation. Thus, 24 articles were identified through this database search, and a total of 19 studies investigating beneficial health effects of the SEAD were finally assessed (**Figure 2**). The different scientific studies that have reported the beneficial health effects of SEAD are summarized in **Table 2**.

In a population-based, case-control study by Oliveira et al. (77) conducted in adults with (n = 820) and without (n = 2,196) a history of incident acute myocardial infarction, it was shown that a greater adherence to the SEAD was associated with a lower probability of nonfatal acute myocardial infarction. In addition, some components of the SEAD may contribute to the very low mortality from CVDs in northern Portugal and Galicia. Guallar-Castillón et al. (51) analyzed the association between the SEAD and coronary risk biomarkers in a cross-sectional study conducted in 10,231 individuals; the study showed that the SEAD was associated with lower concentrations of inflammation markers and a reduction in triglyceride concentrations, insulin concentrations, resistance to insulin, and blood pressure. In line with the aforementioned findings, in a recent subanalysis with 833 participants from the EVIDENT 2 study, Rodríguez-Martín et al. (83) showed that greater adherence to the SEAD was associated with a lower CVD disease risk, lower total cholesterol and triglyceride concentrations, and lower rates of obesity.

Adherence to the SEAD has also been associated with decreased myocardial infarction risk due to its links with reduced triglyceride concentrations, inflammatory markers, insulin concentrations, and blood pressure (51, 83). Some

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

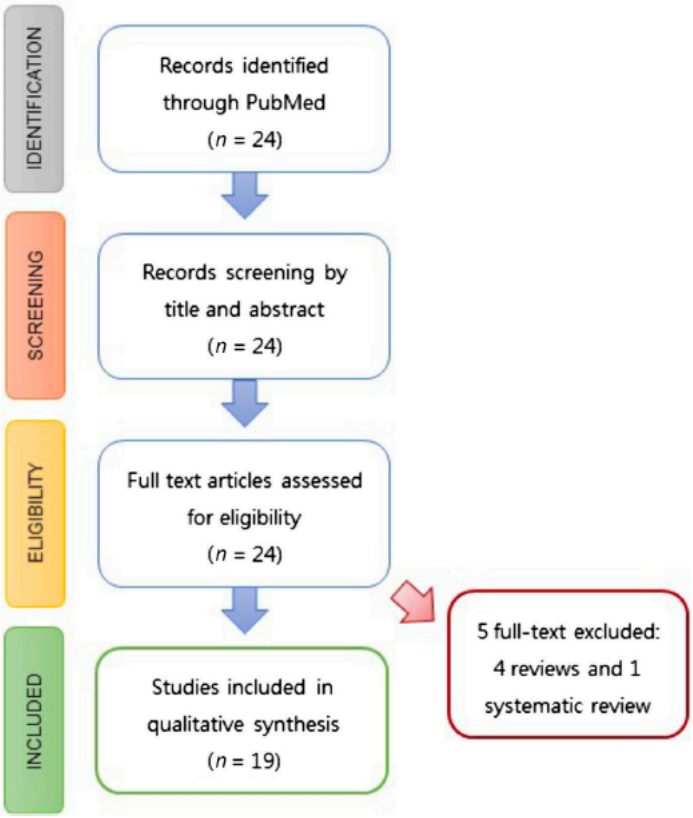


FIGURE 2 Systematic review flow chart.

studies have investigated the combined effects of cardiorespiratory fitness (CRF) or muscular fitness (MF) and the SEAD (78). The first cross-sectional study assessing the combined associations of CRF and the SEAD on cardiometabolic risk was carried out in 468 adolescents aged 15–18 y. Different variables were studied, such as CRF, cholesterol concentrations, insulin concentrations, waist circumference, and systolic blood pressure, among others, from which the metabolic risk score was constructed (78, 86). In this study, it was shown that adherence to the SEAD combined with CRF decreased the metabolic risk score, whereas low adherence to the SEAD was significantly associated with a high metabolic risk score (78).

Although the clinical manifestations of CVD occur in adulthood, the development of atherosclerosis begins during early stages of life, often during childhood (87). A study carried out in an adolescent population evaluated the association of CRF, MF, and adherence to the SEAD with the atherogenic index of plasma (82). Agostinis-Sobrinho et al. (82) observed that the atherogenic index of plasma was inversely associated with CRF, MF, and adherence to the SEAD in adolescents. In addition, adolescents with high adherence to the SEAD, high MF, and high CRF had the lowest atherogenic index of plasma. As part of the same longitudinal school-based study, the same authors investigated the combined impact of MF, adherence to the SEAD, and C-reactive protein concentrations (81). This protein is one the most important inflammatory markers that is released as a proinflammatory acute-phase protein; thus, an anti-inflammatory dietary pattern, such as the SEAD, could exert an effect on the concentrations of the proinflammatory C-reactive protein (88). Several studies have demonstrated C-reactive protein to be a powerful predictor for the development of CVDs and type 2 diabetes (87, 88). The authors concluded that MF was inversely associated with C-reactive protein concentrations, and adolescents with low MF and low adherence to the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 2 Overview of observational and interventional studies that assessed the associations between adherence to the SEAD and health promotion in subjects aged 3–85 y[1]

Reference	Objective	Study design	Measurements	FFQ	Time	Participants (age)	Outcomes
(77)	Adherence to the SEAD and occurrence of nonfatal AMI	Observational	Anthropometric measures, lifestyle information	Yes	4 y (1999–2003)	820 with AMI; 2196 without AMI (≥18 y)	SEAD was associated with lower odds of nonfatal AMI
(51)	Effects of a SEAD on coronary risk	Observational, cross-sectional	Blood and urine biomarkers, anthropometric measures	Yes	2 y (2008–2010)	10,231 (≥18 y)	Decreased in markers of inflammation, TGs, insulin, insulin resistance, and systolic blood pressure
(78)	Effects of CRF and SEAD on metabolic risk	Observational, cross-sectional	Blood biomarkers, blood pressure, anthropometric measures, 20-m shuttle-run test	Yes	—	468 (15–18 y)	SEAD + CRF = decreased metabolic risk score
(50, 79)	Effects of the SEAD on anthropometric indices and lipid profile	Interventional, randomized. GALIAT study	Blood biomarkers, anthropometric measures	Yes	6 mo	720 (3–85 y)	Decreased in cholesterol, weight, BMI and % body fat mass
(66)	SEAD and gut microbiota	Observational	Fecal, anthropometric measures	Yes	—	31 (18–65 y)	Increased of healthy microbiota
(80)	Effects of MF and SEAD on cardiometabolic risk	Cross-sectional "Azorean Physical Activity and Health Study II"	Blood biomarkers, blood pressure, anthropometric measures, 20-m shuttle-run test, curl-up and push-up test	Yes	1 y (2009)	467 (15–18 y)	SEAD + MF = decreased systolic blood pressure, waist circumference, metabolic risk factors
(81)	Effects of MF and SEAD on inflammation	Cross-sectional Azorean Physical Activity and Health Study II	Blood biomarkers, anthropometric measures, curl-up and push-up test	Yes	1 y (2009)	463 (15–18 y)	High adherence to SEAD decrease C-reactive protein
(82)	Effects of MF, CRF, and SEAD on AIP	Cross-sectional Azorean Physical Activity and Health Study II	Blood biomarkers, blood pressure, anthropometric measures, 20-m shuttle-run test, curl-up and push-up test	Yes	1 y (2009)	493 (15–18 y)	High adherence to SEAD decrease AIP

(*Continued*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 2 (*Continued*)

Reference	Objective	Study design	Measurements	FFQ	Time	Participants (age)	Outcomes
(83)	Analyze the relations of SEAD with cardiovascular risk factors, obesity indexes, and arterial stiffness markers	Interventional randomized subanalysis of EVIDENT-II study	Blood biomarkers, blood pressure, physical activity, anthropometric measures	Yes	2 y (2014–2016)	791 (20–70 y)	Decreased in cardiovascular risk, total cholesterol, TGs, and lower rates of obesity
(84)	Fatty acid profile of breast milk from lactating women in Galicia	Observational, cross-sectional	Human-milk mineral composition, anthropometric measures	Yes	3 y (2016–2019)	102 (≥18 y)	Increased iron in breast milk of women with SEAD
(85)	Association between adherence to the SEAD and all-cause mortality in older adults	Observational, prospective Seniors-ENRICA-1 study	Physical activity, BMI	Yes	3 y (2008–2010, 2012)	3165 (≥60 y)	Adherence to the SEAD is associated with lower risk of all-cause of mortality

[1]AIP, Atherogenic Index of Plasma; AMI, acute myocardial infarction; BMI, body mass index; CRF, cardiorespiratory fitness; FFQ, food-frequency questionnaire; GALIAT, Galicia Alimentación Atlántica (Galicia Atlantic Diet); MF, muscular fitness; SEAD, Southern European Atlantic diet; TG, triglyceride.

Atlantic diet had the highest C-reactive protein values. For this reason, the combined effect of high MF and high adherence to the SEAD played a key role in low-grade inflammation in adolescents (81). Additionally, in the same Azorean population that was studied, it was observed that the SEAD was inversely correlated with systolic blood pressure, waist circumference, and the cardiometabolic risk score. In fact, low MF with low adherence to the SEAD was associated with the highest cardiometabolic risk score (80).

Although there is no scientific evidence on the role of the SEAD in cancer until now, certain components of this dietary pattern are associated with a decreased risk of the incidence of some types of cancer. The SEAD comprises foods rich in bioactive compounds with potential cancer-fighting effects, such as resveratrol, which is present in grapes and red wine, which has shown potential in vitro anticancer effects on various tissues and cell lines, including in breast cancer (14). Preclinical studies have shown that certain components, such as glucosinolates from *Brassica* vegetables, have anticancer properties (33, 60). In addition, the SEAD also has beneficial environmental impacts. As certain environmental pollutants are associated with complications that can manifest into serious illnesses over time, such as cancer, high adherence to the SEAD could reduce the risk of cancer (89, 90). More studies are warranted to evaluate the beneficial effects of this dietary pattern on cancer.

Interestingly, dietary quality also influences other important aspects, such as the nutritional composition of breast milk (91). It has been observed that the concentrations of some nutrients, such as PUFAs, in the mother's diet and in human milk are correlated (92). However, no correlation was observed for iron and other minerals (zinc and chromium) (93). Nevertheless, a recent analysis from 75 human-milk samples from Galicia in northwestern Spain showed a positive association between adherence to the SEAD and iron content in breast milk (84). As previously mentioned, this dietary pattern is characterized by a high consumption of meat; thus, maternal adherence to the SEAD could influence the iron content in breast milk, which has a fundamental role in infant development (94). Moreover, it has been shown that Galician breast milk has high concentrations of the PUFAs α-linolenic acid (18:3n−3) and linoleic acid (18:2n−6), due to the high intake of especially fish, and also nuts. It is known that the quality of fats rather than the total amount plays an important role in an infants' neurological and retina development (95, 96).

Another important aspect to consider is the role of dietary patterns in microbiota profiles. Gut bacteria play an important role in various metabolic processes and human diseases, such as obesity and its accompanying comorbidities such as diabetes and adverse cardiovascular events (97, 98). Both diet and physical activity influence different microbiota profiles. In fact, it is known that dietary patterns, probiotics, and other factors such as stress, age, exercise, and climatic conditions can dramatically affect the balance and diversity of the human gut microbiota (99). The proportion of different microbial populations in the human intestine in relation to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

adherence to the SEAD was studied, and it was observed that the only bacterial group that demonstrated statistically significant differences was the genus *Bifidobacterium* spp., whose concentrations were greater in participants who adhered to the SEAD (66). *Bifidobacterium* spp. plays an important role in the human body as it participates in important physiological functions, such as the development of the immune response (100), and several species are considered probiotics (101). Hence, it is believed that *Bifidobacterium* spp. has a protective effect on health. The genus has been linked to the concept of a healthy microbiota (102–104) and is closely associated with the consumption of dairy products. Fermented milks, which is 1 of the 10 points in the Atlantic Diet Decalogue (66, 105), have probiotics able to reduce lactose malabsorption (106), a fairly common problem in the Galician population (107).

Scientific evidence published to date shows that the SEAD is associated with improvements in general health. In line with this, in a representative cohort of noninstitutionalized persons aged ≥60 y in Spain, higher adherence to the SEAD was associated with lower all-cause mortality. Nevertheless, the associations between the food components of the SEAD and all-cause mortality were weak, except for moderate wine consumption (85). This result reinforces the idea that the benefits of this dietary pattern are due to the cumulative effect of individual foods and the interactions between the food components (108).

In the current coronavirus disease 2019 (COVID-19) era, studies linking dietary recommendations and the risk of infections are scarce. Viral infections are characterized by the production of reactive oxygen species (ROS), which can lead to decreased immunity in an organism (109). Thus, obtaining appropriate amounts of natural antioxidants from dietary sources could be of particular relevance during the current COVID-19 pandemic. In this context, healthy dietary patterns, such as the SEAD, provide the recommended amounts of essential vitamins, minerals, and phenolic compounds needed to activate antioxidant responses to maintain the immune system, with the exception of vitamins D and E, which should be supplemented, especially in vulnerable populations (110). Further studies are needed to evaluate the role of a dietary pattern based on the SEAD in the prevention and management of COVID-19.

Most of the studies performed to date that have assessed the beneficial effects of the SEAD have been observational, based on the evaluation of adherence to the SEAD. To the best of our knowledge, there is only 1 clinical trial that examined the effects of the SEAD on metabolic health, cardiovascular health, and adiposity: the GALIAT [Galicia Alimentación Atlántica (Galicia Atlantic Diet)] study (111). This was a randomized, controlled, dietary intervention clinical trial that evaluated the potential effects of this dietary pattern on glucose metabolism, inflammation markers, lipid profiles, and adiposity in 250 families (715 adults and children aged >3 y). The sample unit was the family, and each family was randomly assigned to either the control diet group or SEAD group (AD group) for a period of 6 mo. The families in the AD group received educational sessions on food, diet, and gastronomy. Moreover, they attended cooking lessons and were provided with a range of foods characteristic of the traditional SEAD. Some results of this nutritional intervention were decreases in cholesterol concentrations, body weight, BMI, and body fat mass percentages in the AD group (50, 111, 79). Therefore, more intervention studies with large sample sizes and longer follow-up are needed to evaluate the effects of the SEAD on human health.

Evidence of the Epigenetic Effects Induced by the SEAD Components

The term "epigenetics" refers to the study of the different molecular mechanisms that regulate the expression of genes without changes in the underlying DNA nucleotide sequence, ultimately determining the phenotype from the genotype and playing an important role in healthy development (112, 113). These changes in gene expression respond to the state of transcriptional activation or inactivation of genes and are regulated by the action of epigenetic mechanisms that are relevant throughout the life course and at different stages of embryonic development (114, 115). Epigenetic mechanisms are important molecular regulators that include DNA methylation, one of the most present in the organism and one of the most studied, histone post-translational modification and regulatory noncoding RNAs (ncRNAs), currently considered as health actors (116, 117) (**Figure 3**). They are characterized by being transmissible to the following generations (118), and by changing in response to specific stimuli of the organism (117). For these reasons, epigenetic mechanisms are characterized by being hereditary, dynamic, and reversible.

Epigenetic mechanisms are subject to the action of various environmental factors and external agents, such as lifestyle, nutrition, physical activity, stress, or exposure to pathogens and toxins, among others (5), with nutrition being a relevant environmental factor in health. In fact, nutritional epigenetics is currently postulated as a potential study tool for understanding the interconnection between genes and diet (24–26).

Along with the modulating role of the environment determined by our lifestyles, aging itself increases the susceptibility to a wide range of diseases (119, 120). The application of epigenetic clock models to data generated by epigenome-wide association studies that are focused on dietary intake and nutritional interventions is helping uncover the dietary determinants of healthy aging (121–124). Interestingly, a comparison of different molecular predictors of age indicated that the epigenetic clock had the highest correlation with biological age (125).

In this context, recent studies have shown that a low BMI, exercise, and consumption of fish, poultry, fruits, and vegetables (126) reduce the acceleration of the epigenetic clock. Dietary factors such as folate and related B vitamins are emerging as modifiers of epigenetic age because they can

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

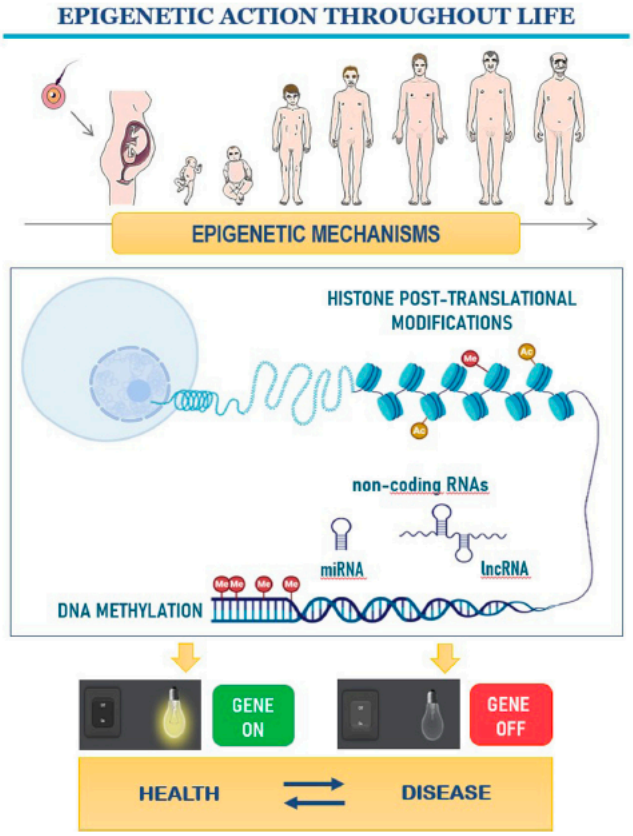


FIGURE 3 Role of epigenetic mechanisms during development and aging. Histone post-translational modifications, DNA methylation, and non-coding RNAs (miRNA and lncRNA) are involved in the regulation of gene expression, which induce the activation or inactivation of genes. This regulation is involved in the proper functioning of an organism and, if it becomes aberrant, it can promote disease onset. Part of this figure was produced using modified elements from BioRender.io (Toronto, ON, Canada). lncRNA, long-noncoding-RNA; miRNA, micro-RNA.

modulate DNA methylation (127). Therefore, we hypothesized that the components provided by the SEAD may have an important contribution in improving health outcomes with respect to diseases related to age and life expectancy.

Epigenetic effects of food and nutrients

The foods included in the SEAD contain bioactive and functional compounds, such as omega-3 fatty acids, sterols, flavonoids, carotenoids, and glucosinolates, that have beneficial health effects (49). In addition, the cooking techniques used in this dietary pattern preserve these bioactive compounds better than other culinary techniques such as frying (50). In this section, we focus on the actions that the main foods of the SEAD exert on health through epigenetic mechanisms (**Table 3**, **Figure 4**).

Experimental studies in animal and cell models have shown that compounds contained in the *Brassicaceae* family and their derivatives exert beneficial health effects, such as preventing the development of cancer (135). This protective effect is mediated through epigenetic markers, which act as regulators and inhibitors of the expression factors present in most cancers (136). Glucosinolates induce changes in DNA methylation that reduce the risk of developing certain chronic diseases (137), and the chemopreventive and health-promoting properties of cruciferous vegetables could be mediated by mechanisms related to ncRNAs (138). More studies are needed, especially in humans, to determine which epigenetic markers occur as a result of the incorporation of these cruciferous vegetables into the diet, not only in cancer prevention but also in many other biological processes in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 3 Summary of the bioactive compounds present in the SEAD and their effects on health in the general population[1]

Bioactive compound	Dietary source	Effects on health
Sulfur compounds		
Glucosinolates	Turnip greens, cabbage, collard greens	Anticancer Cholesterol-lowering (128)
Aliaceae	Onion, garlic, leek	Anticancer Cholesterol-lowering antihypertensive (128)
Omega-3 fatty acids	Fish, shellfish, walnuts	Anti-inflammatory (129, 130)
Bioactive peptides	Dairy products	Antihypertensive (131)
Polyphenols		
Flavonoids	Onion, leek, tomato, apple, pear, grape, lettuce, or citrus	Antioxidant capacity Antithrombotic Anti-atherosclerotic Anti-inflammatory (132)
Resveratrol	Grape skin and wine	Antioxidant capacity Antithrombotic Anti-atherosclerotic Anti-inflammatory (132)
Carotenoids		
Carotenes	Dark-green leafy vegetables, orange vegetables and fruits	Antioxidant capacity (132) Anticancer Cholesterol-lowering (133)
Xanthophylls	Green leafy vegetables, potatoes, tomato, red pepper, egg yolk	Antioxidant capacity (132) Anticancer Cholesterol-lowering (133)
Plant sterols	Olive oil, nuts	Cholesterol-lowering (134)
Vitamins		
Vitamin C	Citrus, cabbage, peppers, peas	Antioxidant capacity (49)
Vitamin E	Tomato, peppers, lettuce, peas	Antioxidant capacity (49)
Folic acid	Green leafy vegetables	Anticancer Prevents degenerative diseases Important in embryonic development (49)

[1] SEAD, Southern European Atlantic diet.

chronic diseases that involve inflammation and elevated cell proliferation.

Carotenoids have anticancer properties that have been shown to be driven by changes in the DNA methylation of genes responsible for proangiogenic processes (139). Polyphenols, which include flavonoids and stilbenes such as resveratrol, can alter epigenetic cellular mechanisms associated with potential health-promoting effects (140, 141). Polyphenols reverse adverse epigenetic regulation by altering epigenetic markers, resulting in the reactivation of favorable genes (silenced tumor suppressors, antioxidant genes, and DNA repair genes) or inactivation of harmful genes (oncogenes involved in inflammation, cell cycle progression, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis) (142).

The positive action of polyphenols on the body, mediated by epigenetic mechanisms, inhibits the development of pathologies such as CVDs (143–146), metabolic syndrome (147, 148), obesity (149), and cancer (150, 151), among others.

Omega-3 fatty acids and selenium contained in fish and shellfish possess anti-inflammatory and hypotriglyceridemic properties that are attributed to their alteration of genes carried out by epigenetic mechanisms such as DNA methylation (152) and microRNAs (153). Recently, anti-obesity effects and efficacy against metabolic syndrome have been attributed to omega-3 fatty acids, and research has shown that these effects are due to the epigenetic action carried out by these components when counteracting the associated metabolic changes (154, 155). Other beneficial actions of omega-3 fatty acids associated with epigenetic markers have been reported in research related to other disease areas such as cancer (156), Alzheimer disease (157), and CVD (158, 159). There are some studies on the favorable effects of selenium on health, which are also regulated by epigenetic modifications (160).

In addition, olive oil, dairy products, and foods rich in vitamins are present in the SEAD, which also have nutrients and bioactive components that promote proper functioning

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

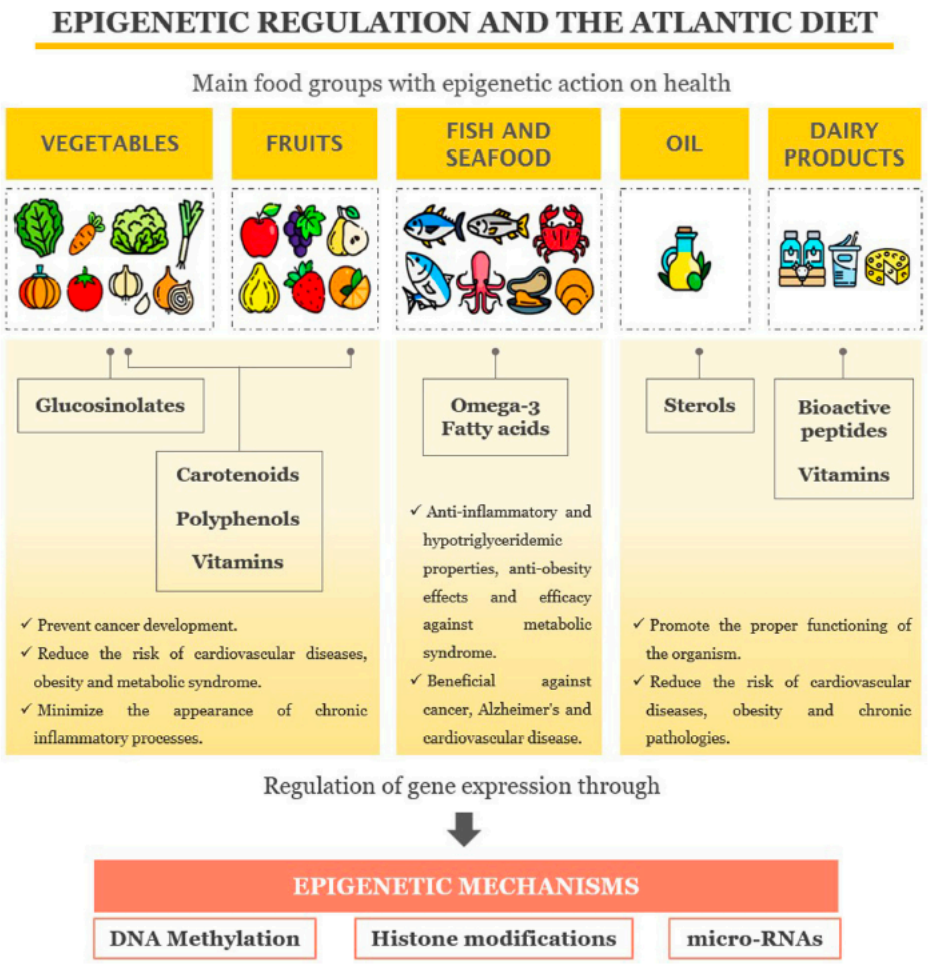


FIGURE 4 Representation of the epigenetic effects of bioactive compounds in foods of the Southern European Atlantic diet to promote health benefits.

of the body and reduce the risk of developing obesity and chronic diseases (2). Studies have shown that epigenetics may be regulating these processes (161–165).

Epigenetic effects of exercise

Recent research shows that exposure of an organism to certain external agents, such as diet and physical exercise, can trigger alterations in the epigenome (126, 166, 167). This implies that nutrients and physical activity influence the expression of genes and, therefore, have a relevant role in health status and disease prevention in individuals. In this context, physical activity is able to induce a modulation in gene expression, and this modulation can be mediated by epigenetic mechanisms (168). Furthermore, the effect of physical exercise on gene expression depends on the type, intensity, duration of exercise, as well as on sex and age (169). Thus, the beneficial effects of moderate exercise on health, mainly its anti-inflammatory potential (169, 170), improvements in clinical outcomes (171), and reduction in the risk of noncommunicable diseases (170), may be mediated by epigenetic mechanisms (169, 170). Recent studies have reported that exercise causes a decrease in the methylation of many genes; in contrast, other studies have reported that the levels of methylation increase in some genes with physical activity (**Table 4**) (168–177).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 4 Overview of observational and interventional studies that assessed the associations between adherence to physical exercise and epigenetic effects in adults aged >18 y[1]

Reference	Type of physical exercise	Epigenetic modifications	Participants (age)	Sample
(173)	At least 30 min/d of physical activity ≤10 min/d of physical activity	Increased level of global DNA methylation with physical activity	131 (45–75 y)	Peripheral blood
(172)	Physical activity across 3 time periods (≥9.8 h/wk in childhood, 5.9 h/wk in adolescence, and 12.5 h/wk in past 12 mo)	Increased level of percent global DNA methylation	647 non-Hispanic White women with a family history of breast cancer (35–74 y)	Peripheral blood
(178)	Physical exercise intervention for 6 wk Resistance exercise plus walking	Changes in methylation of 756 CpG sites	8 colorectal cancer survivors (>50 y)	Peripheral blood
(174)	3 mo of aerobic physical exercise intervention	Increased level of global DNA methylation Increased levels of DNA methylation in genes involved in blood pressure	68 (22–70 y)	Peripheral blood
(22)	6 mo of endurance exercise	Changes in global DNA methylation of genes important in muscle physiology	13 men without family history of T2D; 15 men with family history of T2D (32–44 y)	Skeletal muscle
(176)	1 wk of acute exercise	Changes in global DNA methylation of genes important in muscle physiology	14 healthy and sedentary (25 ± 1 y)	Skeletal muscle
(23)	6 mo of endurance exercise intervention	Changes in DNA methylation of adipocyte-specific genes	16 healthy and sedentary men without family history of T2D; 15 healthy and sedentary men with family history of T2D (32–42 y)	Adipose tissue
(177)	Acute exercise plus 6 wk of intensive exercise program (45-min cycling sessions 5 d/wk)	Changes in DNA methylation of adipocyte-specific genes	15 healthy and sedentary men (19–27 y)	Adipose tissue

[1] T2D, type 2 diabetes.

Several epigenetic markers were found to be altered in response to exercise, with a potential influence on skeletal muscle metabolism. However, whether these epigenetic markers play a role in the physiological impact of exercise is unclear (22). On the other hand, in men with a history of low physical activity levels, a 6-mo exercise intervention altered the level of DNA methylation of numerous CpG sites in genes that affect adipocyte lipogenesis (23). Currently, there is still a lack of clear data on the role of the type of exercise on epigenetic modulation. Therefore, the main objective of future studies should focus on developing panels of specific epigenetic markers that allow predicting the reaction of an individual to stimulation by a specific exercise-training regimen (168).

Epigenetic effects of psychological well-being

The tradition of family meals is an important aspect of the SEAD. Several studies have suggested that healthier family meals benefit the nutritional health of family members, with positive benefits on weight-related health, particularly in young individuals and children (179–181). It has currently been reported that frequent family meals help overcome several challenges, such as costs of healthy foods, scheduling, differences in food preferences, etc. The home environment is very important for mealtime, and lack of organization and a frantic pace of life are associated with an inadequate diet. On the contrary, low levels of household chaos, fixed dinnertime routines, and family cohesion have been linked to better nutrition and eating behaviors, with higher childhood intake of healthier foods such as fruits or vegetables, lower consumption of fast foods, and lower standardized BMI scores among children and parents being observed (179, 182, 183). Furthermore, adolescent involvement in food preparation has been associated with improved dietary quality and healthier eating patterns for the family.

Family meals also provide opportunities for communication and connections among members, which exerts a protective effect against adolescent participation in risky health behaviors and promotes social and psychosocial well-being (184–187). Thus, meal preparation and family mealtimes could be parts of an intervention program to improve family health and prevent obesity.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

The protective role of family meals against disordered eating behaviors among young individuals has been demonstrated in numerous studies (188–191). In line with this, nutritional psychiatry is based on the relation between dietary patterns and psychiatric pathologies (depression, anxiety, and bipolar disorder). Dietary intervention studies, for example, the SMILES and HELFIMED trials (192–194), reported a reduction in depressive symptoms; however, the molecular mechanisms involved in this relation are still poorly understood. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation are present in neuropsychiatric pathologies. Epigenetics also plays an important role in the pathogenesis of psychiatric disorders. Several studies have shown that environmental factors, such as stress, act through epigenetic mechanisms that lead to changes in gene expression and altered brain function (195, 196). A growing number of studies demonstrate DNA methylation of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis genes as an important mechanism involved in stressful physical and social environments (197). Furthermore, a differential methylation profile was found in association with posttraumatic stress disorder, suggesting a relevant role of epigenetic mechanisms in the development of this pathology (198, 199).

A stress-free environment associated with dietary patterns such as the SEAD could prevent the activation of epigenetic mechanisms associated with mental health disorders.

Epigenetic effects of environmental contaminants

Dietary strategies promote health and well-being and reduce the incidence of diet-related diseases. However, in recent years, dietary strategies have increasingly been investigated as approaches to reduce the environmental impacts of the food system (200). Food production chains and consumption patterns account for one-third of the human impact on climate change; hence, it is important to fight climate change through sustainable diets that are more environmentally friendly (72). The sustainable diets concept, according to the FAO, encompasses those diets with low environmental impacts that contribute to food and nutrition security and to healthy lives for present and future generations. Sustainable diets are protective and respectful of biodiversity and ecosystems, culturally acceptable, accessible, economically fair and affordable, nutritionally adequate, and safe and healthy, while optimizing natural and human resources (201).

Approximately 50% of all GHG emissions from the food system are related to farming activities, which are attributed to emissions of nitrous oxide, methane, and carbon dioxide (202, 203). GHG emissions vary according to food products (especially those of animal origin, e.g., red meat) and the efficiency of the production chain.

The environmental footprints of some diets have been quantified according to the Life Cycle Assessment methodology (204–208) through the determination of the carbon footprint, which is considered an indicator of environmental impact. The SEAD has an approximately 8% lower carbon footprint than that of the Mediterranean diet, due to the SEAD prioritizing the consumption of plant-based, seasonal, fresh, and local products with limited cooking, which translates into a reduction in GHG emissions (72, 209, 210).

In the SEAD, the manufacturing stage is responsible for approximately 78% of the total GHG emissions, while the remaining amount is attributed to the household stage and transport activities. Due to the shorter distribution distances of Galician products, they are associated with low GHG emissions. With regard to food, meat and dairy production is responsible for 26% and 30% of GHG emissions, respectively, whereas the contribution of seafood is 15%. Grain products are basic components of the SEAD, and their contribution is 9% (72, 209).

Thus, the SEAD is not only beneficial for health but also for the environment due to the high intake of vegetables and fish compared with other dietary patterns, as well as the focus on consuming local products with simple cooking methods. These are important characteristics of the SEAD to consider because the presence of manmade chemical pollutants in the environment has increased rapidly over the past 70 y. The harmful effects of these pollutants are predominantly induced by endocrine-disrupting chemicals (211). These chemicals are environmental compounds that interfere with normal endocrine signaling and they are one of the largest classes of toxins that we are exposed to on a daily basis. Endocrine disruptors (EDCs) interfere with hormone signaling pathways in the body. They are synthetic or natural compounds present in the environment that can interfere with endocrine functions (212) as they mimic the actions of endogenous hormones and have impacts at various levels of organization in organisms, from physiological changes (phenotypes) to molecular alterations, including epigenetic modifications (211). EDCs in the environment can be classified as pesticides, plasticizers, industrial by-products, pharmaceuticals, flame retardants, phytoestrogens, or heavy metals such as cadmium (213–215). Environmental pollutants, such as pesticides, can cause both acute and delayed health effects in exposed participants (216). The molecular mechanisms underlying such effects are still under investigation; however, as epigenetic mechanisms such as DNA methylation have already been shown to be activated by external factors, they may be also triggered by environmental factors (217). Early exposure to EDCs has been associated with complications that manifest over time, such as obesity, diabetes, and cancer. The underlying factors for such associations are still unknown; however, they may be likely mediated by EDC-induced epigenetic changes (89, 90). Current evidence indicates that epigenetic markers may mediate the effects of pesticides on human health, including EDCs, persistent organic pollutants, arsenic, various herbicides, and insecticides (218).

Understanding the mechanistic links between EDC- and pesticide-induced epigenetic changes and phenotypic endpoints will be critical in providing improved strategies to better protect the environment and humans from exposure to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

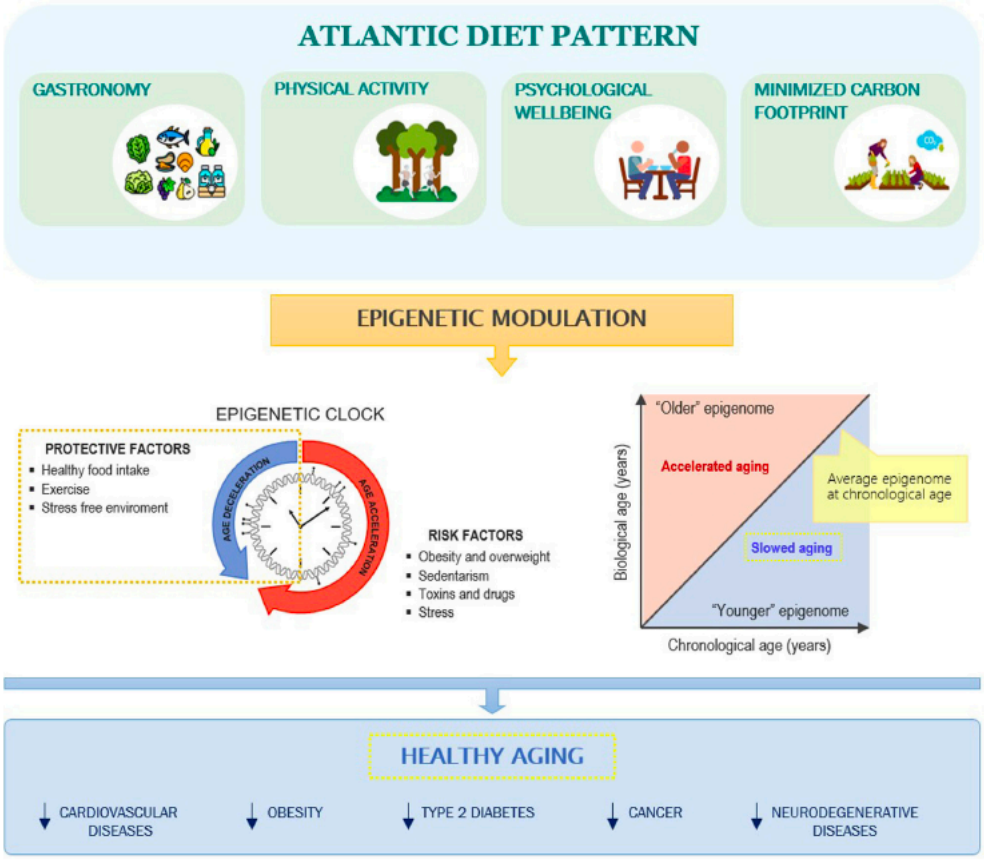


FIGURE 5 Representation of the proposal of the SEAD as an "epigenetic diet." The SEAD involves healthy food, physical activity, promotion of psychological well-being through a stress-free environment, and a reduction in endocrine disruptors by minimizing the carbon footprint. These factors may help modulate mechanisms of the epigenetic clock and, as a result, may improve life expectancy, promote healthy aging, and reduce the risk of several diseases. SEAD, Southern European Atlantic diet.

these contaminants. In recent years, environmental epigenetics aims to analyze compounds, such as EDCs, responsible for inducing epigenetic effects (219, 220). Evidence suggests that environmental exposures markedly affect endocrine-related gene expression and, therefore, affect clinical endocrine outcomes (89). Several investigations have examined the effects of environmental exposures and epigenetic markers and have identified toxic substances that modify epigenetic states (221, 222). Thus, current evidence underscores that epigenetics has substantial potential to broaden our understanding of the molecular mechanisms of the effects of pesticides and EDCs on health, as well as to predict health-related risks due to environmental exposure and individual susceptibility. This risk of disease-promoting epigenetic mechanisms mediated by environmental factors could be prevented by adhering to the SEAD, which is associated with a low consumptive water footprint and carbon footprint (223).

Another major problem for the environment is the drastic increase in the production of plastics, used for food packaging and water bottling, which are easily incorporated into marine ecosystems due to their great stability and durability. These break down into small pieces called microplastics or nanoplastics depending on their size. These fragments are ingested by living beings, joining the food system. The ingestion of micro- and nanoplastics is associated with metabolic and intestinal problems, and some scientific evidence indicates that the ingestion of nanoplastics can induce important epigenetic changes (224). In this regard,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

due to the consumption of seasonal and local foods, the SEAD has a beneficial impact on the environment also by reducing the use of plastics in food packaging.

Conclusions

The SEAD is a specific and traditional dietary pattern from the Southern Atlantic area that shows beneficial effects from both a health and environmental perspective. These beneficial features could induce their effect on increased human survival by means of modulating epigenetic mechanisms. This warrants the necessity to explore the current adherence to a pattern of the SEAD in the population. To this end, there is a score for the study of the adherence to the SEAD, which was designed in 2010 by Oliveira et al. (77) based on population data collected in Porto (northern Portugal). The score has been widely used in different studies. However, the index has some limitations. It does not include the consumption of shellfish or olive oil, 2 basic foods in the Galician diet, as shown by dietary surveys carried out in this population (225, 226). Thus, it is necessary to design a new index of adherence to the Atlantic diet that represents the overall characteristics of the SEAD.

According to the scientific evidence so far, diet plays a critical role in both health and disease. Embracing and promoting healthy diets enriched in nutrients of high biological value, such as the SEAD, are crucial to guarantee the well-being of and disease prevention in the population. New scientific advances in epigenetics and nutrition are necessary to establish the mechanisms through which food interferes with the expression of genes. As epigenetic changes are reversible, epigenetic markers associated with nutrients have been postulated as attractive and promising tools for the prescription of personalized diets to treat diseases. The SEAD has features that are able to modulate epigenetic mechanisms, which could, in turn, promote healthy aging through the consumption of nutritional bioactive compounds, physical activity, promotion of psychological well-being, and reduction in EDCs (**Figure 5**). Therefore, the SEAD could be proposed as an epigenetic diet. The term "epigenetic diet" was coined for the first time in 2011 by Hardy and Tollefsbol (227), based on numerous studies delineating the impact of bioactive dietary compounds on changes in the epigenome. Considering that definition, we propose in this narrative review that the SEAD could be a potential "epigenetic diet" considering that there is scientific evidence regarding the epigenetic effect of its main components (nutrients, healthy habits and behaviors, and environmental sustainability). This proposal strongly warrants further scientific studies to demonstrate the epigenetic value of the SEAD as a whole in promoting healthy aging by slowing down the molecular or physiological aging process.

Acknowledgments

The authors' responsibilities were as follows—ABC: designed the study; PML, AGI, GR-C, AFP, and ABC: designed the study and prepared the figures and tables and wrote the first draft; PML, AGI, GR-C, AFP, AI, MCC, CT, and ABC: performed the literature search through scientific databases; DB, MAM-O, RL, FFC, and ABC: verified eligibility of the papers and critically revised the manuscript; and all authors: read and approved the final manuscript.

References

1. Sales NMR, Pelegrini PB, Goersch MC. Nutrigenomics: definitions and advances of this new science. J Nutr Metab 2014;2014:202759.
2. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Allayee H, Chmurzynska A, Choi MS, Curi R, et al. Guide for current nutrigenetic, nutrigenomic, and nutriepigenetic approaches for precision nutrition involving the prevention and management of chronic diseases associated with obesity. J Nutr 2017;10:43–62.
3. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A. DNA methylation in obesity and associated diseases. In: Epigenetic biomarkers and diagnostics. García-Giménez JL,editor. London, UK: Academic Press, Elsevier; 2016. p.313–29.
4. Izquierdo AG, Crujeiras AB. Epigenetic biomarkers in metabolic syndrome and obesity. In: Prognostic epigenetics. Sharma S,editor. London, UK: Academic Press, Elsevier; 2019. p.269–87.
5. Liu L, Li Y, Tollefsbol TO. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. Curr Issues Mol Biol 2008;10: 25–36.
6. Sayols-Baixeras S, Subirana I, Fernández-Sanlés A, Sentí M, Lluís-Ganella C, Marrugat J, et al. DNA methylation and obesity traits: an epigenome-wide association study. The REGICOR study. Epigenetics 2017;12(10):909–16.
7. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira MC, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. Sci Rep 2017;7(1):41903.
8. Samblas M, Milagro FI, Martínez A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. Epigenetics 2019;14(5):421–44.
9. Shen J, Zhu B. Integrated analysis of the gene expression profile and DNA methylation profile of obese patients with type 2 diabetes. Mol Med Rep 2018;17:7636–44.
10. Martín-Núñez GM, Rubio-Martín E, Cabrera-Mulero R, Rojo-Martínez G, Olveira G, Valdés S, et al. Type 2 diabetes mellitus in relation to global LINE-1 DNA methylation in peripheral blood: a cohort study. Epigenetics 2014;9(10):1322–8.
11. Castellano-Castillo D, Moreno-Indias I, Sanchez-Alcoholado L, Ramos-Molina B, Alcaide-Torres J, Morcillo S, et al. Altered adipose tissue DNA methylation status in metabolic syndrome: relationships between global DNA methylation and specific methylation at adipogenic, lipid metabolism and inflammatory candidate genes and metabolic variables. J Clin Med 2019;8(1):87.
12. Izquierdo AG, Crujeiras AB. Role of epigenomic mechanisms in the onset and management of insulin resistance. Rev Endocr Metab Disord 2019;20(1):89–102.
13. 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. Translat Res 2016;178:13–24, e5.
14. Lorenzo PM, Izquierdo AG, Diaz-Lagares A, Carreira MC, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, et al. ZNF577 methylation levels in leukocytes from women with breast cancer is modulated by adiposity, menopausal state, and the Mediterranean diet. Front Endocrinol 2020;11:245.
15. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Stefansson OA, Macias-Gonzalez M, Sandoval J, Cueva J, et al. Obesity and menopause modify the epigenomic profile of breast cancer. Endocr Relat Cancer 2017;24: 351–63.
16. Crujeiras AB, Morcillo S, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Castellano-Castillo D, Torres E, et al. Identification of an episignature of human colorectal cancer associated with obesity by genome-wide DNA methylation analysis. Int J Obes 2019;43(1):176–88.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

17. Cabrera-Mulero A, Crujeiras AB, Izquierdo AG, Torres E, Ayers D, Casanueva FF, et al. Novel SFRP2 DNA methylation profile following neoadjuvant therapy in colorectal cancer patients with different grades of BMI. J Clin Med 2019;8(7): 1041.
18. Milagro FI, Campión J, Cordero P, Goyenechea E, Gómez-Uriz AM, Abete I, et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. FASEB J 2011;25(4):1378–89.
19. Moleres A, Campión J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, et al. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. FASEB J 2013;27(6): 2504–12.
20. Izquierdo AG, Crujeiras AB. Obesity-related epigenetic changes after bariatric surgery. Front Endocrinol 2019;10:232.
21. Nicoletti CF, Pinhel MAS, Diaz-Lagares A, Casanueva FF, Jácome A, Pinhanelli VC, et al. DNA methylation screening after Roux-en Y gastric bypass reveals the epigenetic signature stems from genes related to the surgery per se. BMC Med Genet 2019;12(1):72.
22. Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, Elgzyri T, Hall E, Nilsson E, et al. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. Diabetes 2012;61(12):3322–32.
23. 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.
24. Arora I, Sharma M, Sun LY, Tollefsbol TO. The epigenetic link between polyphenols, aging and age-related diseases. Genes (Basel) 2020;11:1094.
25. Milenkovic D, Krga I, Aung HH, Leroux C. Molecular nutrition and epigenetics. Reference Module in Food Science. London, UK: Elsevier; 2018.
26. Park LK, Friso S, Choi S-W. Nutritional influences on epigenetics and age-related disease. Proc Nutr Soc 2012;71(1):75–83.
27. Divella R, Daniele A, Savino E, Paradiso A. Anticancer effects of nutraceuticals in the Mediterranean diet: an epigenetic diet model. Cancer Genomics Proteomics 2020;17(4):335–50.
28. Peña-Romero AC, Navas-Carrillo D, Marín F, Orenes-Piñero E. The future of nutrition: nutrigenomics and nutrigenetics in obesity and cardiovascular diseases. Crit Rev Food Sci Nutr 2018;58(17):3030–41.
29. Cena H, Calder PC. Defining a healthy diet: evidence for the role of contemporary dietary patterns in health and disease. Nutrients 2020;12:334.
30. Campbell AP. DASH eating plan: an eating pattern for diabetes management. Diabetes Spectrum 2017;30(2):76–81.
31. Tertsunen H-M, Hantunen S, Tuomainen T-P, Virtanen JK. Adherence to a healthy Nordic diet and risk of type 2 diabetes among men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. Eur J Nutr 2021;60(7):3927–34.
32. Krznarić Ž, Karas I, Kelečić DL, Bender DV. The Mediterranean and Nordic diet: a review of differences and similarities of two sustainable, health-promoting dietary patterns. Front Nutr 2021;8:683678.
33. Velho MV, Pinheiro R, Rodrigues AS. The Atlantic diet—origin and features. Int J Food Stud 2016;5:106–19.
34. Ribeiro AI, Krainski ET, Carvalho MS, Pina M de F. Where do people live longer and shorter lives? An ecological study of old-age survival across 4404 small areas from 18 European countries. J Epidemiol Community Health 2016;70(6):561–8.
35. Instituto Nacional de Estadística. Home page [Internet]. [cited 2021 Nov 22]. Available from: https://www.ine.es.
36. Mathers CD, Stevens GA, Boerma T, White RA, Tobias MI. Causes of international increases in older age life expectancy. Lancet North Am Ed 2015;385(9967):540–8.
37. Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of measurable variable cardiovascular disease' risk factors. Curr Cardiol Rev 2018;14(3): 153–63.
38. Müller-Nordhorn J, Binting S, Roll S, Willich SN. An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. Eur Heart J 2008;29(10):1316–26.
39. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. Eur Heart J 2014;35(42):2950–9.
40. Casanueva FF, Bellido D, Crujeiras AB, Vaz-Velho M LR. Hacia un score de dieta Atlántica. In: Casanueva FF, editor. Bases científicas de la dieta Atlántica. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (Spain); 2020:265–71.
41. Monteagudo C, Mariscal-Arcas M, Rivas A, Lorenzo-Tovar ML, Tur JA, Olea-Serrano F. Proposal of a Mediterranean diet serving score. PLoS One 2015;10(6):e0128594.
42. Olsen A, Egeberg R, Halkjær J, Christensen J, Overvad K, Tjønneland A. Healthy aspects of the Nordic diet are related to lower total mortality. J Nutr 2011;141(4):639–44.
43. Adamsson V, Reumark A, Cederholm T, Vessby B, Risérus U, Johansson G. What is a healthy Nordic diet? Foods and nutrients in the NORDIET study. Food Nutr Res 2012;56(1): 18189.
44. Tejera-Pérez C, Sánchez-Bao A, Bellido-Guerrero D, Casanueva FF. The Southern European Atlantic diet, a review. Minerva Endocrinol 2020;46:145–60.
45. Mithril C, Dragsted LO, Meyer C, Blauert E, Holt MK, Astrup A. Guidelines for the new Nordic diet. Public Health Nutr 2012;15(10):1941–7.
46. Mithril C, Dragsted LO, Meyer C, Tetens I, Biltoft-Jensen A, Astrup A. Dietary composition and nutrient content of the new Nordic diet. Public Health Nutr. 2013;16(5):777–85.
47. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Consumo en hogares. [cited 2021 Nov 22]. Available from:https://www.mapa.gob.es/app/consumo-en-hogares/resultado1.asp.
48. Fundación Dieta Atlántica. Caracteristicas. Fundación Dieta Atlántica. [cited 2021 Nov 22]. Available from: https://www.fundaciondietatlantica.com/caracteristicas.php.
49. Trabazo RL, Pérez C L, Castro Pérez X, Solla P. Atlantic diet. Nutrition and gastronomy in Galicia. Nutr Hosp 2019;36:7–13.
50. Calvo-Malvar MDM, Leis R, Benítez-Estévez AJ, Sánchez-Castro J, Gude F. A randomised, family-focused dietary intervention to evaluate the Atlantic diet: the GALIAT study protocol. BMC Public Health 2016;16(1):820.
51. Guallar-Castillón P, Oliveira A, Lopes C, López-García E, Rodríguez-Artalejo F. The Southern European Atlantic diet is associated with lower concentrations of markers of coronary risk. Atherosclerosis 2013;226(2):502–9.
52. Hanach NI, McCullough F, Avery A. The impact of dairy protein intake on muscle mass, muscle strength, and physical performance in middle-aged to older adults with or without existing sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. Adv Nutr 2019;10(1):59–69.
53. Ethgen O, Beaudart C, Buckinx F, Bruyère O, Reginster JY. The future prevalence of sarcopenia in Europe: a claim for public health action. Calcif Tissue Int 2017;100(3):229–34.
54. Kiczorowska B, Samolińska W, Grela ER,Bik-Małodzińska M. Nutrient and mineral profile of chosen fresh and smoked fish. Nutrients 2019;11:1448.
55. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Catálogo oficial de razas. [cited 2022 Feb 10]. Available from: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/.
56. García-Atance MA, Carleos C, Dunner S, Eusebi PG, Rivero CJ, Justo JR, et al. Genomic characterization of a set of Iberian Peninsula bovine local breeds at risk of extinction: Morenas gallegas. Animal 2020;10(11):1956.
57. De Smet S, Vossen E. Meat: the balance between nutrition and health. A review. Meat Sci 2016;120:145–56.
58. Moreno T, Varela A, Oliete B, Carballo JA, Sánchez L, Montserrat L. Nutritional characteristics of veal from weaned and unweaned calves: discriminatory ability of the fat profile. Meat Sci 2006;73(2): 209–17.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

59. Bispo E, Moreno T, Thomas A, Durand D, Monserrat L, Gonzalez L, et al. Effects of weaning and finishing feeding treatment on fatty acids, especially cis and trans C18:1 isomers, in the longissimus thoracis muscle of Galician blond calves. Animal 2011;5(5):802–12.
60. Charron CS, Vinyard BT, Jeffery EH, Ross SA, Seifried HE, Novotny JA. BMI is associated with increased plasma and urine appearance of glucosinolate metabolites after consumption of cooked broccoli. Front Nutr 2020;7:575092.
61. Boctor D. The role of dietary fibre and prebiotics in the paediatric diet. Paediatr Child Health. 2020;25(4):263–4.
62. De Vasconcelos M, Bennett RN, Rosa EAS, Ferreira-Cardoso JV. Composition of European chestnut (Castanea sativa mill.) and association with health effects: fresh and processed products. J Sci Food Agric 2010;90(10):1578–89.
63. Zlatanov MD, Antova GA, Angelova-Romova MJ, Teneva OT. Lipid composition of Castanea sativa mill. and Aesculus hippocastanum fruit oils. J Sci Food Agric 2013;93(3):661–6.
64. Rodrigues P, Ferreira T, Nascimento-Gonçalves E, Seixas F, Gil da Costa RM, Martins T, et al. Dietary supplementation with chestnut (Castanea sativa) reduces abdominal adiposity in FVB/n mice: a preliminary study. Biomedicines 2020;8(4):75.
65. Livesey G, Taylor R, Livesey HF, Buyken AE, Jenkins DJA, Augustin LSA, et al. Dietary glycemic index and load and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and updated meta-analyses of prospective cohort studies. Nutrients 2019;11:1436.
66. Castro-Penalonga M, Roca-Saavedra P, Miranda JM, Porto-Arias JJ, Nebot C, Cardelle-Cobas A, et al. Influence of food consumption patterns and Galician lifestyle on human gut microbiota. J Physiol Biochem 2017;74:1–8.
67. de Lamas C, de Castro MJ, Gil-Campos M, Gil Á, Couce ML, Leis R. Effects of dairy product consumption on height and bone mineral content in children: a systematic review of controlled trials. Adv Nutr 2019;10(Suppl):S88–96.
68. Turismo de G. Las ferias gastronómicas ocupan un lugar muy relevante en la política turística de la Xunta de Galicia [Internet]. 2015. [cited 2021 Nov 22]. Available from: https://www.turismo.gal/espazo-institucional/actualidade/detalle-nova?content=nova_0625.html.
69. Castro X. Yantares gallegos: historia de la dieta Atlantica. Santiago de Compostela, Spain: Universidade de Santiago de Compostela; 2013.
70. Marx W, Lane M, Hockey M, Aslam H, Berk M, Walder K, et al. Diet and depression: exploring the biological mechanisms of action. Mol Psychiatry 2020;26:134–50.
71. González-García S, Green RF, Scheelbeek PF, Harris F, Dangour AD. Dietary recommendations in Spain—affordability and environmental sustainability? J Cleaner Prod 2020;254:120125.
72. Esteve-Llorens X, Darriba C, Moreira MT, Feijoo G, González-García S. Towards an environmentally sustainable and healthy Atlantic dietary pattern: life cycle carbon footprint and nutritional quality. Sci Total Environ 2019;646:704–15.
73. Instituto Galego de Estadística. Concellos e a súa poboación clasificados polo número dos seus habitantes. Padrón municipal de habitantes. Ano 2021 [Internet]. 2021. Available from:https://www.ige.eu/igebdt/esqv.jsp?paxina=001&c=0201001002&ruta=verPpalesResultados.
74. Instituto Galego de Estadística. [Internet]. Available from: https://www.ige.eu/web/mostrar_seccion.jsp?idioma=gl&codigo=0609.
75. Gicquel E, Boettcher P, Besbes B, Furre S, Fernández J, Danchin-Burge C, et al. Impact of conservation measures on demography and genetic variability of livestock breeds. Animal 2020;14(4):670–80.
76. Medugorac I, Medugorac A, Russ I, Veit-Kensch CE, Taberlet P, Luntz B, et al. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. Mol Ecol 2009;18(16):3394–410.
77. Oliveira A, Lopes C, Rodríguez-Artalejo F. Adherence to the Southern European Atlantic diet and occurrence of nonfatal acute myocardial infarction. Am J Clin Nutr 2010;92(1):211–7.
78. Moreira C, Santos R, Moreira P, Lobelo F, Ruiz JR, Vale S, et al. Cardiorespiratory fitness is negatively associated with metabolic risk factors independently of the adherence to a healthy dietary pattern. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2013;23(7):670–6.
79. Calvo-Malvar M, Benítez-Estévez AJ, Sánchez-Castro J, Leis R, Gude F. Effects of a community-based behavioral intervention with a traditional Atlantic diet on cardiometabolic risk markers: a cluster randomized controlled trial (the GALIAT study). Nutrients 2021;13:1211.
80. Agostinis-Sobrinho C, Abreu S, Moreira C, Lopes L, García-Hermoso A, Ramírez-Vélez R, et al. Muscular fitness, adherence to the Southern European Atlantic diet and cardiometabolic risk factors in adolescents. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2017;27(8):695–702.
81. Agostinis-Sobrinho C, Brand C, Moreira C, Lopes L, Oliveira-Santos J, Silva P, et al. Muscular fitness, Southern European Atlantic diet and inflammation in adolescents. Azorean Physical Activity and Health Study II. Eur J Sport Sci 2018;18(1):104–11.
82. Agostinis-Sobrinho C, Dias AF, Brand C, Norkiene S, Abreu S, Gaya ACA, et al. Adherence to Southern European Atlantic diet and physical fitness on the atherogenic index of plasma in adolescents. Cad Saude Publica 2019;35:e00200418.
83. Rodríguez-Martín C, Garcia-Ortiz L, Rodriguez-Sanchez E, Maderuelo-Fernandez C, Lugones-Sanchez A, Martin-Cantera MS, et al. The relationship of the Atlantic diet with cardiovascular risk factors and markers of arterial stiffness in adults without cardiovascular disease. Nutrients 2019;11:742.
84. Sánchez C, Fente C, Barreiro R, López-Racamonde O, Cepeda A, Regal P. Association between breast milk mineral content and maternal adherence to healthy dietary patterns in Spain: a transversal study. Foods (Basel) 2020;9:659.
85. Carballo-Casla A, Ortolá R, García-Esquinas E, Oliveira A, Sotos-Prieto M, Lopes C, et al. The Southern European Atlantic diet and all-cause mortality in older adults. BMC Med 2021;19(1):36.
86. Moreira C, Santos R, Vale S, Soares-Miranda L, Marques AI, Santos PC, et al. Metabolic syndrome and physical fitness in a sample of Azorean adolescents. Metab Syndr Relat Disorder 2010;8(5):443–9.
87. Balagopal P,de Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, Gidding SS, Hayman LL, McCrindle BW, et al. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth. Circulation 2011;123(23):2749–69
88. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. Circ Res 2001;89(9):763–71.
89. Casati L, Sendra R, Sibilia V, Celotti F. Endocrine disrupters: the new players able to affect the epigenome. Front Cell Dev Biol 2015;3:37.
90. Alavian-Ghavanini A, Rüegg J. Understanding epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals: from mechanisms to novel test methods. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2018;122(1):38–45.
91. Keikha M, Bahreynian M, Saleki M, Kelishadi R. Macro- and micronutrients of human milk composition: are they related to maternal diet? A comprehensive systematic review. Breastfeed Med 2017;12(9):517–27.
92. Morrow AL, Dawodu A. Fatty acids and fat-soluble vitamins in breast milk: physiological significance and factors affecting their concentrations. Nestle Nutr Inst Workshop Ser 2019;90:57–67.
93. Choi YK, Kim J-M, Lee J-E, Cho MS, Kang BS, Choi H, et al. Association of maternal diet with zinc, copper, and iron concentrations in transitional human milk produced by Korean mothers. Clin Nutr Res 2016;5(1):15–25.
94. Cohen Kadosh K, Muhardi L, Parikh P, Basso M, Jan Mohamed HJ, Prawitasari T, et al. Nutritional support of neurodevelopment and cognitive function in infants and young children—an update and novel insights. Nutrients 2021;13(1):199.
95. Koletzko B. Human milk lipids. Ann Nutr Metab 2016;69(Suppl 2):28–40.
96. Campoy C, Chisaguano Tonato AM, de la Garza Puentes A, Sáenz de Pipaón M, Verduci E, Koletzko B, et al.[Controversy about the critical role of long-chain polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(ARA) and docosahexaenoic acid (DHA), during infancy]. Nutr Hosp 2021;38:1101–12.
97. Hills RD, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA, Sutton SC, Theberge CR. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. Nutrients 2019;11:1613.
98. Kim YA, Keogh JB, Clifton PM. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. Nutr Res Rev 2018;31(1):35–51.
99. Roca-Saavedra P, Mendez-Vilabrille V, Miranda JM, Nebot C, Cardelle-Cobas A, Franco CM, et al. Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota—a review. J Physiol Biochem 2018;74(1):69–83.
100. Cresci GA, Bawden E. Gut microbiome: what we do and don't know. Nutr Clin Pract. 2015;30(6):734–46.
101. Conlon M, Bird A. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. Nutrients 2014;7(1):17–44.
102. Trebichavsky I, Rada V, Splichalova A, Splichal I. Cross-talk of human gut with bifidobacteria. Nutr Rev 2009;67(2):77–82.
103. Taft DH, Liu J, Maldonado-Gomez MX, Akre S, Huda MN, Ahmad SM, et al. Bifidobacterial dominance of the gut in early life and acquisition of antimicrobial resistance. Msphere 2018;3(5): e00441–18.
104. Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Bifidobacterium longum subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut. Pediatr Res 2015;77(1-2):229–35.
105. Kok CR, Hutkins R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. Nutr Rev 2018;76(Suppl 1):4–15.
106. Savaiano DA, Hutkins RW. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review. Nutr Rev 2021;79(5):599–614.
107. Saborido R, Leis R. [Yogurt and dietary recommendations for lactose intolerance]. NutriciÃ³n Hospitalaria 2018;35(6):45–8.
108. Cespedes EM, Hu FB. Dietary patterns: from nutritional epidemiologic analysis to national guidelines. Am J Clin Nutr 2015;101(5): 899–900.
109. Beck MA, Levander OA. Dietary oxidative stress and the potentiation of viral infection. Annu Rev Nutr 1998;18(1):93–116.
110. Trujillo-Mayol I, Guerra-Valle M, Casas-Forero N, Sobral MMC, Viegas O, Alarcón-Enos J, et al. Western dietary pattern antioxidant intakes and oxidative stress: importance during the SARS-CoV-2/COVID-19 pandemic.Adv Nutr 2021;12:670–81.
111. Calvo-Malvar M. Effect of an Atlantic diet on anthropometric indices and serum lipid profile [Internet]. 2015 [cited 2021 Feb 26]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02391701.
112. Wu CT, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. Science 2001; 293(5532):1103–5.
113. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004;429(6990): 457–63.
114. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature 2007;447(7143):425–32.
115. Aguilera O, Fernández AF, Muñoz A, Fraga MF. Epigenetics and environment: a complex relationship. J Appl Physiol 2010;109(1): 243–51.
116. Xu W, Wang F, Yu Z, Xin F. Epigenetics and cellular metabolism. Genet Epigenet 2016;8:43–51.
117. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. Nat Rev Genet 2016;17(8):487–500.
118. Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. Nat Rev Mol Cell Biol 2018;19(12):774–90.
119. Voisin S, Harvey NR, Haupt LM, Griffiths LR, Ashton KJ, Coffey VG, et al. An epigenetic clock for human skeletal muscle. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2020;11(4):887–98.
120. Benayoun BA, Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. Nat Rev Mol Cell Biol 2015; 16(10):593–610.
121. Maegawa S, Lu Y, Tahara T, Lee JT, Madzo J, Liang S, et al. Caloric restriction delays age-related methylation drift. Nat Commun 2017;8(1): 539.
122. Voisin S, Eynon N, Yan X, Bishop DJ. Exercise training and DNA methylation in humans. Acta Physiologica 2015; 213(1): 39–59.
123. Jacques M, Hiam D, Craig J, Barrès R, Eynon N, Voisin S. Epigenetic changes in healthy human skeletal muscle following exercise—a systematic review. Epigenetics 2019;14(7):633–48.
124. Amenyah SD, Ward M, Strain JJ, McNulty H, Hughes CF, Dollin C, et al. Nutritional epigenomics and age-related disease. Curr Dev Nutr 2020;4(7):nzaa097.
125. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological age predictors. EBioMedicine 2017; 21:29–36.
126. Quach A, Levine ME, Tanaka T, Lu AT, Chen BH, Ferrucci L, et al. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. Aging. 2017;9(2):419–46.
127. Bailey LB, Stover PJ, McNulty H, Fenech MF, Gregory JF, Mills JL, et al. Biomarkers of Nutrition for Development—folate review. J Nutr 2015;145(7):1636S–80S.
128. Martínez Roldán C, Carbajal Azcona Á. Componentes bioactivos de los alimentos conceptos clave. Available from: https://www.kelloggsnutrition.com/content/dam/globalnutrition/es_ES/assets/Manual_Nutricion_Kelloggs_Capitulo_02.2.pdf [Accessed 8 December 2020].
129. Guillamón E. Efecto de compuestos fitoquímicos del género allium sobre el sistema inmuno y la respuesta inflamatoria [Internet]. Ars Pharmaceutica 2018;59(3):185–96.
130. Ácidos grasos omega-3—datos en español. Available from: https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcids-DatosEnEspanol/ (accessed 8 December 2020).
131. Castellanos T L, Rodriguez D M. El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. Revista Chilena De NutriciÃ³N 2015;42(1):90–5.
132. Ali MA, Kamal MM, Rahman MH, Siddiqui MN, Haque MA, Saha KK, et al. Functional dairy products as a source of bioactive peptides and probiotics: current trends and future prospectives. J Food Sci Technol 2022;59(4):1263–73.
133. Lin T, Zirpoli GR, McCann SE, Moysich KB, Ambrosone CB, Tang L. Trends in cruciferous vegetable consumption and associations with breast cancer risk: a case-control study. Curr Dev Nutr 2017;1(8):e000448.
134. Luteína y zeaxantina: los carotenoides del huevo. Granjas Redondo. Available from: http://www.avicolaredondo.com/luteina-zeaxantina-carotenoides-huevo/ (accessed 8 December 2020).
135. Kaufman-Szymczyk A, Majewski G, Lubecka-Pietruszewska K, Fabianowska-Majewska K. The role of sulforaphane in epigenetic mechanisms, including interdependence between histone modification and DNA methylation. Int J Mol Sci 2015;16(12): 29732–43.
136. Royston KJ, Tollefsbol TO. The epigenetic impact of cruciferous vegetables on cancer prevention. Curr Pharmacol Rep 2015;1(1):46.
137. Baenas N, Wagner AE. Pharmacoepigenetics of Brassica-derived compounds. Cacabelos R. Translational epigenetics, pharmacoepigenetics. London, UK: Academic Press, Elsevier; 10;2019;Chapter 34,847–57.
138. Chapado LA, Martín-Hernández R, Hernández De La Red S, Tomé-Carneiro J, Gil-Zamorano J, Ruiz-Roso MB, et al. Connection between miRNA mediation and the bioactive effects of broccoli (Brassica oleracea var. italica): exogenous miRNA resistance to food processing and GI digestion. J Agric Food Chem 2021;69(32): 9326–37.
139. Kiec-Wilk B, Sliwa A, Mikolajczyk M, Malecki MT, Mathers JC. The CpG island methylation regulated expression of endothelial proangiogenic genes in response to β-carotene and arachidonic acid. Nutr Cancer 2011;63(7):1053–63.
140. Busch C, Burkard M, Leischner C, Lauer UM, Frank J, Venturelli S. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. Clin Epigenet 2015;7(1):64.
141. Declerck K, Szarc vel Szic K, Palagani A, Heyninck K, Haegeman G, Morand C, et al. Epigenetic control of cardiovascular health

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

by nutritional polyphenols involves multiple chromatin-modifying writer-reader-eraser proteins. Curr Top Med Chem 2016;16(7):788–806.
142. Pan M-H, Lai C-S, Wu J-C, Ho C-T. Epigenetic and disease targets by polyphenols. Curr Pharm Des 2013;19(34):6156–85.
143. Milenkovic D, Vanden, BW, Morand C, Claude S, van de Sandt A, Gorressen S, et al. A systems biology network analysis of nutri(epi)genomic changes in endothelial cells exposed to epicatechin metabolites. Sci Rep 2018;8(1):15487.
144. Milenkovic D, Declerck K, Guttman Y, Kerem Z, Claude S, Weseler AR, et al. (-)-Epicatechin metabolites promote vascular health through epigenetic reprogramming of endothelial-immune cell signaling and reversing systemic low-grade inflammation. Biochem Pharmacol 2020;173:113699.
145. Ruskovska T, Maksimova V, Milenkovic D. Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability—an overview and perspective. Br J Nutr 2020;123(3):241–54.
146. Monfoulet L-E, Ruskovska T, Ajdžanović V, Havlik J, Vauzour D, Bayram B, et al. Molecular determinants of the cardiometabolic improvements of dietary flavanols identified by an integrative analysis of nutrigenomic data from a systematic review of animal studies. Mol Nutr Food Res 2021;65(16):2100227.
147. Tauriainen E, Luostarinen M, Martonen E, Finckenberg P, Kovalainen M, Huotari A, et al. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and fatty liver formation. J Nutr Metab 2011;2011:1.
148. Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martínez JA. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. Mol Aspects Med 2013;34(4):782–812.
149. Bruckbauer A, Zemel MB, Thorpe T, Akula MR, Stuckey AC, Osborne D, et al. Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. Nutr Metab 2012;9(1):77.
150. Pudenz M, Roth K, Gerhauser C. Impact of soy isoflavones on the epigenome in cancer prevention. Nutrients 2014;6(10):4218–72.
151. Lee P-S, Chiou Y-S, Ho C-T, Pan M-H. Chemoprevention by resveratrol and pterostilbene: targeting on epigenetic regulation. Biofactors 2018;44(1):26–35.
152. Hussey B, Lindley MR, Mastana SS. Omega 3 fatty acids, inflammation and DNA methylation: an overview. Clin Lipidol 2017;12:24–32.
153. Ortega FJ, Cardona-Alvarado MI, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Sabater M, et al. Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. J Nutr Biochem 2015;26(10):1095–101.
154. Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang S, Rahman SM, Robert-McComb J, et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. J Nutr Biochem 2018;58:1–16.
155. D'Amore S, Vacca M, Cariello M, Graziano G, D'Orazio A, Salvia R, et al. Genes and miRNA expression signatures in peripheral blood mononuclear cells in healthy subjects and patients with metabolic syndrome after acute intake of extra virgin olive oil. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipid 2016;1861(11):1671–80.
156. Huang Q, Wen J, Chen G, Ge M, Gao Y, Ye X, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibited tumor growth via preventing the decrease of genomic DNA methylation in colorectal cancer rats. Nutr Cancer 2016;68(1):113–9.
157. Karimi M, Vedin I, Freund Levi Y, Basun H, Faxén Irving G, Eriksdotter M, et al. DHA-rich n-3 fatty acid supplementation decreases DNA methylation in blood leukocytes: the OmegAD study. Am J Clin Nutr 2017;106(4):1157–65.
158. Tremblay BL, Guénard F, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl M-C. Epigenetic changes in blood leukocytes following an omega-3 fatty acid supplementation. Clin Epigenet 2017;9(1):43.
159. Daimiel L, Micó V, Valls RM, Pedret A, Motilva MJ, Rubió L, et al. Impact of phenol-enriched virgin olive oils on the postprandial levels of circulating microRNAs related to cardiovascular disease. Mol Nutr Food Res 2020;64(15):2000049.
160. Speckmann B, Grune T. Epigenetic effects of selenium and their implications for health. Epigenetics 2015;10(3):179–90.
161. Corominas-Faja B, Cuyàs E, Lozano-Sánchez J, Cufí S, Verdura S, Fernández-Arroyo S, et al. Extra-virgin olive oil contains a metabolo-epigenetic inhibitor of cancer stem cells. Carcinogenesis 2018;39(4):601–13.
162. Ledesma-Martínez E, Aguiñiga-Sánchez I, Weiss-Steider B, Rivera-Martínez AR, Santiago-Osorio E. Casein and peptides derived from casein as antileukaemic agents. J Oncol 2019;2019;1–14.
163. Carlberg C. Nutrigenomics of vitamin D. Nutrients 2019;11:676.
164. Bar-El Dadon S, Reifen R. Vitamin A and the epigenome. Crit Rev Food Sci Nutr 2017;57(11):2404–11.
165. Guz J, Oliński R. The role of vitamin C in epigenetic regulation. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2017;71:747–60.
166. Remely M, Stefanska B, Lovrecic L, Magnet U, Haslberger AG. Nutriepigenomics: the role of nutrition in epigenetic control of human diseases. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2015;18(4):328–33.
167. Ntanasis-Stathopoulos J, Tzanninis JG, Philippou A, Koutsilieris M. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. J Musculoskelet Neuronal Interact 2013;13:133–46.
168. Izquierdo AG, Portela M, Lorenzo PM, Mallo F, Crujeiras AB. Food components affecting the epigenome: "ergogenetic" aids for performance. PharmaNutrition 2020;14:100231.
169. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. Inflamm Res 2020;1:29–49.
170. Horsburgh S, Robson-Ansley P, Adams R, Smith C. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. Exerc Immunol Rev 2015;21:26–41.
171. Elsner V, Trevizol L, de Leon I, da Silva M, Weiss T, Braga M, et al. Therapeutic effectiveness of a single exercise session combined with Walkaide functional electrical stimulation in post-stroke patients: a crossover design study. Neural Regen Res 2021;16(5):805.
172. White AJ, Sandler DP, Bolick SCE, Xu Z, Taylor JA, Deroo LA. Recreational and household physical activity at different time points and DNA global methylation. Eur J Cancer 2013;49(9):2199–206.
173. Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Zhang S, Fulda KG, Gonzalez K, et al. Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. Epigenetics 2011;6(3):293–9.
174. Ferrari L, Vicenzi M, Tarantini L, Barretta F, Sironi S, Baccarelli AA, et al. Effects of physical exercise on endothelial function and DNA methylation. Int J Environ Res Public Health 2019;16(14):2530.
175. Ling C, Rönn T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. Cell Metab 2019;29(5):1028–44.
176. Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. Cell Metab 2012;15(3):405–11.
177. Fabre O, Ingerslev LR, Garde C, Donkin I, Simar D, Barrès R. Exercise training alters the genomic response to acute exercise in human adipose tissue. Epigenomics 2018;10(8):1033–50.
178. Hwang SH, Kang DW, Lee MK, Byeon JY, Park H, Park DH, et al. Changes in DNA methylation after 6-week exercise training in colorectal cancer survivors: a preliminary study. Asia Pac J Clin Oncol 2022;18(1):52–60.
179. Fulkerson JA, Telke S, Larson N, Berge J, Sherwood NE, Neumark-Sztainer D. A healthful home food environment: is it possible amidst household chaos and parental stress? Appetite 2019;142:104391.
180. Horning ML, Fulkerson JA, Friend SE, Neumark-Sztainer D. Associations among nine family dinner frequency measures and child weight, dietary, and psychosocial outcomes. J Acad Nutr Diet 2016;116(6):991–9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los principales hallazgos de esta Tesis Doctoral demuestran la capacidad inmunomoduladora de una VLCKD mediante la regulación de los niveles de factores implicados en la cascada de señalización del INF-γ e inducción de mitohormesis. Este efecto parece estar mediado por la cetosis nutricional inducida por la VLCKD y podría estar asociado a una reducción del riesgo de desarrollo de cáncer en pacientes con obesidad. Finalmente, se demuestra que la cetosis nutricional es capaz de modular epigenéticamente genes relacionados con la carcinogénesis. Todo ello pone de manifiesto que el tratamiento con una terapia nutricional en la obesidad capaz de inducir cetosis, podría ser una estrategia útil, no solo para la reducción del peso corporal sino también para prevenir el desarrollo de cáncer en pacientes con obesidad.