



Fundació
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM
Diabetis i Obesitat



MARCADORS POLIGÈNICS DE RISC EN LA DIABETIS TIPUS 2: MODULACIÓ PER L'OBESITAT I LA INTERVENCIÓ DIETÈTICA EN LA INCIDÈNCIA DE DIABETIS I MALALTIES CARDIOVASCULARS

Dolores Corella Piquer

Facultat de Medicina - Universitat de València

1. Resum

Resum general

Antecedents i objectius

La diabetis de tipus 2 (DT2) és una de les principals causes de malaltia cardiovascular (MCV). Tot i que l'obesitat s'ha identificat com un factor de risc important de la DT2, no tots els individus obesos desenvolupen DT2; per això és important descobrir els factors genètics associats amb un risc més alt de DT2 en persones obeses, a fi d'actuar sobre aquests factors a través de la seva modulació ambiental. De la mateixa manera, també hem d'identificar els gens associats amb la DT2 en individus no obesos. Per tant, el nostre objectiu principal és analitzar l'heterogeneïtat genètica del risc de DT2 segons l'estat de l'obesitat així com elaborar unes puntuacions de risc genètic (GRS, *genetic risk scores*) en individus obesos i no obesos. A més, examinarem l'associació d'aquestes GRS amb la incidència de MCV, així com la modulació per la dieta mediterrània (DietMed).

Disseny i mètodes

Durem a terme un estudi de seguiment (5,7 anys de mitjana) en uns 7.000 participants d'alt risc cardiovascular (més de 67 +/- 7 anys i el 48,5 % amb DT2 a l'inici de l'estudi) per analitzar la interacció entre els SNP associats amb la DT2 i l'obesitat (46,8 % d'obesos a l'inici de l'estudi) en la incidència de la DT2 per construir GRS específiques d'obesitat (incloent-hi tant nous SNP que s'ha descobert que són rellevants en aquest projecte, com SNP prèviament coneguts a partir de les publicacions). Es farà un genotipatge d'alta densitat amb xips de genoma complet en una submostra en què s'inclouran els casos incidents de DT2 (315) i els controls corresponents (n'hi haurà el doble que casos). Les corbes ROC s'utilitzaran per a la selecció dels SNP i GRS amb millor valor predictiu, tant de manera general com estratificada per obesitat. Es genotiparan 23 SNP seleccionats (inclosos a les GRS) en tots els participants i s'ajustaran els models de regressió de Cox multivariant amb els termes d'interacció per calcular les *hazard ratios* (HR) i l'IC al 95 %. Així, es determinaran els riscos de DT2 i els riscos de MCV associats amb les GRS de manera general i modulats per l'obesitat. La modulació addicional per DietMed s'investigarà en models multivariants. Per comprendre millor els mecanismes que intervenen en les associacions i modulacions, es durà a terme una anàlisi pilot de metilació de l'epigenoma complet (EWA, de l'anglès *epigenome-wide methylation*) amb el xip EPIC

en una submostra de casos i controls i es validaran els millor *loci* diferencialment metilats en una submostra més gran de casos i controls de la DT2. Finalment s'integraran tots els resultats genètics-epigenètics (també amb possibilitat d'incloure-hi dades metabòliques) i de les variables de l'exposoma per tenir una visió més completa de les interaccions en la malaltia.

Resum de resultats

Els resultats del projecte han estat molt rellevants. Hem investigat els determinants genètics de la diabetis en persones d'edat avançada de manera general i també tenint en compte la influència de l'obesitat en població mediterrània. Hem utilitzat tant l'aproximació d'estudi d'associació de genoma complet (GWAS, de l'anglès *genome-wide association study*), com l'aproximació de gens candidats que han estat importants en altres poblacions. Amb això hem descobert puntuacions de risc genètic associades amb el risc de diabetis prevalent, diabetis incident i malaltia cardiovascular. Cadascuna de les GRS creades ha mostrat unes associacions específiques, cosa que indica la importància de tenir en compte les característiques de la població (tant demogràfiques com geogràfiques) i del fenotip estudiat a l'hora de dur a terme investigacions genòmiques amb possibles aplicacions en medicina de precisió. Hem trobat gran heterogeneïtat per obesitat, ja que hem obtingut una combinació de polimorfismes que s'associen amb diabetis només en persones obesas, mentre que una altra combinació de polimorfismes s'associa amb diabetis en persones no obesas. Hem calculat el valor predictiu d'aquestes GRS i hem demostrat que, si apliquem una GRS per a persones obesas en persones no obesas, el valor predictiu és gairebé nul, i viceversa. Això és molt rellevant per a les aplicacions dels tests genètics, perquè fins ara no es consideraven les característiques fenotípiques de partida de la persona testada i en el nostre estudi hem descobert que és crucial tenir-les en compte. També hem analitzat les dades des de la perspectiva de gènere i hem trobat diferències en els valors predictius dels polimorfismes genètics entre homes i dones, fet que aporta més evidència per considerar rellevant la variable del sexe en la futura medicina de precisió.

2. Resultats

En l'anàlisi de GWAS en la mostra de genoma complet, hem fet un estudi d'associació dels SNP (més de 700.000 SNP) amb **diabetis prevalent**. Els SNP més significatius corresponen a alguns gens que prèviament s'havien identificat com a associats amb diabetis en diferents estudis. Per exemple, trobem com a *top-ranked* el gen TCF7L2, que és un dels més associats a la diabetis a escala mundial. Altres SNP també s'havien associat prèviament a la diabetis, però la seva magnitud i freqüència varien en funció de la població estudiada. En el nostre cas, els SNP al gen *CSMD1* (*CUB and Sushi multiple domains 1*) són molt significatius. Aquest gen es va reportar en un GWAS de diabetis en població hispana de Texas (Parra *et al.*, *Diabetologia*, 2011). Això ens il·lustra un altre aspecte important que hem posat de manifest en algunes de les nostres publicacions (Ortega-Azorín *et al.*, *Nutrients*, 2019). Es tracta del fet que els SNP que s'han publicat com a més rellevants associats a determinats fenotips cardiometabòlics no tenen el mateix efecte en totes les poblacions. Per aquest motiu, el fet d'utilitzar GRS creades amb SNP derivats d'anàlisis realitzades en altres poblacions, per exemple del nord d'Europa, pot no tenir validesa en població mediterrània. I és per això que cal fer estudis de GWAS en la població específica en què es vol testar el valor predictiu de les associacions. Seguint amb la hipòtesi del nostre estudi, consistent amb la idea que els gens associats amb diabetis són diferents en persones obesas que no obesas, vam dur a terme un altre GWAS per investigar els gens que presentaven una associació més significativament amb la diabetis prevalent, i vam estratificar la mostra de participants de diferents centres en persones no obesas i obesas.

En estratificar segons l'obesitat, podem comprovar que hi ha molt poca coincidència genètica en els gens més significatius associats a la diabetis. **En les persones no obesas, l'SNP top-ranked associat a la diabetis** és rs4911429 al gen *MAP1LC3A* (*microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha*), també conegut com a *LC3*. Les proteïnes associades als microtúbuls (MAP) regulen l'estabilitat dels microtúbuls i tenen un paper crític en el desenvolupament neuronal i la plasticitat. *MAP1LC3A* pertany a la família de proteïnes MAP1 LC3 que formen complexos madurs amb MAP1A i MAP1B, que es creu que són importants en la formació i desenvolupament d'axons i dendrites. *MAP1LC3A* és una de les tres isoformes de MAP1LC3, l'homòleg en els mamífers del llevat ATG8, una

proteïna autofàgica essencial. En un estudi realitzat per Portilla Fernández *et al.*, (*PlosOne*, 2019), en què estudiaven la relació entre SNP d'autofàgia i paràmetres cardiometabòlics, van trobar que hi havia una associació significativa entre un SNP al gen *MAP1LC3A* i les malalties cardiovasculars a l'estudi Rotterdam. Encara que aquest gen s'ha relacionat amb diabetis en estudis experimentals, l'associació en GWAS no és coneguda. Aquí tenim un resultat nou que cal investigar amb més detall. Els resultats amb el gen *PARVB* (parvin beta), també *top-ranked*, són innovadors. Aquest gen codifica un membre de la família parvin de proteïnes d'unió a l'actina, que tenen un paper en l'organització del citoesquelet i l'adhesió cel·lular. Aquestes proteïnes s'associen a contactes focals i contenen dominis d'homologia de calponina que s'uneixen als filaments d'actina. Aquest membre de la família s'uneix a alfa-PIX i alfa-actinina, i pot inhibir l'activitat de la quinasa lligada a la integrina. Aquesta proteïna també funciona en la supressió del tumor. Se'n sap poc, de l'associació de l'SNP amb la diabetis. En poblacions asiàtiques (Kumar *et al.*, *J Genet*, 2019), el gen *PARVB* s'ha associat amb més risc de fetge gras no alcohòlic (NAFLD), que es caracteritza per l'acumulació de greix al fetge sense antecedents de consum crònic d'alcohol. El tercer gen més significatiu associat a la diabetis en persones no obesas és *RAD52* (*DNA repair protein RAD52 homolog*), que està implicat en la reparació de trencaments d'ADN de doble cadena. Aquest gen té un paper central en la recombinació genètica i la reparació de l'ADN, ja que promou el recuit d'ADN monocatenari complementari mitjançant l'estimulació de la recombinasa RAD51. Els altres gens estan implicats en diverses vies metabòliques. Actualment estem acabant una anàlisi de *pathways* i de *gene-enrichment* per conèixer-ne millor la funcionalitat potencial. També estem treballant en la replicació en altres poblacions. Aquest aspecte és molt important per augmentar la causalitat de les associacions. De manera similar a l'estudi que hem fet amb participants no obesos, hem realitzat una anàlisi estratificada per identificar els gens més associats a la diabetis prevalent en persones obesas, ajustats per factors.

L'SNP més associat al risc de diabetis prevalent en persones obesas és rs706282 al gen *TRIO* (*Trio Rho guanine nucleotide exchange factor*). *TRIO* és un gen candidat de discapacitat intel·lectual (DI) i també és un regulador de Rho GTPasa ben conservat que s'expressa molt en el cervell en desenvolupament. Tot i això, no se'n sap gaire, dels esdeveniments específics regulats per *TRIO* durant el

desenvolupament cerebral i el seu impacte clínic en humans quan es muta (Ba *et al.*, *Hum Mol Genet*, 2015). El segon SNP més significatiu és rs9384832, al gen *CDH22* (*cadherin 22*). Aquest gen és membre de la superfamília de la cadherina. El producte gènic es compon de cinc dominis de repetició de cadherina i una cua citoplasmàtica similar a la regió citoplasmàtica altament conservada de les cadherines. Expressada predominantment al cervell, aquesta suposada proteïna d'adhesió cel·lular dependent del calci pot tenir un paper important en la morfogènesi i la formació de teixits en cèl·lules neuronals i no neuronals durant el desenvolupament i manteniment del cervell i dels òrgans neuroendocrins. Aquest gen s'ha associat amb la diabetis en molts estudis. El 2008, Bento *et al.* (*Genomics*) ja van indicar que hi havia una associació de diversos SNP en aquest gen amb la diabetis i van suggerir que hi havia presència d'heterogeneïtat en les associacions. Els altres SNP identificats tenen funcionalitats diverses i actualment treballem per obtenir-ne una millor caracterització.

Posteriorment hem procedit a crear una GRS amb els SNP *top-ranked*

tenint en compte algunes premisses bàsiques, entre les quals hi havia que la MAF dels SNP inclosos fos relativament alta, que els SNP no estiguessin en desequilibri de lligament i que el nombre d'SNP no fos gaire alt per minimitzar el cost de les determinacions. Inicialment hem creat GRS no ponderades i per rellevància hem triat 19 SNP tant per a la GRS de persones no obesas com per a la GRS de persones obesas. Per a ambdós casos s'ha creat una variable estandarditzada de GRS amb mitjana zero i desviació típica de la unitat per poder comparar millor els resultats. En primer lloc, s'ha creat un model de regressió logística en què la diabetis prevalent és la variable dependent i cadascuna de les GRS s'utilitza per explicar la diabetis de manera global, sense tenir en compte si la persona és obesa o no.

- En calcular l'OR de diabetis prevalent en la població total per cada desviació estàndard de la variable GRS estandarditzada creada per a no obesos, s'obté una OR d'1,63 (IC al 95 %: 1,44-1,83); $P = 1,4 \times 10^{-5}$.
- En calcular l'OR de diabetis prevalent per cada desviació estàndard de la variable GRS estandarditzada creada per a obesos, s'obté una OR d'1,80 (IC al 95 %: 1,60-2,02); $P = 4,4 \times 10^{-23}$.

Això ens indica que en molts estudis s'han obtingut associacions estadísticament significatives per a SNP o GRS en el global de la població, sense que aquests SNP o GRS fossin significatius o predictors per als diferents grups d'individus, com veurem a continuació:

→ Càlcul de l'associació de la GRS19-No_ob per estimar (per SD) el risc genètic de diabetis prevalent en persones no obeses: OR: 2,34 (IC al 95 %: 1,95-2,80); $P = 1,04 \times 10^{-19}$.

→ Càlcul de l'associació de la GRS19-No_ob per estimar (per SD) el risc genètic de diabetis prevalent en persones obeses: OR: 1,09 (IC al 95 %: 0,92-1,31); $P = 0,289$.

→ Càlcul de l'associació de la GRS19-Obes per estimar (per SD) el risc genètic de diabetis prevalent en persones obeses: OR: 3,83 (IC al 95 %: 3,08-4,76); $P = 1,43 \times 10^{-33}$.

→ Càlcul de l'associació de la GRS19-Obes per estimar (per SD) el risc genètic de diabetis prevalent en persones no obeses: OR: 1,01 (IC al 95 %: 0,86-1,17); $P = 0,989$.

Aquests resultats clarament ens mostren l'especificitat de les associacions, ja que una GRS que per a obesos té una gran associació amb el risc de diabetis prevalent no presenta cap associació per a persones no obeses i viceversa. Aquests resultats mostren la gran heterogeneïtat en el poder predictiu de les GRS i la necessitat de dur a terme investigacions més detallades en lloc de les estimacions generalitzades.

Hem calculat les corbes ROC de les GRS genètiques per a diabetis prevalent en persones no obeses i en persones obeses. S'ha aconseguit un bon valor predictiu dels 19 SNP de la GRS de no obesos en les persones no obeses (AUC: 0,71; $p = 2,5 \times 10^{-21}$), però el valor predictiu de la GRS19 d'obesos no té significació estadística en aquestes persones. Igualment (panel B), la GRS19 d'obesos té una AUC elevada en les persones obeses (AUC: 0,81; $p = 9,5 \times 10^{-47}$), però en aquestes persones la GRS19 de no obesos no té associació estadística.

Actualment, en medicina de precisió és molt important tenir en compte **l'homogeneïtat o heterogeneïtat per sexe**. El nostre grup ha elaborat una guia

per analitzar aquestes diferències en estudis de genòmica nutricional (Corella *et al.*, *Nutrients*, 2019) i hem aplicat les generalitats a aquest projecte de La Marató de TV3. Per això, en totes les anàlisis estudiem la possible homogeneïtat o heterogeneïtat per sexe en les anàlisis mitjançant una estratificació en homes i dones i testem també la significació estadística del terme d'interacció entre les variants genètiques o GRS i el sexe. En aquest cas, l'efecte de les GRS19 específiques d'obesitat en el risc de diabetis prevalent presenta una gran homogeneïtat en homes i en dones, i en tots dos grups podem observar l'efecte específic de les GRS.

En estudiar l'efecte de la interacció amb la dieta mediterrània en l'efecte de les GRS específiques d'obesos i no obesos, no hem obtingut interaccions estadísticament significatives. Haurem d'estudiar amb més profunditat aquest fet i analitzar components específics de la dieta mediterrània. En estudiar els gens de diabetis segons l'adherència a la dieta mediterrània, quan hi ha adherència alta apareixen els coneguts CUL5, prèviament associats a la diabetis. CUL5 té activitat d'unió a la proteïna ligasa d'ubiquitina i activitat transferida a la proteïna ubiquitina, i està implicat en la regulació de la concentració d'ions de calci citosòlic i la resposta a l'estrès osmòtic. Es localitza al citoplasma, al nucli i a la membrana plasmàtica. L'ortòleg de CUL5 humà (cullina 5) participa en la via de degradació del proteasoma que implica la ligasa d'ubiquitina dependent de cullina i la via de degradació de la ubiquitina/proteasoma.

També es detecta en aquest grup el gen *SMAD7* (*Mothers against decapentaplegic homolog 7*). La proteïna codificada per aquest gen és una proteïna nuclear que uneix la lligasa de la ubiquitina E3 SMURF2. En unir-se, aquest complex es trasllada al citoplasma, on interactua amb el receptor TGF-beta tipus-1 (TGFBR1) i dona lloc a la degradació de la proteïna codificada i del TGFBR1. L'expressió d'aquest gen és induïda per TGFBR1.

En estudiar la diabetis incident, l'SNP amb més significació és un SNP intergènic al cromosoma 22. Amb els SNP *top-ranked* hem creat una GRS de 28 SNP per a la diabetis incident (GRS_BTBD8_rs563113 GRS_C1orf146_rs + 35513239 + GRS_CAB39L_rs12429253 GRS_CHL1_rs13093895 GRS_COL24A1_rs593146 GRS_CSGALNACT1_rs3802328 GRS_CYP2C18_rs1326832 GRS_CYP2C19_rs4641393

GRS_CYP2C9_rs12569850 + GRS_DMBX1_rs6683116 GRS_DOCK9_rs11842122
GRS_EMCC8_rs2291658 + GRS_FAM107B_rs4750540 GRS_GABRB3_rs17738349
GRS_GLMN_rs7524120 + GRS_HELLS_rs2025445 GRS_intg_rs6662618
GRS_ISPD_rs1918259 + GRS_LOC105369617_rs867167 GRS_NOC3L_rs17109928
GRS_NOS2_rs944722 + GRS_NPY6R_rs12652106 GRS_PDZD2_rs6874198 +
GRS_PRKCE_rs11898209 GRS_PSG9_rs8109311 GRS_RBMS3_rs9819610 +
GRS_SPATA13_rs7987854 GRS_TSHZ2_rs200602). L'AUC és alta (AUC: 0,79; IC al
95 %: 0,75-0,84), amb una associació molt significativa ($P = 1,2 \times 10^{-25}$). En
estratificar en obesos i no obesos, la GRS té un valor predictiu lleugerament més
alt en no obesos (AUC: 0,83; $P = 7 \times 10^{-15}$) que en obesos (AUC: 0,77; $P = 8 \times$
 10^{-13}). En homes i en dones les associacions són semblants, encara que una mica
més altes en les dones (AUC: 0,86; $P = 1 \times 10^{-9}$, en dones no obeses).
Posteriorment hem estimat el risc (HR) de diabetis incident mitjançant un model de
regressió de Cox. La variable de GRS s'ha utilitzat com a contínua, i s'ha
estandarditzat per poder comparar millor les estimacions dels diferents models.
L'HR que s'ha obtingut per desviació estàndard ha estat: HR: 1,78 (IC al 95 %;
1,52-2,08); $P = 5,4 \times 10^{-13}$. Es tracta d'una associació molt significativa i rellevant
en magnitud. La magnitud de l'associació és lleugerament més alta en no obesos
(HR: 2,07) que en obesos (HR: 1,71).

A l'estudi pilot de l'**epigenoma complet** hem trobat gens diferencialment metilats
en diabètics i no diabètics. Per exemple, el gen *KIRREL3* (*kin of irregular chiasm-
like protein 3*), s'ha detectat també en l'anàlisi genètica de polimorfismes associats
amb diabetis prevalent. La proteïna codificada per aquest gen és un membre de la
família de les proteïnes semblants a la nefrina i pertany a la superfamília de les
immunoglobulines. S'expressa en el cervell fetal i adult, i també en podòcits de
glomèruls renals. Les mutacions d'aquest gen s'associen a diversos trastorns
neurològics i cognitius (Bhalla *et al.*, *Am J Clin Genet*, 2008). Posteriorment, també
s'han descrit associacions de polimorfismes en el gen *KIRREL3* amb diabetis (Muller
et al., *Human Genetics*, 2013). La majoria de gens de la llista de metilació
diferencial entre diabètics i no diabètics han estat prèviament descrits com a
associats experimentalment o genèticament amb la diabetis. Així, per exemple,
podem destacar-ne el gen *TXNIP* (*thioredoxin-interacting protein*). Recentment es
va trobar que *TXNIP* era el gen més induït per la glucosa en un *microarray* d'illots
pancreàtics humans; aquest gen augmenta en diabetis i la seva sobreexpressió

dona lloc a apoptosi de cèl·lules beta. La reducció de l'expressió de *TXNIP* ha mostrat efectes favorables, ja que té lloc una disminució de l'apoptosi de les cèl·lules beta, un augment de la massa de les cèl·lules beta, un augment dels nivells d'insulina i protecció enfront de la diabetis (Thielen *et al.*, *Diabetes*, 2018). Per tant, l'anàlisi integrada dels diferents gens *top-ranked* en metilació resulta molt interessant per aconseguir més informació sobre la funcionalitat dels gens i validar-ne les associacions, alhora que se n'augmenta la consistència. En **l'estudi de metilació de l'epigenoma complet** també hem analitzat **les diferències de metilació entre diabètics obesos i diabètics no obesos**. El lloc de metilació que presenta diferències estadísticament més significatives ($P = 4,3 \times 10^{-8}$) entre els diabètics obesos i no obesos és cg15563355 al gen *SERF2* (*small EDRK-rich factor 2*). Finalment, hem estudiat si hi ha diferències en metilació en els diabètics que tenen una alta adhesió a dieta mediterrània en comparació amb els diabètics que tenen una baixa adhesió a aquesta dieta. Entre aquestes vies, destaca de manera molt significativa la via de senyalització de l'apelina. Aquests resultats són molt nous i interessants. L'apelina és un pèptid conegut com el lligand del receptor acoblat a la proteïna G APJ. Existeixen diverses formes actives d'apelina. S'ha demostrat que l'apelina participa en la regulació de l'homeòstasi cardiovascular i de líquids, la ingesta d'aliments, la proliferació cel·lular i l'angiogènesi. A més de ser un pèptid omnipresent, l'apelina també és produïda i secretada pels adipòcits i, per tant, es considera una adipocina.

Selecció de polimorfismes, creació de GRS i anàlisi d'associació en la mostra completa de participants de l'estudi PREDIMED: influència en la diabetis incident, influència en la malaltia cardiovascular i modulació per la dieta. Vam seleccionar els 42 SNP amb més associació significativa amb la diabetis prevalent en el total de la població. La GRS té una **forta associació amb la diabetis prevalent** en el total de la població estudiada. En un model ajustat per sexe, edat, centre i obesitat, la GRS (estandarditzada) s'associa significativament (per desviació estàndard) amb la diabetis prevalent amb OR: 1,31; $P = 3,1 \times 10^{-22}$. De manera interessant, observem que al total de la població de no diabètics, la GRS creada per diabetis prevalent s'associa significativament amb la diabetis incident HR: 1,21 (IC al 95 %: 1,07-1,37); $P = 0,003$.

Vam observar una interacció estadísticament significativa entre la GRS i l'adherència a la dieta mediterrània, de manera que, en les persones amb més adherència a la dieta mediterrània, la GRS no s'associava amb la diabetis incident (HR: 1,09; P = 0,549); això suggereix que una dieta mediterrània saludable neutralitza la susceptibilitat genètica. En el grup de baixa adherència a la dieta mediterrània, la GRS es va continuar associant molt significativament amb més risc de diabetis incident (HR: 1,54; P = 0,001). Posteriorment, hem analitzat la influència dels diferents components de la dieta mediterrània en la modulació del risc genètic per determinar la incidència de la diabetis. Amb diversos components hem obtingut resultats significatius, però, de tots, el que ha resultat més rellevant en la modulació per contrarestar el risc genètic ha estat la ingesta de verdures.

Per això hem creat una variable de consum de verdures basada en la mitjana de la població. Hem considerat les categories de consum de verdures baix (inferior a la mitjana) i alt (superior a la mitjana). Per il·lustrar millor la relació dosi-resposta de com el consum de verdures modula el risc genètic de diabetis en la incidència d'aquesta malaltia, hem emprat una variable de risc genètic amb tres categories i hi hem utilitzat els tercils de la GRS. S'obté una interacció estadísticament significativa (P < 0,05). En les persones amb un consum de verdures baix, el risc genètic s'associa molt amb la diabetis incident de manera creixent segons el tercil (HR: 2,10; P = 0,0004 del tercil genètic superior vs. el tercil inferior). No obstant això, en les persones amb un consum elevat de verdures, l'associació del risc genètic amb la incidència de diabetis es minimitza, especialment en les persones amb més risc genètic situades al tercil superior (HR = 1,09; P = 0,725 del tercil superior vs. el tercil inferior). També s'ha elaborat una GRS específica per a la diabetis incident. L'HR ha estat d'1,54 (IC al 95 %: 1,35-1,75); P = 1,44 × 10⁻¹⁰ per desviació estàndard. Aquesta associació és molt més alta i estadísticament significativa que la que havíem trobat per a la GRS creada per a la diabetis prevalent, que ahora també s'associava significativament amb la diabetis incident. Aquests resultats confirmen l'especificitat dels polimorfismes genètics a l'hora d'estudiar les seves associacions més rellevants, ja sigui amb diabetis incident o prevalent.

A més, hem estudiat l'associació entre la GRS de la diabetis incident i l'ocurrència de **malaltia cardiovascular** durant el mateix període de seguiment. La variable

d'esdeveniment cardiovascular inclou els tres principals esdeveniments cardiovascular més greus (infart, ictus i mortalitat cardiovascular). En considerar la població en tot el seu conjunt, la GRS de diabetis incident es va associar significativament amb un risc més alt de malaltia cardiovascular. L'efecte estimat per a la variable dicotòmica va ser d'HR: 1,34 (IC al 95 %: 1,03-1,74); P = 0,028 en el model multivariant. Aquests resultats en què les variants genètiques que confereixen un risc més alt de diabetis incident s'associen també amb un risc cardiovascular més alt poden reflectir el *common soil* que s'ha publicat moltes vegades segons el qual la diabetis i les malalties cardiovasculars comparteixen molts factors de risc genètics. També hem trobat una modulació per la dieta mediterrània en l'efecte de la GRS de risc genètic de diabetis incident en l'ocurrència de malaltia cardiovascular. Quan l'adherència a la dieta mediterrània era baixa (inferior a 9 punts en l'escala), la GRS de diabetis s'associava de manera més significativa amb el risc de malaltia cardiovascular: HR: 1,55 (IC al 95 %: 1,07-2,23); P = 0,018. No obstant això, en el grup de més adherència a la dieta mediterrània, la mateixa GRS de risc genètic no mostrava associació estadísticament significativa amb la incidència de malaltia cardiovascular: HR: 1,14 (IC al 95 %: 0,78-1,66); P = 0,507. Aquests resultats mostren que, encara que es tingui una susceptibilitat genètica més gran, aquesta es pot contrarestar o minimitzar amb un patró de dieta saludable, per exemple amb una adherència més gran a la dieta mediterrània. A més de testar l'efecte de l'adherència a la dieta mediterrània (variable que ens demana un patró de dieta a més llarg termini), hem testat també l'efecte de la variable d'intervenció amb dieta mediterrània (canvi a curt termini) en l'efecte de la GRS de diabetis incident en la incidència de malaltia cardiovascular. També per a aquesta variable hem observat que el risc de malaltia cardiovascular és més alt en les persones del grup de control (HR: 1,79; IC al 95 %: 1,14-2,80; P = 0,012) que en les persones del grup d'intervenció amb dieta mediterrània (HR: 1,19; IC al 95 %: 0,87-1,66; P = 0,274), tot i tenir la mateixa susceptibilitat genètica. Aquests resultats són rellevants, però necessiten replicació en altres poblacions per tenir un grau més alt d'evidència. Actualment estem estenent aquests resultats als participants de l'estudi PREDIMED amb més òmiques. Hem començat a estudiar cada un dels polimorfismes seleccionats, així com les GRS en la seva associació amb determinats metabòlits en plasma. També estem comparant associacions genòmiques, epigenòmiques i metabolòmiques amb els participants en l'estudi PREDIMED-Plus València. L'anàlisi de dades s'ha

realitzat de manera general seguint la metodologia proposada al pla de treball. Molts dels resultats més rellevants s'han presentat en els apartats anteriors, però encara estem fent noves anàlisis optimitzades de dades, i incorporem, a més, noves metodologies de *machine learning* que poden suposar un avantatge i que no estaven previstes inicialment en la sol·licitud.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els resultats del projecte han estat molt rellevants. Hem investigat els determinants genètics de la diabetis en persones d'edat avançada de manera general i tenint en compte també la influència de l'obesitat. Hem utilitzat tant l'aproximació d'estudi d'associació de genoma complet (GWAS), com l'aproximació de gens candidats que han estat importants en altres poblacions. Amb això hem construït puntuacions de risc genètic (GRS) associades amb el risc de diabetis prevalent, diabetis incident i malaltia cardiovascular. Cadascuna de les GRS creades ha mostrat unes associacions específiques, fet que indica la importància de tenir en compte les característiques de la població (tant demogràfiques com geogràfiques) i del fenotip estudiat a l'hora de dur a terme investigacions genòmiques amb possibles aplicacions en medicina de precisió.

Hem trobat que hi ha gran heterogeneïtat per obesitat i hem obtingut una combinació de polimorfismes que s'associen amb la diabetis només en persones obesas, així com també una altra combinació de polimorfismes que s'associa amb la diabetis en persones no obesas. Hem calculat el valor predictiu d'aquestes GRS i hem demostrat que, si apliquem una GRS per a persones obesas en persones no obesas, el valor predictiu és gairebé nul, i viceversa. Això és molt rellevant per a les aplicacions dels tests genètics, perquè fins ara no es consideraven les característiques fenotípiques de partida de la persona testada, i en el nostre estudi hem demostrat que és crucial tenir-les en compte. També hem analitzat les dades des de la perspectiva de gènere i hem trobat diferències en els valors predictius dels polimorfismes genètics entre homes i dones, fet que aporta més evidència per considerar rellevant la variable del sexe en la futura medicina de precisió. Les troballes indiquen que s'ha de canviar el paradigma en la construcció de les GRS per millorar-ne la utilitat. Actualment hi ha una tendència a anar augmentant el

nombre dels SNP a les GRS per millorar-ne el valor predictiu, sense tenir en compte les característiques de la població a la qual s'apliquen. Això no està donant bons resultats i molts autors han indicat que les GRS són el menys precís de la medicina de precisió. Mitjançant un canvi en la forma de generar les GRS, una focalització en les característiques demogràfiques i fenotípiques de la població i la definició de manera més precisa del fenotip que es vol predir (diabetis prevalent o diabetis incident en un temps determinat, per exemple), hem demostrat que s'incrementa el valor predictiu i la magnitud de les associacions. D'altra banda, els nostres resultats també han demostrat que l'efecte de la susceptibilitat genètica tant per a diabetis com per a malaltia cardiovascular no és determinista, sinó que es pot contrarestar amb la dieta mediterrània. Això és molt rellevant per aplicar-ho en les mesures preventives. Els nostres resultats, tot i que poden no tenir una aplicació clínica imminent, sí que serveixen per reorientar les investigacions en medicina genòmica i en prevenció personalitzada per a les futures medicina de precisió o nutrició de precisió més personalitzades. Amb relació a l'aplicació pràctica, les nostres troballes indiquen que s'ha de canviar el paradigma en la construcció de les GRS per millorar-ne la utilitat, i reorientar les investigacions en medicina genòmica i en prevenció personalitzada per a les futures medicina de precisió o nutrició de precisió més personalitzades.

4. Bibliografia científica generada

Fins al moment de redactar aquest informe hem publicat 12 articles amb dades i metodologia derivada del projecte. Estem elaborant més articles amb els resultats principals. Fins a la finalització recent de totes les anàlisis genòmiques no ha estat possible poder publicar els resultats globals, i s'han anat publicant resultats parcials. En els propers mesos es remetran més articles amb més resultats del projecte. A continuació es detallen els articles publicats. En tots s'ha esmentat en els agraïments el projecte de La Marató TV3, i se n'ha explicitat la referència.

1. Corella D, Coltell O, Macian F, Ordovás JM.

Advances in Understanding the Molecular Basis of the Mediterranean Diet Effect.

Annu Rev Food Sci Technol. 2018;9:227-249.

2. Corella D, Coltell O, Portolés O, Sotos-Prieto M, Fernández-Carrión R, Ramírez-Sabio JB, Zanón-Moreno V, Mattei J, Sorlí JV, Ordovas JM.
A Guide to Applying the Sex-Gender Perspective to Nutritional Genomics.
Nutrients. 2018 Dec 20;11(1). pii: E4.
3. Corella D, Barragán R, Ordovás JM, Coltell Ó.
Nutrigenetics, nutrigenomics and Mediterranean diet: a new vision for gastronomy.
Nutr Hosp. 2018;35(Spec No4):19-27.
4. Corella D, Ordovás JM.
The role of omics in precision nutrition: strengths and weaknesses.
Nutr Hosp. 2018 12;35(Spec No4):10-18.
5. Papandreou C, Li J, Liang L, Bulló M, Zheng Y, Ruiz-Canela M, Yu E, Guasch-Ferré M, Razquin C, Clish C, Corella D, Estruch R, Ros E, Fitó M, Arós F, Serra-Majem L, Rosique N, Martínez-González MA, Hu FB, Salas-Salvadó J.
Metabolites related to purine catabolism and risk of type 2 diabetes incidence; modifying effects of the TCF7L2-rs7903146 polymorphism.
Sci Rep. 2019;9(1):2892.
6. Coltell O, Asensio EM, Sorlí JV, Barragán R, Fernández-Carrión R, Portolés O, Ortega-Azorín C, Martínez-LaCruz R, González JI, Zanón-Moreno V, Gimenez-Alba I, Fitó M, Ros E, Ordovas JM, Corella D.
Genome-Wide Association Study (GWAS) on Bilirubin Concentrations in Subjects with Metabolic Syndrome: Sex-Specific GWAS Analysis and Gene-Diet Interactions in a Mediterranean Population.
Nutrients. 2019 Jan 4;11(1):90.
7. BIRTH-GENE (BIG) Study Working Group, Huang T, Wang T, Zheng Y, Ellervik C, Li X, Gao M, Fang Z, Chai JF, Ahluwalia TVS, Wang Y, Voortman T, Noordam R, Frazier-Wood A, Scholz M, Sonestedt E, Akiyama M, Dorajoo R, Zhou A, Kilpeläinen TO, Kleber ME, Crozier SR, Godfrey KM, Lemaitre R, Felix JF, Shi Y, Gupta P, Khor CC, Lehtimäki T, Wang CA, Tiesler CMT, Thiering E, Standl M, Rzehak P, Marouli E, He M, Lecoeur C, Corella D, Lai CQ, Moreno LA, Pitkänen N, Boreham CA, Zhang T, Saw SM, Ridker PM, Graff M, van Rooij FJA, Uitterlinden AG, Hofman A, van Heemst D, Rosendaal FR, de

Mutsert R, Burkhardt R, Schulz CA, Ericson U, Kamatani Y, Yuan JM, Power C, Hansen T, Sørensen TIA, Tjønneland A, Overvad K, Delgado G, Cooper C, Djousse L, Rivadeneira F, Jameson K, Zhao W, Liu J, Lee NR, Raitakari O, Kähönen M, Viikari J, Grote V, Langhendries JP, Koletzko B, Escribano J, Verduci E, Dedoussis G, Yu C, Tham YC, Lim B, Lim SH, Froguel P, Balkau B, Fink NR, Vinding RK, Sevelsted A, Bisgaard H, Coltell O, Dallongeville J, Gottrand F, Pahkala K, Niinikoski H, Hyppönen E, Pedersen O, März W, Inskip H, Jaddoe VWV, Dennison E, Wong TY, Sabanayagam C, Tai ES, Mohlke KL, Mackey DA, Gruszfeld D, Deloukas P, Tucker KL, Fumeron F, Bønnelykke K, Rossing P, Estruch R, Ordovas JM, Arnett DK, Meirhaeghe A, Amouyel P, Cheng CY, Sim X, Teo YY, van Dam RM, Koh WP, Orho-Melander M, Loeffler M, Kubo M, Thiery J, Mook-Kanamori DO, Mozaffarian D, Psaty BM, Franco OH, Wu T, North KE, Davey Smith G, Chavarro JE, Chasman DI, Qi L. *JAMA Netw Open*.

Association of Birth Weight With Type 2 Diabetes and Glycemic Traits: A Mendelian Randomization Study.

2019 Sep 4;2(9):e1910915.

8. Ortega-Azorín C, Coltell O, Asensio EM, Sorlí JV, González JI, Portolés O, Saiz C, Estruch R, Ramírez-Sabio JB, Pérez-Fidalgo A, Ordovas JM, Corella D.

Candidate Gene and Genome-Wide Association Studies for Circulating Leptin Levels Reveal Population and Sex-Specific Associations in High Cardiovascular Risk Mediterranean Subjects.

Nutrients. 2019 Nov 13;11(11):2751.

9. Serra-Majem L, Román-Viñas B, Sanchez-Villegas A, Guasch-Ferré M, Corella D, La Vecchia C.

Benefits of the Mediterranean diet: Epidemiological and molecular aspects.

Mol Aspects Med. 2019 Jun;67:1-55.

10. Zheng Y, Huang T, Wang T, Mei Z, Sun Z, Zhang T, Ellervik C, Chai JF, Sim X, van Dam RM, Tai ES, Koh WP, Dorajoo R, Saw SM, Sabanayagam C, Wong TY, Gupta P, Rossing P, Ahluwalia TS, Vinding RK, Bisgaard H, Bønnelykke K, Wang Y, Graff M, Voortman T, van Rooij FJA, Hofman A, van Heemst D, Noordam R, Estampador AC, Varga TV, Enzenbach C, Scholz M, Thiery J, Burkhardt R, Orho-Melander M, Schulz CA, Ericson U, Sonestedt E, Kubo M, Akiyama M, Zhou A, Kilpeläinen TO, Hansen T, Kleber ME, Delgado G, McCarthy M, Lemaitre RN, Felix JF, Jaddoe VWV, Wu Y, Mohlke KL,

Lehtimäki T, Wang CA, Pennell CE, Schunkert H, Kessler T, Zeng L, Willenborg C, Peters A, Lieb W, Grote V, Rzehak P, Koletzko B, Erdmann J, Munz M, Wu T, He M, Yu C, Lecoeur C, Froguel P, Corella D, Moreno LA, Lai CQ, Pitkänen N, Boreham CA, Ridker PM, Rosendaal FR, de Mutsert R, Power C, Paternoster L, Sørensen TIA, Tjønneland A, Overvad K, Djousse L, Rivadeneira F, Lee NR, Raitakari OT, Kähönen M, Viikari J, Langhendries JP, Escribano J, Verduci E, Dedoussis G, König I, Balkau B, Coltell O, Dallongeville J, Meirhaeghe A, Amouyel P, Gottrand F, Pahkala K, Niinikoski H, Hyppönen E, März W, Mackey DA, Gruszfeld D, Tucker KL, Fumeron F, Estruch R, Ordovas JM, Arnett DK, Mook-Kanamori DO, Mozaffarian D, Psaty BM, North KE, Chasman DI, Qi L.

Mendelian randomization analysis does not support causal associations of birth weight with hypertension risk and blood pressure in adulthood.

Eur J Epidemiol. 2020 Jul;35(7):685-697.

11. Sorlí JV, Barragán R, Coltell O, Portolés O, Pascual EC, Ortega-Azorín C, González JI, Estruch R, Saiz C, Pérez-Fidalgo A, Ordovas JM, Corella D.

Chronological Age Interacts with the Circadian Melatonin Receptor 1B Gene Variation, Determining Fasting Glucose Concentrations in Mediterranean Populations. Additional Analyses on Type-2 Diabetes Risk.

Nutrients. 2020 Oct 29;12(11):3323. doi: 10.3390.

12. Coltell O, Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Portolés O, Asensio EM, Saiz C, Barragán R, Estruch R, Corella D.

Circulating Adiponectin and Its Association with Metabolic Traits and Type 2 Diabetes: Gene-Diet Interactions Focusing on Selected Gene Variants and at the Genome-Wide Level in High-Cardiovascular Risk Mediterranean Subjects.

Nutrients. 2021 Feb 7;13(2):541.

Comunicacions a congressos

Hem presentat diverses comunicacions a congressos en forma de pòster o comunicació oral, a més de diverses ponències convidades. Se'n detallen les més rellevants a continuació.

- Entre les ponències convidades, destaquen les impartides per la Dra. Corella amb motiu d'haver rebut el premi Jaume I d'Investigació Mèdica del 2018; en les

ponències va difondre alguns resultats preliminars d'aquest projecte en diferents fòrums.

- També destaca la presentació oral de la Dra. Corella al Congrés d'Obesitat de Las Vegas celebrat el 2019, en què va presentar resultats de GWAS en població mediterrània.

- La Dra. Corella ha presentat una ponència convidada al Congrés de la Societat Espanyola de Diabetis (juny del 2020) sobre interaccions gen-dieta i GRS.