

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

División Académica de Ciencias de la Salud



“Marcadores asociados a la metilación en población adolescente mexicana con diagnóstico de trastorno de la conducta alimentaria”

**Tesis que para obtener el grado de la:
Maestría en Ciencias Biomédicas**

Presenta:

David Ruiz Ramos

Directores:

Dra. Isela Esther Juárez Rojop

Dra. Alma Delia Genis Mendoza

Villahermosa, Tabasco.

Noviembre 2020.



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Jefatura del
Área de Estudios
de Posgrado



Of. No. 0289/DACS/JAEP

09 de marzo de 2020

ASUNTO: Autorización impresión de tesis

C. David Ruiz Ramos

Maestría en Ciencias Biomédicas

Presente

Comunico a Usted, que ha sido autorizada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate, Dr. Jorge Luis Ble Castillo, M. en C. Thelma Beatriz González Castro, Dra. Isela Esther Juárez Rojop y la Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego, impresión de la tesis titulada: "**Marcadores asociados a la metilación en población adolescente mexicana con diagnóstico de trastorno de la conducta alimentaria**", para sustento de su trabajo recepcional de la Maestría en Ciencias Biomédicas, donde fungen como Directores de Tesis la Dra. Isela Esther Juárez Rojop y la Dra. Alma Delia Genis Mendoza.

Atentamente



Dra. Mirian Carolina Martínez López

Directora

C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop.- Director de Tesis
C.c.p.- Dra. Alma Delia Genis Mendoza.- Director de Tesis
C.c.p.- Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate.- Sinodal
C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- Sinodal
C.c.p.- M. en C. Thelma Beatriz González Castro.- Sinodal
C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop Sinodal
C.c.p.- Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego.- Sinodal

C.c.p.- Archivo
DC'MCML/MO'MACA/lkrd*



ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Villahermosa Tabasco, siendo las 16:00 horas del día 06 del mes de marzo de 2020 se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la División Académica de Ciencias de la Salud para examinar la tesis de grado titulada:

"Marcadores asociados a la metilación en población adolescente mexicana con diagnóstico de trastorno de la conducta alimentaria"

Presentada por el alumno (a):

Ruíz	Ramós	David
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)

Con Matricula


1	8	1	E	5	7	0	0	2
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al Grado de:


Maestro en Ciencias Biomédicas

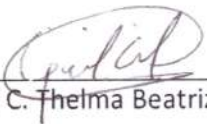
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

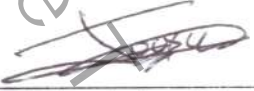
COMITÉ SINODAL


 Dra. Isela Esther Juárez Rojop
 Director de Tesis

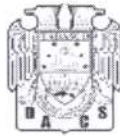

Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zarate


Dr. Jorge Luis Ble Castillo


M. en C. Thelma Beatriz González Castro


Dra. Isela Esther Juárez Rojop


Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego



Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 06 del mes de marzo del año 2020, el que suscribe, David Ruiz Ramos, alumno del programa de la Maestría en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 181E57002 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autora intelectual del trabajo de tesis titulada: **"Marcadores asociados a la metilación en población adolescente mexicana con diagnostico de trastorno de la conducta alimentaria"**, bajo la Dirección de la Dra. Isela Esther Juárez Rojop, Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31. La alumna cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: daruiz_914@hotmail.com. Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

David Ruiz Ramos
Nombre y Firma

DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS DE LA SALUD



JEFATURA DEL ÁREA DE
ESTUDIOS DE POSGRADO

Sello



Dedicatorias

A mi familia, en especial a mi hijo Carlos Manuel.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



Agradecimientos

A Dios

Por la vida y permitirme superar cada día.

A mi familia

Por su amor y apoyo incondicional, además de palabras de aliento cuando más lo necesito. Mamá, Papá, Alo, Poncho y Carlitos,

LOS AMO

A mis amigos

Por motivarme a vivir y disfrutar cada momento al máximo.

A mis profesores

Dra. Isela, Dr. Carlos, Dra. Alma, Mtra Thelma , Mtra Mile, Mtro Jaime.

Por el tiempo que me dedicaron, sus enseñanzas no quedan en el olvido; además de virtudes que me transmitieron son el resultado de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por considerarme becario durante mis estudios de la maestría.



Abreviaturas y siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AN	Anorexia nerviosa
BN	Bulimia nerviosa
DSM-5	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales 5 (por sus siglas en inglés, <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
EWAS	Estudio de asociación de epigenoma completo, Epigenome-Wide Association Study
MINI-KID	Mini Entrevista Internacional Neuropsiquiátrica para niños y adolescentes, Mini International Neuropsychiatric Interview for Children and Adolescents
TA	Trastorno por atracón
TCA	Trastorno de la conducta alimentaria
QEWP-R	Cuestionario de patrones de alimentación y peso versión revisada, Questionnaire on Eating and Weight Patterns Revised, QEWP-R



Glosario

Epigenética:

Se define como el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de los genes sin una modificación en la secuencia del ADN. Establece la relación entre las influencias genéticas y ambientales que determinan un fenotipo.

Metilación:

Es la adición de un grupo metilo (-CH₃) a una molécula. En biología del desarrollo, la metilación es el principal mecanismo epigenético. Consiste en la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas (C) del ADN situadas previa y continuamente a una guanina (G).

Genoma:

Es el conjunto de genes contenidos en los cromosomas, puede interpretarse como la totalidad del material genético que posee un organismo.

Isla CpG:

Es una región de tamaño igual o superior a 500 pares de bases y con un porcentaje de guanina y citocina mayor de 50 y con un promedio de CpG observado/esperado mayor de 0.6.



Resumen

Antecedentes. Los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) son un problema de salud mental con alta comorbilidad psiquiátrica. La etiología de los TCA es incierta, sin embargo, estudios genómicos han demostrado que la metilación del ADN es un mecanismo que podría participar en el desarrollo de la enfermedad; y la adolescencia es la etapa ideal para identificar estos cambios en el genoma. El objetivo fue obtener sitios CpG diferencialmente metilados entre los diferentes diagnósticos de TCA en población adolescente mexicana.

Material y métodos. Se reclutaron 64 pacientes con los diagnósticos de anorexia nerviosa (AN), bulimia nerviosa (BN) y trastorno por atracón (TA). Se realizó extracción de ADN y análisis del metiloma mediante componentes principales (ACP), composición celular, enriquecimiento de vías y anotación de los sitios CpG con búsqueda en bases de datos previamente publicadas de patrones de metilación en cerebro. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Resultados. Demostramos alta variabilidad clínica en los pacientes con TCA con comorbilidad psiquiátrica. Observamos un ACP con 2 grupos de variabilidad entre los diagnósticos de TCA; sin diferencias en la composición celular de la metilación del ADN. Observamos 23 sitios CpGs diferencialmente metilados entre los diagnósticos de TCA; de los cuales, encontramos 10 sitios CpGs correlacionados con los patrones de metilación de muestras del cerebro. Los sitios CpGs diferencialmente metilados se encontraron en 17 genes, y observamos participación con el factor de transcripción SRF y varios componentes de la vía de señalización MAP cinasa.

Conclusiones. Diez sitios CpGs son potenciales biomarcadores en sangre para identificar a pacientes con TCA con alta heterogeneidad clínica. Además, el gen *GALNT18* podría ser biomarcador que confiere riesgo poligénico en población adolescente con TCA. Finalmente, sugerimos que las proteínas KPNA1 y SOCS6 podrían participar en la modulación de actividad neuronal y ser el fundamento molecular para la alta comorbilidad psiquiátrica en pacientes adolescentes con TCA.

Palabras claves: trastornos de la conducta alimentaria, metilación del ADN, adolescentes mexicanos, epigenética, comorbilidad psiquiátrica.



Abstract

Background. Anorexia nervosa (AN), bulimia nervosa (BN) and binge eating disorder (BED), are the most common eating disorders (ED) with a high prevalence of psychiatry comorbidities. Although the etiology is not well established, there is a hypothesis indicating that epigenetic mechanisms, indeed DNA methylation, could influence the onset of the disease; adolescence is the ideal moment to identify genomic changes. Our study aimed to establish differentially methylated CpGs sites within the eating disorders diagnoses in an adolescent Mexican population.

Methods. We recruited 64 patients with a diagnosis of AN, BN, and BED. Genomic DNA extraction was performed; in the methylome analysis we included a principal component analysis, a cellular composition analysis, a pathway enrichment, and a CpG annotation in the genome; with final database research of previous methylation patterns in the brain.

Results. We demonstrated a high prevalence of psychiatric comorbidities. In the PCA we observed 2 groups of variability in the sample studied, and no differences were observed in the cellular composition analysis. Twenty-three differentially methylated CpGs sites were found, 10 of them were correlated with methylation patterns in brain samples. We obtained 17 genes from the CpG annotation, and from enrichment pathway analysis we observed the possible participation of a transcription factor (SRF) and different MAPK pathway components.

Conclusions. We obtained 10 potential genomic markers from blood samples to identify patients with ED and high clinical variability. Furthermore, the *GALNT18* gene could contribute to a polygenic risk in an adolescent population with ED. Finally, we suggest that KPNA1 and SOCS6 proteins could participate in neuronal activity modulation, being the molecular mechanism to explain high psychiatry comorbidity in adolescents with ED.

Keywords: eating disorders, DNA methylation analysis, Mexican adolescents, epigenetic, psychiatry comorbidity.



Índice

	Página
Resumen	I
Abstract.....	II
<hr/>	
1. Introducción	1
<hr/>	
1.1. Trastornos de la conducta alimentaria	1
1.1.1. Anorexia nerviosa	2
1.1.2. Bulimia nerviosa	2
1.1.3 Trastorno por atracón	3
1.2. Etiología de los trastornos de la conducta alimentaria	3
1.2.1 Genómica de los trastornos de la conducta alimentaria	4
1.3. Epigenética	7
1.3.1 Epigenética en trastornos de la conducta alimentaria	8
<hr/>	
2. Planteamiento del problema	13
<hr/>	
3. Justificación	14
<hr/>	
5. Objetivos	15
<hr/>	
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos específicos	15
<hr/>	



5. Material y Métodos	16
5.1. Tipo de estudio	16
5.2. Población de estudio	16
5.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	16
5.4. Diseño del estudio	17
5.5. Instrumentos y medidas clínicas	17
5.6. Análisis del metiloma	18
5.7. Análisis de datos del metiloma	20
5.7.1. Software y paquetes	21
5.7.2. Análisis del metiloma	21
5.7.2.1. Valores β y M de metilación	21
5.7.2.2. Control de calidad y densidad β	22
5.7.2.3. Filtro de sondas y normalización	24
5.7.2.4. Análisis de componentes principales	24
5.7.2.5. Composición celular	25
5.7.2.6. Análisis de variables subrogadas y modelo de regresión lineal	25



5.8. Enriquecimiento de vías y correlación en sangre	26
5.9. Declaración de ética	26
<hr/>	
6. Resultados	27
<hr/>	
6.1 Características de la población en estudio	27
6.1.1. Heterogeneidad de los pacientes con TCA	31
6.2. Análisis de componentes principales	32
6.3. Composición celular	33
6.4. Sitios CpGs diferencialmente metilados	33
6.5 Enriquecimiento de vías y correlación en sangre	39
<hr/>	
7. Discusión	42
<hr/>	
7.1 Características clínicas de la población adolescente mexicana con TCA	42
7.2 Metilación del ADN en pacientes con TCA	45
7.3 Sitios CpGs diferencialmente metilados en población adolescente mexicana con TCA	48
7.4 Enriquecimiento de vías	50
<hr/>	
8. Conclusión	55
<hr/>	
9. Referencias	56
<hr/>	



Índice de tablas

Tablas		Pág.
Tabla 1	Niveles de gravedad en pacientes adultos con TCA. Modificada (DSM-5)	4
Tabla 2	Estudios del estatus global de metilación en pacientes con trastornos de la conducta alimentaria. Modificada (Hübel et al., 2019)	8
Tabla 3	Estudios de genes candidatos en población con trastornos de la conducta alimentaria. Modificada (Hübel et al., 2019)	10
Tabla 4	Estudios de asociación de epigenoma completo en pacientes con trastornos de la conducta alimentaria. Modificada (Hübel et al., 2019)	11
Tabla 5	Características sociodemográficas y clínicas de la población adolescente mexicana con trastornos de la conducta alimentaria.	28
Tabla 6	Comparación de las comorbilidades psiquiátricas entre diagnósticos de trastorno de la conducta alimentaria.	30
Tabla 7	Heterogeneidad entre diagnósticos de TCA en población adolescente mexicana.	31
Tabla 8	Comparación de las proporciones celulares del análisis de la metilación en pacientes adolescentes con trastorno de la conducta alimentaria.	34



Tabla 9	Sitios CpGs diferencialmente metilados en pacientes con AN y BN.	37
Tabla 10	Sitios CpGs diferencialmente metilados en pacientes con BN y TA.	38
Tabla 11	Sitios CpGs diferencialmente metilados en pacientes con AN y TA.	39
Tabla 12	Factores de transcripción del enriquecimiento de vías en Enrichr.	40
Tabla 13	Vías de señalización en Enrichr.	40



Índice de figuras

	Pág.
Figura 1	Hipótesis de la conducta anorexigénica por mecanismos genéticos y epigenéticos 12
Figura 2	Procesamiento semi-automatizado de muestras para análisis de metilación. 19
Figura 3	Gráficos de control de calidad. Mediana de la intensidad de fluorescencia de las sondas metiladas y no metiladas. 23
Figura 4	Gráfico de densidad de los valores β de los microarreglos. Cada microarreglo contiene información de 8 muestras. 23
Figura 5	Comorbilidades psiquiátricas en pacientes mexicanos con trastorno de la conducta alimentaria. 29
Figura 6	Análisis de componentes principales de los diagnósticos de TCA 32
Figura 7	Volcán plot de sitios CpGs diferencialmente metilados en pacientes con TCA 35
Figura 8	Diagrama Venn con el número de sitios CpGs diferencialmente metilados en las comparaciones de pacientes con TCA. 35
Figura 9	Correlación de valores β en sangre y cerebro de sitios CpGs diferencialmente metilados. 41



1. Introducción

1.1. Trastornos de la conducta alimentaria

Los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) son alteraciones psicossomáticas según el Manual Diagnóstico y Estadístico para los trastornos mentales (DSM 5; siglas en inglés) considerando a la anorexia nerviosa (AN), la bulimia nerviosa (BN) y el trastorno por atracón (TA) los más frecuentes (American Psychiatric Association, 2013). Estos son trastornos complejos que se caracterizan por un comportamiento distorsionado ante la comida donde se altera la actitud de la persona hacia el peso y la forma de su cuerpo.

Los TCA presentan gran relevancia en la población por un aumento en la incidencia y alta morbi-mortalidad entre las alteraciones psiquiátricas; las prevalencias actuales son de 0.8% (AN), 2.6% (BN) y 3% (TA); afectando principalmente a adolescentes del sexo femenino. En México las prevalencias reportadas son de 0.5% (AN), 1% (BN) y 1.5% (TA) (Kolar *et al.*, 2016; Stice, Marti, y Rohde, 2013).

El trastorno por atracón se contemplaba en la versión IV del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) como un trastorno alimentario o de la ingestión de alimentos no especificado (EDNOS, eating disorder not otherwise specified); y en la versión más reciente (DSM-5) se incluye al trastorno por atracón como un diagnóstico de TCA. Este cambio permitió identificar más pacientes jóvenes con TCA (Mairs y Nicholls, 2016); aumentó la prevalencia y la heterogeneidad entre diagnósticos (Breithaupt, Hubel, y Bulik, 2018). En adultos, la heterogeneidad (transición diagnóstica) dificulta el diagnóstico y tratamiento



(Mustelin *et al.*, 2016); y en población en etapa del neurodesarrollo, los síndromes completos de TCA se alcanzan antes de terminar la pubertad (Klump, 2013).

1.1.1. Anorexia nerviosa

La AN se caracteriza por restricción constante de ingesta de comida que conduce a un peso corporal bajo con relación a la edad, sexo y salud física. Además, los pacientes tienen miedo intenso a la ganancia de peso ó presentan un comportamiento persistente que interfiere con la ganancia de peso, incluso con un peso bajo, y percepción corporal alterada. Existen dos subtipos de AN, el tipo restrictivo y el tipo con atracones/purgas. En el tipo restrictivo, la pérdida de peso se debe a la dieta, el ayuno y/o ejercicio excesivo. Mientras que en el tipo con atracones/purga, el individuo provoca el vómito, utiliza laxantes, diuréticos o enemas. La gravedad de la enfermedad en adultos tiene como parámetro el índice de masa corporal (IMC); mientras que, para niños y adolescentes se utilizan los percentiles correspondientes del IMC para edad y género (APA, 2013) (Tabla 1).

1.1.2. Bulimia nerviosa

Los pacientes con BN presentan episodios recurrentes de atracones y un comportamiento compensatorio. Un atracón tiene 2 características, ingestión de la cantidad de alimento 2 veces mayor a la que la mayoría de las personas ingerirían dentro de un periodo de 2 horas; y sensación de falta de control sobre lo que se ingiere durante el episodio. Por otra parte, el mecanismo compensatorio tiene la finalidad de evitar el aumento de peso y se caracteriza por la inducción del vómito, uso de laxantes o diuréticos, periodos de ayuno y ejercicio excesivo. Este



comportamiento debe estar presente al menos 1 vez a la semana durante 3 meses. La gravedad se basa en el número de episodios de comportamiento compensatorio (APA, 2013) (Tabla 1).

1.1.3. Trastorno por atracón

Los pacientes con TA presentan episodios recurrentes de atracones, similar a los pacientes con BN. En contraste, el TA no presenta comportamiento compensatorio y los episodios de atracones causan malestar intenso y se asocian a: comer mucho más rápido de lo normal, comer hasta sentirse desagradablemente lleno, comer grandes cantidades de alimentos cuando no se siente hambre físicamente, comer solo debido a la vergüenza que se siente por la cantidad que se ingiere y, sentirse luego a disgusto con uno mismo, deprimido o muy avergonzado. La mayoría de los individuos con TA tienen sobrepeso u obesidad; y la gravedad se basa en la frecuencia de episodios de atracones (APA, 2013). (Tabla 1)

1.2. Etiología de los trastornos de la conducta alimentaria

La etiología de los trastornos de la conducta alimentaria no es certera. Sin embargo, existe evidencia que diversos factores biológicos, sociales y psicológicos contribuyen a la etiología y la cronicidad de esta enfermedad. Los factores biológicos juegan un papel fundamental debido a la predisposición genética y a los componentes neurobiológicos que pueden considerarse como marcadores biológicos de la enfermedad (Genis-Mendoza, Tovilla-Zarate, y Nicolini, 2013).



Tabla 1.

Niveles de Gravedad en Pacientes Adultos con TCA. Modificada (DSM-5)

Nivel de gravedad	Anorexia nerviosa	Bulimia nerviosa	Trastorno por atracón
Leve	IMC \geq 17 kg/m ²	Un promedio de 1–3 episodios de comportamientos compensatorios inapropiados a la semana.	1–3 atracones a la semana.
Moderado	IMC 16–16.99 kg/m ²	Un promedio de 4–7 episodios de comportamientos compensatorios inapropiados a la semana.	4–7 atracones a la semana.
Grave	IMC 15–15.99 kg/m ²	Un promedio de 8–13 episodios de comportamientos compensatorios inapropiados a la semana.	8–13 atracones a la semana.
Extremo	IMC < 15 kg/m ²	Un promedio de 14 episodios de comportamientos compensatorios inapropiados a la semana.	14 o más atracones a la semana.

Abreviaciones: AN, anorexia nerviosa; BN, bulimia nerviosa; TA, trastorno por atracón; IMC, índice de masa corporal (kilogramo/metro²)

Fuente: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

1.2.1. Genómica de los trastornos de la conducta alimentaria

Los TCA son resultado de la interacción genética; la susceptibilidad genética (heredabilidad) de estudios en gemelos, en familias y en sujetos dados en adopción, demostró influencia significativa para TCA. La heredabilidad para TCA es 74%, 62% y 45% (AN, BN y TA, respectivamente). Además, hay estudios de ligamiento descritos que se atribuyen como factor de riesgo para estas alteraciones. Estos estudios identifican regiones del genoma involucrados con características fenotípicas. En pacientes con AN se identificó el cromosoma 1, 2 y 13 como factores de riesgo que conllevan al bajo peso y la obsesión. Mientras que en pacientes con BN se identificó al cromosoma 10 (Gervasini y Gamero-Villaruel, 2015; Yilmaz, Hardaway, y Bulik, 2015).



Por otra parte, el estudio de genes candidatos examina la frecuencia alélica de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, siglas en inglés) en personas con o sin una característica en específico (enfermedad). Mientras que el estudio de asociación de genoma completo (GWAS, siglas en inglés) compara a los individuos con la enfermedad buscando SNPs en todo el genoma simultáneamente. Ambos estudios han arrojado información sobre el sistema serotoninérgico; por ejemplo, en un estudio de casos y controles en población mexicana se reportó asociación del polimorfismo rs6311 del gen *5-HTR2A* con trastornos de la conducta alimentaria en pacientes adolescentes (Genis-Mendoza *et al.*, 2019). En este sentido, se sugiere que el neurotransmisor de serotonina participa en la regulación del peso corporal, saciedad y regulación del apetito. Otros estudios demuestran que el sistema dopaminérgico está relacionado con la alteración de la imagen corporal y el sistema de recompensa. Estos estudios son una herramienta para comprender la etiología de las TCA. Además, se han asociado genes relacionados con el sistema opioide, el sistema de recompensa, la regulación del apetito, la ingesta de alimentos y regulación del peso. Las evidencias muestran que falta realizar estudios para relacionar a los genes con los trastornos de la conducta alimentaria; probablemente debido al tamaño de muestra, falta de replicación y diferencias étnicas (Scherag, Hebebrand, y Hinney, 2010; Trace *et al.*, 2013).

Por otro lado, existe evidencia genética que reporta asociaciones entre diversas alteraciones psiquiátricas; en estudios de gemelos, se estudió la relación entre TCA, depresión y suicidio. Se reportaron 3 estudios con asociación significativa y aumento en el riesgo de suicidio en los pacientes con TCA; por otra parte, estudios



de familia sugieren factores genéticos que influyen en el desarrollo de AN y ansiedad; la literatura clínica apoya el vínculo entre ansiedad y el sistema de recompensa; de esta manera se explica el comportamiento de los pacientes con AN; iniciando con recompensas, mismas que con el tiempo se mantienen, implementando un comportamiento de asociación aprendidas y refuerzo condicionado (Lipsman, Woodside, y Lozano, 2015).

Mas y colaboradores (2013) han demostrado relación entre AN y el trastorno obsesivo compulsivo; asociando a diversos SNPs; además se sugiere una interacción biológica entre los neurotransmisores glutamato, serotonina y factores asociados con neurogénesis. A la fecha se han generado varias decenas de genes involucrados en los TCA, sin embargo, estudios moleculares más específicos como la epigenética han sido útil en desarrollar nuevas hipótesis asumiendo que la metilación del ADN podría contribuir al desarrollo de los trastornos de la conducta alimentaria (Grzelak *et al.*, 2017).

1.3. Epigenética

La epigenética es el estudio de cambios en la expresión de genes; dichos cambios ocurren sin alteraciones en la secuencia de ADN. Las modificaciones epigenéticas proveen un mecanismo para alterar los niveles de expresión de genes en distintas fases del desarrollo y como consecuencia de cambios ambientales. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo por distintas vías, y las más estudiadas son la metilación de ADN, acetilación de histonas, y la participación de ARN no codificante (Pjetri *et al.*, 2012).



La metilación provoca cambios en la estructura de la cromatina a través de modificaciones en el terminal amino. La DNA-metil-transferasa es la enzima responsable de añadir un grupo metilo en los nucleótidos CpG (citosina-fosfato-guanina) en la posición 5 del anillo de pirimidinas (formado por los residuos de citosina); alterando la transcripción. El concentrado de nucleótidos CpGs dentro de una región abundante de GC (Guanina y Citosina) forma las islas CpG, presentes en 40% en la región promotora de los genes.

La técnica empleada para metilación del ADN ha variado entre los estudios y han reportado los niveles de metilación global, el estatus de metilación en genes candidatos y sitios CpGs diferencialmente metilados en todo el genoma humano. Se tiene registro de trabajos en donde reportan alteraciones epigenéticas en los TCA, se enfocan principalmente en la metilación del ADN en pacientes con AN y BN, pero no en pacientes con TA (Pjetri *et al.*, 2012; Shih y Woodside, 2016; Yilmaz *et al.*, 2015).

1.3.1. Epigenética en los trastornos de la conducta alimentaria

Tremolizzo y colaboradores (2014) estudiaron el nivel global de la metilación del ADN en una muestra de 32 pacientes con diagnóstico de AN y 13 controles en población italiana, sus resultados demostraron una leve hipometilación global en pacientes con AN. Sin embargo, los autores sugirieron que sus resultados fueron atribuidos al tamaño de la muestra y la disfunción hormonal (fisiopatología principal de la AN y presencia de alteraciones cardíacas) (Tremolizzo *et al.*, 2014). (Tabla 2)



Tabla 2.

Estudios del Estatus Global de Metilación en Pacientes con Trastornos de la Conducta Alimentaria. Modificada (Hübel et al., 2019)

Autor (Año)	Muestra			Resultado		
	N	Población Femenino (%)	Edad (DE) [años]	Metilación global		
				AN	BN	TA
Frieling (2007)	AN: 22 BN: 24 CO: 30	100% 100% 100%	26.5 (10.3) 25.8 (7.7) 22.0 (4.8)	↓	↔	
Saffrey (2014)	AN: 10 CO: 10	100% 100%	21.5 (10.2) 23.1 (9.5)	↔		
Tremolizzo (2014)	AN: 32 CO: 13	100% 100%	15.5 (1.4) 16.3 (1.3)	↓		
Booij (2015)	AN: 29 CO: 15	100% 100%	22.7 (5.9) 24.2 (5.8)	↑		

Abreviaciones: ↓ = descenso en el nivel de metilación; ↑ = aumento en el nivel de metilación; ↔ = sin cambios en el nivel de metilación; AN, anorexia nerviosa; BN, bulimia nerviosa; CO, control; DE, desviación estándar; N, tamaño de muestra; TA, trastorno por atracón.

Fuente: Hübel et al., 2019

Se realizó un estudio de genes candidatos en población alemana; Ehrlich y colaboradores (2010) estudiaron el nivel de metilación del promotor del gen *POMC*; los autores realizaron 3 grupos de comparación, el primer grupo consistió en 31 pacientes con AN, el segundo grupo de 30 pacientes con su respectiva recuperación de peso y el tercer grupo consistió en 30 sujetos sanos. Los autores encontraron el porcentaje de metilación muy similar entre los 3 grupos, y sugirieron que la metilación de este promotor no se ve afectado por el estado nutricional (malnutrición). Aunque no hubo diferencias entre el porcentaje de metilación de ADN, se sugirió que cambios en la dieta que conllevan a una reducción de metilación del ADN (mecanismo epigenético) podrían ser el cambio molecular en



adolescentes que podría contribuir en la progresión del trastorno. No obstante, la expresión periférica de ARNm del gen se halló asociada a pacientes con malnutrición e hipoleptinemia, sugiriendo que la metilación localizada fuera de la región promotora podría influir en la expresión del ARNm (Ehrlich *et al.*, 2010). Otros genes candidatos estudiados en AN y BN reportados metilados son: el transportador de dopamina (SLC6A3), el receptor D2 de dopamina (DRD2), el péptido auricular natriurético, el receptor de glucocorticoide (NR3C1), y el gen del receptor de oxitocina (OXTR, asociado negativamente con el IMC) (Shih y Woodside, 2016; Yilmaz *et al.*, 2015). (Tabla 3)

A diferencia de los estudios previos, los EWAS (estudio de asociación de epigenoma completo) son una herramienta que permite buscar sitios o marcadores específicos en todo el genoma. Booij y colaboradores (2015) demostraron islas metiladas en varios genes relacionados con modificaciones del ARN, acetilación de histonas, almacenamiento de colesterol, transporte de lípidos, señalización de dopamina y glutamina, metabolismo y pérdida de peso. Podrían ser la causa de alteraciones psicológicas y medicas de la AN (Booij *et al.*, 2015).

Las tablas 2-4 resumen los hallazgos epigenéticos en población adulta y adolescente con trastornos de la conducta alimentaria.



Tabla 3.

Estudios de Genes Candidatos en Población con Trastornos de la Conducta Alimentaria. Modificada (Hübel et al., 2019)

Autor (Año)	Muestra			Resultado			
	N	Población Femenino (%)	Edad (DE/Q1, Q3) [años]	Gen candidato	AN	BN	TA
Frieling (2007)	AN: 22 BN: 24 CO: 30	100% 100% 100%	26.5 (10.3) 25.8 (7.7) 22.0 (4.8)	SNCA HERP	↑ ↔	↔ ↔	
Frieling (2008)	AN: 22 BN: 22 CO: 30	100% 100% 100%	22 (18–51) 23 (18–42) 21 (19–43)	ANP Vasopresina	↔ ↔	↑ ↔	
Frieling (2009)	AN: 20 BN: 23 CO: 26	100% 100% 100%	26.4 (10.6) 25.9 (7.9) 21.3 (2.2)	CNR1/CB1 CB2	↔ nd		
Frieling (2010)	AN: 22 BN: 24 CO: 30	100% 100% 100%	26.5 (10.3) 25.8 (7.7) 22.0 (4.5)	SLC6A3/DAT DRD2 DRD4	↑ ↑ ↔	↑ ↔ ↔	
Ehrlich (2010)	AN: 31 AN-Rec: 30 CO: 30	100% 100% 100%	16.4 (1.3) 19.3 (3.0) 16.4 (1.5)	POMC	↔		
Ehrlich (2012)	AN: 40 AN-Rec: 21 CO: 54	100% 100% 100%	17.88 (3.2) 19.25 (3.7) 17.10 (2.3)	POMC	↔ ↔		
Pjetri (2013)	AN: 45 CO: 45	n.d. n.d.	16–60 n.d.	DRD2 LEP BDNF SLC6A4	↔ ↔ ↔ ↔		
Steiger (2013)	BN: 64 CO: 32	100% 100%	26.1 (6.6) 23.7 (5.7)	GR		↔	
Groleau (2014)	BN: 52 CO: 19	100% 100%	24.7 (5.7) 23.7 (4.6)	DRD2		↔	
Kim (2014)	AN: 15 CO: 36	100% 100%	24.7 (10.7) 22.1 (2.2)	OXTR	↑		
Saffrey (2014)	AN: 10 CO: 10	100% 100%	21.5 (10.16) 23.1 (9.45)	IGF2	↔		
Thaler (2014)	BN: 64 CO: 32	100% 100%	26.1 (6.6) 23.7 (5.7)	BDNF		↑	
Veldic (2017) Jia (2017)	TA/BN: 30 CO: 32	76.7% 56.3%	45.2 (14.8) 37.4 (13.4)	SLC1A2		↓	↓

Abreviaciones: ↓ = descenso en el nivel de metilación; ↑ = aumento en el nivel de metilación; ↔ = sin cambios en el nivel de metilación; AN, anorexia nerviosa; AN-Rec, peso recuperado de anorexia nerviosa; ANP, péptido natriurético A; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; BN, bulimia nerviosa; CNR1/CB1, receptor cannabinoide 1; CNR2/CB2, receptor cannabinoide 2; CO, control; DAT/ SLC6A3, transportador de dopamina; DE, desviación estándar; DRD2, receptor de dopamina D2; DRD4, receptor de dopamina D4; GR, receptor de glucocorticoide, HERP, proteína retículo endoplásmico con ubiquitina inducido por homocisteína; IGF2, factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 2; LEP, leptina; N, tamaño de muestra; nd, no disponible; ns, no significativo; OXTR, receptor de oxitocina; POMC, proopiomelanocortina; Q1, cuartil 1; Q3, cuartil 3; SLC1A2, transportador glutamato/aspartato tipo 2; SLC6A4, transportador de sodio dependiente de serotonina; SNCA sinucleína α

Fuente: Hübel et al., 2019



Tabla 4.

Estudios de Asociación de Epigenoma Completo en Pacientes con Trastornos de la Conducta Alimentaria. Modificada (Hübel et al., 2019)

Autor (Año)	Muestra			Resultado			
	N	Población Femenino (%)	Edad (DE/Q1, Q3) [años]	EWAS	AN	BN	TA
Booij (2015)	AN: 29 CO: 15	100% 100%	22.7 (5.9) 24.2 (5.8)		14 CpG		
Kesselmeier (2016)	AN: 47 CT: 47 CO: 100	100% 100% 100%	16 (14, 17) 22 (21, 23) 60 (54, 69)	AN vs CT AN vs CO	51 CpG 81 CpG		
Ramoz (2017)	AN: 18 AN-Rec: 18	100% 100%	nd	ns	↔		

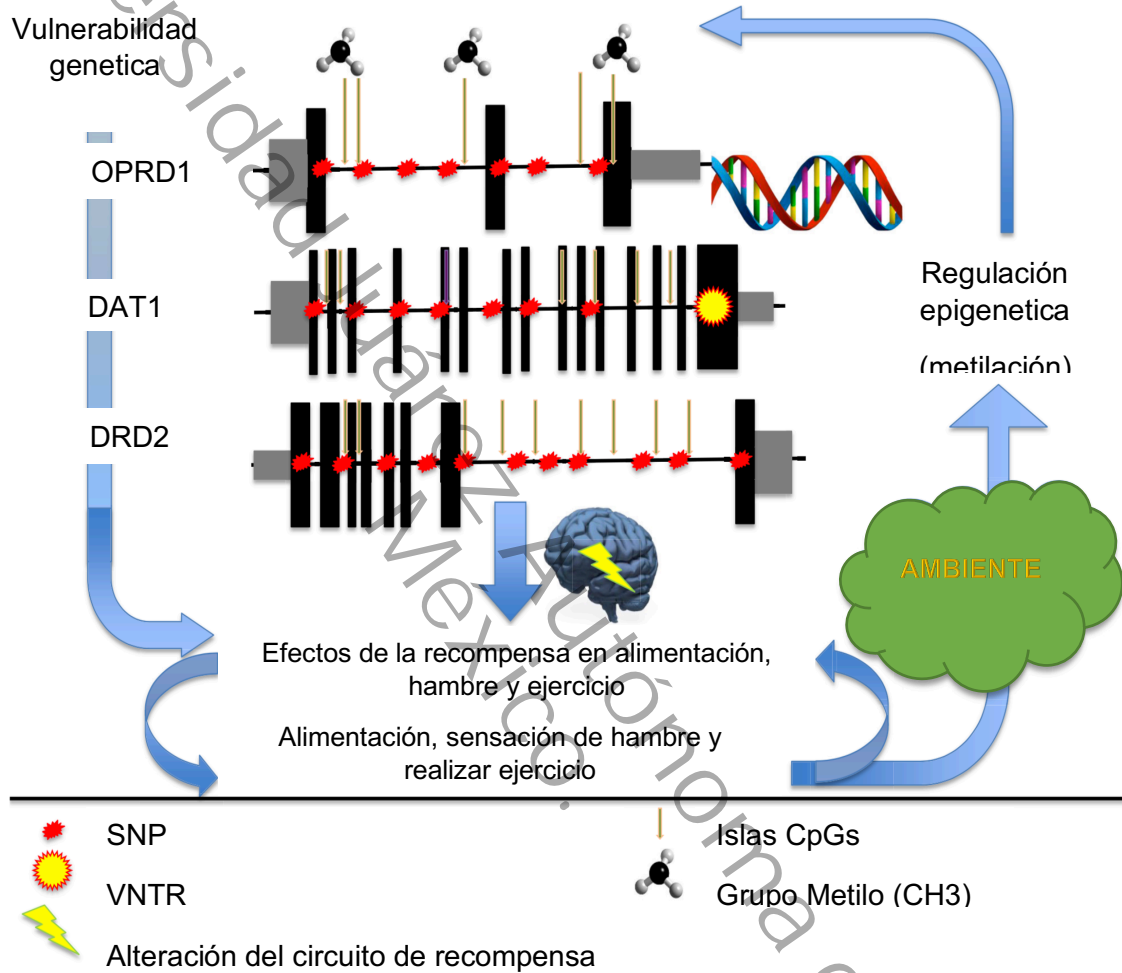
Abreviaciones: ↔ = sin cambios en el nivel de metilación; AN, anorexia nerviosa; AN-Rec, peso recuperado de anorexia nerviosa; BN, bulimia nerviosa; CO, control; CpG, sitio CpG, DE, desviación estándar; EWAS, estudio de asociación de epigenoma completo; N, tamaño de muestra; nd, no disponible; ns, no significativo; Q1, cuartil 1; Q3, cuartil 3; TA, trastorno por atracón.

Fuente: Hübel et al., 2019

En los estudios previos se estipuló la teoría que la anorexia nerviosa es resultado de la desregulación entre los niveles genéticos o epigenéticos de los genes de dopamina involucrados en el sistema de recompensa y mecanismos regulatorios de la ingesta; y de esta manera se alteran estos procesos y confieren la dependencia a la privación de la comida (Gorwood *et al.*, 2016). (Figura 1) Aunque faltan estudios para generar estas hipótesis para bulimia nerviosa y trastorno por atracón.

Figura 1.

Hipótesis de la Conducta Anorexigénica por Mecanismos Genéticos y Epigenéticos.



DAT1, transportador de dopamina; DRD2, receptor D2 de dopamina; OPRD1, receptor delta de opioides; SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; VNTR, Número variable de repeticiones en tándem.



2. Planteamiento del problema

Los trastornos de la conducta alimentaria son un problema de salud mental con gran interés en los últimos años. La prevalencia de TCA aumentó a nivel mundial; así mismo, la incidencia de la enfermedad es en edades más tempranas; y finalmente, los pacientes con anorexia nerviosa tienen la tasa de mortalidad más alta entre los trastornos psiquiátricos. Estos datos sugieren que la población adolescente en pleno neurodesarrollo es la población en riesgo para desarrollar un trastorno alimenticio (Klump, 2013). Sin embargo, actualmente se observa que los pacientes con TCA comparten síntomas, como la restricción a la ingesta de alimentos, y en la población adulta existe la oscilación clínicamente entre los diagnósticos. Aunque esta transición no está demostrada en población adolescente, en la pubertad no hay síndromes alimentarios completos (AN, BN, TA). Esta característica permite que los síntomas clínicos de los TCA en los pacientes adolescentes se compartan entre los diagnósticos. Por otro lado, a la fecha con la amplia gama de herramientas biotecnológicas como la epigenómica, no hay evidencia que reporte las diferencias epigenéticas entre los diagnósticos de TCA en población adolescente.



3. Justificación

Actualmente estudios de EWAS, estudio de asociación de epigenoma completo nos permiten identificar patrones de metilación del ADN, con la finalidad de obtener marcadores de riesgo o predictores de la enfermedad. La utilidad de la metilación del ADN en población adolescente es identificar los cambios en etapas tempranas y prevenir el riesgo de desarrollar TCA en la edad adulta, y de la misma manera reconocer patrones de metilación característicos de cada diagnóstico. En este sentido, se publicaron dos listas de sitios CpGs diferencialmente metilados en población con AN. Un estudio corresponde a 47 pacientes adolescentes, y no hay evidencia a la fecha que identifiquen los sitios CpGs diferencialmente metilados en pacientes con BN y TA. Adicionalmente, el grupo de comparación fueron sujetos sin TCA o pacientes en recuperación. Por otro lado, no existen estudios de este tipo que muestren diferencias entre los diagnósticos de TCA y específicamente en población mexicana. Así es como proponemos seleccionar biomarcadores informativos que nos indiquen diferencias entre los diagnósticos de AN, BN y TA en población adolescente mexicana; además, que nos permitan predecir el riesgo de presentar conductas asociadas a desarrollar un trastorno de la conducta alimentaria o predecir el riesgo incrementado de presentar complicaciones en la evolución de la enfermedad.



4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Obtener los sitios CpG diferencialmente metilados entre los diferentes diagnósticos de TCA en población adolescente mexicana.

4.2. Objetivos particulares

1. Realizar un análisis de agrupación no supervisado (análisis de componentes principales, ACP) para comparar los diagnósticos de TCA.
2. Obtener una inferencia celular del estudio del metiloma.
3. Describir los sitios CpG diferencialmente metilados en pacientes con TCA.
4. Comparar los sitios CpG diferencialmente metilados entre los diagnósticos de anorexia nerviosa, bulimia nerviosa y trastorno por atracón.
5. Realizar el enriquecimiento de vías de las funciones biológicas de los genes asociados.



5. Material y métodos

5.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio transversal y observacional de tipo ambispectivo.

5.2. Población de estudio

Se reclutaron pacientes que acudieron al servicio de consulta externa, hospitalización y urgencias del Hospital Psiquiátrico Infantil "Juan N. Navarro (HPIJNN)" en la Ciudad de México. Un médico psiquiatra especialista en trastornos de la conducta alimentaria evaluó y diagnosticó a los pacientes.

5.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión

- 1) Pacientes con diagnóstico de TCA valorados por médicos especialistas en Psiquiatría.
- 2) Edad entre 12 a 17 años.
- 3) Ambos géneros.
- 4) Pacientes con nacionalidad mexicana con padres y abuelos mexicanos.
- 5) Aceptación voluntaria de participación y consentimiento informado firmado por el paciente y padres o tutores.
- 6) Pacientes que aceptaron donar la muestra de sangre.

Criterios de exclusión

- 1) Pacientes cuyos padres no aceptaron voluntariamente la participación de su hijo(a)
- 2) Pacientes que negaron donar la muestra de sangre



Criterios de eliminación

- 1) Pacientes con escalas de valoración clínica incompletas.
- 2) Pacientes que decidieron retirarse del estudio.

5.4. Diseño de estudio

A los pacientes que pasaron el escrutinio inicial se les comentó a través de sus padres (o tutores) y se les explicó el objetivo del estudio. Se proporcionó por escrito y se explicó el consentimiento y asentimiento informado. Posteriormente se procedió a la entrevista clínica para la aplicación de los instrumentos y medición antropométrica. Una vez finalizada la evaluación clínica se procedió a practicar una punción de vena periférica por personal entrenado, con la finalidad de obtener 5-10 ml de sangre y posteriormente se emplearon tubos vacutainer Benton-Dickson con anticoagulante (EDTA al 0.5%) para su conservación y finalmente, extraer el ADN genómico

5.5. Instrumentos y medidas

Medidas antropométricas

Altura y peso se midieron en el escrutinio de pacientes con TCA. El sobrepeso y la obesidad se clasificó de acuerdo con los criterios de la OMS.

Mini Entrevista Internacional Neuropsiquiátrica para niños y adolescentes, (Mini International Neuropsychiatric Interview for Children and Adolescents, MINI-KID).

Se aplicó a los adolescentes participantes en presencia del padre o el tutor. Esta entrevista diagnóstica clínica estructurada; desarrollada en base los criterios



diagnósticos del DSM-IV y CIE-10, dirigida a los niños y adolescentes (de 6 a 17 años 11 meses), se aplica fácil y rápidamente (aproximadamente 25-35 minutos). El MINI-KID incluye 22 trastornos psiquiátricos, divididos en módulos. Las respuestas negativas o positivas orientan al examinador a la presencia de dichos trastornos psiquiátricos.

Cuestionario de patrones de alimentación y peso versión revisada (Questionnaire on Eating and Weight Patterns Revised, QEWP-R).

Se utilizó para identificar individuos con TA, recurrentes, con un sentimiento de pérdida de control y de culpa, en ausencia de conductas compensatorias inapropiadas típicas de la BN de acuerdo con el DSM-IV. Está compuesto por 13 reactivos, donde se indaga acerca de la cantidad de comida consumida en el atracón, la duración de este y sobre sentimientos de culpa con respecto a la comida, la dieta y el peso. Los reactivos se califican de acuerdo con la regla de decisión propuesta por Spitzer. El QEWP-R identifica de manera precisa a individuos con probabilidad baja y alta para TA y a discriminar entre niveles clínicos y no clínicos de este trastorno. Tiene una adecuada confiabilidad y validez en mujeres europeas y americanas.

5.6. Análisis del metiloma

Para realizar el análisis del metiloma se requirió extraer el ADN genómico (ADNg) a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando el Kit Genomic Wizard DNA Purification de Promega. La integridad del material genético se verificó en geles de

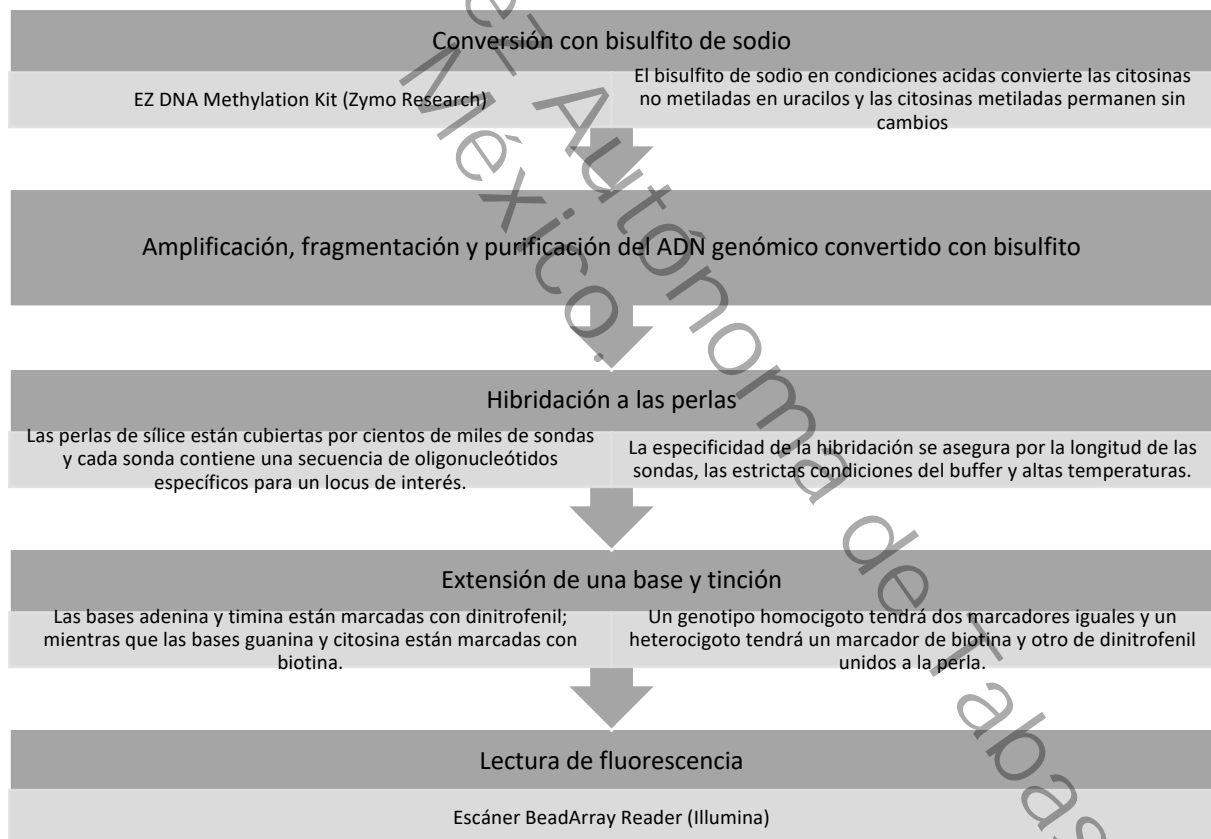


agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría utilizando el sistema Nanodrop 2000.

Se requirió de una concentración de ADNg de 80 ng/mL; según el protocolo del fabricante “Infinium Assay for Methylation Protocol” (Illumina Inc) específico para el “Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit”. El procesamiento de las muestras se realizó de manera semi-automatizada en equipos de la marca Tecan (Modelo Freedom EVO).

Figura 2.

Procesamiento Semi-automatizado de Muestras para Análisis de Metilación.





El ADN genómico convertido con bisulfito (BCD) fue amplificado y durante este proceso la base nitrogenada uracilo fue complementada con timina. Se fragmentó el BCD a segmentos de 300-600 pares de bases y se purificó con isopropanol. Al terminar la centrifugación agregó una solución buffer de hibridación. Posteriormente, las muestras se agregaron al microarreglo que contiene millones de perlas de sílice. La extensión de una base es una reacción que permitió diferenciar entre genotipos homocigotos y heterocigotos. Finalmente, se realizó la tinción de las sondas marcadas con un fluorescente verde específico para biotina o rojo para dinitrofenil. Las imágenes de fluorescencia de los microarreglos fueron transformadas a datos cuantitativos (formato ".idat") mediante el programa GenomeStudio v3.2 (Illumina). Se reportaron dos archivos para cada muestra: canal rojo (no metilación) y canal verde (metilación). (Figura 2)

5.7. Análisis de datos del metiloma

Las características demográficas y clínicas se describieron mediante frecuencias y porcentajes para las variables categóricas; con medias y desviaciones estándar (DE) para las variables continuas. Para comparar los valores del IMC de los pacientes adolescentes, estos datos fueron convertidos a valores de Z score (desviación estándar) y a percentiles específicos para edad y género (tablas de crecimiento CDC).

Se calculó el percentil del IMC de acuerdo con las tablas de crecimiento de la CDC (Centers for Disease Control and Prevention; de sus siglas en inglés) para agrupar a los pacientes de la siguiente manera: bajo peso (percentil < 5%), peso normal (6% – 90%), sobrepeso (91% - 95%) y obesidad (> 95%).



5.7.1. Software y paquetes

El análisis de datos y el análisis del metiloma fue realizado con los paquetes disponibles en el software R versión 3.5.1 (<https://CRAN.R-project.org>). El nivel de significancia fue establecido a un valor de 0.05. Lista de paquetes utilizados:

- 1) Minfi versión 1.30.0
- 2) Limma versión 3.40.0
- 3) Maxprobes versión 0.0.2
- 4) ExperimentHub versión 1.10.0
- 5) FlowSorted.Bood.EPIC versión 1.1.0
- 6) SVA versión 1.32.0

5.7.2. Análisis del metiloma

Para el análisis se realizaron 3 grupos, cada grupo fue un diagnóstico (AN, BN, TA). Las comparaciones fueron las siguientes: AN-BN, BN-TA, AN-TA y AN-BN-TA. Los archivos en formato ".idat" y la base de datos fueron incorporados al ambiente de R, y con el paquete minfi fueron vinculados para crear un objeto de clase *RGchannelSet*. Posteriormente se procesó a objeto *Methylset* para obtener los datos de las sondas metiladas y no metilados (valores β).

5.7.2.1. Valores β y M de metilación

El análisis de metilación reporta los valores Beta (β) y los valores M. Los valores β representan una razón de la intensidad de fluorescencia de las sondas metiladas entre la suma de intensidades de ambas sondas metiladas y no metiladas. Es empleado con fines de interpretación biológica. El valor β oscila entre 0 y 1, valores



cercanos a 0 representa sitios CpGs con hipometilación ($\beta \leq 0.20$) y valores cercanos a 1 equivale a sitios CpGs con hipermetilación ($\beta \geq 0.80$). Los valores M representan el logaritmo en base 2 de la razón entre la intensidad de fluorescencia de las sondas metiladas y sondas no metiladas. El valor M de 0 indica similar intensidad entre las sondas metiladas y no metiladas; y este valor oscila entre positivo y negativo, un valor positivo representa más sondas metiladas en comparación con las no metiladas. Son usados para realizar análisis estadísticos. El fundamento de emplear ambos valores se debe a que los valores β tienen homocedasticidad (varianza de las variables constante) en los valores de 0.2-0.8; y tienen heterocedasticidad en el rango de hipometilación e hipermetilación. Por lo tanto, al transformar los valores β a M la varianza de los datos se mantiene constante en el rango de valores M y pueden emplearse en los análisis de microarreglos. Un valor β de 0.2, 0.5 y 0.8 corresponde a un valor M de -2, 0 y 2, respectivamente (Du *et al.*, 2010).

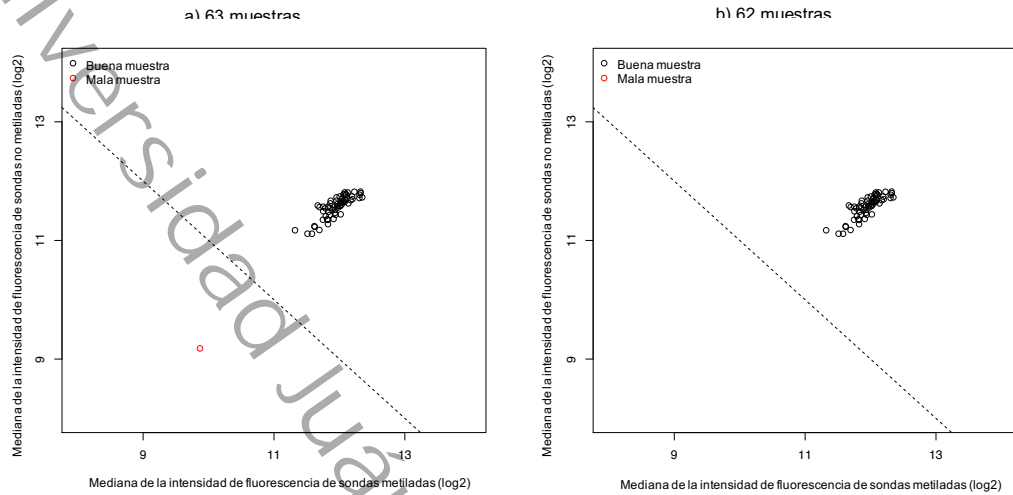
5.7.2.2. Control de calidad y densidad β .

Se realizó un gráfico para el control de calidad que comparó la mediana de intensidad de fluorescencia de las sondas metiladas y no metiladas; aquellas muestras que no alcanzaron el umbral de intensidad de metilación fueron retiradas previo al análisis de metilación. (Figura 3) Con los valores β de los microarreglos, se realizó el gráfico de densidad y se observó la densidad de las sondas no metiladas con valores β cercanos a 0 y sondas metiladas con valores β cercanos a 1. (Figura 4)



Figura 3.

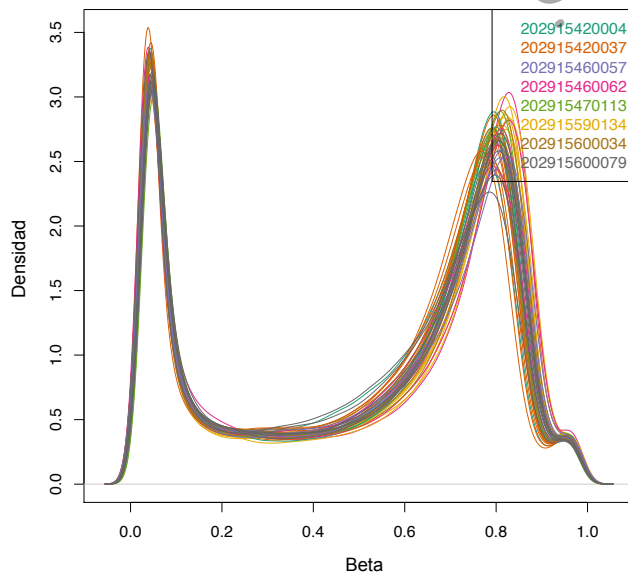
Mediana de la Intensidad de Fluorescencia de las Sondas Metiladas y No Metiladas.



a) Control de calidad con 63 muestras, b) Control de calidad con 62 muestras al retirar la muestra que no alcanza el umbral de intensidad de metilación.

Figura 4.

Gráfico de Densidad de los Valores β de los Microarreglos.



Cada Microarreglo contiene información de 8 muestras.



5.7.2.3. Filtro de sondas y normalización

Se detectó el valor de p para la intensidad de fluorescencia de las sondas (el valor pequeño de p indica una buena intensidad de fluorescencia en comparación con el control de fluorescencia basal). Posteriormente, se normalizaron los datos para crear un objeto *GenomicRatioSet* e identificar los sitios CpGs en el genoma. Cuando las sondas se encontraban mapeadas al genoma, se realizó el filtro de sondas y se eliminaron las sondas con una $p > 0.05$. Se agregó la información de los SNPs y se eliminaron las sondas hibridadas con SNPs que tuvieran una frecuencia alélica mayor a 0.05. El último filtro consistió en eliminar sondas cruzadas (sondas que hibridaron con diferentes segmentos de ADN) y obtener los valores de β y M de los sitios CpGs ya identificados en el genoma.

5.7.2.4. Análisis de componentes principales

Posterior a la normalización de los datos, se realizó el análisis de componentes principales (ACP). Este modelo matemático utiliza componentes principales que representan miles de variables (por ejemplo, genes) y pueden ser graficadas para visualizar diferencias o similitudes entre las muestras. Los componentes principales pueden correlacionar con algún fenotipo de interés, o asociarse con genes y patrones de expresión que ayuden a identificar las diferencias entre las muestras a evaluar (Ringner, 2008). Para este análisis empleamos los diagnósticos de TCA para identificar diferencias o similitudes entre las muestras de la metilación.



5.7.2.5. Composición celular

Se realizó un análisis de composición celular de la metilación y se obtuvieron las proporciones celulares de neutrófilos, monocitos, células NK (natural killer), linfocitos B, y linfocitos T (CD4 y CD8). El método utilizado fue deconvolución basada en referencias (disponible en el paquete *FlowSorted.Bood.EPIC*) el cual realizó inferencia de las proporciones celulares (algoritmo matemático de Houseman validado en muestras de sangre total). El algoritmo toma como referencia los patrones de metilación de ADN proveniente de la población de células purificadas (Titus *et al.*, 2017).

5.7.2.6. Análisis de variables subrogadas y modelo de regresión lineal

Se realizó el análisis de variables subrogadas para identificar las variables latentes y subrogadas por efecto batch y adicionalmente se consideró la composición celular como factores para el modelo lineal de la regresión. Se realizó el análisis de expresión diferencial con el paquete *Limma* para obtener los sitios diferencialmente metilados. Los resultados de estos análisis nos reportaron los valores de p de las comparaciones y el valor fold change (FC) o tasa de cambio, este valor equivale a la diferencia en porcentaje entre los dos grupos con respecto al nivel de metilación. Un fold change equivale a una diferencia en 100%. El valor positivo o negativo nos ayuda a identificar cuál de los dos grupos de comparación tiene mayor o menor metilación. Los resultados del fold change y el valor de p se graficaron en un volcan plot. Este gráfico ha sido utilizado en estudios de metiloma para reportar las diferencias en la metilación en pacientes con enfermedades psiquiátricas, como



esquizofrenia y trastorno bipolar (Mill *et al.*, 2008). Finalmente, el punto corte del valor de p fue establecido a 0.0001.

5.8. Enriquecimiento de vías y correlación en sangre

Con la lista de los sitios CpGs diferencialmente metilados se obtuvo la información de la posición de los sitios y los genes cercanos. Se utilizó la base de datos Enrichr para realizar un análisis de enriquecimiento de vías de los genes cercanos a los sitios CpGs; esta base contiene librerías con información de los genes reportados en la literatura y sus funciones biológicas y moleculares (Kuleshov *et al.*, 2016). Además, utilizamos una herramienta bioinformática BECon para correlacionar el nivel de metilación de los sitios CpGs obtenidos de sangre y sustentar que los patrones de metilación que obtuvimos son semejantes con los patrones de metilación en cerebro (Edgar *et al.*, 2017). Esta herramienta fue diseñada para visualizar el valor β provenientes de la metilación en sangre y de las áreas 7, 10 y 20 de Brodmann. Finalmente, se grafican 16 pacientes para cada sitio CpG.

5.9. Declaración de ética

Este estudio se realizó acorde a los principios de la Declaración de Helsinki, fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Psiquiátrico Infantil “Juan N. Navarro (HPIJNN)” y del Instituto Nacional de Medicina Genómica en la Ciudad de México No. 06/2018/I. Los padres de los adolescentes recibieron información verbal y escrita sobre los objetivos del estudio. La participación fue voluntaria, sin remuneración económica. Todos aceptaron participar firmando una carta de consentimiento informado aprobada por el Comité de Ética.



6. Resultados

6.1. Características de la población en estudio

Se incluyó a 187 pacientes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N. Navarro (HPIJNN). El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo en los servicios de consulta externa, hospitalización y urgencias del HPIJNN. Un médico psiquiatra especialista en trastornos de la conducta alimentaria evaluó y diagnosticó a los pacientes. Adicionalmente se obtuvo el índice de masa corporal (IMC) de los pacientes reclutados.

Posteriormente 64 pacientes fueron incluidos en el análisis del metiloma; el 75 % de los casos fueron de género femenino (n=48) y el 25% fueron de género masculino (n=16). Respecto a los diagnósticos, 28.13% (n=18) de los pacientes fueron diagnosticados con anorexia nerviosa; así mismo, 25 pacientes presentaron bulimia nerviosa (39.06%); y finalmente 21 pacientes (32.81%) con trastorno por atracón. (Tabla 5)

La edad en promedio de los pacientes fue de 13.87 ± 1.68 años. El peso promedio fue de 61.19 ± 17.20 kg; y la talla en promedio fue de 1.57 ± 0.08 m. Se calculó el IMC y el promedio fue de 24.49 ± 5.50 kg/m²; sin embargo, también se calculó el Z score para el IMC y el promedio de la muestra fue de 0.98 ± 0.92 . Se calculó el percentil del IMC de acuerdo con las tablas de crecimiento (CDC) y el percentil promedio percentil fue de $78.68 \pm 22.49\%$. (Tabla 5) De la muestra, el 46.88% (n=30) de los casos fueron catalogados en peso normal; el 20.31% (n=23) en sobrepeso, el 31.25% (n=20) en obesidad y el 1.56% (n=1) en bajo peso.



Finalmente, respecto a la escolaridad, los pacientes con TCA estudiaron en promedio 8.34 ± 1.98 años.

Nuestra población de estudio presentó alta la prevalencia de comorbilidades psiquiátricas (93.75%; n=60). Todos los pacientes con TA, 16 pacientes con AN (88.89%) y 23 pacientes con BN (92%) presentaron diversas comorbilidades.

Las comorbilidades más prevalentes fueron trastornos del estado de ánimo, siendo el episodio depresivo mayor el más frecuente y la segunda comorbilidad más frecuente en este grupo fue el riesgo de suicidio con 34.38%. El segundo grupo de comorbilidades más frecuente fueron los trastornos de ansiedad, trauma y factores de estrés. En menor proporción fueron trastorno del neurodesarrollo con 23.43% y trastornos disruptivos, del control de impulsos y de la conducta con 20.31%.

Tabla 5.

Características Sociodemográficas y Clínicas de la Población Adolescente Mexicana con Trastornos de la Conducta Alimentaria.

Característica	Casos (n = 64)	AN (n =18)	BN (n =25)	TA (n =21)
Edad (años)	13.87 ± 1.68	13.78 ± 2.07	13.76 ± 1.56	14.09 ± 1.51
Género (F/M)	48/16	14/4	22/3	12/9
Peso (kg)	61.19 ± 17.20	48.61 ± 7.91	58.98 ± 14.56	74.62 ± 17.91
Talla (m)	1.57 ± 0.10	1.55 ± 0.09	1.56 ± 0.09	1.60 ± 0.04
Percentil IMC (%)	78.68 ± 22.49	59.53 ± 26.53	79.98 ± 16.84	93.55 ± 9.57
Z score IMC	0.98 ± 0.92	0.30 ± 0.85	0.87 ± 0.74	1.69 ± 0.64
<i>Abreviaciones: AN, anorexia nervosa; BN, bulimia nervosa; TA, trastorno por atracón</i>				

Fuente: Pacientes adolescentes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro

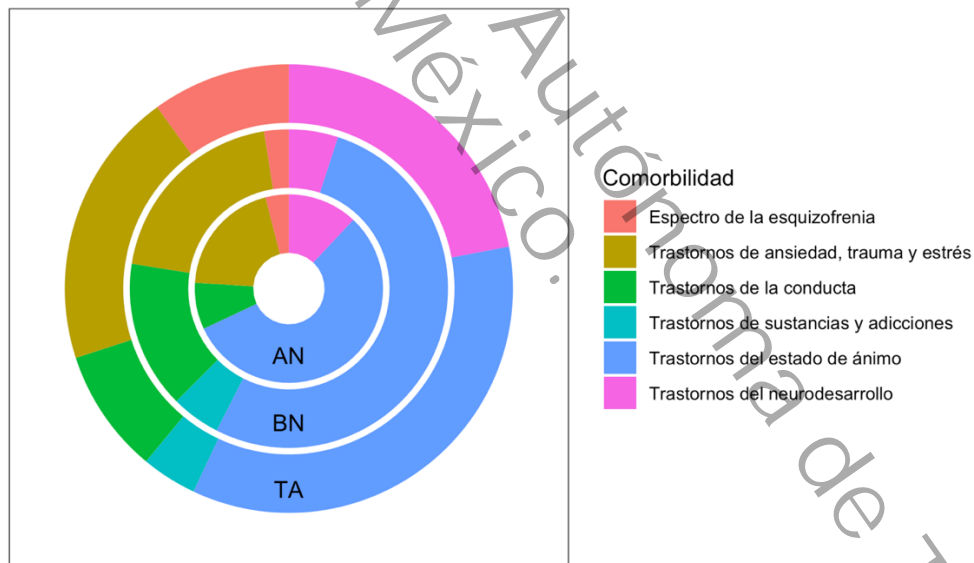


Se realizó una comparación entre diagnósticos y observamos que los pacientes con diagnóstico de AN no presentaron alteraciones relacionadas con sustancias y trastornos adictivos. Por otra parte, los pacientes con TA presentaron mayor prevalencia de trastornos del neurodesarrollo en comparación con los pacientes con AN y BN. (Figura 5) (Tabla 6)

Figura 5.

Comorbilidades Psiquiátricas en Pacientes Mexicanos con Trastorno de la Conducta Alimentaria.

Comorbilidades psiquiátricas en pacientes con TCA



Abreviaciones: AN, anorexia nervosa; BN, bulimia nervosa; TA, trastorno por atracón.



Tabla 6.

Comparación de las Comorbilidades Psiquiátricas entre Diagnósticos de Trastorno de la Conducta Alimentaria.

Comorbilidad psiquiátrica	AN n=18 n (%)	BN n=25 n (%)	TA n=21 n (%)	χ^2	Valor p
Trastornos del estado de ánimo	14 (77.78)	21 (84.00)	16 (76.19)	0.49	0.7929
Episodio depresivo mayor	7 (38.89)	10 (40.00)	14 (66.67)	4.16	0.1247
Trastorno distímico	6 (33.33)	10 (40.00)	5 (23.81)	1.36	0.5066
Episodio (hipo)maniaco	-	-	-	-	-
Riesgo suicida	3 (16.67)	11 (44.00)	8 (38.10)	3.66	0.1615
Trastornos relacionados con ansiedad, traumas y factores de estrés	5 (27.78)	8 (32.00)	9 (42.86)	1.40	0.4976
Trastorno de angustia	1 (5.56)	1 (4.00)	3 (14.29)	1.85	0.5055
Agorafobia	-	1 (4.00)	3 (14.29)	3.73	0.2328
Trastorno de ansiedad de separación	-	1 (4.00)	-	1.58	1.0000
Fobia social	1 (5.56)	2 (8.00)	1 (4.76)	0.22	1.000
Fobia específica	2 (11.11)	4 (16.00)	1 (4.76)	1.48	0.5344
Trastorno de ansiedad generalizada	1 (5.56)	6 (24.00)	5 (23.81)	2.86	0.2574
Trastorno obsesivo compulsivo	1 (5.56)	-	-	2.60	0.2812
Estrés postraumático	1 (5.56)	-	-	2.60	0.2812
Trastorno adaptativo	-	-	-	-	-
Alteraciones relacionadas con sustancias y trastornos adictivos	-	2 (8.00)	2 (9.52)	1.71	0.5464
Abuso o dependencia de alcohol	-	2 (8.00)	-	3.22	0.3289
Abuso o dependencia de drogas (no alcohol)	-	1 (4.00)	2 (9.52)	2.01	0.4924
Trastornos disruptivos, del control de impulsos y de la conducta	2 (11.11)	6 (24.00)	4 (19.05)	1.14	0.6118
Trastorno de la conducta	1 (5.56)	4 (16.00)	1 (4.76)	2.13	0.4247
Trastorno negativista desafiante	2 (11.11)	4 (16.00)	3 (14.29)	0.21	1.000
Trastornos del neurodesarrollo	3 (16.67)	2 (8.00)	10 (47.62)	10.62	0.0061
Trastorno de TIC	1 (5.56)	-	-	2.59	0.2812
Trastorno por déficit de atención e hiperactividad	3 (16.67)	2 (8.00)	10 (47.62)	10.62	0.0061
Trastornos psicóticos	1 (5.56)	1 (4.00)	5 (23.81)	5.34	0.0999

Abreviaciones: AN, anorexia nerviosa; BN, bulimia nerviosa; TA, trastorno por atracón; χ^2 , Chi cuadrada
Notas: Negritas indica valor de $p < 0.05$; Prueba exacta de Fisher fue empleada cuando los valores fueron < 5
Trastorno psicótico fue considerado como espectro de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos

Fuente: Pacientes adolescentes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro



6.1.1. Heterogeneidad de los pacientes con TCA

Observamos alta variabilidad clínica entre los diagnósticos. En los pacientes con AN, 5 pacientes fueron catalogados como anorexia nerviosa tipo con atracones/purgas; además el 50% demostró restricción de alimentos y solo 17% tuvo miedo a ganar peso. Por otro lado, de los pacientes con BN el 68% tuvo episodios de atracón y el resto de los pacientes tuvo trastorno por purgas (n=8); además, el 8% demostró el mecanismo compensatorio de vómito, 28% uso medicamentos para bajar de peso y 72% tuvo miedo a ganar peso. Respecto a los pacientes con TA, todos los pacientes tenían episodios de atracón; 28.57% tuvo restricción y el 9.52% presentaron miedo a ganar peso y uso de medicamentos; sin embargo, este mecanismo compensatorio no influyó en el diagnóstico de TA por ser de baja frecuencia. (Tabla 7)

Tabla 7.

Heterogeneidad entre Diagnósticos de TCA en Población Adolescente Mexicana.

Comportamiento	AN n (%)	BN n (%)	TA n (%)
<i>Atracón</i>	2 (11.11)	17 (68)	21 (100)
<i>Vómito</i>	5 (27.78)	22 (8)	0
<i>Uso de medicamentos</i>	3 (16.67)	7 (28)	2 (9.52)
<i>Restricción</i>	9 (50)	18 (72)	6 (28.57)
<i>Miedo a ganar peso</i>	17 (94.44)	24 (96)	2 (9.52)

Abreviaciones: AN, anorexia nerviosa; BN, bulimia nerviosa; TA, trastorno por atracón

Fuente: Pacientes adolescentes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro

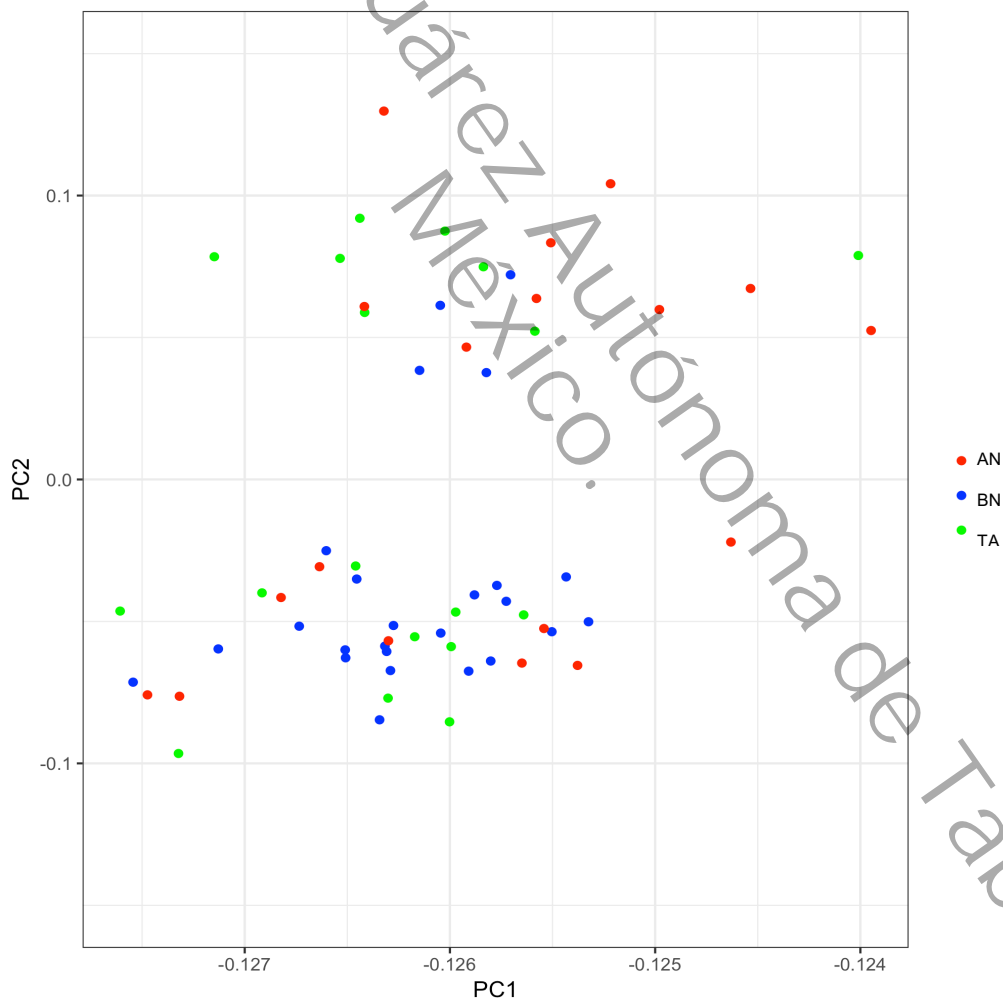


6.2. Análisis de componentes principales

El Análisis de componentes principales (ACP) mostró poca variabilidad de los datos de metilación y se agruparon visualmente en dos grupos. Sin embargo, se observó una distribución heterogénea entre estos 2 grupos de variabilidad respecto a los grupos diagnósticos de TCA. (Figura 6)

Figura 6.

Análisis de Componentes Principales de los Diagnósticos de TCA.



Abreviaciones: AN, anorexia nervosa; BN, bulimia nervosa; TA, trastorno por atracón, PC, componente principal.



6.3. Composición celular

El resultado de la inferencia celular nos reportó las proporciones celulares para cada paciente con TCA. Nosotros agrupamos los datos por diagnóstico para hacer la comparación, y obtuvimos las medias de las proporciones para cada célula. Observamos distribución normal para las siguientes células: neutrófilos, los linfocitos T CD4, monocitos, y células NK; y utilizamos T de student y ANOVA para comparar los grupos. Por otro lado, los linfocitos B y linfocitos T CD8 no presentaron esta distribución normal y para la comparación empleamos la prueba de Wilcox y Kruskal-Wallis. Finalmente, no se observaron diferencias al comparar la composición entre diagnósticos. (Tabla 8)

6.4. Sitios CpGs diferencialmente metilados

Se realizó el análisis de regresión lineal y cada comparación correspondió a 2 diagnósticos de TCA (AN-BN, BN-TA, AN-TA). Posteriormente se realizó el volcán plot para observar la distribución del valor fold change (tasa de cambio) de todos los sitios CpGs. (Figura 7) Se utilizó como punto de corte un valor de p en escala logarítmica base 10 de 4 ($p=0.0001$), donde observamos 23 sitios CpGs diferencialmente metilados. Con el diagrama de Venn se identificaron el número de sitios CpGs diferencialmente metilados en las 3 comparaciones. (Figura 8)



Tabla 8.

Comparación de las Proporciones Celulares del Análisis de la Metilación en Pacientes Adolescentes con Trastorno de la Conducta Alimentaria.

Célula	AN	BN	TA	Estadístico		Valor p	
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	t	F		
Neutrófilos	0.5465 ± 0.10	0.5864 ± 0.07	0.5614 ± 0.11	-1.3893 ^a -0.8788 ^b 0.4207 ^c	0.971	0.1760 ^a 0.3864 ^b 0.6765 ^c 0.385 ^d	
	0.0953 ± 0.02	0.0916 ± 0.01	0.0960 ± 0.03	0.6047 ^a 0.4849 ^b 0.0729 ^c			
	0.0659 ± 0.03	0.00533 ± 0.01	0.0620 ± 0.02	1.4404 ^a 1.2722 ^b -0.4098 ^c			
Linfocito T CD4+	0.1101 ± 0.04	0.1061 ± 0.03	0.1079 ± 0.05	0.3276 ^a 0.1401 ^b -0.1448 ^c	0.041	0.7453 ^a 0.8894 ^b 0.8857 ^c 0.9540 ^d	
	0.1239 ± 0.04	0.1204 ± 0.02	0.1290 ± 0.03	W 205 ^a 285 ^b 215 ^c			H 62
	0.0914 ± 0.04	0.0767 ± 0.02	0.0825 ± 0.03	263 ^a 282 ^b 169 ^c			62
Linfocito B	0.0914 ± 0.04	0.0767 ± 0.02	0.0825 ± 0.03	263 ^a 282 ^b 169 ^c	62	0.3597 ^a 0.4756 ^b 0.7616 ^c 0.4761 ^d	

Abreviaciones: AN, anorexia nervosa; BN, bulimia nervosa; TA, trastorno por atracón; t, T de student; W, Prueba de Wilcoxon; F, Análisis de varianza (ANOVA); H, Prueba H de Kruskal-Wallis; a, comparación entre anorexia nervosa y bulimia nervosa; b, comparación entre bulimia nervosa y trastorno por atracón; c, comparación entre anorexia nervosa y trastorno por atracón; d, comparación entre los 3 grupos

Fuente: Pacientes adolescentes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro



Figura 7.

“Volcan plot” de Sitios CpGs Diferencialmente Metilados en Pacientes con TCA.

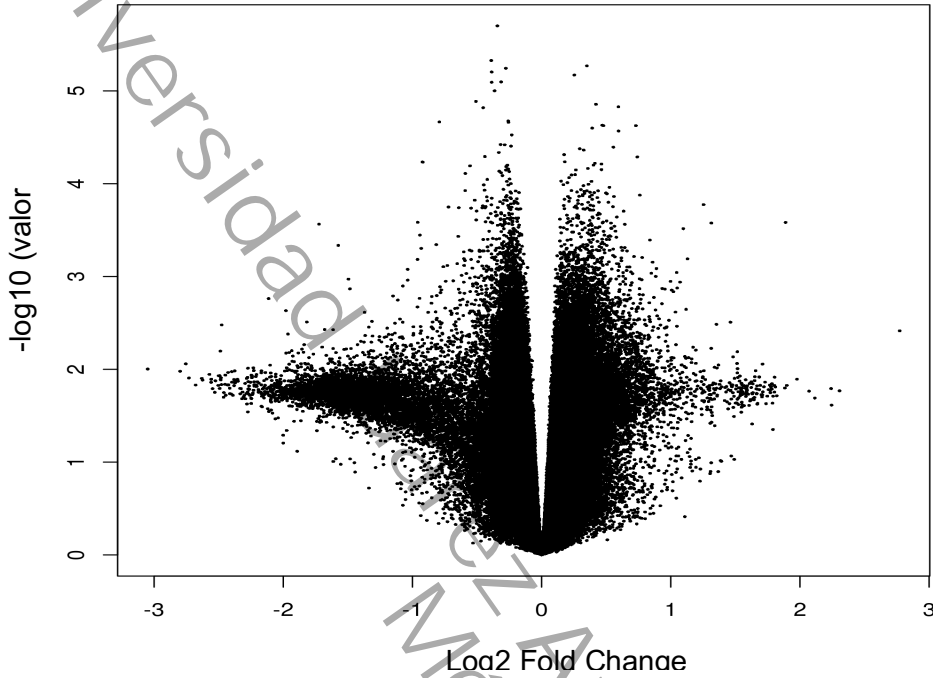
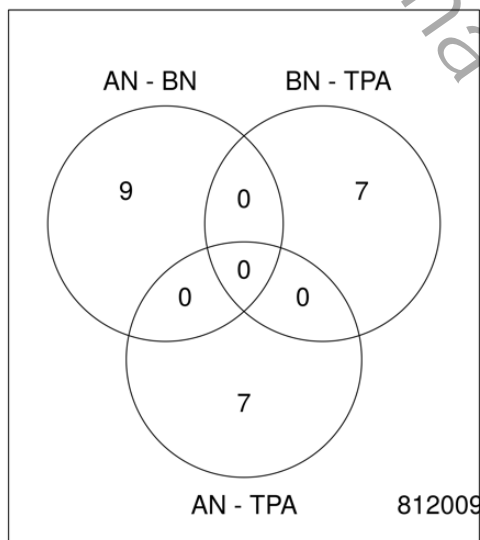


Figura 8.

Diagrama Venn con el Número de Sitios CpGs Diferencialmente Metilados en las Comparaciones de Pacientes con TCA.





En la comparación de pacientes con AN y BN observamos 9 sitios CpGs diferencialmente metilados. En el cromosoma 3, encontramos 2 sitios CpGs diferencialmente metilados; el sitio cg13845098 cerca del gen *KPNA1* presenta una tasa de cambio de 0.2533, interpretándose que el 25.33% es más metilado en pacientes con AN en comparación con los pacientes con BN; el sitio cg09326546 cerca del gen *RAF1* presenta una tasa de cambio de 0.3502 con mayor metilación en los pacientes con AN. Por el contrario; el sitio cg04865319 cerca del gen *PALLD* en el cromosoma 4 presenta una tasa de cambio de -0.3866, esto se considera una menor metilación en pacientes con AN en comparación con pacientes con BN. El sitio cg04812891 en el cromosoma 6 no está cerca de un gen conocido hasta el momento; sin embargo, presenta una tasa de cambio de -0.2769 que corresponde a menor metilación en pacientes con AN. En el cromosoma 11; el sitio cg25149859 se encuentra cerca del gen *CSNK2A3* y *GALNT18*, presenta una tasa de cambio equivalente a -0.3892. En el cromosoma 12, el sitio cg11997526 presenta una tasa de cambio de -0.3638, equivalente a menor metilación en pacientes con AN. El sitio cg17843418 cerca del gen *TBC1D16* en el cromosoma 17 presenta una tasa de cambio de -0.3869. El sitio cg00164837 en el cromosoma 21, cerca del gen *FAM207A* presenta una tasa de cambio de -0.3132. Finalmente, el sitio cg12519135 cerca del gen *PLXNBB2* en el cromosoma 22 presenta una tasa de cambio de -0.3423. Los sitios CpGs de cromosoma 3 presentan mayor metilación en pacientes con AN cuando se compara con los pacientes con BN; y los sitios CpGs en el cromosoma 4, 6, 11, 12, 17, 21 y 22, equivalen a mayor metilación en pacientes con BN en comparación con los pacientes con AN. (Tabla 9)



Tabla 9.

Sitios CpGs Diferencialmente Metilados en Pacientes con AN y BN.

Cromosoma	Sitio	Gen	Tasa de Cambio	Valor P
3	cg13845098	<i>KPNA1</i>	0.2533	2.23 E-05
3	cg09326546	<i>RAF1</i>	0.3502	2.72 E-05
4	cg04865319	<i>PALLD</i>	-0.3866	2.99 E-05
6	cg04812891	-	-0.2769	1.76 E-05
11	cg25149859	<i>CSNK2A3</i> <i>GALNT18</i>	-0.3892	1.59 E-05
12	cg11997526	-	-0.3638	4.56 E-05
17	cg17843418	<i>TBC1D16</i>	-0.3869	3.49 E-05
21	cg00164837	<i>FAM207A</i>	-0.3132	2.27 E-05
22	cg12519135	<i>PLXNB2</i>	-0.3423	1.09 E-05

Fuente: Pacientes adolescentes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro

En el análisis de datos de pacientes con BN y TA observamos 7 sitios CpGs diferencialmente metilados. En el cromosoma 3, el sitio cg07492056 cerca del gen *CACNA2D3* presenta una tasa de cambio equivalente a -0.4828, indica que los pacientes con BN tienen menor metilación de este sitio CpG en comparación con los pacientes con TA. Los sitios CpGs cg25939242, cg09466243 y cg04149955 en los cromosomas 4, 11 y 19 respectivamente, no se encuentran cerca de un gen conocido; sin embargo, presentan una tasa de cambio con valor negativo. Este resultado se interpreta que hay menor metilación en los pacientes con BN en comparación con los pacientes con TA. En el cromosoma 10, el sitio cg10612237 cerca del gen *ZMIZ1* y *ZMIZ1-AS1* presenta mayor metilación en los pacientes con



BN (tasa de cambio de 0.4884). El sitio cg22681738 del cromosoma 20, que corresponde al gen *RPRD1B* y *TTI1* presenta menor metilación en pacientes con BN, con tasa de cambio equivalente a -0.2409, cuando se compara con los pacientes con TA. Finalmente, el único sitio diferencialmente metilado en cromosomas sexuales es el sitio cg07063583, con tasa de cambio de -0.8454, y corresponde al gen *KAL1* en el cromosoma X, representa menor metilación en pacientes con BN en comparación con pacientes con TA. El sitio CpG diferencialmente metilado del cromosoma 10 equivale a mayor metilación en pacientes con BN, mientras que en los sitios CpGs de los cromosomas 3, 4, 11, 19, 20 y cromosoma sexual X hay mayor metilación en pacientes con TA.

Tabla 10.

Sitios CpGs Diferencialmente Metilados en Pacientes con BN y TA.

Cromosoma	Sitio	Gen	Tasa de cambio	Valor P
3	cg07492056	<i>CACNA2D3</i>	-0.4838	9.40 E-06
4	cg25939242	-	-0.3474	1.95 E-06
10	cg10612237	<i>ZMIZ1; ZMIZ1-AS1</i>	0.4884	1.05 E-05
11	cg09466243	-	-0.2696	4.46 E-05
19	cg04149955	-	-0.2563	1.16 E-05
20	cg22681738	<i>RPRD1B; TTI1</i>	-0.2409	3.30 E-06
X	cg07063583	<i>KAL1</i>	-0.5484	7.63 E-07

Fuente: Pacientes adolescentes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro

En la última comparación de sitios CpGs, correspondiente a los pacientes con AN y TA, observamos 7 sitios CpGs diferencialmente metilados. En el cromosoma 6 y 12



observamos a los sitios cg19743686 y cg09361817 con una tasa de cambio negativa (-0.3538 y -0.3969, respectivamente), corresponde a menor metilación en pacientes con AN en comparación con los pacientes con TA. De esta manera en el cromosoma 18 el sitio cg09417725 representa menor metilación en pacientes con AN, con una tasa de cambio de -0.3409. Por el contrario; el sitio cg23521742 en el cromosoma 15, y los sitios cg12063490, cg17737967 y cg05806864, del cromosoma 19 presentan mayor metilación en pacientes con AN.

Tabla 11.

Sitios CpGs Diferencialmente Metilados en Pacientes con AN y TA.

Cromosoma	Sitio	Gen	Tasa de cambio	Valor P
6	cg19743686	-	-0.3538	2.16 E-06
12	cg09361817	-	-0.3969	1.79 E-05
15	cg23521742	HYKK	0.4086	1.54 E-05
18	cg09417725	SOCS6	-0.3409	5.09 E-05
19	cg12063490	MAN2B1	0.7701	2.12 E-05
19	cg17737967	MAN2B1	1.0644	2.69 E-05
19	cg05806864	MAN2B1	0.7686	1.05 E-05

Fuente: Pacientes adolescentes del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N Navarro

6.5. Enriquecimiento de vías de los sitios CpGs y correlación en sangre

En la búsqueda de interacciones de los genes en la base de datos de Enrichr, obtuvimos un factor de transcripción que participa con la proteína KPNA1 del gen del mismo nombre. El análisis estadístico de las interacciones demostró un valor de $p < 0.05$ para el factor de transcripción SRF (factor de respuesta al suero). SRF fue



obtenido de la librería TRRUST (Relaciones de Regulación Transcripcional Descifrado por Extracción de Texto). (Tabla 12) De esta manera, en la interacción de los genes *SOCS6* y *RAF1*, 5 vías de señalización fueron identificadas de las librerías humanas KEGG 2019 (Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas) y Wikipathways. (Tabla 13)

Tabla 12.

Factores de Transcripción del Enriquecimiento de Vías en Enrichr.

Nombre	Valor p	Valor p ajustado	Gen
<i>SRF_human</i>	0.02105	0.02105	<i>KPNA1</i>

Fuente: Base de datos Enrichr

Tabla 13.

Vías de Señalización en Enrichr.

KEGG 2019 human			
<i>Nombre</i>	Valor p	Valor p ajustado	Gen
<i>JAK-STAT</i>	0.02410	0.02410	<i>SOCS6</i>
WikiPathways 2019 human			
<i>Receptor KIT</i>	0.008824	0.008824	<i>SOCS6</i>
<i>MAPK y NFkB</i>	0.004791	0.05071	<i>RAF1</i>
<i>Receptor 2 serotonina ELK-SRF/GATA4</i>	0.007973	0.05071	<i>RAF1</i>
<i>Vía en comun con adicción a drogas</i>	0.01668	0.05071	<i>RAF1</i>

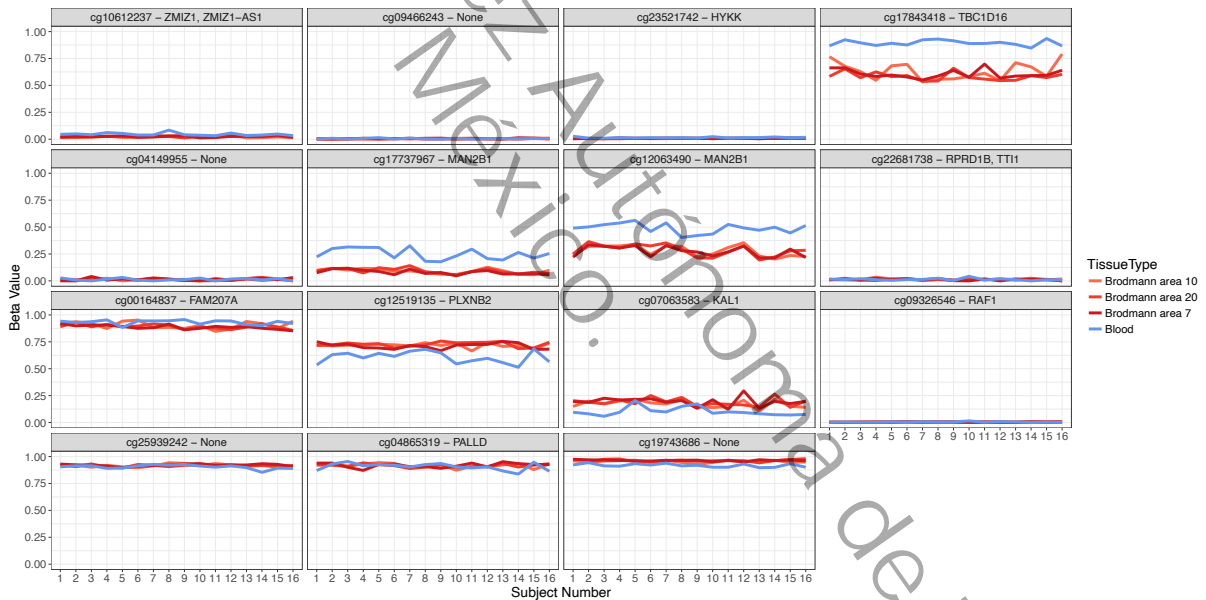
Fuente: Base de datos Enrichr



Se realizó la correlación entre los niveles de metilación de sangre con tejido nervioso utilizando la herramienta BECon. De los 23 sitios CpGs de nuestro análisis, se analizaron 15 sitios de los cuales 10 sitios CpGs se encontraron correlacionados con el nivel de metilación en cerebro. La figura 10 muestra los gráficos de los 15 sitios CpGs con sus respectivos valores β de metilación.

Figura 9.

Correlación de Valores β en Sangre y Cerebro de Sitios CpGs Diferencialmente Metilados.





7. Discusión

7.1. Características clínicas de la población adolescente mexicana con TCA

En el presente trabajo realizamos un análisis de las características clínicas de la población adolescente mexicana con diagnóstico de TCA. En nuestra población de estudio observamos variabilidad clínica entre los diagnósticos y encontramos una alta prevalencia de trastornos del estado de ánimo, nuestros resultados son similares a estudios previamente reportados (Tsai *et al.*, 2018; Ulfvebrand *et al.*, 2015). Los pacientes diagnosticados con TA tuvieron mayores niveles de comorbilidades psiquiátricas en comparación con los pacientes con AN o BN. En este sentido, los criterios diagnósticos de TA son recientes, y la presencia de comorbilidades en este grupo ha sido escasamente explorado. Además, la alta prevalencia de comorbilidades psiquiátricas en pacientes con TCA podría tener un impacto negativo en el curso de la enfermedad y posiblemente en el resultado a los tratamientos (Lindstedt, Kjellin, y Gustafsson, 2017). Por otra parte, es importante mencionar el riesgo de suicidio en nuestra población en estudio, donde el 40% de nuestros pacientes (BN o TA) presentaron riesgo de suicidio. Estos datos están en coherencia con otros estudios, donde la prevalencia oscila entre 40% al 60% (Kostro, Lerman, y Attia, 2014; Koutek, Kocourkova, y Dudova, 2016; Portzky, van Heeringen, y Vervaet, 2014). Debido a la alta mortalidad por el suicidio, nosotros sugerimos que se debe tener un seguimiento de los pacientes con riesgo de suicidio y estudiar los efectos de esta comorbilidad en el desarrollo de la enfermedad.



En nuestro estudio observamos que alrededor del 50% de nuestra población presentaron sobrepeso u obesidad, principalmente los pacientes con BN y TA. Existe una estrecha relación entre las alteraciones de los patrones de alimentación y los cambios en la modulación del IMC (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014).

Los mecanismos subyacentes a esta relación no están dilucidados y se han generado algunas hipótesis. (Berthoud, Munzberg, y Morrison, 2017). En este sentido, una hipótesis sugiere que las alteraciones en el peso corporal (sobrepeso u obesidad) son procesos influenciados por una desregulación en los circuitos neurobiológicos que controlan algunos comportamientos, como la impulsividad y la sensibilidad de recompensa (Steward *et al.*, 2017). Estas alteraciones en la regulación de los circuitos neurobiológicos de recompensa-impulsividad podrían conllevar a un patrón de alimentación aberrante como la falta de control. La regulación de estos circuitos de impulsividad-recompensa se han identificado en áreas cerebrales como el área tegmental ventral, el hipotálamo lateral, la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo (Kahnt, 2018; Mitchell y Potenza, 2014). Además, algunos estudios también han reportado alteraciones en estos circuitos de impulsividad-recompensa en pacientes con TCA y trastornos de uso de sustancias y alcohol; lo que podría ser un vínculo entre estos rasgos complejos y proponer que solo pacientes con BN y TA presentan alteraciones relacionadas con el uso de sustancias como comorbilidad psiquiátrica (Donnelly *et al.*, 2018; Frank, 2015; Uhl, Koob, y Cable, 2019).



Nuestros resultados demostraron que la población adolescente con TA presentó mayor prevalencia de trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) en comparación a los pacientes con AN y BN. En la literatura se ha reportado una relación entre TA, TDAH y obesidad que apoya estos resultados (Brunault *et al.*, 2019). En este sentido, hay evidencia en la literatura de la relación TDAH y el comportamiento alimentario que sugiere la participación de un factor genético de riesgo que podría modular esta relación, el gen asociado a la masa grasa y la obesidad (gen *FTO*, Fat-mass and obesity associated gen) (Frayling *et al.*, 2007). Además, variantes genéticas en el gen *FTO* (polimorfismo rs9939609) han sido establecidos como factor de riesgo para TCA y TDAH (Castellini *et al.*, 2017; Muller *et al.*, 2012; Velders *et al.*, 2012); y otras variantes genéticas en el mismo gen (rs1421085, con alta correlación con la variante rs9939609) han sido asociadas a la impulsividad, demostrando alteraciones en áreas cerebrales que regulan este comportamiento (Chuang *et al.*, 2015). Por otra parte, también hay reportes de asociación entre el uso de sustancias (alcohol) y el gen *FTO* (Sobczyk-Kopciol *et al.*, 2011); aunque esta relación no se puede sustentar con nuestros resultados, debido al tamaño de la muestra de nuestro estudio. Por lo que se sugiere que se puede explorar la relación entre pacientes con TCA y la comorbilidad de trastornos relacionados al uso de sustancias y adicciones.

Por otro lado, otros estudios demuestran correlaciones entre alteraciones psiquiátricas debido a la heterogeneidad fenotípica. Destacando la correlación genética de AN con trastorno obsesivo compulsivo (TOC) y esquizofrenia. De la misma manera, reportaron una correlación clínica con trastornos psiquiátricos,



además, una correlación positiva del nivel cognitivo y el diagnóstico de AN y TOC; una correlación positiva entre el neuroticismo y AN. Anttila y colaboradores (2018), demuestran que el IMC correlacionó positivamente con TDAH y trastorno depresivo mayor; y el IMC correlacionó negativamente con AN y esquizofrenia (Anttila *et al.*, 2018). Nuestros resultados sugieren que los pacientes con AN son los únicos pacientes con TOC. Sugerimos que la presencia de comorbilidades demuestra la correlación genética entre alteraciones psiquiátricas y la heterogeneidad clínica. Sin embargo, se requieren evaluar los procesos fisiopatológicos y componentes genéticos en común. Estos datos podrían ser útiles en la toma de decisiones para tratamientos oportunos desde el inicio de la sintomatología de los trastornos psiquiátricos. Sin embargo, para confirmar estos datos se requiere utilizar herramientas bioinformáticas más especializadas como la transcriptómica o la metabolómica para determinar la correlación de los TCA con otras comorbilidades.

7.2. Metilación del ADN en pacientes con TCA

En el presente estudio se realizó un estudio del metiloma de 62 pacientes con diagnóstico de TCA en una población adolescente mexicana. Sin embargo diversos autores han estudiado los trastornos de la conducta alimentaria en población caucásica (Hübel *et al.*, 2019). La diferencia de nuestro estudio radicó en la comparación de los patrones de metilación entre diagnósticos de TCA y la utilización del “Infinium Methylation EPIC BeadChip” (microarreglo EPIC) con cobertura de 850 mil sitios CpGs.

En nuestro estudio, se realizó un análisis de componentes principales. Donde observamos la formación de dos grupos principales.



Sobre este resultado se sugieren 2 hipótesis. Primero, cada grupo podría corresponder a diferentes niveles de metilación de todo el genoma entre los pacientes con TCA. La segunda hipótesis se basa en la heterogeneidad clínica en nuestra población; por lo tanto, no hay agrupaciones por diagnóstico en el ACP debido a la presencia de síndromes parciales (Klump, 2013). Por lo tanto, en población adolescente mexicana existen presentaciones clínicas compartidas entre los diferentes diagnósticos.

Por otra parte, el análisis de la composición celular de la metilación del ADN nos permitió eliminar una variable de confusión; tomando en consideración la metilación como tejido específico. Nuestro estudio demostró que no existen diferencias en la composición celular en el estudio del metiloma en población adolescente con TCA. En este caso, no fue necesario considerar la composición celular como variable en el análisis de regresión lineal. Por lo tanto, los patrones de metilación no son atribuidos a diferencias en la composición de los elementos sanguíneos. Sin embargo, Keisselmeier y colaboradores (2018) reportaron diferencias en la composición celular en población adolescente con AN en comparación de sujetos delgados y población en general (Kesselmeier *et al.*, 2018). Nosotros sugerimos que la composición celular de la metilación del ADN en población adolescente mexicana no difiere entre diagnósticos.

El gráfico del volcán plot; útil para observar todos los sitios CpGs diferencialmente metilados y el valor estadístico de la comparación, representa los valores fold change de las comparaciones entre diagnósticos de TCA. Nosotros establecimos el valor p para mostrar una tendencia estadística y observamos 23 sitios CpGs



diferencialmente metilados; al realizar el análisis por múltiples comparaciones no obtuvimos sitios diferencialmente metilados y esto podría ser atribuido al tamaño de la muestra. En este estudio se requiere aumentar el tamaño de la muestra para encontrar diferencias significativas, aunque biológicamente se observaron diferencias entre los sitios CpGs.

En un estudio reporta en población adolescente una hipometilación global del ADN (Tremolizzo *et al.*, 2014). Sin embargo, Booij y colaboradores (2015) reportaron hipermetilación del ADN en el EWAS realizado en población adulta con AN (Booij *et al.*, 2015). En nuestra población de estudio la variabilidad en los niveles de metilación podría explicarse con: la presencia de múltiples comorbilidades psiquiátricas que permitirían diferentes patrones de metilación en población adolescente; factores ambientales como la alimentación y el poco tiempo de exposición a la enfermedad en nuestros pacientes. Así mismo, el uso de medicamentos como antidepresivos, y alteraciones hormonales. Por lo tanto, sugerimos que son necesarios más estudios epigenéticos para poder correlacionar los niveles de metilación con la información clínica.

Los sitios CpGs diferencialmente metilados en población mexicana adolescente son potenciales biomarcadores de TCA. Los patrones de metilación de los 23 sitios CpGs podrían ser una firma molecular que indique la alta heterogeneidad y variabilidad clínica previamente mencionada de los pacientes adolescentes con TCA. Esta característica dificulta un tratamiento oportuno (Kazdin, Fitzsimmons-Craft, y Wilfley, 2017). Por lo tanto, la identificación de biomarcadores en sangre



juegan un rol fundamental en el diagnóstico oportuno y el pronóstico de la enfermedad (Breithaupt *et al.*, 2018).

Actualmente, es posible correlacionar los niveles de metilación de ADN en sangre con tejido nervioso (Edgar *et al.*, 2017). Sin embargo, esta herramienta contempla los sitios CpGs del “Human Methylation 450K Beadchip” (microarreglo 450K) y nuestro microarreglo empleado contiene más de 850 mil sitios (incluye los sitios del microarreglo 450K). De los 23 sitios CpGs en nuestro estudio, hasta el momento solo 10 sitios podrían ser biomarcadores en sangre que correlacionan con el estado de metilación en tejido nervioso. (Figura 9) De esta manera podemos sugerir hasta el momento que los patrones de metilación (temporales y específicos para cada tejido) de 10 sitios CpGs diferencialmente metilados en nuestro estudio podrían ser utilizados para futuros estudios y análisis como biomarcadores en sangre. Sin embargo, se requieren más estudios que correlacionen los niveles de metilación de sangre y tejido nervioso para los sitios del microarreglo EPIC.

7.3. Sitios CpGs diferencialmente metilados en población mexicana adolescente con TCA

Hasta el momento se han reportaron dos listas de sitios CpGs diferencialmente metilados empleando el microarreglo 450K; uno en población adulta canadiense y el segundo en población adolescente alemana. Se reportó el sitio cg15094908 en el cromosoma 11 en la posición 11499674 correspondiente al gen *GALNTL4*, y el grupo de comparación correspondió a pacientes adolescentes con AN y población en general. Similar, nosotros reportamos el sitio cg25149859 en el cromosoma 11 en la posición 11374995 correspondiente al gen *GALNT18* (antes *GALNTL4*);



aunque nuestro resultado fue en el grupo de comparación de pacientes con AN y BN. Este gen codifica una enzima (ppGalNAc-T18) que participa en la regulación de síntesis de proteínas mediante la O-glicosilación tipo mucina. Además, la proteína ppGalNAc-T18 se expresa en la membrana celular, en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, en tejido pulmonar y en menor proporción en cerebro (X. Li *et al.*, 2012). En estudios *in vitro* la proteína ppGalNAc-T18 participa en la regulación del estrés y de la apoptosis (Shan *et al.*, 2019). En estudios animales aumentó la expresión del gen *GALNT18* al ser estimulado por la inflamación en células hepáticas (Hoffman *et al.*, 2018); y en estudios *in vitro*, la proteína ppGalNAc-T18 modula la actividad de ppGalNAc-T2 (gen *GALNT2*) como una proteína chaperona (X. Li *et al.*, 2012). El gen *GALNT2* participa en la regulación del metabolismo de lípidos (Willer *et al.*, 2008). Por otra parte, polimorfismos del gen *GALNT18* se asocian en pacientes con enfermedades endocrinas y autoinmunes; el polimorfismo rs2722769 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Palmer *et al.*, 2012); y el polimorfismo rs4910008 como factor pronóstico en respuesta al tratamiento de artritis reumatoide (Maldonado-Montoro *et al.*, 2016). Finalmente, nuestros resultados demostraron que el sitio cg25149859 presenta mayor metilación en pacientes con BN; y más del 40% de los pacientes con BN tenían sobrepeso u obesidad; nosotros sugerimos que la metilación del sitio cg25149859 del gen *GALNT18* podría participar en la regulación del metabolismo de lípidos y podría regular la síntesis de proteínas en vías neurobiológicas relacionadas con el sistema de recompensa; y de esta manera participar en la fisiopatología en enfermedades psiquiátricas y metabólicas. Sin embargo, esta hipótesis fue planteada al obtener



mediante un GWAS 8 genes que regulan la actividad metabólica en pacientes con anorexia nerviosa; y 2 de estos genes (*ASB3*, *ERLEC1*) fueron asociados a diabetes mellitus tipo 2. Estos resultados apoyan la teoría de un riesgo poligenico en el origen de los TCA.

7.4. Enriquecimiento de vías

Nuestros resultados ubican a los sitios CpGs diferencialmente metilados de nuestro estudio en 17 genes. Se destaca la participación del factor de transcripción SRF (factor de respuesta al suero) con el gen *KPNA1* (proteína importina α -1, función de comunicación entre citoplasma y el núcleo de la célula). (Tabla 12) La literatura ha reportado que el SRF es un factor de transcripción que regula la formación de músculo liso, estriado y cardíaco, y controla la expresión de genes expresados tempranamente (IEG) (Rosenwald *et al.*, 2017). En células no musculares existen dos familias ó vías de señalización reguladas por cofactores para SRF, Rho-actina y Ras-ERK (quinasa regulada extracelularmente) (Kikuchi *et al.*, 2019). ERK es regulada por un complejo de factores ternarios (TCF) conformado por los factores Elk-1, SAP-1 y NET, además ERK es activada por la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Posern y Treisman, 2006). Por el contrario, Rho-actina es controlada por factores de transcripción relacionados con el miocardio (MTFA) (Esnault *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que existe regulación por factores de transcripción miembros de la familia zinc (GATA) (Gau y Roy, 2018). Sin embargo, SRF requiere de un complejo nuclear de poros para ingresar al núcleo. Este complejo se forma por la proteína SRF, *KPNA1* y *KPNB1* (McConville *et al.*, 2011).



Por otro lado, hay estudios que demuestran la relación entre serotonina y SRF (Hirota *et al.*, 2014). Se reportó que la pérdida de SRF en cerebro anterior y en neuronas del hipocampo están asociadas con la incapacidad de habituación y depresión a largo plazo; y en ganglios basales con hiperactividad. Por el contrario, la alta expresión de SRF en el núcleo accumbens y núcleo estriado, postulan a SRF como regulador de la plasticidad neuronal en el sistema dopaminérgico. Se sugiere que SRF influye en el desarrollo de alteraciones del comportamiento dependientes de dopamina en el cuerpo estriado. (Parkitna *et al.*, 2010). Aunque no hay reportes de SRF y TCA, hay estudios de SRF en modelos de epilepsia (Losing *et al.*, 2017), enfermedad de Parkinson (Rieker *et al.*, 2012) y, en la formación de espinas dendríticas por los efectos de uso repetido de cocaína (Cahill *et al.*, 2018). Estos datos sugieren que SRF y sus cofactores regulan funciones como, actividad sináptica, crecimiento de la fibra nerviosa y modulación de la forma del cono de crecimiento neuronal. Algunos cofactores son: BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y TFII-I (factor general de transcripción Ii), que fueron identificados como moduladores de SRF (Kikuchi *et al.*, 2019; Meyer zu Reckendorf *et al.*, 2016). Nosotros observamos el sitio cg13845098 hipometilado en pacientes con TCA. Nuestros datos sugieren que el gen *KPNA1* participa como cofactor con SRF. Esta interacción podría modular la actividad neuronal en neuronas dopaminérgicas y ser una de las causas y el fundamento molecular que explique la alta comorbilidad psiquiátrica de TCA con alteraciones del estado de ánimo o trastornos del neurodesarrollo. Sin embargo, a la fecha no hay estudios que reporten la



participación de SRF en trastornos de la conducta alimentaria con alta comorbilidad psiquiátrica.

Adicionalmente, encontramos la participación del gen *SOCS6* (supresor de señalización de citosina 6) en la vía de señalización del receptor KIT. (Tabla 13) Este gen codifica una proteína que pertenece a los inhibidores STAT inducido por citosina (CIS), también conocido como supresor de señalización por citosinas (SOCS). En la literatura se reportó la presencia del receptor KIT en neuronas del ganglio dorsal (Hirata *et al.*, 1995). La regulación por SOCS se ha descrito por retroalimentación negativa en la vía JAK/STAT; al unirse al receptor KIT reduce su actividad en 40% y también reduce la activación de la proteína ERK, vía de las MAPK (Kazi *et al.*, 2012), lo que sugiere que SOCS participa como proteína inhibitoria en la señalización de las MAPK. Por otro lado, se ha reportado que la expresión de SOCS inhibe el receptor de insulina. En este sentido, la expresión de SOCS ha sido asociada con agentes que inducen resistencia a la insulina como interleucina 1- β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (Mooney *et al.*, 2001). Nosotros observamos que el estado de metilación del sitio cg09417725 que corresponde al gen *SOCS* se encontró hipermetilado en los pacientes con TCA. Aunque no hay datos para correlacionar el estatus de metilación de este sitio con tejido nervioso, sugerimos que la proteína SOCS tiene un rol de regulación en la vía de señalización MAPK reportada previamente. La poca expresión de este gen, podría ser el mecanismo que regula en la población con TCA el desarrollo de alteraciones inflamatorias, como diabetes tipo 2 y obesidad. Aunque, este patrón de metilación podría ser distinto en otro tejido, como en hepatocitos, pudiendo ser un factor de



desarrollo de obesidad en pacientes adolescentes con TCA. Por lo tanto, se requieren más estudios que comparen los patrones de metilación en diferentes tejidos en pacientes con TCA para confirmar esta teoría.

Otro gen, que participa en varias vías de señalización fue el *RAF1*, ubicado en el cromosoma 3. Este gen codifica la proteína RAF, que activa la vía de MAPK/ERK; involucrado en procesos celulares como proliferación, diferenciación, muerte celular, metabolismo y motilidad (Huang *et al.*, 2017). En la literatura se ha reportado la participación de esta vía en la adicción por drogas (C. Y. Li, Mao, y Wei, 2008), además que la proteína ERK2, regula la adicción a drogas en tratamientos contra el cáncer (Kong *et al.*, 2017). El mecanismo propuesto, involucra al receptor de dopamina 4, que activa proteína quinasa C (PKC). Además, PKC permite la activación del receptor NMDA con el consecuente aumento de la concentración de calcio citosólico; estimulando la proteína ERK (C. Y. Li *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha reportado a la vía dopaminérgica y el circuito de recompensa como el vínculo entre obesidad y adicción (Volkow *et al.*, 2013); estos datos respaldan nuestros resultados en relación a sobrepeso y obesidad y uso de sustancias en pacientes con TCA. En nuestros resultados observamos hipometilación del sitio cg09326546, correspondiente al gen *RAF*. Este dato sugiere que, a mayor expresión de esta proteína, existe más activación de la vía MAPK. Esta activación podría ser el fundamento del comportamiento adictivo hacia la comida de los pacientes con BN y TA; o la base que explique la presencia de adicciones en pacientes con TCA. Sin embargo, se requieren de más estudios que relacionen la participación de la vía MAPK en modelos experimentales.



Finalmente, el enriquecimiento de vías demostró participación del gen RAF con el receptor de serotonina y la vía ELK-GATA4, aunque hay pocos datos de esta relación, nosotros sugerimos que la activación del receptor 2 activa las quinasas de la familia SRC, el cual permite el aumento de la concentración de calcio citosólico y este paso podría activar la vía RAS/RAF/MAP/ERK y regular la transcripción de genes relacionados a la conducta adictiva. Sin embargo, a la fecha hay pocos estudios que evalúen genes asociados a la adicción de la comida (Cornelis *et al.*, 2016).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



8. Conclusión

De nuestros resultados obtenidos en el estudio, se establecieron las siguientes conclusiones:

- Los pacientes con bulimia nerviosa y trastorno por atracón presentan mayor riesgo de suicidio, y está asociado con sobrepeso u obesidad. Además, los sujetos con anorexia nerviosa se relacionan con el trastorno obsesivo compulsivo.
- Los patrones de metilación de los sitios cg10612237, cg09466243, cg23521742, cg04149955, cg22681738, cg00164837, cg09326546, cg25939242, cg04865319 y cg19743686 son posibles biomarcadores de heterogeneidad clínica en pacientes adolescentes mexicanos con trastornos de la conducta alimentaria.
- En pacientes con anorexia nerviosa, la metilación de gen *KPNA1* podría estar relacionado con la actividad de neuronas dopaminérgicas en pacientes con trastornos del estado de ánimo.
- En pacientes con bulimia nerviosa, la metilación del gen *GALNT18* podría participar en la regulación del metabolismo de lípidos y síntesis de proteínas.
- En pacientes con trastorno por atracón, la metilación del gen *SOCS6* es capaz de inhibir la vía de señalización MAPK.



9. Referencias

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)* (5th ed.). Washington: American Psychiatric Pub.
- Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., Finucane, H. K., Walters, R. K., Bras, J., Duncan, L., ... Murray, R. (2018). Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science*, 360(6395). doi:10.1126/science.aap8757
- Berthoud, H. R., Munzberg, H., y Morrison, C. D. (2017). Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology*, 152(7), 1728-1738. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.050
- Booij, L., Casey, K. F., Antunes, J. M., Szyf, M., Joober, R., Israel, M., y Steiger, H. (2015). DNA methylation in individuals with anorexia nervosa and in matched normal-eater controls: A genome-wide study. *Int J Eat Disord*, 48(7), 874-882. doi:10.1002/eat.22374
- Breithaupt, L., Hubel, C., y Bulik, C. M. (2018). Updates on Genome-Wide Association Findings in Eating Disorders and Future Application to Precision Medicine. *Current neuropharmacology*, 16(8), 1102-1110. doi:10.2174/1570159X16666180222163450
- Brunault, P., Frammery, J., Montaudon, P., De Luca, A., Hankard, R., Ducluzeau, P. H., ... Ballon, N. (2019). Adulthood and childhood ADHD in patients consulting for obesity is associated with food addiction and binge eating, but not sleep apnea syndrome. *Appetite*, 136, 25-32. doi:10.1016/j.appet.2019.01.013



- Cahill, M. E., Walker, D. M., Gancarz, A. M., Wang, Z. J., Lardner, C. K., Bagot, R. C., ... Nestler, E. J. (2018). The dendritic spine morphogenic effects of repeated cocaine use occur through the regulation of serum response factor signaling. *Mol Psychiatry*, 23(6), 1474-1486. doi:10.1038/mp.2017.116
- Castellini, G., Franzago, M., Bagnoli, S., Lelli, L., Balsamo, M., Mancini, M., ... Stanghellini, G. (2017). Fat mass and obesity-associated gene (FTO) is associated to eating disorders susceptibility and moderates the expression of psychopathological traits. *PLoS One*, 12(3), e0173560. doi:10.1371/journal.pone.0173560
- Chuang, Y. F., Tanaka, T., Beason-Held, L. L., An, Y., Terracciano, A., Sutin, A. R., ... Thambisetty, M. (2015). FTO genotype and aging: pleiotropic longitudinal effects on adiposity, brain function, impulsivity and diet. *Mol Psychiatry*, 20(1), 133-139. doi:10.1038/mp.2014.49
- Cornelis, M. C., Flint, A., Field, A. E., Kraft, P., Han, J., Rimm, E. B., y van Dam, R. M. (2016). A genome-wide investigation of food addiction. *Obesity (Silver Spring)*, 24(6), 1336-1341. doi:10.1002/oby.21476
- Donnelly, B., Touyz, S., Hay, P., Burton, A., Russell, J., y Caterson, I. (2018). Neuroimaging in bulimia nervosa and binge eating disorder: a systematic review. *J Eat Disord*, 6, 3. doi:10.1186/s40337-018-0187-1
- Du, P., Zhang, X., Huang, C. C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., y Lin, S. M. (2010). Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*, 11, 587. doi:10.1186/1471-2105-11-587



- Edgar, R. D., Jones, M. J., Meaney, M. J., Turecki, G., y Kobor, M. S. (2017). BECon: a tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain. *Transl Psychiatry*, 7(8), e1187. doi:10.1038/tp.2017.171
- Ehrlich, S., Weiss, D., Burghardt, R., Infante-Duarte, C., Brockhaus, S., Muschler, M. A., ... Frieling, H. (2010). Promoter specific DNA methylation and gene expression of POMC in acutely underweight and recovered patients with anorexia nervosa. *J Psychiatr Res*, 44(13), 827-833. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.01.011
- Esnault, C., Gualdrini, F., Horswell, S., Kelly, G., Stewart, A., East, P., ... Treisman, R. (2017). ERK-Induced Activation of TCF Family of SRF Cofactors Initiates a Chromatin Modification Cascade Associated with Transcription. *Mol Cell*, 65(6), 1081-1095.e1085. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.005
- Frank, G. K. (2015). Advances from neuroimaging studies in eating disorders. *CNS Spectr*, 20(4), 391-400. doi:10.1017/s1092852915000012
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., ... McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316(5826), 889-894. doi:10.1126/science.1141634
- Gau, D., y Roy, P. (2018). SRF'ing and SAP'ing - the role of MRTF proteins in cell migration. *J Cell Sci*, 131(19). doi:10.1242/jcs.218222
- Genis-Mendoza, A. D., Ruiz-Ramos, D., Lopez-Narvaez, M. L., Tovilla-Zarate, C. A., Rosa Garcia, A., Cortes Meda, G., ... Nicolini, H. (2019). Genetic



- association analysis of 5-HTR2A gene variants in eating disorders in a Mexican population. *Brain Behav*, 9(7), e01286. doi:10.1002/brb3.1286
- Genis-Mendoza, A. D., Tovilla-Zarate, C. A., y Nicolini, H. (2013). [Genomic Advances in Eating Behavior Disorders]. *Rev Colomb Psiquiatr*, 42(4), 350-355. doi:10.1016/s0034-7450(13)70031-3
- Gervasini, G., y Gamero-Villarroel, C. (2015). Discussing the putative role of obesity-associated genes in the etiopathogenesis of eating disorders. *Pharmacogenomics*, 16(11), 1287-1305. doi:10.2217/pgs.15.77
- Gorwood, P., Blanchet-Collet, C., Chartrel, N., Duclos, J., Dechelotte, P., Hanachi, M., ... Epelbaum, J. (2016). New Insights in Anorexia Nervosa. *Front Neurosci*, 10, 256. doi:10.3389/fnins.2016.00256
- Grzelak, T., Dutkiewicz, A., Paszynska, E., Dmitrzak-Weglarz, M., Slopian, A., y Tyszkiewicz-Nwafor, M. (2017). Neurobiochemical and psychological factors influencing the eating behaviors and attitudes in anorexia nervosa. *J Physiol Biochem*, 73(2), 297-305. doi:10.1007/s13105-016-0540-2
- Hirata, T., Kasugai, T., Morii, E., Hirota, S., Nomura, S., Fujisawa, H., y Kitamura, Y. (1995). Characterization of c-kit-positive neurons in the dorsal root ganglion of mouse. *Brain Res Dev Brain Res*, 85(2), 201-211.
- Hirota, N., McCuaig, S., O'Sullivan, M. J., y Martin, J. G. (2014). Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res*, 12(3), 599-609. doi:10.1016/j.scr.2014.02.003



- Hoffman, P. L., Saba, L. M., Vanderlinden, L. A., y Tabakoff, B. (2018). Voluntary exposure to a toxin: the genetic influence on ethanol consumption. *Mamm Genome*, 29(1-2), 128-140. doi:10.1007/s00335-017-9726-3
- Huang, Y., Guo, X. X., Han, B., Zhang, X. M., An, S., Zhang, X. Y., ... Xu, T. R. (2017). Decoding the full picture of Raf1 function based on its interacting proteins. *Oncotarget*, 8(40), 68329-68337. doi:10.18632/oncotarget.19353
- Hübel, C., Marzi, S. J., Breen, G., y Bulik, C. M. (2019). Epigenetics in eating disorders: a systematic review. *Mol Psychiatry*, 24(6), 901-915. doi:10.1038/s41380-018-0254-7
- Kahnt, T. (2018). A decade of decoding reward-related fMRI signals and where we go from here. *Neuroimage*, 180(Pt A), 324-333. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.03.067
- Kazdin, A. E., Fitzsimmons-Craft, E. E., y Wilfley, D. E. (2017). Addressing critical gaps in the treatment of eating disorders. *The International journal of eating disorders*, 50(3), 170-189. doi:10.1002/eat.22670
- Kazi, J. U., Sun, J., Phung, B., Zadjali, F., Flores-Morales, A., y Ronnstrand, L. (2012). Suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6) negatively regulates Flt3 signal transduction through direct binding to phosphorylated tyrosines 591 and 919 of Flt3. *J Biol Chem*, 287(43), 36509-36517. doi:10.1074/jbc.M112.376111
- Kesselmeier, M., Putter, C., Volckmar, A. L., Baurecht, H., Grallert, H., Illig, T., ... Hinney, A. (2018). High-throughput DNA methylation analysis in anorexia



- nervosa confirms TNXB hypermethylation. *World J Biol Psychiatry*, 19(3), 187-199. doi:10.1080/15622975.2016.1190033
- Kikuchi, K., Ihara, D., Fukuchi, M., Tanabe, H., Ishibashi, Y., Tsujii, J., ... Tabuchi, A. (2019). Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the Arc gene. *J Neurochem*, 148(2), 204-218. doi:10.1111/jnc.14596
- Klump, K. L. (2013). Puberty as a critical risk period for eating disorders: a review of human and animal studies. *Horm Behav*, 64(2), 399-410. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.02.019
- Kolar, D. R., Rodriguez, D. L., Chams, M. M., y Hoek, H. W. (2016). Epidemiology of eating disorders in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *Curr Opin Psychiatry*, 29(6), 363-371. doi:10.1097/ycp.0000000000000279
- Kong, X., Kuilman, T., Shahrabi, A., Boshuizen, J., Kemper, K., Song, J. Y., ... Peeper, D. S. (2017). Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature*, 550(7675), 270-274. doi:10.1038/nature24037
- Kostro, K., Lerman, J. B., y Attia, E. (2014). The current status of suicide and self-injury in eating disorders: a narrative review. *J Eat Disord*, 2, 19. doi:10.1186/s40337-014-0019-x
- Koutek, J., Kocourkova, J., y Dudova, I. (2016). Suicidal behavior and self-harm in girls with eating disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12, 787-793. doi:10.2147/ndt.S103015



- Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., ... Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*, 44(W1), W90-W97. doi:10.1093/nar/gkw377
- Li, C. Y., Mao, X., y Wei, L. (2008). Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Comput Biol*, 4(1), e2.
doi:10.1371/journal.pcbi.0040002
- Li, X., Wang, J., Li, W., Xu, Y., Shao, D., Xie, Y., ... Zhang, Y. (2012). Characterization of ppGalNAc-T18, a member of the vertebrate-specific Y subfamily of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*, 22(5), 602-615.
doi:10.1093/glycob/cwr179
- Lindstedt, K., Kjellin, L., y Gustafsson, S. A. J. J. o. E. D. (2017). Adolescents with full or subthreshold anorexia nervosa in a naturalistic sample – characteristics and treatment outcome. 5(1), 4. doi:10.1186/s40337-017-0135-5
- Lipsman, N., Woodside, D. B., y Lozano, A. M. (2015). Neurocircuitry of limbic dysfunction in anorexia nervosa. *Cortex*, 62, 109-118.
doi:10.1016/j.cortex.2014.02.020
- Losing, P., Niturad, C. E., Harrer, M., Reckendorf, C. M. Z., Schatz, T., Sinske, D., ... Knoll, B. (2017). SRF modulates seizure occurrence, activity induced gene transcription and hippocampal circuit reorganization in the mouse



- pilocarpine epilepsy model. *Mol Brain*, 10(1), 30. doi:10.1186/s13041-017-0310-2
- Mairs, R., y Nicholls, D. (2016). Assessment and treatment of eating disorders in children and adolescents. *Arch Dis Child*, 101(12), 1168-1175.
doi:10.1136/archdischild-2015-309481
- Maldonado-Montoro, M., Canadas-Garre, M., Gonzalez-Utrilla, A., Plaza-Plaza, J. C., y Calleja-Hernandez, M. Y. (2016). Genetic and clinical biomarkers of tocilizumab response in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res*, 111, 264-271. doi:10.1016/j.phrs.2016.06.016
- Mas, S., Plana, M. T., Castro-Fornieles, J., Gasso, P., Lafuente, A., Moreno, E., ... Lazaro, L. (2013). Common genetic background in anorexia nervosa and obsessive compulsive disorder: preliminary results from an association study. *J Psychiatr Res*, 47(6), 747-754.
doi:10.1016/j.jpsychires.2012.12.015
- McConville, J. F., Fernandes, D. J., Churchill, J., Dewundara, S., Kogut, P., Shah, S., ... Solway, J. (2011). Nuclear import of serum response factor in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45(3), 453-458.
doi:10.1165/rcmb.2008-0393OC
- Meyer zu Reckendorf, C., Anastasiadou, S., Bachhuber, F., Franz-Wachtel, M., Macek, B., y Knoll, B. (2016). Proteomic analysis of SRF associated transcription complexes identified TFII-I as modulator of SRF function in neurons. *Eur J Cell Biol*, 95(1), 42-56. doi:10.1016/j.ejcb.2015.11.002



- Mill, J., Tang, T., Kaminsky, Z., Khare, T., Yazdanpanah, S., Bouchard, L., ...
Petronis, A. (2008). Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet*, 82(3), 696-711.
doi:10.1016/j.ajhg.2008.01.008
- Mitchell, M. R., y Potenza, M. N. (2014). Recent Insights into the Neurobiology of Impulsivity. *Curr Addict Rep*, 1(4), 309-319. doi:10.1007/s40429-014-0037-4
- Mooney, R. A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L. M., Shang, Y., y Furlanetto, R. W. (2001). Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem*, 276(28), 25889-25893.
doi:10.1074/jbc.M010579200
- Muller, T. D., Greene, B. H., Bellodi, L., Cavallini, M. C., Cellini, E., Di Bella, D., ... Hinney, A. (2012). Fat mass and obesity-associated gene (FTO) in eating disorders: evidence for association of the rs9939609 obesity risk allele with bulimia nervosa and anorexia nervosa. *Obes Facts*, 5(3), 408-419.
doi:10.1159/000340057
- Mustelin, L., Silen, Y., Raevuori, A., Hoek, H. W., Kaprio, J., y Keski-Rahkonen, A. (2016). The DSM-5 diagnostic criteria for anorexia nervosa may change its population prevalence and prognostic value. *J Psychiatr Res*, 77, 85-91.
doi:10.1016/j.jpsychires.2016.03.003
- Palmer, N. D., McDonough, C. W., Hicks, P. J., Roh, B. H., Wing, M. R., An, S. S., ... Sladek, R. (2012). A genome-wide association search for type 2 diabetes



- genes in African Americans. *PLoS One*, 7(1), e29202-e29202.
doi:10.1371/journal.pone.0029202
- Parkitna, J. R., Bilbao, A., Rieker, C., Engblom, D., Piechota, M., Nordheim, A., ... Schutz, G. (2010). Loss of the serum response factor in the dopamine system leads to hyperactivity. *Faseb j*, 24(7), 2427-2435. doi:10.1096/fj.09-151423
- Pjetri, E., Schmidt, U., Kas, M. J., y Campbell, I. C. (2012). Epigenetics and eating disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 15(4), 330-335.
doi:10.1097/MCO.0b013e3283546fd3
- Portzky, G., van Heeringen, K., y Vervaet, M. (2014). Attempted suicide in patients with eating disorders. *Crisis*, 35(6), 378-387. doi:10.1027/0227-5910/a000275
- Posern, G., y Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol*, 16(11), 588-596. doi:10.1016/j.tcb.2006.09.008
- Rieker, C., Schober, A., Bilbao, A., Schutz, G., y Parkitna, J. R. (2012). Ablation of serum response factor in dopaminergic neurons exacerbates susceptibility towards MPTP-induced oxidative stress. *Eur J Neurosci*, 35(5), 735-741.
doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08003.x
- Ringner, M. (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotechnol*, 26(3), 303-304. doi:10.1038/nbt0308-303



- Rodriguez-Ramirez, S., Mundo-Rosas, V., Garcia-Guerra, A., y Shamah-Levy, T. (2011). Dietary patterns are associated with overweight and obesity in Mexican school-age children. *Arch Latinoam Nutr*, 61(3), 270-278.
- Rosenwald, M., Efthymiou, V., Opitz, L., y Wolfrum, C. (2017). SRF and MKL1 Independently Inhibit Brown Adipogenesis. *PLoS One*, 12(1), e0170643. doi:10.1371/journal.pone.0170643
- Santos, N. H., Fiaccone, R. L., Barreto, M. L., Silva, L. A., y Silva Rde, C. (2014). Association between eating patterns and body mass index in a sample of children and adolescents in Northeastern Brazil. *Cad Saude Publica*, 30(10), 2235-2245.
- Scherag, S., Hebebrand, J., y Hinney, A. (2010). Eating disorders: the current status of molecular genetic research. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19(3), 211-226. doi:10.1007/s00787-009-0085-9
- Shan, A., Lu, J., Xu, Z., Li, X., Xu, Y., Li, W., ... Zhang, Y. (2019). Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 18 non-catalytically regulates the ER homeostasis and O-glycosylation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1863(5), 870-882. doi:10.1016/j.bbagen.2019.01.009
- Shih, P. A., y Woodside, D. B. (2016). Contemporary views on the genetics of anorexia nervosa. *Eur Neuropsychopharmacol*, 26(4), 663-673. doi:10.1016/j.euroneuro.2016.02.008
- Sobczyk-Kopciol, A., Broda, G., Wojnar, M., Kurjata, P., Jakubczyk, A., Klimkiewicz, A., y Ploski, R. (2011). Inverse association of the obesity predisposing FTO rs9939609 genotype with alcohol consumption and risk



- for alcohol dependence. *Addiction*, 106(4), 739-748. doi:10.1111/j.1360-0443.2010.03248.x
- Steward, T., Mestre-Bach, G., Vintro-Alcaraz, C., Aguera, Z., Jimenez-Murcia, S., Granero, R., y Fernandez-Aranda, F. (2017). Delay Discounting of Reward and Impulsivity in Eating Disorders: From Anorexia Nervosa to Binge Eating Disorder. *Eur Eat Disord Rev*, 25(6), 601-606. doi:10.1002/erv.2543
- Stice, E., Marti, C. N., y Rohde, P. (2013). Prevalence, incidence, impairment, and course of the proposed DSM-5 eating disorder diagnoses in an 8-year prospective community study of young women. *J Abnorm Psychol*, 122(2), 445-457. doi:10.1037/a0030679
- Titus, A. J., Gallimore, R. M., Salas, L. A., y Christensen, B. C. (2017). Cell-type deconvolution from DNA methylation: a review of recent applications. *Hum Mol Genet*, 26(R2), R216-r224. doi:10.1093/hmg/ddx275
- Trace, S. E., Baker, J. H., Penas-Lledo, E., y Bulik, C. M. (2013). The genetics of eating disorders. *Annu Rev Clin Psychol*, 9, 589-620. doi:10.1146/annurev-clinpsy-050212-185546
- Tremolizzo, L., Conti, E., Bomba, M., Uccellini, O., Rossi, M. S., Marfione, M., ... Nacinovich, R. (2014). Decreased whole-blood global DNA methylation is related to serum hormones in anorexia nervosa adolescents. *World J Biol Psychiatry*, 15(4), 327-333. doi:10.3109/15622975.2013.860467
- Tsai, M. C., Gan, S. T., Lee, C. T., Liang, Y. L., Lee, L. T., y Lin, S. H. (2018). National population-based data on the incidence, prevalence, and



- psychiatric comorbidity of eating disorders in Taiwanese adolescents and young adults. *Int J Eat Disord*, 51(11), 1277-1284. doi:10.1002/eat.22970
- Uhl, G. R., Koob, G. F., y Cable, J. (2019). The neurobiology of addiction. *Ann N Y Acad Sci*. doi:10.1111/nyas.13989
- Ulfvebrand, S., Birgegård, A., Norring, C., Hogdahl, L., y von Hauswolff-Juhlin, Y. (2015). Psychiatric comorbidity in women and men with eating disorders results from a large clinical database. *Psychiatry Res*, 230(2), 294-299. doi:10.1016/j.psychres.2015.09.008
- Velders, F. P., De Wit, J. E., Jansen, P. W., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Verhulst, F. C., y Tiemeier, H. (2012). FTO at rs9939609, food responsiveness, emotional control and symptoms of ADHD in preschool children. *PLoS One*, 7(11), e49131. doi:10.1371/journal.pone.0049131
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Tomasi, D., y Baler, R. D. (2013). Obesity and addiction: neurobiological overlaps. *Obes Rev*, 14(1), 2-18. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01031.x
- Willer, C. J., Sanna, S., Jackson, A. U., Scuteri, A., Bonnycastle, L. L., Clarke, R., ... Abecasis, G. R. (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature genetics*, 40(2), 161-169. doi:10.1038/ng.76
- Yilmaz, Z., Hardaway, J. A., y Bulik, C. M. (2015). Genetics and Epigenetics of Eating Disorders. *Adv Genomics Genet*, 5, 131-150. doi:10.2147/agg.S55776