

Biomarcadores: antecedentes, clasificación y guía para su aplicación en epidemiología nutricional

Dolores Corella^{1,2}, José M. Ordovás^{3,4,5}

¹Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Universidad de Valencia. ²CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. ³Department of Cardiovascular Epidemiology and Population Genetics. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Madrid. ⁴IMDEA Alimentación. Madrid. ⁵Nutrition and Genomics Laboratory. JM-USDA Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University. Boston. MA. USA.

Resumen

En los estudios de epidemiología nutricional uno de los principales problemas es conocer la ingestión de alimentos y sus componentes de manera válida y precisa. Para ayudar en este proceso se ha planteado repetidas veces la necesidad de contar con buenos biomarcadores, que de manera más objetiva nos permitan conocer de manera más estandarizada, válida y precisa la dieta consumida. Existen varias definiciones de biomarcador y también distintas clasificaciones de los mismos. En general un biomarcador es una característica que puede medir objetivamente en distintas muestras biológicas y que puede evaluarse como indicador de exposiciones, de procesos biológicos normales o patogénicos o de respuestas a una intervención determinada. Las muestras biológicas más utilizadas en epidemiología nutricional son sangre total, eritrocitos, plasma, suero, orina, uñas, saliva, heces y muestras de distintos tejidos. En estas muestras se pueden determinar biomarcadores de exposición (ingesta dietética), biomarcadores de efectos y biomarcadores de estado de enfermedad. A su vez los biomarcadores de exposición pueden categorizarse temporalmente en biomarcadores de efectos agudos, a medio plazo y crónicos. Existen muchas dificultades en la identificación de buenos biomarcadores. Actualmente los avances en las nuevas ómicas están abriendo nuevas posibilidades para la obtención de nuevos biomarcadores de distintos tipos utilizando genómica, epigenómica, transcriptómica, lipidómica, proteómica y metabolómica. Revisaremos el estado actual de los biomarcadores en epidemiología nutricional así como las tendencias futuras de los nuevos biomarcadores ómicos.

Palabras clave: *Biomarcador. Dieta. Ingesta. Muestra biológica. Genómica. Transcriptómica. Metabolómica.*

BIOMARKERS: BACKGROUND, CLASSIFICATION AND GUIDELINES FOR APPLICATIONS IN NUTRITIONAL EPIDEMIOLOGY

Abstract

One of the main problems in nutritional epidemiology is to assess food intake as well as nutrient/food component intake to a high level of validity and reliability. To help in this process, the need to have good biomarkers that more objectively allow us to evaluate the diet consumed in a more standardized, valid and precise way has often been commented upon. There are various definitions of biomarkers and also different classifications of the same. In general a biomarker can be defined as a characteristic that can objectively measure different biological samples and that can be evaluated as an exposure marker of normal or pathogenic biological processes or of responses to a certain intervention. The biological samples most commonly used in nutritional epidemiology are blood, red blood cells, plasma, serum, urine, nails, saliva, faeces and samples of different tissues. Exposure biomarkers (dietary intake), biomarkers of effects and biomarkers of disease status can be determined from these samples. In turn, exposure biomarkers can be temporarily categorized into markers of acute, medium term or chronic effects. Many difficulties arise in identifying good biomarkers. Currently, advances in omics are opening up new possibilities for obtaining new biomarkers of various kinds, using genomics, epigenomics, transcriptomics, lipidomics, proteomics and metabolomics. We shall review the present situation of biomarkers in nutritional epidemiology as well as the future trends of the new omic biomarkers.

Key words: *Biomarker. Diet. Intake. Biological sample. Genomics. Transcriptomics. Metabolomics.*

Correspondencia: Dolores Corella.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública.
Facultad de Medicina.
Avda. Blasco Ibáñez, 15.
46010 Valencia. España.
E-mail: dolores.corella@uv.es

Antecedentes

Son ampliamente conocidas las limitaciones de los cuestionarios para medir la dieta consumida con suficiente validez y precisión. Aunque se intente mejorar la validez de dichos instrumentos utilizando registros de dieta o varios recordatorios de 24 horas, en lugar de los menos precisos cuestionarios semicuantitativos de consumo de alimentos, siempre existen errores aleatorios y sistemáticos que hacen que las medidas autorreportadas de la dieta se alejen de la realidad¹. Es más, estos errores en la medida de los alimentos consumidos, se extienden a los nutrientes y otros componentes de los alimentos derivados de la ingesta consumida, no sólo porque la ingesta no se haya anotado con validez y precisión, sino porque existen otros factores como la variabilidad en la composición del alimento consumido, etc que también contribuyen a que los nutrientes y componentes de los alimentos derivados de manera teórica a través de tablas de composición de alimentos, no se ajusten fielmente a la realidad consumida. Medir bien estas ingestas es muy importante, porque en la mayoría de las ocasiones, los estudios nutricionales no solamente van a tener como objetivo el conocer el consumo de alimentos en una población determinada, sino que el siguiente paso será estudiar las asociaciones entre el consumo de alimentos y un determinado problema de salud. Así, está ampliamente demostrado que, la determinación correcta de la exposición a la dieta es crucial en la investigación de la relación entre dieta y enfermedad. Por ello es necesario disponer de otras medidas alternativas para conocer el consumo de alimentos y los nutrientes (y componentes no nutritivos de los alimentos) aportados por los mismos con mayor validez y precisión que el obtenido a través de las medidas auto-referidas a través de cuestionarios. Los biomarcadores nutricionales son importantes para la investigación future entre dieta y salud, ya que pueden aportar una medida más objetiva de la dieta consumida. Sin embargo, la definición de biomarcador no es sencilla y existen múltiples definiciones de los mismos en función de la aplicación de estos biomarcadores. En general, una definición ampliamente utilizada de biomarcador es la dada por "the Biomarker Definition Working Group (BDWG)" in 2001². De acuerdo con la misma un biomarcador es una característica que puede ser objetivamente medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológica o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. Sin embargo, esta definición de biomarcador no ajusta bien en todas las situaciones y se han propuesto múltiples variantes de la misma³. En investigación nutricional tenemos que utilizar una definición amplia y también adaptada a cada situación, ya que necesitaremos biomarcadores cubriendo al menos los siguientes aspectos: ingesta dietética, estado nutricional, exposición a nutrientes y efectos de las intervenciones nutricionales en estados de salud fisiológicos o patológicos, así como proporcionar información de las diferentes respuestas interindividuales a la dieta. También tendremos que tener en cuenta que muchos biomarcadores pueden pertenecer al mismo tiempo a varias de estas categorías.

Actualmente, el estudio de los biomarcadores nutricionales, ya sean bioquímicos, funcionales o índices clínicos de la ingesta de nutrientes o de su metabolismo, está revolucionando nuestro conocimiento del papel de los nutrientes y componentes de los alimentos no nutritivos en la salud y en la enfermedad. Aunque existe un enorme interés en la utilización y en el desarrollo de nuevos biomarcadores, la situación actual es que todavía no disponemos de buenos biomarcadores para la mayoría de los aspectos relevantes mencionados anteriormente. Tanto es así que desde distintos organismos de investigación públicos y privados se está poniendo de manifiesto la necesidad de profundizar en la investigación de nuevos biomarcadores nutricionales y se están potenciando investigaciones en esta línea. Así, desde que una de las conclusiones iniciales del *European Commission-funded project* PASSCLAIM, coordinado por coordinated *ILSI Europe*, fue que había una gran necesidad de obtener marcadores adecuados en ciencias de la nutrición, se considera prioritario en los Proyectos europeos la investigación en mejores biomarcadores (entre ellas las recientes iniciativas del *Joint Programming Initiative (JPI) on food and nutrition in Europe* que este año ha comenzado la financiación de dos nuevos proyectos (MIRDIET and FOOD-BALL). Estos proyectos tienen como objetivos la validación de biomarcadores y la investigación de biomarcadores de ingesta/exposición, así como de estatus nutricional en el área de la nutrición y la salud. El primero de ellos centrado en los microRNA y el segundo de ellos centrado la aplicación de la metabolomics. En Estados Unidos también se están incentivando los proyectos dirigidos a la investigación sobre biomarcadores nutricionales y en abril de 2012, *the Sackler Institute for Nutrition Science* y *the New York Academy of Sciences* organizaron una conferencia titulada *Biomarkers in Nutrition: New Frontiers in Research and Application*. El objetivo de esta conferencia fue poner a trabajar conjuntamente a investigadores y personal de la industria, académicos y organizaciones gubernamentales para establecer el estado actual de conocimientos sobre biomarcadores nutricionales, identificar los retos más importantes, así como las preguntas no resueltas, y catalizar nueva investigación in este campo para que pronto sea posible la implementación de buenos biomarcadores en epidemiología nutricional que permitan una mejor medida del consumo de alimentos, de sus efectos y de su asociación con los estados de salud-enfermedad.

En artículo realizaremos una revisión del conocimiento actual de los biomarcadores en epidemiología nutricional y profundizaremos en la nueva ómicas ya que prometen una revolución en la identificación de nuevos marcadores en los estudios nutricionales.

Clasificación de los biomarcadores y guía para su uso

El uso primer de biomarcadores fue atribuido a Isaakson en 1980, cuando propuso utilizar la medida del nitrógeno urinario como un marcador independiente de la medida de la ingesta de proteínas, y todavía permanece

siendo uno de los principales biomarcadores empleados¹. Sin embargo no todos los biomarcadores poseen las mismas características. Existen distintas clasificaciones de biomarcadores. Potischman definió los biomarcadores como "cualquier espécimen biológico que sea un indicador del estado nutricional con respecto a la ingesta o al metabolismo de algún componente de la dieta"⁴. Este autor clasificó los biomarcadores en dos grandes grupos: Biomarcadores de exposición nutricional y biomarcadores de estado nutricional. Los biomarcadores de exposición nutricional serían aquellos utilizados para validar la medida de la ingesta o como subrogados de la ingesta dietética. Tanto ellos como los biomarcadores de estado nutricional podrían ser evaluados en cuanto a precisión, sensibilidad, especificidad, variabilidad entre-sujetos y temporalidad. Sin embargo esta clasificación de biomarcadores puede ampliarse teniendo en cuenta que en los estudios nutricionales no solamente interesa medir bien la dieta, sino también la relación entre la misma y los estados de salud-enfermedad, por ello en los estudios nutricionales también es necesario incorporar las mediciones de biomarcadores relacionados con la enfermedad para tener así unas determinaciones más completas. En la tabla I se presenta esta clasificación ampliada de los biomarcadores en estudios nutricionales de acuerdo con su finalidad. El papel de los biomarcadores nutricionales en la salud y la enfermedad ha evolucionado desde los marcadores de deficiencia en una enfermedad específica (por ejemplo, la vitamina A y los ojos), a una multitud de afecciones crónicas que abarcan las endocrinas, cardiovasculares, respiratorias, digestivas y el sistema inmunológico y nervioso, entre otros.

Pero los biomarcadores también se pueden clasificar también en función de su temporalidad. Así, los biomarcadores se pueden clasificar en biomarcadores de corto plazo (reflejando la ingesta en el pasado de horas o días); biomarcadores de término medio (reflejando la ingesta de semanas o meses) y biomarcadores de largo plazo (reflejando de ingesta de meses o años). Por ejemplo, los biomarcadores

medidos en orina, plasma o suero reflejan bien ingestas a corto plazo, mientras que las medidas de biomarcadores en eritrocitos o en el tejido adiposo son indicadores de ingestas a medio plazo. Por otra parte, las medidas de biomarcadores en pelo, uñas, o dientes, son más frecuentemente utilizadas para los biomarcadores a largo plazo⁵.

Otra clasificación de los biomarcadores⁶ distingue entre los biomarcadores de recuperación, de concentración, de sustitución y biomarcadores predictivos.

Los biomarcadores de recuperación se basan en el concepto del equilibrio metabólico entre la ingesta y la excreción durante un período fijo de tiempo y así proporcionan una estimación de los niveles de ingesta absolutos. Los biomarcadores de recuperación son productos biológicos específicos que están directamente relacionados con la ingesta y no sujetos a la homeostasis o diferencias interindividuales sustanciales en el metabolismo. Se conocen sólo unos biomarcadores de recuperación. Los principales ejemplos de biomarcadores recuperación de los siguientes: agua doblemente marcada que se utiliza para medir la tasa metabólica y el gasto total de energía; nitrógeno urinario total/potasio que se utilizan para estimar el consumo de proteínas y la ingesta diaria total de potasio, respectivamente^{7,8}. El primer estudio de validación grande con biomarcadores de recuperación fue el estudio *Observing Protein and Energy Nutrition* (OPEN), realizado por el Instituto Nacional del Cáncer en el período 1999-2000⁹.

Entre otros estudios posteriores en relación con estos marcadores de recuperación podemos citar los trabajos del Dr. Prentice y su grupo en una sub-muestra de mujeres que participaban en el Women's Health Initiative Dietary Modification Trial (WHI-DM)^{10,11}. El WHI-DM es un ensayo controlado aleatorio entre mujeres posmenopáusicas con el objetivo de analizar si una dieta baja en grasas reducía la incidencia de cáncer de mama y colorrectal, y en segundo lugar, las enfermedades del corazón. El subgrupo de mujeres, completó un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, el protocolo de agua doblemente marcada, y una colección de orina de

Tabla I
Clasificación de los biomarcadores en estudios nutricionales

<i>Biomarcadores de exposición alimentaria:</i>	Diferentes tipos de marcadores biológicos destinados a evaluar la ingesta alimentaria de los diferentes alimentos, los nutrientes, los componentes no nutritivos o patrones dietéticos (biomarcadores de recuperación, biomarcadores de concentración, los biomarcadores de recuperación y biomarcadores predictivos). Ejemplo: nitrógeno urinario como biomarcador de la ingesta de proteínas.
<i>Biomarcadores de estado nutricional:</i>	Biomarcadores que reflejan no sólo el consumo sino también el metabolismo de los nutrientes (s) y, posiblemente, los efectos de los procesos de enfermedad. Ejemplo: Algunos de los biomarcadores del metabolismo de la homocisteína, que reflejan no sólo la ingesta nutricional, sino también los procesos metabólicos. Es importante tener en cuenta que un solo biomarcador puede no reflejar el estado nutricional de un solo nutriente, pero puede indicar las interacciones de varios nutrientes.
<i>Biomarcadores de salud/enfermedad:</i>	Los biomarcadores relacionados con diferentes fenotipos intermedios de una enfermedad o incluso a la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo las concentraciones plasmáticas de colesterol total o triglicéridos asociados a las enfermedades cardiovasculares.

24 horas (como biomarcador para el consumo de proteínas). La colección de estos biomarcadores de recuperación permitió a los investigadores caracterizar las distribuciones de error de medición de energía y proteína evaluados por los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos⁹. Adicionalmente, pudieron identificar las características generales (edad, sexo, obesidad, etc) de los participantes que hacían que los errores de medida en los cuestionarios fueran mayores^{10,11}. En este estudio específico pudieron confirmar que los cuestionarios infraestimaban el consumo de energía y proteínas. También observaron que la infraestimación del consumo de energía era mayor en mujeres obesas y con sobrepeso. Estos resultados permiten crear ecuaciones de calibración para la energía y proteínas y aplicarlas a las medidas obtenidas en los cuestionarios^{10,11}.

Los biomarcadores de concentración, son biomarkers si bien tiene una correlación con la ingesta, están afectados por el metabolismo o características personales (sexo, edad, consumo de tabaco, obesidad, etc), por lo que no pueden ser utilizados como medidas absolutas de la ingesta en estudios de validación¹². Ejemplos de biomarcadores de concentración son los siguientes: carotenoides en suero, lípidos, vitaminas, etc. Pueden utilizarse para analizar la relación entre la concentración de los mismos en algún tejido y variables del estado de salud⁶.

Los biomarcadores de sustitución están estrechamente relacionados con los biomarcadores de concentración y algunas veces la distinción entre ellos es difícil de realizar. Su característica diferencial sería que se refieren específicamente a compuestos para los cuales la información de los mismos en tablas de composición de alimentos no es satisfactoria, o no existe. Ejemplos de estos biomarcadores de sustitución son algunas aflatoxinas, algunos fitoestrógenos¹³, o algunos de los biomarcadores recientemente identificados mediante metabolómica⁶, a los que nos referiremos más adelante en esta revisión.

Una clasificación más reciente de biomarcadores, denominada biomarcadores predictivos, se ha propuesto. Estos biomarcadores muestran una relación dosis-respuesta con la ingesta. Como biomarcadores de recuperación, los biomarcadores predictivos son sensibles, dependiente del tiempo, muestran una relación dosis-respuesta con los niveles de ingesta y pueden verse afectados por las características personales, pero la diferencia es que su recuperación total es inferior¹⁴. Ejemplos de biomarcadores predictivos son fructosa y sacarosa urinaria de 24 horas¹⁴. También se ha reportado que el uso de estos marcadores urinarios de azúcares es útil para establecer el error de medida en los estudios que reportan la ingesta de estos azúcares mediante cuestionarios como por ejemplo en el Nutrition and Physical Activity Assessment Study (NPAAS)¹⁵. En la figura 1 se

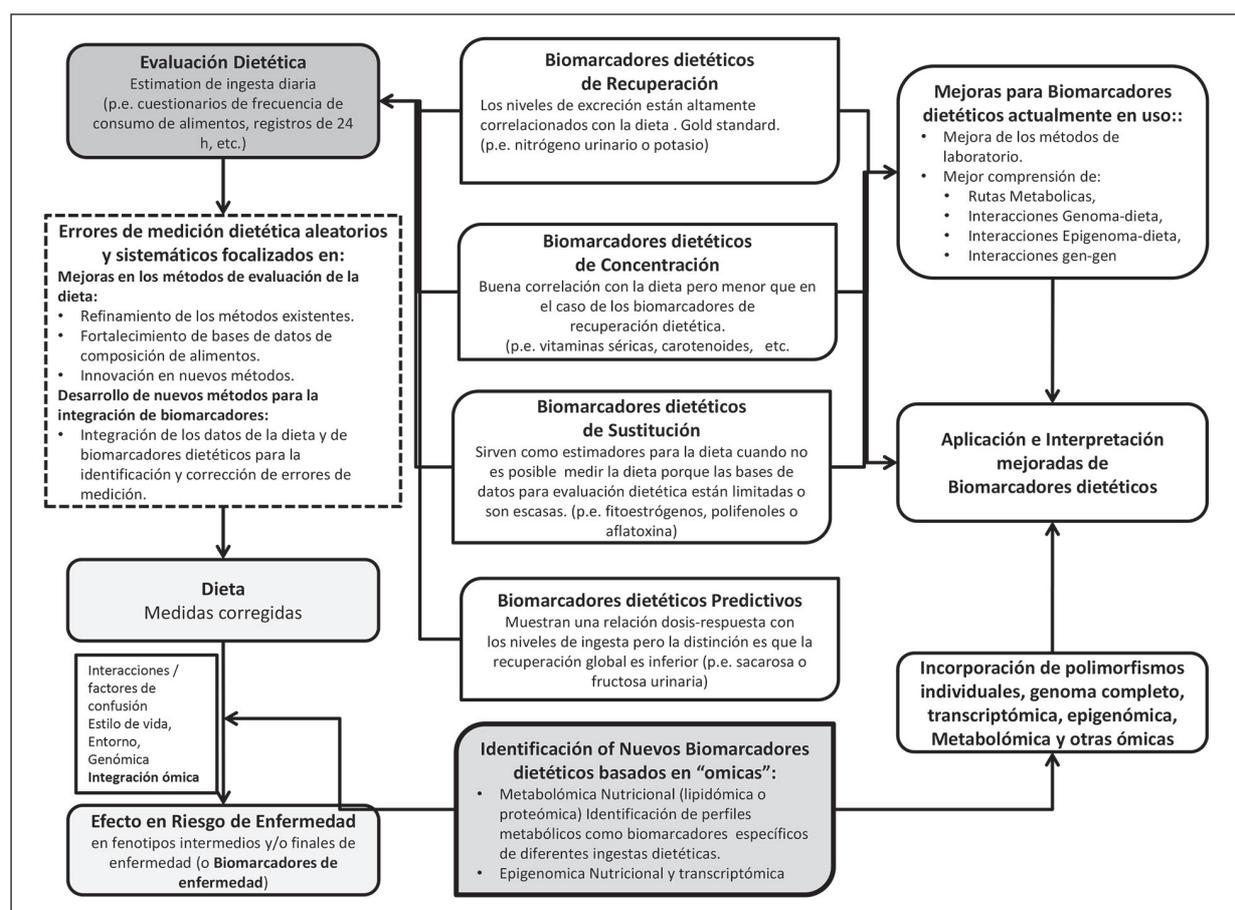


Fig. 1.—Clasificación de los biomarcadores y sus aplicaciones en la validación de la medida de la dieta y en la estimación de su asociación con diferentes fenotipos de enfermedad (adaptada de la referencia 6).

resume la clasificación de estos biomarcadores, así como sus aplicaciones a la validación de los métodos para estimar la dieta consumida, medidas de error y estimación de las asociaciones con los distintos fenotipos de enfermedad.

Los biomarcadores requieren de la obtención de distintos tipos de muestras biológicas para su medición. Las más utilizadas son sangre, orina, y saliva, aunque cada vez se realizan más determinaciones en otras muestras como heces, pelos, uñas, adipose tissue y otros tejidos específicos en función de los objetivos del estudio. En el siguiente epígrafe se realizan unas consideraciones generales para la obtención de almacenamiento de las muestras biológicas para determinar biomarkers en los estudios epidemiológicos.

Obtención y almacenamiento de muestras biológicas en los estudios de epidemiología nutricional

Dado que en la actualidad y se dispone de algunos biomarcadores relevantes para su utilización en los estudios de epidemiología nutricional, y en un futuro se espera que se puedan incorporar muchos biomarcadores más, se aconseja obtener y almacenar muestras biológicas en los nuevos estudios de epidemiología nutricional que se inicien. El número de muestras biológicas y su complejidad dependerá de los objetivos del estudio epidemiológico y de los medios disponibles para ello. Como mínimo se aconseja tomar muestras biológicas de saliva y de orina de cada uno de los participantes en el estudio, ya que son las muestras biológicas menos invasivas. En ellas se pueden determinar un número importante de biomarcadores e incluso a partir de la saliva se puede aislar el ADN de las células bucales que se recogen en la misma. Se aconseja también no tomar sólo una muestra biológica en el mismo tubo, sino fraccionarla en distintas alícuotas para evitar los procesos de congelación y descongelación que pueden afectar varios de los biomarcadores que se pretende determinar. De esta manera, pensar en un mínimo de dos o tres alícuotas para almacenar para cada participante, sería una buena estrategia. Estas muestras tendrían que congelarse a muy baja temperatura (ultracongelación a -80°C como conservación más estandarizada) para garantizar una mejor conservación y no degradación de los biomarcadores. Si no fuera posible conseguir muestras biológicas de todos los participantes, al menos sería aconsejable plantear la obtención de las mismas en una submuestra representativa de la población. Si se dispone de más capacidad de obtención y almacenamiento de muestras, es muy aconsejable realizar extracciones de sangre venosa periférica en ayunas y a partir de las mismas, procesarlas mediante centrifugación, etc y obtener alícuotas de suero, plasma y buffy-coat. Estas muestras van a resultar muy valiosas posteriormente para determinar en ellas distintos biomarcadores. Aunque la congelación a -80°C puede ser suficiente, resultaría ideal congelar las muestras a menor temperatura y mantenerlas en nitrógeno líquido¹⁶. Sin embargo este tipo de conservación no está ampliamente disponible y queda limitado para unos pocos estudios). Si en la inves-

tigación se estima relevante la medida de biomarcadores en eritrocitos o en otros tipos de células de la sangre como leucocitos, estas muestras se tendrían que aislar a partir de la sangre extraída mediante los protocolos estandarizados y congelarlas ya separadas de los demás componentes. Del mismo modo si se opta por realizar determinaciones con ADN o ARN de los participantes, estas muestras también se tienen que obtener de manera estandarizada utilizando los protocolos pertinentes. La temporalidad en la recolección de muestras vendrá determinada según el estudio sea transversal o longitudinal. En los estudios transversales solamente será necesario recogerlas una vez, mientras que en los estudios longitudinales, habrá que tomar muestras en el momento basal y en distintos períodos de seguimiento de acuerdo con los objetivos del estudio. El número de alícuotas obtenidas puede ser muy grande en los estudios que incluyen miles de participantes por lo que habrá que tener prevista una buena infraestructura de etiquetado y de trazabilidad de las muestras en los congeladores de almacenamiento. También es aconsejable que se piense en constituir algún banco de muestras biológicas y seguir los protocolos de los mismos¹⁷. Al elegir los protocolos para la obtención y conservación de muestras hay que tener en cuenta algunas limitaciones para la posterior validez de las determinaciones y comparabilidad de los resultados. Actualmente existen distintos anticoagulantes que se utilizan en los tubos de recolección de las muestras de sangre. Determinaciones posteriores pueden variar según se utilice citrato, heparina o EDTA. El tiempo de procesado de la muestra también puede ser muy relevante, así como el tiempo de conservación. Para los estudios ómicos, una de las muestras limitantes es la obtención del RNA, ya que requiere aislamiento previo in fresco o recoger las muestras de sangre, así como almacenarlas en presencia de un conservante del RNA. Aunque la obtención de ADN para genotipado no plantea problemas y generalmente cumple los requisitos de calidad independientemente del anticoagulante utilizado, tiempo de almacenamiento, etc, la obtención de ADN para estudios epigenéticos como metilación puede estar sujeta a más problemas de validez y reproducibilidad en función del método utilizado, la época del año en que se recolectó la muestra, etc. Para un mayor detalle de los factores que afectan a la conservación y procesado de las muestras biológicas en los estudios ómicos, se recomienda la lectura del trabajo de Helbes y cols.¹⁸ en el que dan unas directrices generales in the context of the European project EnviroGenomarkers (<http://www.envirogenomarkers.net>). In this Project, blood-derived biobank samples are being analyzed on multiple omic platforms with the aim of discovering new biomarkers of exposure and disease risk.

Uso de biomarcadores nutricionales en combinación con datos de cuestionarios

Otro método que se puede utilizar es el uso conjunto de biomarcadores de ingesta con los datos procedentes de cuestionarios donde se mide el consumo de auto-

reportado. Esta combinación permite aumentar la validez de las mediciones, así como aumentar el poder estadístico de las asociaciones entre la dieta y enfermedades relacionadas. Este enfoque ha sido utilizado por varios autores, entre ellos Freedman y cols.¹⁹ en el estudio CAREDS (Estudio de la enfermedad ocular relacionada con la edad). Se trata de un estudio anidado del Health Initiative (WHI). El WHI es un estudio de cohorte prospectivo de 93.676 mujeres posmenopáusicas, reclutados en 40 lugares de los Estados Unidos. En concreto, los investigadores utilizaron este estudio para ilustrar que la asociación inversa entre la luteína de la dieta más zeaxantina y las cataratas nucleares. Mejora en el uso de biomarcadores de forma global para estos carotenoides al considerar también la ingesta con los datos de los cuestionarios de auto-reportados. La ingesta dietética se evaluó mediante el uso de cuestionarios semicuantitativos de consumo de alimentos. Las muestras de suero se recogieron después de 10 o más horas de ayuno en los exámenes iniciales del WHI y se analizaron para la luteína y la zeaxantina (suma de los isómeros trans). Los autores investigaron 3 maneras de analizar la luteína más la zeaxantina dietéticas, así como sus niveles séricos: Sólo dieta, sólo biomarcadores o combinando las tres formas. Para el tercer método, que utiliza un marcador combinado donde se utilizaron los datos de ambas determinaciones, se utilizaron "scores" ponderadas. Para más detalles sobre ese aspecto, se puede consultar la referencia original¹⁹. La conclusión a la que llegaron los autores es que mediante la combinación de un biomarcador de la ingesta de la dieta con la ingesta dietética reportada puede aumentar el poder estadístico para detectar una asociación dieta-enfermedad. Por lo tanto, es aconsejable utilizar este método combinado siempre que sea posible. Sin embargo, también reconocen limitaciones a esa combinación cuando el biomarcador no es válido o cuando el error derivado de la ingesta o de la medición de nutrientes a través de los cuestionarios también tiene grandes errores.

Limitaciones y consideraciones en el uso de los biomarcadores

Aunque los biomarcadores pueden proporcionar una medida más objetiva de la ingesta de alimentos, para muchos de ellos existen distintos factores inter-individuales que pueden sesgar dichos marcadores y dar valores no verdaderos²⁰. Entre estos factores, además del sexo, edad, consumo de tabaco, alcohol, fármacos, actividad física y otros factores del estilo de vida, se encontrarían otros factores de la dieta (interacciones nutriente-nutriente), tipo de muestra biológica (sangre, plasma, suero, orina, etc) y condiciones relacionadas con la obtención y de almacenamiento de las muestras (transporte, tiempo de almacenamiento, época de la recolección de la muestra incluyendo día de la semana, estación del año, etc) así como las particularidades de la metodología de laboratorio para su determinación (pre-

visión, validez, límites de detección, técnica analítica, variaciones inter-laboratorios; etc.)²⁰. Además de todos ellos, cada día, a medida que avanzan las investigaciones sobre la variabilidad inter-individual, cobran más importancia los marcadores genéticos. En particular los polimorfismos genéticos en genes relevantes relacionados con cada uno de los biomarcadores analizados. Existen muchos tipos de polimorfismos genéticos. Los más estudiados son los que consisten en un solo cambio de base en un lugar del genoma y se denominan single nucleotide polymorphisms (SNPs). Existen millones de SNPs en el genoma humano y la tecnología para su determinación ha evolucionado espectacularmente pasando de técnicas rudimentarias que eran lentas y caras a otras tecnologías muy automatizadas y de menor coste. Con ello en la actualidad resulta muy fácil y rápido incorporar las determinaciones genéticas en los estudios de epidemiología nutricional⁶. Esta variación genética no solo puede afectar a las preferencias en la elección y consumo de alimentos, sino que también va a tener un papel relevante en el metabolismo del nutriente, en la biodisponibilidad, absorción, transporte, y de los nutrientes o componentes de los alimentos. Existen muchos ejemplos de la influencia de los polimorfismos genéticos en las concentraciones de distintos biomarcadores. Entre ellos podemos señalar la influencia del polimorfismo genético rs1279683 (A > G) en el gen SLC23A2 y concentraciones plasmáticas de vitamina C²¹. Las concentraciones plasmáticas de vitamina C están determinadas por la ingesta dietética, así como por factores genéticos. El ácido L-ascórbico obtenido a partir de la dieta se transporta a través de la membrana celular por cotransportadores de ácido L-ascórbico/sodio (SVCTs). Dos isoformas, SVCT1 (codificada por el gen SLC23A1) y SVCT2 (codificada por el gen SLC23A2), desempeñan papeles centrales en la absorción y la acumulación de la vitamina C en muchos tejidos. En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo para investigar la influencia de las concentraciones plasmáticas de vitamina C en el riesgo de glaucoma²¹, encontramos que el SNP rs1279683-SLC23A2, estaba fuertemente asociado a las concentraciones en plasma de vitamina C, tanto en los casos y controles (fig. 2). De acuerdo con estos resultados, los homocigotos portadores del alelo G tienen concentraciones plasmáticas de vitamina C significativamente más bajas que los otros genotipos a pesar de tener ingestas similares.

Otro ejemplo relevante de la influencia de los polimorfismos genéticos en concentraciones de un biomarcador, independientemente de la ingestión, son los polimorfismos en genes relevantes en el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados. La delta-6 desaturasa (D6D) y la delta-5 desaturasa (D5D) son enzimas unidas a la membrana que catalizan la formación de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los genes que codifican desaturasas (FADS1 para D5D y FADS2 para D6D) forman un grupo de genes en el cromosoma 11 junto con un tercer gen de desaturasa, FADS3, con función menos conocida. Varios estudios han replicado consistentemente las asociaciones entre los polimorfismos

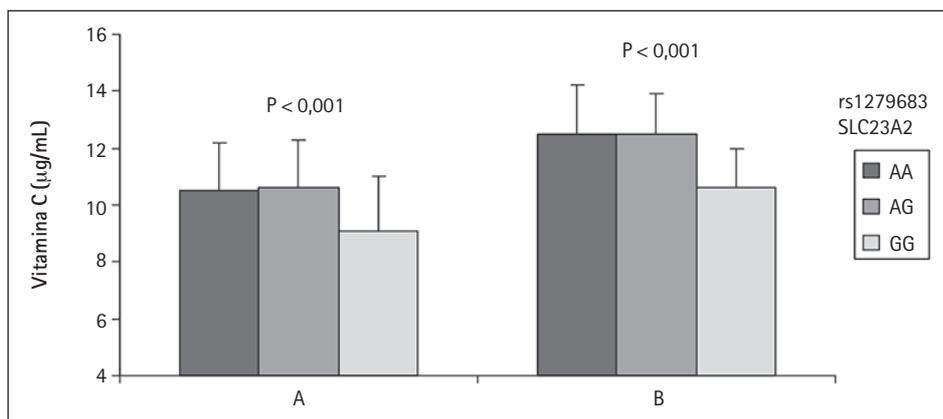


Fig. 2.—Concentraciones plasmáticas de vitamina C (µg/mL) en casos de glaucoma de ángulo abierto ($n = 150$) (A) y controles ($n = 150$) (B) de acuerdo con el polimorfismo rs1279683 (A > G) en el gen SLC23A2 (adaptada de la referencia 21).

en los genes FADS1 y FADS2 y mediciones de la concentración de ácidos grasos poliinsaturados en diferentes muestras biológicas²². Esta influencia genética es relevante y es importante tenerla en cuenta en los estudios de epidemiología nutricional y, como directriz, se recomienda incorporar gradualmente las determinaciones de los polimorfismos genéticos más relevantes en estudios epidemiológicos nutricionales como control de las diferencias interindividuales más importantes.

Nuevos biomarcadores basados en ómicas

Ya sea como control de las diferencias interindividuales en la medición de biomarcadores clásicos o adecuadamente consideradas como biomarcadores, las tecnologías ómicas han llevado al estudio y validación de

nuevos biomarcadores en nutrición y salud²³. Entre ellos se encuentran los que se muestran en la tabla II:

– *Biomarcadores genéticos*: Estos biomarcadores se basan en la determinación de polimorfismos genéticos (SNPs) principalmente y pueden ser de cualquier tipo, ya sean de ingesta o de efecto (metabolismo) o como riesgo de enfermedad. Ellos se pueden determinar en el ADN de cualquier muestra biológica que contiene células con núcleo (ventaja). Su determinación no varía con el tiempo y las muestras son fácilmente conservadas y transportadas (sangre, orina, pelo, tejidos diferentes, etc. todo puede ser usado). Además, permiten una determinación rápida a bajo coste económico. Por otra parte, en los últimos años los chip de genotipado de alta densidad han permitido determinar simultáneamente miles de polimorfismos genéticos. Esta capacidad ha llevado a los llamados estu-

Tabla II
Clasificación de los nuevos biomarcadores basados en ómicas

<i>Biomarcadores genéticos:</i>	Basados en los cambios en el ADN, principalmente los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Ejemplos: Los polimorfismos en el gen de la lactasa (LCT) como representantes del consumo de leche en los análisis de randomización mendeliana.
<i>Biomarcadores epigenéticos:</i>	Biomarcadores basados en de los principales reguladores epigenéticos: metilación del ADN, modificación de histonas y ARNs no codificantes. Ejemplos: hipermetilación del ADN o hipometilación del genes específicos en función de la ingesta de alimentos; Los niveles de microRNAs circulantes asociados con varias enfermedades relacionadas con la nutrición.
<i>Biomarcadores transcriptómicos:</i>	Biomarcadores basados en la expresión de ARN (transcriptoma completo o diferencias en la expresión de genes específicos seleccionados). Ejemplo: Diferencias del perfil de expresión génica en sujetos que siguen una dieta mediterránea, en comparación con los sujetos control.
<i>Biomarcadores proteómicos:</i>	Biomarcadores basados en el estudio del proteoma. Ejemplo: Análisis del proteoma de los participantes alimentados con dietas control con el proteoma de participantes alimentados con dietas bajas en folato.
<i>Biomarcadores lipídómicos:</i>	Biomarcadores basados en el estudio del lipidoma. Ejemplo: Perfil lipídómico de plasma humano en sujetos diabéticos tipo 2 con una dieta alta en grasas en comparación con una dieta alta en carbohidratos.
<i>Biomarcadores metabolómicos:</i>	Biomarcadores basados en el estudio del metaboloma. Ejemplo: El perfil urinario 1H NMR en sujetos que siguen una dieta mediterránea tradicional en comparación con el perfil urinario de sujetos en una dieta baja en grasas.

dios de asociación de genoma completo (GWAS) y al descubrimiento de nuevos genes y SNPs asociados a los diferentes niveles de los otros biomarcadores, la ingesta dietética o de fenotipos de la enfermedad. Recientemente una serie de meta-análisis que incluyen miles de personas han publicado la identificación de nuevas variantes genéticas asociadas con la ingesta de alimentos y nutrientes^{24,25} o con concentraciones de biomarcadores, como filloquina circulante²⁶ circulante. También recientemente, los estudios genómicos en lípidos han incorporado las tecnologías de secuenciación de nueva generación para la identificación de nuevas variantes genéticas asociadas con diferentes biomarcadores, identificando principalmente nuevas variantes de baja prevalencia²⁷.

Por otra parte, la randomización mendeliana implica utilizar biomarcadores genéticos como variables representativas del consumo. Las variantes genéticas asociadas con el factor de riesgo de interés se consideran de una manera similar a la asignación aleatoria en un ensayo clínico. El significado moderno de la aleatorización mendeliana se basa en la segunda ley de Mendel, la ley de la distribución independiente, lo que supone que la herencia de un rasgo es independiente de la herencia de otro rasgo²⁸. En términos de biomarcadores nutricionales, SNPs que tienen una función biológica bien caracterizada puede ser utilizado para estudiar el efecto de una exposición ambiental sospechada sobre el riesgo de la enfermedad. Por lo tanto, hay varios estudios que utilizan variantes genéticas como variables instrumentales para las exposiciones ambientales. Un ejemplo bien conocido es el polimorfismo de la lactosa. El polimorfismo -13910C > T (rs4988235) en el gen de la lactasa (LCT) está fuertemente asociado con la persistencia de la lactasa (LP) en Europeans²⁹. Los individuos lactasa no persistentes (LNP) tienen dificultades para metabolizar la lactosa y, después de consumir productos lácteos, a menudo tienen síntomas de dolor abdominal y diarrea. Como resultado, los individuos con LNP tienden a consumir menos productos lácteos²⁹ que contiene lactosa y, por lo tanto, la variante asociada con LNP (genotipo CC) puede ser una variable instrumental para una baja exposición a la leche. Del mismo modo, otro gen informativo es la ALDH2 (aldehído deshidrogenasa). El acetaldehído es el primer metabolito de del etanol. La ALDH2 es la enzima principal responsable de la eliminación de acetaldehído. Hay un polimorfismo funcional (Glu487Lys), resultando en una enzima inactiva. El alelo 487Lys se asocia con disminución de la capacidad para metabolizar el acetaldehído, y por lo tanto contribuye a altas concentraciones de acetaldehído después de beber alcohol (que resulta en enrojecimiento de la cara, náuseas y dolor de cabeza en respuesta al consumo de alcohol). Debido a estas reacciones adversas, los sujetos homocigotos para el alelo 487Lys beben notablemente menos alcohol que los sujetos homocigotos para el otro alelo. Por lo tanto, el polimorfismo ALDH2 puede definir grupos con diferentes cantidades de ingesta de alcohol y estas variantes usadas como un sustituto de exposición al alcohol³⁰. Sin embargo, aunque el enfoque de la alea-

torización mendeliana muestra una promesa considerable en la integración de los marcadores genéticos en la investigación de epidemiología nutricional, su aplicación a otras variantes genéticas tiene varias limitaciones potenciales cuando los supuestos de aleatorización mendeliana son violados²⁸.

Además de estas consideraciones, los biomarcadores genéticos son cruciales para estudiar distintos fenotipos intermedios (lípidos plasmáticos, glucosa en ayunas, los marcadores oxidativos, los marcadores de inflamación, etc.) y fenotipos finales de enfermedad (enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes tipo 2, obesidad, etc.). En epidemiología nutricional, al establecer la asociación entre la dieta y las enfermedades, los polimorfismos genéticos más relevantes relacionados con los fenotipos de interés deben ser determinados. Actualmente hay cientos de SNPs consistentemente asociados con diferentes fenotipos de enfermedades relacionadas con la nutrición que deben ser considerados en los estudios se centran en estos fenotipos. A modo de ejemplo, la tabla III³¹⁻³⁷ muestra los principales genes y variantes genéticas consistentemente asociados con fenotipos intermedios y enfermedades en la epidemiología cardiovascular. La integración de la genética en la nutrición ha impulsado los avances en las interacciones gen-dieta y la genómica nutricional³⁸. En el estudio PREDIMED, hemos encontrado algunas interesantes interacciones gen-dieta en la determinación de los fenotipos intermedios y enfermedad cardiovascular que implican polimorfismos comunes en el gen TCF7L2³⁹ y el gen MLXIPL⁴⁰ y la intervención con dieta mediterránea.

- *Biomarcadores epigenéticos*: El término epigenética/epigenómica se utiliza para describir una variedad de modificaciones en el genoma que no implican cambios en la secuencia de ADN y pueden resultar en la alteración de la expresión génica que permiten la expresión diferencial de información genética⁴⁰. Constituye el eslabón perdido entre la genética, el medio ambiente y las enfermedades. Una de las principales ventajas de los biomarcadores epigenéticos, a diferencia de las variaciones en el genoma, es que las marcas epigenéticas son reversibles y pueden permitir una rápida adaptación al medio ambiente. Hay 3 categorías principales de las marcas epigenéticas: metilación del ADN, modificación de histonas y regulación por ARN no codificante. La metilación del ADN es una modificación epigenética bien caracterizado del genoma. La mayoría de la metilación del ADN en los seres humanos se produce en los dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpG) y consiste en la adición de un grupo metilo en posición 5 de los residuos de citosina de la isla CpG, proporcionando marcas en el genoma por las cuales los genes se activan transcripcionalmente o se silencian⁴¹. La hipermetilación de islas o hipometilación pertinentes se han asociado con varios fenotipos de enfermedad⁴². Existen estudios preliminares que muestran que la dieta puede afectar la metilación de ciertos sitios del ADN y que estos cambios

Tabla III
Principales genes y variantes genéticas asociadas con fenotipos intermedios y finales de enfermedad cardiovascular

Referencias	Gen	Variante genética	Fenotipo intermedio	Enfermedad cardiovascular
Khan et al, 2013 ³¹	APOE	Polimorfismo común APOE (E2,E3 y E4) (rs4420638 and rs7412)	Superior c-LDL y colesterol total en los portadores del alelo APOE-E4 en comparación con los sujetos E3/E3	El alelo APOE-E4 asociado con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (ictus e infarto de miocardio)
Ridker et al, 2009 ³²	CETP	Varios SNPs en parcial LD: rs708272, rs7202364 y rs4329913	Mayores concentraciones de HDL-C y APOA1 en portadores del alelo menor	Menor riesgo de infarto de miocardio en los portadores del alelo menor
Wang et al, 2011 ³³	LPL	Varios SNPs en parcial LD: rs328 y rs230	Mayores concentraciones de HDL-C y triglicéridos más bajos en los portadores del alelo menor	Baja el riesgo de ictus en los portadores del alelo menor
Zang et al, 2011 ³⁴	APOA5	SNPs: -1131T > C (rs662799) y S19W (rs3135506)	Elevadas concentraciones de triglicéridos en portadores de los alelos menores	Mayor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores de los alelos menores
Teslovich et al, 2010 ³⁵	LDL-R	SNP rs6511720	Menor c-LDL y colesterol total en los portadores del alelo menor	Menor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores del alelo menor
Teslovich et al, 2010 ³⁵	CILP2	SNP rs10401969	Menor c-LDL y colesterol total en los portadores del alelo menor	Menor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores del alelo menor
Teslovich et al, 2010 ³⁵	SORT1	SNP rs629301	Menor c-LDL y colesterol total en los portadores del alelo menor	Menor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores del alelo menor
Teslovich et al, 2010 ³⁵	KLF14	SNP rs4731702	Mayores concentraciones de c-HDL en los portadores del alelo menor	Menor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores del alelo menor
Kathiresan and Srivastava, 2012 ³⁶	TRIB1	Varios SNPs en parcial LD: rs2954029, rs2954022 y rs2980885	El alelo menor se asocia a reducir los triglicéridos, reducir el colesterol LDL, y el aumento de c-HDL	Menor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores del alelo menor
Kathiresan and Srivastava, 2012 ³⁶	PCSK9	Variante común con cambio de aminoácido	La variante alélica se asocia con menores concentraciones de c-LDL	Menor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores del alelo menor
Do et al, 2013 ³⁷	APOA1	SNP rs10790162	La variante alélica se asocia con mayores concentraciones de c-LDL	Mayor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores de la variante alélica
Do et al, 2013 ³⁷	APOB	SNP rs1367117	La variante alélica se asocia con mayores concentraciones de triglicéridos	Mayor riesgo de enfermedad coronaria en los portadores de la variante alélica

LD: Desequilibrio de ligamiento.

en la metilación son dinámicos^{43,44}. Sin embargo, se necesitan muchos más estudios para establecer las metilaciones en distintos genes como nuevos biomarcadores de ingesta de enfermedad.

En cuanto a la regulación epigenética a través de los ARN no codificantes, aunque existen distintas clases de estos ARNs en función de su tamaño (largos, pequeños, etc.), los microRNA (miRNA) son actualmente los más importantes⁴⁵. Los miRNAs son pequeñas cadenas de ARN de una sola hebra (18-25 nucleótidos) no codificantes pero funcionales, que regulan la expresión de genes actuando sobre su ARNm diana de manera post-transcripcional. Estos miRNAs han surgido como reguladores epigenéticos cruciales de muchos procesos relacionados con la nutrición. La evidencia reciente pone de relieve cómo la dieta puede influir en varios fenotipos de la enfermedad a través de la modulación de la expresión por miRNAs⁴⁵ expression. Además, los miRNAs circulantes están emergiendo como biomarcadores de varias enfermedades^{46,47}. Por otra parte, hay algunos estudios que indican que algunos miRNAs exógenos podrían ser utilizados como biomarcadores de la ingesta de alimentos (detección de miRNAs de arroz consumidos en el plasma humano), pero todavía hay mucha controversia sobre ello⁴⁵. En general, en cuanto a las promesas de los diferentes tipos de biomarcadores de microARN, podemos afirmar que todavía es necesaria una optimización muy cuidadosa y una estandarización rigurosa de métodos analíticos y preanalíticos para garantizar que los resultados obtenidos sean validados y fiables⁴⁸.

– *Biomarcadores transcriptómicos*: Nos proporcionan conocimiento del transcriptoma, ya sea de forma individual para cada gen específico estudiado o para el análisis de la expresión de varios genes simultáneamente en diferentes escalas. De esta manera podemos investigar cómo la exposición a diferentes factores de la dieta afecta a la expresión de todos los genes (transcriptoma completo) o de los genes específicos. Estos estudios de expresión se pueden realizar ya sea mediante el análisis de la intervención con dietas completas (por ejemplo, la dieta mediterránea como en contra de una dieta baja en grasas)⁴⁹ o mediante la administración de alimentos específicos (por ejemplo, aceite de oliva) o componentes específicos de la dieta (vitaminas, etc.). Aunque inicialmente se llevaron a cabo estos estudios transcriptómicos independientemente de otras ómicas, en los últimos años, la tendencia general es la integración con otras ómicas: genómica, metabolómica, lipidómica y epigenómica⁵⁰. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que una de las limitaciones de la transcriptómica o de la epigenómica es que el transcriptoma y el epigenoma no son los mismos para todas las células del organismo, como es cierto para la genómica, ya que el nivel de expresión varía en función de los tejidos analizados, añadiendo un poco más de dificultad para la investigación de estos biomarcadores.

– *Biomarcadores proteómicos, lipidómicos y metabolómicos*. La proteómica, la lipidómica y la metabolómica, a

través del estudio exhaustivo de las proteínas, los lípidos y metabolitos, respectivamente también están comenzando a aplicarse en el campo de los biomarcadores nutricionales, proporcionando resultados prometedores. La metabolómica puede ser definida como la detección de metabolitos de tamaño de molécula pequeña presentes en muestras de origen biológico. La caracterización de todos los metabolitos puede proporcionar una imagen del metabolismo y una huella molecular⁵¹. Una caracterización de este tipo es un biomarcador de un estado biológico del sujeto. Además, la metabolómica se pueden utilizar para examinar el resultado de estrategias de intervención nutricional mediante la observación y la comparación de los perfiles metabolómicos. Esta ciencia está todavía en sus incicios, pero promete revolucionar los biomarcadores nutricionales. Hasta hace poco, el análisis de los alimentos se limitó a estimar su valor nutricional basado en el contenido: hidratos de carbono, grasas, proteínas, agua, vitaminas y minerales, además de varios componentes no nutritivos. No obstante, la metabolómica está ayudando a explorar los miles de componentes adicionales. Una gran proporción del metaboloma de alimentos consiste en fitoquímicos. Por otra parte, la metabolómica es capaz de encontrar una gran lista de productos químicos ambientales como plaguicidas y diferentes toxinas en alimentos y bebidas. La detección de estos compuestos en los estudios nutricionales puede ayudar a tener un análisis más integral de la influencia de la alimentación en la salud y la enfermedad. Hay varios estudios que muestran resultados prometedores en el campo nutricional. Así, Guertin y cols.⁵² llevaron a cabo una investigación de metabolómica en una submuestra bastante grande (n = 502) participantes en el estudio Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. Su objetivo era la identificación de los metabolitos que son biomarcadores de la ingesta dietética habitual y también evaluar la reproducibilidad y tamaño de las muestras necesarias para determinar el potencial de la metabolómica en epidemiología nutricional. Muestras de suero basal se analizaron mediante cromatografía en fase líquida de ultra alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas y espectrometría de gases. Se detectaron 412 metabolitos conocidos. Los vegetales verdes, cítricos, carnes rojas, mariscos, pescado, cacahuets, arroz, mantequilla, café, cerveza, licores, etanol total y multivitaminas fueron cada uno de ellos correlacionados con al menos un metabolito y en total, se identificaron 39 biomarcadores dietéticos (ampliar información en referencia 52). Encontraron algunas asociaciones fuertes que replican hallazgos anteriores, como la correlación entre el consumo de cítricos con estachidrina; el consumo de café con trigonelina-N-metilnicotinato y quinato) y la ingesta de alcohol con glucurónido de etilo. En el estudio PREDIMED también hemos utilizado la metabolómica para detectar nuevos biomarcadores de ingesta. En uno de los estudios de metabolómica⁵³, se evaluó el efecto de la intervención con dieta mediterránea (suplementada bien con aceite de oliva virgen extra o frutos secos) en una submuestra

de participantes no diabéticos. Los perfiles urinarios 1H NMR fueron examinados al inicio del estudio y después de 1 y 3 años de seguimiento. En comparación con el grupo control (dieta baja en grasas), los resultados más destacados para los grupos de dieta mediterránea fue la identificación de un perfil de característica relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono (3-hidroxi-butarato, citrato, y cis-acetonato), creatina, creatinina, aminoácidos (prolina, N-acetilglutamina, glicina, aminoácidos de cadena ramificada, y los metabolitos derivados), lípidos (ácidos oleico y subérico), y cometabolitos microbianos (fenilacetilglutamina y p-cresol). Estos resultados mostraron que la aplicación de la metabolómica basada en RMN hacen posible la clasificación de los individuos con respecto a su patrón de dieta y la respuesta a las intervenciones dietéticas específicas.

En general, la proteómica, la lipidómica y la metabolómica y están siendo consideradas como una gran innovación en el descubrimiento de nuevos biomarcadores de ingesta, efecto y de patología. Muchos avances se están realizando en este campo y hay hallazgos importantes. Aunque los resultados son, en general, todavía preliminares y las técnicas siguen siendo caras para grandes estudios epidemiológicos, todas ellas son consideradas como importantes tecnologías del futuro para la detección de la ingesta de alimentos específicos y de otros biomarcadores relevantes del estado de salud.

Conclusiones

Dados los grandes avances que metodológicamente se están realizando en el ámbito de los biomarcadores en los estudios nutricionales con la incorporación de las nuevas ómicas, se aconseja obtener y almacenar muestras biológicas en los estudios de epidemiología nutricional para poder realizar las determinaciones de los principales biomarcadores relacionados con los objetivos del estudio. Actualmente todavía existen limitaciones en la validez y fiabilidad de muchos de los marcadores, pero en un futuro se espera que minimicen muchas de estas limitaciones y podamos disponer de biomarcadores validados y de bajo coste.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado en parte por el Ministerio de Sanidad (Instituto de Salud Carlos III) y el Ministerio de Economía e Innovación, España y el Fondo Europeo de Desarrollo regional (Proyectos: CIBER 06/03, CNIC-06, PI11/02505, AGL2010-22319-C03-03) y Generalitat Valenciana (ACOMP/2013/165 and ACOMP/2013/159).

Conflictos de intereses

Los autores no tienen conflictos de interés

Referencias

1. Hedrick VE, Dietrich AM, Estabrooks PA, Savla J, Serrano E, Davy BM. Dietary biomarkers: advances, limitations and future directions. *Nutr J* 2012; 11: 109.
2. Biomarkers definitions working group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
3. de Vries J, Antoine JM, Burzykowski T, Chiodini A, Gibney M, Kuhnle G, Méheust A, Pijls L, Rowland I. Markers for nutrition studies: review of criteria for the evaluation of markers. *Eur J Nutr* 2013; 52: 1685-99.
4. Potischman N, Freudenheim JL. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: an overview. *J Nutr* 2013; 133: S3873-S3874.
5. Potischman N: Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J Nutr* 2003; 133: 875S-880S.
6. Jenab M, Slimani N, Bictash M, Ferrari P, Bingham SA. Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons. *Hum Genet* 2009; 125: 507-25.
7. Bingham SA. Urine nitrogen as a biomarker for the validation of dietary protein intake. *J Nutr* 2003; 133: 921S-924S.
8. Day N, McKeown N, Wong M, Welch A, Bingham S. Epidemiological assessment of diet: a comparison of a 7-day diary with a food frequency questionnaire using urinary markers of nitrogen, potassium and sodium. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 309-17.
9. Kipnis V, Subar AF, Midthune D, Freedman LS, Ballard-Barbash R, Troiano RP, et al. Structure of dietary measurement error: results of the OPEN biomarker study. *Am J Epidemiol* 2003; 158 (1): 14-21.
10. Prentice RL, Huang Y, Kuller LH, Tinker LF, Horn LV, Stefanick ML, Sarto G et al. Biomarker-calibrated energy and protein consumption and cardiovascular disease risk among postmenopausal women. *Epidemiology* 2011; 22: 170-9.
11. Prentice RL, Mossavar-Rahmani Y, Huang Y, Van Horn L, Beresford SA, Caan B et al. Evaluation and comparison of food records, recalls, and frequencies for energy and protein assessment by using recovery biomarkers. *Am J Epidemiol* 2011; 174 (5): 591-603.
12. Bingham S, Luben R, Welch A, Low YL, Khaw KT, Wareham N et al. Associations between dietary methods and biomarkers, and between fruits and vegetables and risk of ischaemic heart disease, in the EPIC Norfolk Cohort Study. *Int J Epidemiol* 2008; 37: 978-87.
13. Grace PB, Taylor JI, Low YL, Luben RN, Mulligan AA, Botting NP, et al. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective investigation of cancer and nutrition-norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 698-708.
14. Tasevska N, Runswick SA, McTaggart A, Bingham SA. Urinary sucrose and fructose as biomarkers for sugar consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1287-94.
15. Tasevska N, Midthune D, Tinker LF, Potischman N, Lampe JW, Neuhouser ML, Beasley JM, et al. Use of a Urinary Sugars Biomarker to Assess Measurement Error in Self-Reported Sugars Intake in the Nutrition and Physical Activity Assessment Study (NPAAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23: 2874-83.
16. Mercuri A, Turchi S, Borghini A, Chiesa MR, Lazzarini G, Musacchio L, et al. Nitrogen biobank for cardiovascular research. *Curr Cardiol Rev* 2013; 9: 253-9.
17. Peakman TC, Elliott P. The UK Biobank sample handling and storage validation studies. *Int J Epidemiol* 2008; 37: i2-6.
18. Hebel DG, Georgiadis P, Keun HC, Athersuch TJ, Vineis P, Vermeulen R et al. Performance in omics analyses of blood samples in long-term storage: opportunities for the exploitation of existing biobanks in environmental health research. *Environ Health Perspect* 2013; 121: 480-7.
19. Freedman LS, Tasevska N, Kipnis V, Schatzkin A, Mares J, Tinker L, Potischman N. Gains in statistical power from using a dietary biomarker in combination with self-reported intake to strengthen the analysis of a diet-disease association: an example from CAREDS. *Am J Epidemiol* 2010; 172: 836-42.
20. Rubio-Aliaga I, Kochhar S, Silva-Zolezzi I. Biomarkers of nutrient bioactivity and efficacy: a route toward personalized nutrition. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46: 545-54.

21. Zanon-Moreno V, Ciancotti-Olivares L, Asencio J, Sanz P, Ortega-Azorin C, Pinazo-Duran MD, Corella D. Association between a SLC23A2 gene variation, plasma vitamin C levels, and risk of glaucoma in a Mediterranean population. *Mol Vis* 2011; 17: 2997-3004.
22. Corella D, Ordovas JM. Interactions between dietary n-3 fatty acids and genetic variants and risk of disease. *Br J Nutr* 2012; 107: S271-83.
23. Ohlhorst SD, Russell R, Bier D, Klurfeld DM, Li Z, Mein JR et al. Nutrition research to affect food and a healthy life span. *Am J Clin Nutr* 2013; 98: 620-5.
24. Tanaka T, Ngwa JS, van Rooij FJ, Zillikens MC, Wojczynski MK, Frazier-Wood AC et al. Genome-wide meta-analysis of observational studies shows common genetic variants associated with macronutrient intake. *Am J Clin Nutr* 2013; 97: 1395-402.
25. The Coffee and Caffeine Genetics Consortium, Cornelis MC, Byrne EM, Esko T, Nalls MA, Ganna A, et al. Genome-wide meta-analysis identifies six novel loci associated with habitual coffee consumption. *Mol Psychiatry* 2014 (in press).
26. Dashti HS, Shea MK, Smith CE, Tanaka T, Hruby A, Richardson K, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for circulating phyloquinone concentrations. *Am J Clin Nutr* 2014; 100: 1462-9.
27. Wood AR, Tuke MA, Nalls M, Hernandez D, Gibbs JR, Lin H et al. Whole-genome sequencing to understand the genetic architecture of common gene expression and biomarker phenotypes. *Hum Mol Genet* 2014 (in press).
28. VanderWeele TJ, Tchetgen EJ, Cornelis M, Kraft P. Methodological challenges in mendelian randomization. *Epidemiology* 2014; 25: 427-35.
29. Almon R, Patterson E, Nilsson TK, Engfeldt P, Sjöström M. Body fat and dairy product intake in lactase persistent and non-persistent children and adolescents. *Food Nutr Res* 2010; 54.
30. Au Yeung SL, Jiang C, Cheng KK, Liu B, Zhang W, Lam TH et al. Is aldehyde dehydrogenase 2 a credible genetic instrument for alcohol use in Mendelian randomization analysis in Southern Chinese men? *Int J Epidemiol* 2013; 42: 318-28.
31. Khan TA, Shah T, Prieto D, Zhang W, Price J, Fowkes GR et al. Apolipoprotein E genotype, cardiovascular biomarkers and risk of stroke: systematic review and meta-analysis of 14,015 stroke cases and pooled analysis of primary biomarker data from up to 60,883 individuals. *Int J Epidemiol* 2013; 42: 475-92.
32. Ridker PM, Paré G, Parker AN, Zee RY, Miletich JP, Chasman DI. Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 26-33.
33. Wang C, Sun T, Li H, Bai J, Li Y. Lipoprotein lipase Ser447Ter polymorphism associated with the risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Thromb Res* 2011; 128: e107-12.
34. Zhang Z, Peng B, Gong RR, Gao LB, Du J, Fang DZ et al. Apolipoprotein A5 polymorphisms and risk of coronary artery disease: a meta-analysis. *Biosci Trends* 2011; 5: 165-72.
35. Teslovich TM1, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010; 466: 707-13.
36. Kathiresan, S., Srivastava, D. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell* 2012; 148: 1242-57.
37. Do R, Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Gao C, Peloso GM et al. Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat Genet* 2013; 45: 1345-52.
38. Corella D, Ordovas JM. Nutrigenomics in cardiovascular medicine. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 637-51.
39. Corella D, Carrasco P, Sorlí JV, Estruch R, Rico-Sanz J, Martínez-González MÁ et al. Mediterranean diet reduces the adverse effect of the TCF7L2-rs7903146 polymorphism on cardiovascular risk factors and stroke incidence: a randomized controlled trial in a high-cardiovascular-risk population. *Diabetes Care* 2013; 36: 3803-11.
40. Ortega-Azorin C, Sorlí JV, Estruch R, Asencio EM, Coltell O, González JI et al. Amino acid change in the carbohydrate response element binding protein is associated with lower triglycerides and myocardial infarction incidence depending on level of adherence to the Mediterranean diet in the PREDIMED trial. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7: 49-58.
41. Rozek LS, Dolinoy DC, Sartor MA, Omenn GS. Epigenetics: relevance and implications for public health. *Annu Rev Public Health* 2014; 35: 105-22.
42. de Mello VD, Pulkkinen L, Lalli M, Kolehmainen M, Pihlajamäki J et al. DNA methylation in obesity and type 2 diabetes. *Ann Med* 2014; 46: 103-13.
43. Dominguez-Salas P, Moore SE, Baker MS, Bergen AW, Cox SE, Dyer RA et al. Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nat Commun* 2014; 5: 3746.
44. Aslibekyan S, Wiener HW, Havel PJ, Stanhope KL, O'Brien DM, Hopkins SE et al. DNA methylation patterns are associated with n-3 fatty acid intake in Yup'ik people. *J Nutr* 2014; 144: 425-30.
45. Ross SA, Davis CD. The emerging role of microRNAs and nutrition in modulating health and disease. *Annu Rev Nutr* 2014; 34: 305-36.
46. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 2014; 20: 460-9.
47. Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 985408.
48. Witwer KW. Circulating MicroRNA Biomarker Studies: Pitfalls and Potential Solutions. *Clin Chem* 2015; 61: 56-63.
49. Castañer O, Corella D, Covas MI, Sorlí JV, Subirana I, Flores-Mateo G et al. In vivo transcriptomic profile after a Mediterranean diet in high-cardiovascular risk patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2013; 98: 845-53.
50. Wu PY, Chandramohan R, Phan JH, Mahle WT, Gaynor JW, Maher KO, et al. Cardiovascular transcriptomics and epigenomics using next-generation sequencing: challenges, progress, and opportunities. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7: 701-10.
51. Gibbons H, O'Gorman A, Brennan L. Metabolomics as a tool in nutritional research. *Curr Opin Lipidol* 2015; 26: 30-4.
52. Guertin KA, Moore SC, Sampson JN, Huang WY, Xiao Q, Stolzenberg-Solomon RZ, Sinha R, Cross AJ. Metabolomics in nutritional epidemiology: identifying metabolites associated with diet and quantifying their potential to uncover diet-disease relations in populations. *Am J Clin Nutr* 2014; 100: 208-17.
53. Vázquez-Fresno R, Llorach R, Urpi-Sarda M, Lupianez-Barbero A, Estruch R, Corella D et al. Metabolomic Pattern Analysis after Mediterranean Diet Intervention in a Nondiabetic Population: A 1- and 3-Year Follow-up in the PREDIMED Study. *J Proteome Res* 2015; 14: 531-40.