



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Nutriepigènica i obesitat: panoràmica i dissenys experimentals

---

**Andrea Herranz Mochales**

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2014-2015

DNI de l'alumne: 43208955M

Treball tutelat per M. Luisa Bonet Piña  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball: epigènica, obesitat, nutriepigènica, dieta.



## Resum

L'epigenètica és l'estudi dels canvis estables i heretables del fenotip, resultat de canvis als cromosomes sense alteracions a la seqüència del DNA. Els canvis epigenètics es veuen influïts per factors ambientals, entre ells factors nutricionals o relacionats amb la dieta, d'on es deriva el concepte de nutrieipigenètica. L'obesitat és una condició d'etiologia complexa que pot tenir components epigenètics, a més de components genètics i relacionats amb l'estil de vida. Aquest treball té l'objectiu de fer una recopilació bibliogràfica sobre el paper que té la nutrició en l'epigenètica i com aquesta pot estar associada, mitjançant diferents mecanismes, a l'obesitat. Sense voler ser exhaustius, es tracta el tema de l'obesitat i les línies de recerca activa que la relacionen amb l'epigenètica. Finalment, es fa una proposta d'un disseny experimental per estudiar la possible participació de canvis epigenètics en efectes a llarg termini d'un nutrient concret al sistema de control de l'adipositat corporal.

## Continguts

Resum .....	3
1. Objectius.....	4
2. Introducció.....	5
2.1 Conceptes d'epigenètica i nutriepigenètica .....	5
2.2 Mecanismes epigenètics .....	6
2.3 Influència de l'ambient als fenòmens epigenètics .....	8
3. Interacció dels nutrients i factors dietètics amb els mecanismes epigenètics.....	8
3.1 Nutrients que són donadors de grups metil o cofactors de les reaccions de síntesi de S-adenosilmetionina .....	9
3.2 Nutrients que són moduladors al·lostèrics d'enzims epigenètics.....	10
3.3 Mecanismes epigenètics influenciats per l'estat nutricional cel·lular.....	11
4. Nutriepigenètica i obesitat: aspectes generals.....	13
5. Nutriepigenètica i obesitat: línies de recerca activa .....	15
5.1 Nutriepigenètica en la programació perinatal de l'obesitat .....	16
5.2 Canvis epigenètics associats a dietes obesogèniques/estat obès en l'edat adulta .....	18
5.3 Biomarcadors epigenètics per predir la resposta a dietes hipocalòriques i el manteniment del pes corporal .....	20
6. Proposta de projecte experimental.....	22
Conclusions .....	25
Bibliografia .....	25

### 1. Objectius

Els objectius d'aquest treball són 1) aprendre a cercar informació científica a bases de dades i a manejar programes de gestió de referències bibliogràfiques, 2) fer una revisió dels conceptes d'epigenètica i nutriepigenètica, els mecanismes i components dietètics implicats, i les seves implicacions en el context de l'obesitat, 3) elaborar una proposta de recerca en el camp de la nutriepigenètica de l'obesitat.

## 2. Introducció

### 2.1 Conceptes d'epigenètica i nutrieipigenètica

El genoma pot sofrir modificacions funcionalment rellevants que no impliquin canvis a la seqüència del DNA; aquests canvis, particularment quan són relativament estables, són els que es coneixen com canvis epigenètics. L'epigenètica consisteix en alteracions del nivell d'expressió gènica i en l'estructura de la cromatina no causades per canvis a la seqüència del DNA.<sup>1</sup> Els canvis epigenètics, com els que afecten a l'estat de metilació del DNA o la modificació d'histones, canvien l'organització i el grau d'empaquetatge de la cromatina, de manera que afecten els patrons d'expressió gènica i la seva regulació.<sup>2</sup>

Del concepte d'epigenètica hi ha múltiples definicions que han anat canviant al llarg de la història i a conseqüència dels avanços científics. La definició més acceptada, que es va establir al 2008, és la que considera l'epigenètica com l'estudi dels canvis estables i heretables (durant la mitosi o, fins i tot, la meiosi) del fenotip resultat de canvis als cromosomes sense alteracions a la seqüència del DNA.<sup>3,4</sup>

L'epigenòmica és l'estudi de les marques epigenètiques i la seva dinàmica a nivell global, de tot el genoma. Les marques epigenètiques són diferents depenent del tipus cel·lular i depenen també de factors ambientals, incloent la predisposició genètica.<sup>2</sup> Diferents paràmetres ambientals i estímuls de l'entorn afecten l'expressió dels nostres gens mitjançant mecanismes epigenètics que responen, en general, a l'estil de vida. Entre aquests factors hi juguen un paper molt important els relacionats amb l'alimentació i la nutrició.<sup>2</sup>

Si concretem una mica més i tenim en compte la influència de la dieta, els hàbits alimentaris i l'estat nutricional de les cèl·lules, podem parlar d'una part important de l'epigenètica, la nutrieipigenètica. La nutrieipigenètica es centra en l'efecte que tenen els factors dietètics sobre el genoma i explica la relació entre aquests factors específics, els canvis epigenètics que produeixen en el DNA i la cromatina i els efectes sobre la salut humana.<sup>5</sup>

## 2.2 Mecanismes epigenètics

Els canvis epigenètics de la cromatina es duen a terme mitjançant tres mecanismes fonamentals: la metilació del DNA, la modificació d'histones i la regulació per RNAs no codificants.

La **metilació del DNA** és la marca epigenètica de la cromatina més estudiada i millor caracteritzada. El procés de metilació del DNA comporta la transferència covalent d'un grup metil de SAM (S-adenosil metionina) a citosines presents als dinucleòtids CpG (citosina-fosfat-guanina) de les cadenes de DNA. Aquestes seqüències CpG es troben localitzades al llarg del genoma als promotors de molts de gens, habitualment no metilats. A més, estan associades amb seqüències repetitives.<sup>1</sup> La metilació del DNA és catalitzada per DNA metiltransferases (DNMTs) de manteniment, com la DNMT1, que addicionen un grup metil al DNA hemimetilat durant la replicació, i per metiltransferases *de novo*, com la DNMT3a/b, actives després de la replicació del DNA.<sup>6</sup> Ambdós tipus d'enzims utilitzen el SAM com donador de grups metils. Els patrons de metilació del DNA afecten a l'expressió gènica i aquets patrons epigenètics són conservats a través de la replicació del DNA a la progènie cel·lular. Per tant, la metilació del DNA es relaciona amb la regulació del genoma.<sup>1,6</sup> La conseqüència funcional de la metilació del DNA és, habitualment, el silenciament dels gens, és a dir, la inhibició de la transcripció del DNA. Un estat anormal de metilació es relaciona amb el desenvolupament de malalties, fins i tot causalment, en alguns casos.<sup>7</sup>

La **modificació post-traducciona d'histones** representa un mecanisme epigenètic potencial, ja que es pot regular l'expressió gènica alterant l'estat de la cromatina, a través de l'acetilació, la metilació i la fosforilació d'histones, entre d'altres modificacions covalents possibles de les histones. La modificació d'histones sol tenir lloc a les coes N-terminals d'aquestes proteïnes, que són riques en aminoàcids modificables.<sup>1</sup> Aquestes modificacions poden ser molt dinàmiques o ser més estables i persistir a la memòria transcripcional a través de la mitosis o la meiosis.<sup>6</sup> En aquestes modificacions participen nombrosos enzims especialitzats que són els que controlen aquests canvis sobre els aminoàcids de les histones. La metilació d'histones ocupa un paper important en la regulació dels gens i es duta a terme per histona-metiltransferases que

afecten als residus de lisina i arginina; la metilació d'histones es va considerar irreversible durant molt de temps, però més recentment s'ha descrit l'existència de diverses histona-desmetilases.<sup>8</sup>

L'acetilació/desacetilació es dóna a residus de lisina i està catalitzada per enzims de funció oposada, les histona-acetiltransferases (HATs) i les histona-desacetilases (HDACs). La fosforilació de les histones es produeix als residus de serina i treonina i també és reversible.<sup>6,9</sup>

Si ens centrem en el resultat d'aquestes modificacions de les histones podem concloure que la metilació d'histones pot resultar tant en un estat de cromatina activada com de cromatina inactivada, depenent de la histona i el residu aminoacídic particular que sigui metilat. En quant a l'acetilació d'histones, generalment, té com a resultat la conformació oberta de la cromatina, el que facilita la transcripció del DNA; és a dir, l'acetilació promou una estructura més relaxada de la cromatina, permetent el reclutament dels factors de transcripció bàsics i necessaris per a dur a terme la transcripció del DNA. En canvi, la desacetilació d'histones provoca que la cromatina torni més condensada i, per tant, la transcripció gènica és reprimida.<sup>1</sup>

Un altre possible mecanisme epigenètic és l'**acció dels microRNAs (miRNAs) i altres RNAs no codificants** que regulen l'expressió gènica sense alterar la seqüència del DNA. Els miRNAs són molècules de RNA endògenes, de cadena simple i mida petita, d'entre 20-24 nucleòtids, funcionalment molt rellevants. En forma de complexos amb proteïnes, els miRNAs regulen negativament l'expressió dels seus gens diana generalment a un nivell post-transcripcional. Ho fan unint-se, mitjançant complementarietat de bases, a la regió no traduïda 3' (3'UTR) dels seus RNAs missatgers (mRNAs) diana i duent a terme la posterior degradació o repressió de la traducció del mRNA en qüestió. Els miRNAs estan implicats en múltiples processos fisiològics (producció, secreció i acció de la insulina, manteniment de la glucèmia, metabolisme lipídic,...) i patològics, incloent la patogènesi de l'obesitat.<sup>1,10</sup> Però existeixen altres models que mostren que RNAs no codificants funcionen com agents epigenètics via interacció directa amb el DNA, donant com a resultat el silenciament transcripcional estable de diferents gens.

### **2.3 Influència de l'ambient als fenòmens epigenètics**

Els factors ambientals poden produir i produeixen canvis perdurables al nostre genoma, mitjançant els mecanismes epigenètics ja explicats, que tenen influència sobre la salut humana. Gairebé tot el que ens envolta és susceptible de produir una empremta sobre l'expressió dels nostres gens. Entre aquests factors ambientals en podem destacar molts com l'entorn natural en el que vivim, les substàncies químiques a les que estam exposats, l'activitat física, l'estil de vida...però també a factors relacionats amb l'estat psicològic, l'entorn social, l'economia, etc.

A més, també hem de tenir en compte que tots aquests factors ambientals no ens afecten de la mateixa manera a totes les persones ni a tot moment. Sinó que, depenent de la nostra genètica i el període del desenvolupament en el que ens trobem, ens afectaran d'una manera més o menys àmplia i amb més o manco conseqüències per a la nostra salut. Hi ha connexions entre polimorfismes al DNA, respostes a la dieta i marques epigenètiques.<sup>11</sup> Donat que la gestació és el període de major plasticitat epigenètica, que va disminuint a mesura que s'arriba a l'edat adulta, es pot concloure que els efectes epigenètics de l'entorn en aquest període prenatal són fonamentals per a la vida adulta i poden tenir conseqüències en les pròximes generacions.<sup>11</sup>

En aquest treball, ens centrarem en com la dieta pot afectar l'expressió gènica mitjançant canvis epigenètics i com aquests canvis poden afectar a la regulació de gens i processos metabòlics relacionats amb l'estat obès.

### **3. Interacció dels nutrients i factors dietètics amb els mecanismes epigenètics**

La dieta és un dels factors més importants i rellevants en la regulació metabòlica normal i, per tant, per mantenir la salut i evitar malalties, com ara l'obesitat. És a dir, la nutrició pot influenciar les rutes metabòliques i el control de la homeòstasi i, en conseqüència, l'estudi d'aquestes interaccions pot ser útil per a la prevenció de malalties cròniques relacionades amb la dieta com és l'obesitat i les seves complicacions. Molts nutrients són coneguts per la seva capacitat de prevenir i alleujar diferents malalties. És per aquest motiu que



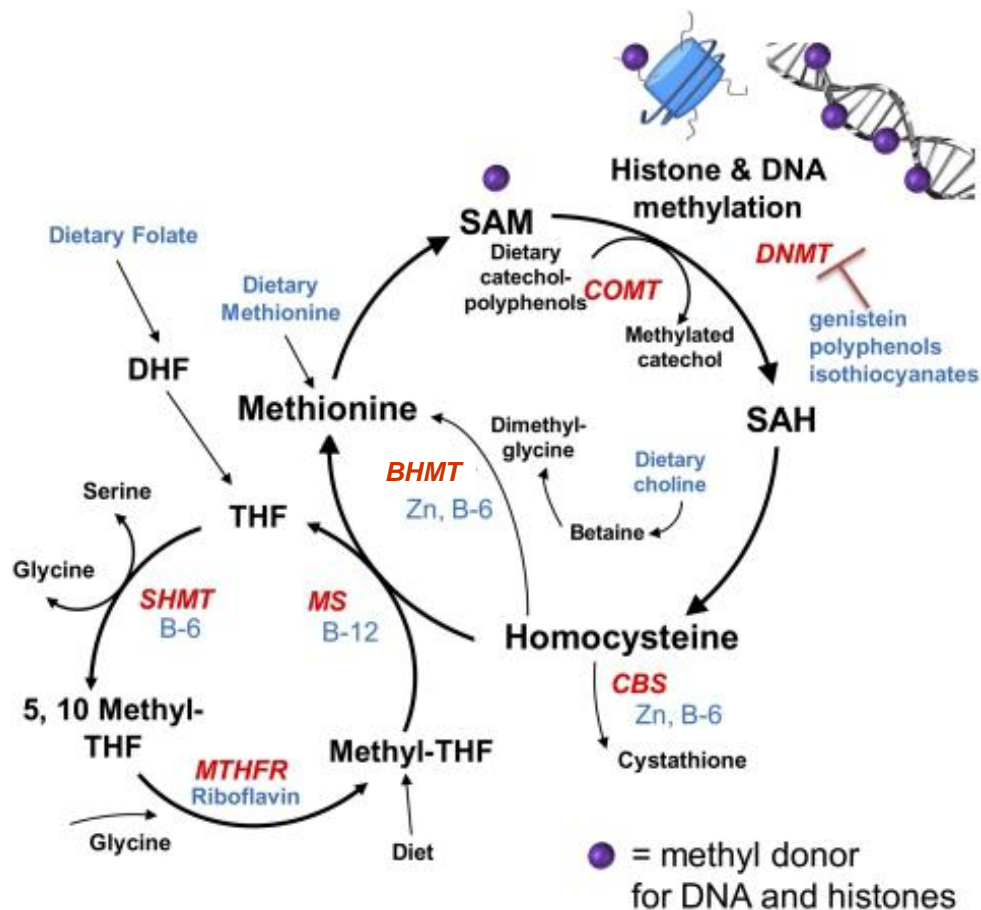
l'estudi de la nutrigenòmica ha augmentat en els darrers anys, per tal d'explicar de quina manera exerceixen els nutrients un efecte sobre la salut.<sup>12</sup>

A part dels seus possibles efectes directes sobre els fluxos metabòlics, nutrients, components no nutritius dels aliments i règims nutricionals, són senyals dietètiques que són detectades per les cèl·lules mitjançant sensors i que tenen una influència sobre l'expressió de gens i proteïnes i, per tant, en la producció de metabòlits.<sup>10</sup> La dieta (com altres factors ambientals) pot afectar l'expressió gènica de dues maneres. Per una banda, mitjançant factors de transcripció que controlen l'expressió de proteïnes reguladores que es veuen afectats per canvis de la dieta i tindrien un efecte més a curt termini. I d'altra banda, l'ambient i la dieta també poden afectar l'expressió gènica, més a llarg termini i amb alteracions que poden ser heretables per les següents generacions, mitjançant canvis epigenètics induïts per la dieta.

Components concrets de la dieta (macro i micronutrients, fitoquímics, antioxidants, etc), així com l'estatus nutricional general de la cèl·lula, tenen un cert nivell d'influència sobre les modificacions dels patrons epigenètics i, en conseqüència, en l'expressió de gens determinats i en la probabilitat de desenvolupar o evitar malalties, com ara l'obesitat.<sup>2</sup> A continuació es resumeixen els principals mecanismes que explicarien aquesta influència.

### **3.1 Nutrients que són donadors de grups metil o cofactors de les reaccions de síntesi de S-adenosilmetionina**

La nutrició té un gran efecte sobre la metilació del DNA.<sup>13</sup> Varis nutrients tenen un paper en la metilació del DNA, que depèn de la quantitat en la que ingerim aquests components. Els donadors de grups metil són aquells que, com el seu nom indica, són capaços de transferir un grup metil al DNA o a les histones, i ho fan a través del S-adenosilmetionina (SAM).<sup>13</sup> La metilació del DNA està lligada al metabolisme intermediari de l'aminoàcid metionina i del ATP, també anomenat metabolisme d'un carboni (*one-carbon metabolism*), a través del SAM com a substrat donador de grups metils.<sup>6</sup>



**Figura 1.** Metabolisme del SAM.<sup>14</sup>

El grup metil del SAM pot derivar-se de donadors de grups metil de la dieta, en particular metionina, serina, glicina, àcid fòlic i colina (Figura 1). A més, varies vitamines (riboflavina, B-12, B-6) i el Zn es requereixen com a cofactors a reaccions implicades en el metabolisme del SAM (Figura 1). Dèficits en alguns d'aquests nutrients poden desembocar en una hipometilació del DNA i afavorir determinades malalties. Però no tots els problemes amb el consum, per falta o excés, de donadors de grup metil tindran les mateixes conseqüències per tothom, sinó que altres factors, com per exemple els polimorfismes (SNP) a gens reguladors del metabolisme dels aminoàcids colina i folat, tindran també el seu paper en el desenvolupament prematur de malalties.<sup>13</sup>

### 3.2 Nutrients que són moduladors al·lostèrics d'enzims epigenètics

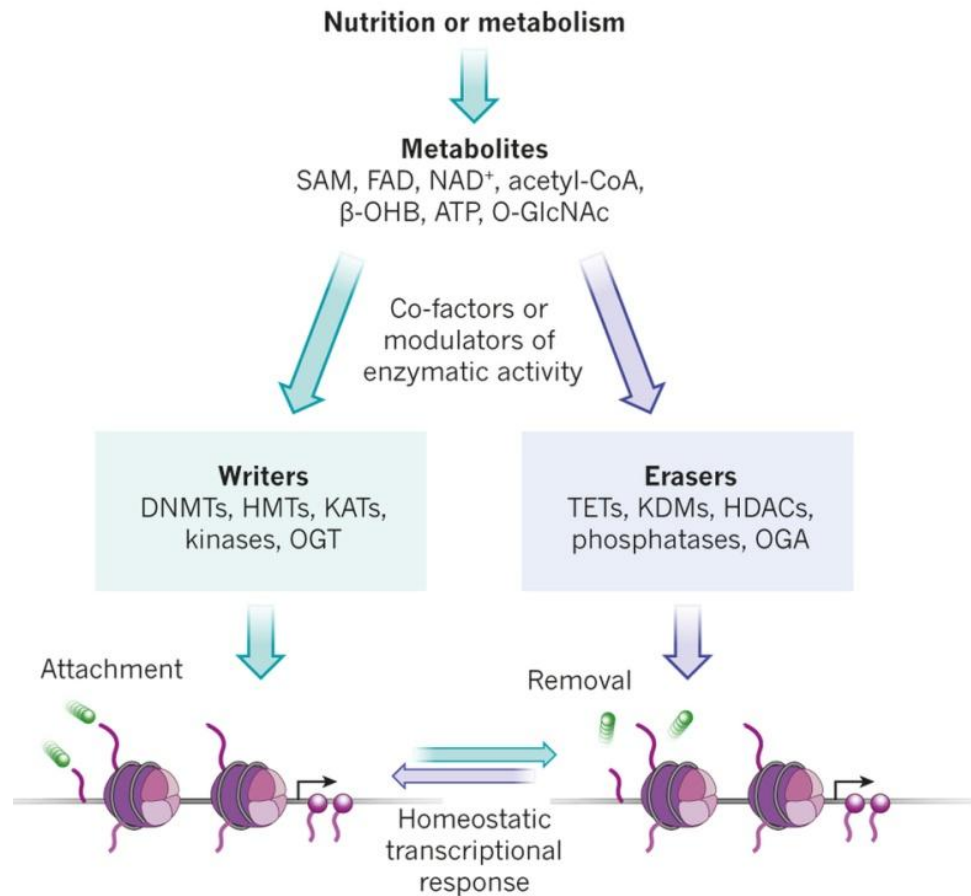
Diversos nutrients i altres components dels aliments poden afectar les marques epigenètiques mitjançant els seus efectes moduladors dels enzims responsables de la dinàmica d'aquestes marques.

Per exemple, els àcids grassos de cadena curta tenen un paper en la desacetilació de les histones, ja que afecten a l'activitat de les desacetilases d'histones (HDACs), inhibint-les.<sup>15</sup> Aquests àcids grassos, com són el butirat, l'acetat i el propionat, són produïts per la microbiota intestinal durant la fermentació de polisacàrids no digeribles o parcialment digeribles, i tenen efectes antiinflamatoris i antitumorals relacionats en part amb la seva activitat sobre les HDACs.<sup>15</sup>

Components de la soja, en concret la proteïna de soja i isoflavonoides (com la genisteïna), a primats no humans modifiquen els patrons de metilació del DNA a fetge i múscul i milloren el pes corporal, la sensibilitat a la insulina i el perfil de lípids circulants.<sup>16</sup> La genisteïna en particular és un inhibidor de DNMTs (Figura 1).<sup>14</sup> Altres polifenols, com les catequines del te, s'han relacionat amb la inhibició de DNMTs i amb la inhibició de l'activitat de HATs.<sup>13</sup> D'aquesta manera, els polifenols són part de la interacció entre el genoma i l'entorn i tenen efectes sobre els mecanismes epigenètics implicats en la salut humana.<sup>12</sup>

### **3.3 Mecanismes epigenètics influenciats per l'estat nutricional cel·lular**

Molts dels enzims modificadors de cromatina utilitzen cofactors o substrats que són metabòlits crucials a vies o rutes del metabolisme intermediari. És a dir, que molts dels components de la maquinària epigenètica necessiten intermediaris del metabolisme cel·lular per dur a terme la seva funció. És per aquest motiu que si la concentració d'aquests metabòlits fluctua, per exemple per el tipus de dieta o el contingut calòric de la dieta, l'activitat dels enzims modificadors també ho farà. Així, les histona-metiltransferases i les histona-acetiltransferases i desacetilases varien la seva activitat segons els nutrients o factors dietètics que conformin la nostra dieta.<sup>6,9</sup>



**Figura 2.** Impacte dels nutrients sobre el metabolisme i el seu efecte sobre els mecanismes epigenètics.<sup>6</sup>

Un exemple l'ofereixen les sirtuïnes, ja que la seva activitat com a histona desacetilases (i proteïna desacetilases en general) és depenent de l'estat nutricional de la cèl·lules, activant-se en condicions de restricció calòrica. Les sirtuïnes necessiten de la presència del NAD<sup>+</sup> com a co-substrat per dur a terme la reacció enzimàtica de desacetilació que catalitzen, i els nivells relatius de NAD<sup>+</sup> augmenten sota condicions de restricció calòrica. És per aquest motiu, que es considera que les sirtuïnes són proteïnes amb la capacitat de detectar les condicions en les que el ràtio NAD<sup>+</sup>/NADH és més elevat del normal fisiològicament i, en conseqüència, respondre silenciant gens o regions gèniques concretes. De manera que davant una situació d'estrès que implica un desequilibri energètic, com és la restricció calòrica, les sirtuïnes s'activarien i durien a terme la seva funció.<sup>9,17</sup>

#### 4. Nutriepigenètica i obesitat: aspectes generals

L'obesitat és una malaltia complexa, habitualment multifactorial que, bàsicament, podríem definir com l'acumulació anormal de greix corporal. És el resultat d'un balanç energètic positiu sostingut a causa d'una dieta hipercalòrica i un estil de vida sedentari, tot això sumat a la predisposició genètica de manifestar la malaltia. En l'actualitat, la visió de l'obesitat ha canviat significativament pel fet que el teixit adipós ha passat de ser considerat un simple dipòsit on s'acumula l'excés d'energia, a ser considerat un òrgan endocrí que allibera hormones, com la leptina, resistina, citoquines, com el TNF $\alpha$ , etc, que informen de l'estat energètic a la resta de l'organisme. <sup>11</sup> Per tant, associat a l'estat obès hi pot haver desequilibris regulatoris importants.

L'obesitat és un dels principals problemes de salut en les poblacions desenvolupades i afecta a un nombre molt gran de persones que augmenta de cada vegada més, de manera que ha resultat una pandèmia i un problema de salut general greu. És per això que la recerca de tractaments i estratègies per mantenir i controlar el pes corporal estan augmentant. Però, per a poder combatre i evitar l'obesitat, és necessari conèixer la malaltia en sí mateixa. De fet, l'etiologia de l'obesitat, els mecanismes i processos bioquímics involucrats, les implicacions sobre l'organisme i la influència que pot tenir sobre altres malalties són aspectes en els que s'investiga activament. Però, el coneixement de l'obesitat i les seves causes és complicat degut a que tots els factors implicats en la seva aparició són molt diversos i estan interrelacionats entre ells. <sup>10</sup>

L'etiologia de l'obesitat és molt variada ja que pot tenir components genètics, ambientals i epigenètics. Diferents estudis, realitzats amb bessons, casos d'adopció i anàlisi de lligament, han demostrat que l'obesitat té una part o una contribució genètica. De manera que, els resultats d'aquests estudis van concloure que els factors genètics podien explicar entre el 40-80% de la variància en l'índex de massa corporal (BMI) i en el risc de patir obesitat. <sup>11</sup> A banda del component genètic, que pot marcar o definir la predisposició de patir la malaltia, hi ha molts altres factors del dia a dia que poden facilitar o conduir a patir obesitat. Entre aquests estan la falta d'exercici i seguir una vida sedentària, determinants socials i econòmics, seguir una dieta no saludable,

malalties o desordres hormonals, etc.<sup>18</sup> És a dir, que l'estil de vida pot conduir a sofrir obesitat. La genètica d'una espècie no pot haver canviat en tant poc temps com per explicar l'actual pandèmia d'obesitat, de manera que la contribució ambiental i epigenètica es considera fonamental per poder explicar-la.<sup>11</sup> Diferents estudis han pogut relacionar la regulació metabòlica normal amb l'equilibri entre ingesta i despesa energètica i amb els entorns pre-natal i post-natal primerenc. Així, s'està consolidant el concepte que la nutrició materna durant la gestació i la lactància pot provocar modificacions epigenètiques que afecten a la regulació gènica a llarg termini i que, en conseqüència, poden modificar el fenotip metabòlic de la descendència, incloent la susceptibilitat a desenvolupar obesitat.<sup>11</sup>

També canvis epigenètics en etapes vitals més avançades poden relacionar-se amb l'obesitat. La majoria dels factors externs, sobretot l'alimentació i els components nutricionals, que tenen un paper important en l'establiment i manteniment del fenotip obès poden provocar canvis epigenètics.<sup>10</sup> A més, canvis metabòlics i fisiopatològics freqüentment associats a l'obesitat, com la dislipèmia, la hiperglucèmia, la inflamació crònica de baix grau, o la hipòxia i l'estrès oxidatiu al teixit adipós també poden funcionar com agents de canvis epigenètics.<sup>4</sup> Per exemple, les espècies reactives d'oxigen i de nitrogen s'associen amb canvis en l'activitat de les DNMTs, el que provoca canvis en els patrons de metilació del DNA.<sup>19</sup> Tot això es pot relacionar o es veu reflectit en el fet que les persones que pateixen obesitat tenen uns patrons de marques epigenètiques diferents als de les persones no obeses.

Una altre manera d'abordar la connexió entre epigenètica i obesitat és considerar tots aquells gens que regulen processos metabòlics relacionats amb el control de la homeòstasi energètica i l'adipositat corporal i que, alhora, la seva expressió està regulada per mecanismes epigenètics. Per exemple, l'adipogènesi està regulada pels gens CEBPA i pel PPARG, que codifiquen per factors de transcripció claus en el procés de diferenciació dels adipòcits, i l'expressió d'aquests gens està regulada per metilació i acetilació d'histones en el primer cas (CEBPA) i per metilació del DNA en el segon (PPARG). Aquest és només un exemple de l'efecte epigenètic sobre els gens que regulen processos

metabòlics directament relacionats amb l'obesitat.<sup>2</sup> Es mostren més exemples a la Taula 1.

Procés metabòlic	Gen	Mecanisme epigenètic
<b>Adipogènesi</b>	CEBPA	Metilació i acetilació d'histones
	PPARG	Metilació del DNA
<b>Regulació de l'apetit</b>	LEP, MC4R	Metilació del DNA
<b>Homeòstasi pes corporal</b>	FTO	Metilació del DNA
<b>Homeòstasi de la glucosa</b>	ADIPOQ GLUT4, INS	Metilació del DNA i acetilació d'histones
<b>Hipòxia</b>	HIF1A	Metilació del DNA i acetilació i metilació d'histones
<b>Inflamació</b>	INFG, TNF	Metilació del DNA
<b>Emmagatzematge de lípids</b>	FASN	Metilació del DNA
<b>Estrés</b>	NR3C1	Acetilació d'histones
<b>Termogènesi</b>	UCP1	Metilació del DNA

**Taula 1.** Exemples de processos metabòlics relacionats amb l'obesitat que estan regulats per gens l'expressió dels quals està controlada per mecanismes epigenètics.<sup>2</sup>

## 5. Nutriepigenètica i obesitat: línies de recerca activa

Hem identificat tres objectius fonamentals de la investigació recent en epigenètica i nutriepigenètica en relació al control de l'adipositat corporal i l'obesitat, 1) la cerca de biomarcadors epigenètics per predir futurs problemes d'obesitat o el risc de patir complicacions associades a la obesitat a nivell individual; 2) la comprensió de la relació entre l'obesitat i l'impacte a nivell epigenètic de les dietes obesogèniques que la promouen, i 3) la cerca de biomarcadors epigenètics que permetin predir la resposta a intervencions nutricionals per al tractament de l'obesitat i ajudin a definir noves estratègies terapèutiques basades en agents nutricionals o farmacològics que puguin modificar les marques epigenètiques.<sup>2</sup>

Aquest nou enfocament, el de cercar biomarcadors epigenètics que indiquin sobre la predisposició o probabilitat de patir obesitat, permetrà dur a terme l'aplicació de diagnòstics i pronòstics sobre l'obesitat de manera individualitzada i a una edat jove i, a més, ajudarà en la realització de teràpies també individualitzades per combatre l'obesitat i les complicacions associades a ella. <sup>2</sup>

En els següents apartats, sense pretendre ser exhaustius, se vol il·lustrar amb exemples concrets aquestes diferents línies de recerca que existeixen sobre la nutriepigènica i l'obesitat.

### 5.1 Nutriepigènica en la programació perinatal de l'obesitat

L'ambient perinatal en general i en particular la dieta materna durant la gestació i la lactància, són factors essencials que determinen canvis i marques epigenètiques que estan relacionades amb el risc de patir obesitat i moltes altres malalties en l'edat adulta.<sup>2,13,10</sup>

La malnutrició a aquests períodes, tant per falta com per excés, impacta sobre els mecanismes epigenètics que hem vist anteriorment, la metilació del DNA, la modificació covalent d'histones i els microRNAs. És a dir, una situació de malnutrició de la mare durant la gestació i la lactància es relaciona amb canvis a l'epigenoma del fetus/recent nat, i té conseqüències molt significatives en la seva descendència degut a que aquests períodes del desenvolupament són summament susceptibles.<sup>20,21,22</sup>

L'interès d'aquesta recerca està, fonamentalment, en la identificació de marques epigenètiques que puguin ser útils per la detecció primerenca de la susceptibilitat en el risc d'obesitat.

A la Taula 2 es presenten, a mode d'exemple, alguns articles d'investigació il·lustratius d'aquesta línia de recerca.

Article	Concepte general
<b>Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes.</b>	El patró de metilació en múltiples regions reguladores de gens <i>imprintats</i> (mesurat a cordó umbilical) és diferent entre infants nascuts de pares obesos i no obesos. Això



<p>Soubry, A, et al. (2005) <sup>23</sup></p>	<p>suggereix que l'estil de vida i la sobrealimentació dels progenitors afecta la dinàmica de les marques epigenètiques durant la gametogènesi i el desenvolupament primerenc. Es va trobar una associació independent entre l'obesitat del pare i l'estat de metilació de la descendència, suggerint que l'esperma en formació és sensible a les agressions ambientals.</p>
<p><b>Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity</b> Öst, A et al. (2014) <sup>24</sup></p>	<p>La intervenció dietètica amb sucre a mascles de <i>Drosophila</i> provoca obesitat en la seva descendència. El sucre afecta l'estat de compactació de la cromatina de l'esperma madur. Hi ha evidència de que un sistema similar pot regular la susceptibilitat de patir obesitat i la variació del fenotip a ratolins i humans.</p>
<p><b>Mendelian randomization supports causality between maternal hyperglycemia and epigenetic regulation of leptin gene in newborns.</b> Allard, C et al. (2015) <sup>25</sup></p>	<p>L'augment dels nivells de leptina al període perinatal i la hiperglucèmia materna tenen un paper crític en la programació de l'obesitat. Investigant en mostres de cordó umbilical els nivells de metilació del DNA prop del locus LEP varen observar que els nounats de mares amb hiperglucèmia tenien nivells inferiors de metilació i superiors de leptina circulant. Demostrant que la glucèmia materna té influència sobre la regulació epigenètica de la leptina en la seva descendència.</p>
<p><b>Overweight and CpG methylation of the Pomc promoter in offspring of high-fat-diet-fed dams are not "reprogrammed" by</b></p>	<p>L'objectiu d'aquest estudi fou determinar si la programació epigenètica induïda per una dieta materna alta en greixos tenia un efecte inductor d'obesitat en rates femelles i la seva descendència. També volien comprovar si</p>

**regular chow diet in rats**Marco, A et al. (2014) <sup>26</sup>

després d'un període amb dieta normal es donava una reprogramació de la epigenètica i el fenotip de la descendència. La dieta materna alta en greixos resultà en una descendència amb més pes corporal, més vulnerable a l'obesitat i amb hipermetilació del promotor POMC (que codifica per pèptids supressors de la gana) a l'hipotàlem. Aquests canvis no eren revertits, alimentant a les cries amb una dieta estàndard.

**Taula 2.** Exemples d'articles sobre la línia de recerca de l'impacte de la nutrieipigenètica en el període perinatal sobre el futur desenvolupament d'obesitat.

## 5.2 Canvis epigenètics associats a dietes obesogèniques/estat obès en l'edat adulta

En els darrers anys s'han fet diferents estudis i investigacions per tal de poder relacionar com afecten els canvis epigenètics provocats per dietes obesogèniques a la pròpia obesitat. És a dir, l'objectiu de la majoria d'aquestes investigacions és conèixer com una dieta obesogènica provoca o induïx canvis epigenètics que incrementen o faciliten el fet de patir obesitat. A la Taula 3 es recullen, a mode d'exemples, una sèrie d'articles d'investigació que tracten sobre aquest tema.

D'aquesta manera, quan els resultats siguin més robustos i es puguin interrelacionar els uns amb els altres, es podran identificar marques epigenètiques relacionades amb l'obesitat que siguin susceptibles de modificar-se per factors dietètics i ingredients actius.

Article	Concepte general
<b>Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in diet induced obese mice</b> Fan, C et al (2014) <sup>27</sup>	S'estudià de manera pangenòmica el perfil de metilació del DNA a promotors gènics i el perfil transcriptòmic en mostres de teixit adipós de ratolins control i amb obesitat induïda per dieta d'alt contingut lipídic. S'identificaren una sèrie de gens amb promotors metilats de forma

	<p>diferencial depenent de la dieta i expressats diferencialment d'acord amb l'estat de metilació del seu promotor. Aquests gens inclouen gens implicats en el metabolisme lipídic i en la patogènia de les complicacions relacionades amb l'obesitat. De manera que es proposen possibles marcadors de marcadors de metilació que podien regular la transcripció gènica en l'obesitat.</p>
<p><b>Shifting to a control diet after a high-fat, high-sucrose diet intake induces epigenetic changes in retroperitoneal adipocytes of Wistar rats</b> Uriarte, G et al. (2013) <sup>28</sup></p>	<p>Un estudi experimental amb animals que havien seguit una dieta obesogènica i que havia estat substituïda posteriorment per una dieta de pinso o control va mostrar que els efectes en els perfils de metilació de diferents gens (al teixit adipós retroperitoneal), induïts per la dieta obesogènica, eren revertits per la dieta control. Mostrant així la reversibilitat dels canvis fenotípics i epigenètics induïts per una dieta d'alt contingut en sacarosa.</p>
<p><b>Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats</b> Jiang, M et al. (2011) <sup>29</sup></p>	<p>En l'obesitat induïda per una dieta alta en greixos, la glucoquinasa hepàtica i la piruvat quinasa tipus L (ambdós enzims glucolítics) es veuen regulades a la baixa degut a la hipermetilació dels seus promotors. Per tant, aquesta hipermetilació pot ser un paràmetre útil per avaluar la resistència a la insulina induïda per obesitat i el fetge gras.</p>
<p><b>Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus</b></p>	<p>El nivell de metilació de l'ADN del gen FTO, mesurat a sang perifèrica, de dones amb diabetes tipus 2 va resultar superior al del grup control. Aquest increment en la quantitat de dinucleòtids CpG el varen relacionar amb el risc de patir obesitat perquè aquesta metilació</p>

Bell, C et al. (2010) <sup>30</sup>	del DNA afecta l'expressió gènica, vinculant la integració entre el genotip i les interaccions epigenètiques dins loci associats amb l'obesitat.
-------------------------------------	--

**Taula 3.** Exemples d'articles relacionats amb la línia de recerca: canvis epigenètics lligats a dietes obesogèniques/obesitat en l'edat adulta.

### 5.3 Biomarcadors epigenètics per predir la resposta a dietes hipocalòriques i el manteniment del pes corporal

S'estan identificant biomarcadors epigenètics a humans que podrien permetre la predicció de la pèrdua de pes i la major o menor dificultat per el manteniment del pes corporal.

Alguns articles d'investigació il·lustratius que recolzen la idea de poder utilitzar determinades marques epigenètiques com biomarcadors per poder predir l'obesitat són els que trobem a la Taula 4.

Article	Concepte general
<b>Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: A translational study</b> Crujeiras, A et al. (2013) <sup>31</sup>	Van revelar que la metilació del DNA podia servir com un biomarcador per predir la recuperació de pes corporal després d'un període de restricció energètica o de dieta hipocalòrica. A més, varen observar que canvis en els perfils de metilació a leucòcits de dos gens associats a la regulació de l'apetit, el neuropèptid Y (NPY) i el propiomelacortin (POMC), indicaven si el manteniment del pes corporal seria un èxit o si, per el contrari, el pes perdut seria fàcilment recuperat.
<b>Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric</b>	S'ha pogut demostrar que en persones adultes la pèrdua de pes provocada per una dieta hipocalòrica altera el patró de metilació de diferents gens al teixit adipós. Varen comparar el perfil epigenòmic de mostres de

<p><b>restriction</b></p> <p>Bouchard, L et al. (2010) <sup>32</sup></p>	<p>teixit adipós del grup amb alta resposta a la dieta hipocalòrica i del grup amb una resposta baixa i tendència a la recuperació de pes. El resultat va ser una diferència significativa en el perfil de metilació del DNA en gens involucrats en el control del pes corporal i la secreció d'insulina. De manera que factors epigenètics poden contribuir a la variabilitat en la resposta a la pèrdua de pes.</p>
<p><b>Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study</b></p> <p>Molerés, A et al. (2013) <sup>33</sup></p>	<p>Aquest estudi tracta sobre quines marques epigenètiques poden mostrar la resposta a una intervenció multidisciplinària per la pèrdua de pes en adolescents amb sobrepès i obesos. En mostres de sang venosa, varen identificar 5 regions del DNA que tenien perfils de metilació diferents segons la resposta a la pèrdua de pes.</p>
<p><b>TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response</b></p> <p>Campión, J et al. (2009) <sup>34</sup></p>	<p>El TNF-<math>\alpha</math> és una citocina proinflamària que es troba elevada en els individus obesos i es sap que el promotor del gen TNF-<math>\alpha</math> pot ser regulat per metilació. Es planteja com objectiu estudiar si la regulació epigenètica del promotor del TNF-<math>\alpha</math> pot relacionar-se amb la susceptibilitat a la pèrdua de pes després de dur a terme una dieta hipocalòrica. Els resultats van indicar que els subjectes obesos que tenien èxit en la pèrdua de pes presentaven, abans de la intervenció nutricional, uns nivells més baixos de metilació al promotor del TNF-<math>\alpha</math> en cèl·lules sanguínies mononuclears.</p>

**Taula 4.** Exemples d'articles relacionats amb la línia de recerca de biomarcadors epigenètics per predir la resposta a dietes hipocalòriques i el manteniment del pes corporal.

## 6. Proposta de projecte experimental

Títol: Impacte de la suplementació amb àcid linoleic conjugat (CLA, de l'anglès *conjugated linoleic acid*) durant la lactància sobre l'estat de metilació de gens relacionats amb el control de l'adipositat corporal.

### Justificació i Objectius:

Un dels períodes més susceptibles alhora de sofrir modificacions epigenètiques influïdes per diferents factors, tant interns com externs, que afectin al fenotip adult és el perinatal, incloent la lactància.

Segons la bibliografia, el CLA afavoreix la reducció de l'adipositat corporal a animals adults.<sup>35,36,37</sup> També, s'ha pogut demostrar que el CLA induïx un augment significatiu de la quantitat de proteïna desacoblant 1 (UCP1) al teixit adipós marró (TAM) i una disminució de l'activitat i expressió de la lipoproteïna lipasa (LPL), en el teixit adipós blanc (TAB).<sup>37,38,39</sup> Aquests canvis explicarien, al menys en part, un efecte anti-obesitat del CLA. D'altra banda, el CLA s'ha relacionat amb mecanismes epigenètics, ja que estudis de modelització molecular han identificat el CLA com un possible inhibidor de HDCAs.<sup>40</sup> A més, a un estudi fet amb ratolins al 2014, es va observar que la suplementació amb CLA a les mares s'associava amb canvis a la composició de la llet i la hipermetilació del promotor POMC a la descendència el que, a llarg termini, podia provocar que la descendència fos més obesa i que tingués desordres metabòlics.<sup>41</sup>

També hi ha evidència de que els promotors dels gens UCP1 i LPL poden estar modulats per metilació. En el cas del promotor del gen LPL, s'han trobat associacions entre l'estat de metilació a leucòcits i el perfil lipídic en sang, i entre l'estat de metilació a teixit adipós i els nivells de mRNA de LPL a dit teixit.<sup>42</sup> També, en un estudi fet amb dones amb diabetis gestacional, varen observar que el perfil de metilació de la LPL de la placenta estava associat amb un estat metabòlic matern alterat i que podia contribuir a la programació del

fetus.<sup>43</sup> En el cas de la UCP1, han pogut demostrar que la desmetilació estava involucrada amb la seva expressió a teixits específics.<sup>44</sup>

A partir d'aquí, hipotetitzem que el tractament amb CLA a les cries durant la lactància pot modificar la susceptibilitat de patir un fenotip obès en l'edat adulta mitjançant canvis epigenètics en gens implicats en el control de l'adipositat corporal, en particular els gens per a la LPL i la UCP1.

L'objectiu d'aquesta proposta de projecte experimental és testar aquesta hipòtesi.

#### Disseny i Metodologia:

A partir de 8 rates femelles reproductores, obtindrem 8 camades que a dia 1 s'uniformitzaran a 10 cries/camada. A la meitat de les cries de cada camada els hi subministrarem diàriament per via oral CLA (15mg/kg; grup control)<sup>45</sup> i a l'altre meitat li donarem vehicle (grup control), durant els 21 dies que dura la lactància. Just després d'aquest període (dia 21 de vida) es procedirà al sacrifici d'una part dels animals de cada grup i obtindrem mostres del TAB i del TAM que s'utilitzaran per extreure el RNA total per analitzar l'expressió gènica dels gens LPL i UCP1 mitjançant retrotranscripció i PCR a temps real, i el DNA, per anàlisi de l'estat de metilació dels promotors gènics d'interès, mitjançant conversió en bisulfit i seqüenciació.

A la resta d'animals, una vegada deslletats, se'ls hi donarà una dieta control durant els següents 4 mesos. A partir d'aquí, la meitat dels animals tractats amb vehicle o amb CLA durant la lactància seguiran una dieta "normal fat" (NF), i l'altre meitat, una dieta "high fat" (HF) inductora de sobrepès/obesitat. Després d'un temps (per exemple 8 setmanes) amb les dietes respectives durant el qual es farà un seguiment del pes, la ingesta i la composició corporal, els animals seran sacrificats i els seus teixits adiposos i altres d'interès (sang, fetge, múscul esquelètic, hipotàlem) seran extrets per a procedir a anàlisis d'interès en estudis en obesitat, incloent l'expressió gènica de gens seleccionats. S'avaluarà doncs l'impacte del tractament durant la lactància amb CLA sobre les respostes a una dieta obesogènica administrada en edat adulta.

D'aquesta manera, podrem comparar els nivells d'expressió gènica dels gens LPL i UCP1 després de la lactància i en l'edat adulta, segons el tractament

inicial rebut i segons el tipus de dieta. Si s'observen diferències significatives en els nivells d'expressió als teixits adiposos d'aquests gens relacionats amb el sistema de control de l'adipositat entre les rates tractades amb vehicle o CLA i aquestes diferències perduren fins l'edat adulta, es procedirà a l'estudi de la metilació dels respectius promotors gènics als teixits adiposos dels animals joves i adults, per investigar si el tractament primerenc amb CLA ha provocat canvis epigenètics que hagin pogut afectar l'expressió a llarg termini. És a dir, per conèixer quines modificacions epigenètiques provoca el CLA sobre el TAB i el TAM i quina relació tenen aquestes amb la possibilitat de patir un fenotip obès en edat adulta. Aquest estudi de metilació del DNA es durà a terme mitjançant la conversió a bisulfit i la reacció Cycle sequencing, on obtindrem els punts CpG metilats del DNA.

Encara que es podria fer un anàlisi global, en aquest cas només es farà dels promotors dels gens de la LPL i la UCP1.

Pressupost:

Concepte	Nº	Tarifa (€)	Total (€)
<b>Rata femella reproductora</b>	8	18	144
<b>Transport animals</b>			650
<b>CLA</b>	1 pot (d'1g)	298	298
<b>Extracció RNA</b>	80 (2x40 animals)	1.5	120
<b>RT</b>	4 (80 mostres; 20 gens x PCR)	2.3	9.2
<b>PCR</b>	80	0.65	52
<b>Extracció DNA: <i>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit</i></b>			1349.91
<b>Purificació DNA: <i>Genomic DNA clean &amp; Concentrator</i></b>			455.80
<b>Conversió bisulfit</b>			855.19
<b><i>EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit</i></b>		617.11	
<b><i>Universal Methylated Mouse DNA Standard</i></b>		238.08	
<b>PCR metilació</b>			214.10



<b><i>N</i> parelles de primers</b>	2	0.8	
<b><i>JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix</i></b>		212.50	
<b>Parella de primers</b>	2	25	50
<b>Purificació producte de PCR : <i>QIAquick PCR Purification Kit</i></b>		625.29	
<b>Cycle sequencing: <i>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i></b>		1188	
<b>Servei seqüenciació</b>		1	
<b>TOTAL (preu aproximat)</b>		6011.49	

## Conclusions

Després de la realització d'aquest treball les conclusions a les que he pogut arribar bàsicament són que la dieta té una gran importància en el desenvolupament d'una persona ja que provoca canvis a l'expressió del genoma, que s'expliquen en part amb l'epigenètica i la nutrieipigenètica i que poden ser perdurables i afectar la susceptibilitat de patir malalties, com l'obesitat.

També que l'obesitat és una malaltia molt complexa de la que encara falten per conèixer molts dels seus mecanismes i de les seves implicacions, i que aquests coneixements ajudaran a elucidar les incògnites sobre la seva etiologia i les implicacions que comporta, per en un futur poder combatre-la més efectivament.

Que tot i que actualment hi ha moltes línies de recerca que investiguen envers al tema de la nutrieipigenètica i la obesitat, segur que en els pròxims anys seguirà sent objecte de molts estudis ja que encara hi ha opinions contradictòries sobre els seus efectes i molts dubtes sense resoldre sobre els seus mecanismes i conseqüències.

D'altra banda, també que la realització d'un projecte d'investigació i tot el que això implica és una tasca que requereix molta elaboració i planificació.

## Bibliografia

1. Seo, J.-Y. *et al.* Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restor. Dent. Endod.* **40**, 14–22 (2015).

2. Martínez, J. A., Milagro, F. I., Claycombe, K. J. & Schalinske, K. L. Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. *Adv. Nutr.* **5**, 71–81 (2014).
3. Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. & Shilatifard, A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* **23**, 781–783 (2009).
4. Choi, S.-W., Claycombe, K. J., Martinez, J. A., Friso, S. & Schalinske, K. L. Nutritional epigenomics: a portal to disease prevention. *Adv. Nutr.* **4**, 530–2 (2013).
5. Neeha, V. S. & Kinth, P. Nutrigenomics research: a review. *J. Food Sci. Technol.* **50**, 415–28 (2013).
6. Gut, P. & Verdin, E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* **502**, 489–98 (2013).
7. Bonasio, R., Tu, S. & Reinberg, D. Molecular signals of epigenetic states. *Science* **330**, 612–6 (2010).
8. Cloos, P. A. C., Christensen, J., Agger, K. & Helin, K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev.* **22**, 1115–40 (2008).
9. Keating, S. T. & El-Osta, A. Epigenetics and Metabolism. *Circ. Res.* **116**, 715–736 (2015).
10. Palou, A. & Bonet, M. L. Challenges in obesity research. *Nutr. Hosp.* **28 Suppl 5**, 144–53 (2013).
11. Burgio, E., Lopomo, A. & Migliore, L. Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. *Mol. Biol. Rep.* (2014). doi:10.1007/s11033-014-3751-z
12. Remely, M. *et al.* Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. *Br. J. Pharmacol.* (2014). doi:10.1111/bph.12854
13. Milagro, F. I., Mansego, M. L., De Miguel, C. & Martínez, J. A. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Mol. Aspects Med.* **34**, 782–812
14. Ho, E., Beaver, L. M., Williams, D. E. & Dashwood, R. H. Dietary factors and epigenetic regulation for prostate cancer prevention. *Adv. Nutr.* **2**, 497–510 (2011).
15. Tan, J. *et al.* The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* **121**, 91–119 (2014).
16. Howard, T. D. *et al.* Epigenetic changes with dietary soy in cynomolgus monkeys. *PLoS One* **6**, e26791 (2011).
17. Guarente, L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.* **27**, 2072–85 (2013).
18. Goni, L., Milagro, F. I., Cuervo, M. & Martínez, J. A. Single-nucleotide polymorphisms and DNA methylation markers associated with central obesity and regulation of body weight. *Nutr. Rev.* **72**, 673–690 (2014).
19. Wu, Q. & Ni, X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr. Drug Targets* **16**, 13–9 (2015).

20. Desai, M., Jellyman, J. K. & Ross, M. G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int. J. Obes. (Lond)*. (2015). doi:10.1038/ijo.2015.13
21. El Hajj, N., Schneider, E., Lehnen, H. & Haaf, T. Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment. *Reproduction* **148**, R111–20 (2014).
22. Zheng, J., Xiao, X., Zhang, Q. & Yu, M. DNA methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life. *Br. J. Nutr.* **112**, 1850–7 (2014).
23. Soubry, A. *et al.* Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int. J. Obes. (Lond)*. **39**, 650–7 (2015).
24. Öst, A. *et al.* Paternal Diet Defines Offspring Chromatin State and Intergenerational Obesity. *Cell* **159**, 1352–1364 (2014).
25. Allard, C. *et al.* Mendelian randomization supports causality between maternal hyperglycemia and epigenetic regulation of leptin gene in newborns. *Epigenetics* **10**, 342–51 (2015).
26. Marco, A., Kisliouk, T., Tabachnik, T., Meiri, N. & Weller, A. Overweight and CpG methylation of the Pomc promoter in offspring of high-fat-diet-fed dams are not 'reprogrammed' by regular chow diet in rats. *FASEB J.* **28**, 4148–57 (2014).
27. Fan, C. *et al.* Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in diet-induced obese mice. *Nutr. Hosp.* **30**, 42–52 (2014).
28. Uriarte, G., Paternain, L., Milagro, F. I., Martínez, J. A. & Campion, J. Shifting to a control diet after a high-fat, high-sucrose diet intake induces epigenetic changes in retroperitoneal adipocytes of Wistar rats. *J. Physiol. Biochem.* **69**, 601–11 (2013).
29. Jiang, M. *et al.* Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats. *Endocrinology* **152**, 1284–9 (2011).
30. Bell, C. G. *et al.* Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. *PLoS One* **5**, e14040 (2010).
31. Crujeiras, A. B. *et al.* Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: A translational study. *Regul. Pept.* **186**, 1–6 (2013).
32. Bouchard, L. *et al.* Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 309–20 (2010).
33. Moleres, A. *et al.* Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. *FASEB J.* **27**, 2504–12 (2013).
34. Campión, J., Milagro, F. I., Goyenechea, E. & Martínez, J. A. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity (Silver Spring)*. **17**, 1293–7 (2009).
35. Yamasaki, M. & Yanagita, T. Adipocyte response to conjugated linoleic acid. *Obes. Res. Clin. Pract.* **7**, e235–42

36. Den Hartigh, L. J., Han, C. Y., Wang, S., Omer, M. & Chait, A. 10E,12Z-conjugated linoleic acid impairs adipocyte triglyceride storage by enhancing fatty acid oxidation, lipolysis, and mitochondrial reactive oxygen species. *J. Lipid Res.* **54**, 2964–78 (2013).
37. Zabala, A. *et al.* trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. *Br. J. Nutr.* **95**, 1112–9 (2006).
38. Miranda, J. *et al.* Weak effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid on body fat accumulation in adult hamsters. *Br. J. Nutr.* **102**, 1583–9 (2009).
39. Castellanos-Tapia, L., Yepiz-Plasencia, G. & Moya-Camarena, S. Y. Dietary conjugated linoleic acid induces tissue-specific lipoprotein lipase mRNA modulation in high-sucrose-fed mice. *Ann. Nutr. Metab.* **54**, 131–7 (2009).
40. Dashwood, R. H. & Ho, E. Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man. *Semin. Cancer Biol.* **17**, 363–9 (2007).
41. Zhang, X. *et al.* Hypermethylation of Sp1 binding site suppresses hypothalamic POMC in neonates and may contribute to metabolic disorders in adults: impact of maternal dietary CLAs. *Diabetes* **63**, 1475–87 (2014).
42. Guay, S. P. *et al.* DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: new molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis* **228**, 413–20 (2013).
43. Houde, A. A. *et al.* Placental lipoprotein lipase DNA methylation levels are associated with gestational diabetes mellitus and maternal and cord blood lipid profiles. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **5**, 132–41 (2014).
44. Shore, A., Karamitri, A., Kemp, P., Speakman, J. R. & Lomax, M. A. Role of Ucp1 enhancer methylation and chromatin remodelling in the control of Ucp1 expression in murine adipose tissue. *Diabetologia* **53**, 1164–73 (2010).
45. Hu, X. *et al.* Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**, 59–65 (2012).