

a cura di Lorella Marselli

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa

Fattori nutrizionali, metilazione del DNA e rischio di diabete di tipo 2 e obesità: nuove sfide e prospettive future

Luca Parrillo, Mattia Costanzo, Michele Campitelli, Giuseppe Cacace, Gregory Alexander Raciti, Francesco Beguinot

URT-GDD IEOS, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Napoli; Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Federico II, Napoli

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2103f>

INTRODUZIONE

L'obesità e il diabete di tipo 2 (DT2) rientrano a pieno titolo tra le malattie cronico-degenerative che maggiormente influenzano la qualità e l'aspettativa di vita, costituendo anche un grave problema di sanità pubblica. Infatti, l'incidenza di entrambe le condizioni patologiche è in continua crescita, assumendo ovunque, nel mondo, proporzioni epidemiche. Le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità suggeriscono che per il 2025 ci saranno, a livello mondiale, più di 800 milioni di obesi e più di 350 milioni di persone colpite da DT2. Nonostante la predisposizione genetica giochi un ruolo fondamentale nel determinare la suscettibilità individuale allo sviluppo di obesità e DT2, i *loci* di suscettibilità fin qui identificati – mediante studi di associazione *genome-wide* (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) – hanno un impatto relativamente modesto sul rischio di malattia (*odds ratio* 1,1-1,4). Inoltre, pur considerando queste varianti nel loro insieme, si riesce a spiegare meno del 10% di suscettibilità al DT2 e circa il 2% per l'obesità (1-2). Pertanto, le varianti di predisposizione genetica forniscono solo una spiegazione parziale del rischio individuale di sviluppare obesità e DT2. Questi dati sottolineano quanto siano determinanti i fattori ambientali, quali dieta, esercizio fisico e fattori socio-culturali, per lo sviluppo di queste patologie (3).

L'epigenetica è lo studio di quei fenomeni, non permanenti ed ereditabili, che influenzano le funzioni del genoma senza determinare cambiamenti della sequenza del DNA (4). Studi pubblicati nell'ultimo decennio indicano che l'epigenetica costituisce un'interfaccia tra l'ambiente, il genoma e le funzioni cellulari a esso sottese (5). Tramite questa interfaccia il flusso di informazioni provenienti dall'ambiente è integrato a quelle contenute nella sequenza del DNA, così da coordinare i processi molecolari che determinano le modifiche strutturali e funzionali di cellule e tessuti, contribuendo alla trasformazione del fenotipo, tanto di quello fisiologico che di quello patologico (5).

I principali meccanismi di regolazione epigenetica alla base dei disturbi metabolici comprendono la metilazione del DNA e le modifiche post-traduzionali degli istoni. Queste ultime includono una serie di modifiche covalenti reversibili come acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, sumoilazione e ADP-ribosilazione, la cui compromissione altera la conformazione tridimensionale della cromatina, attivando programmi di espressione genica aberranti, che contribuiscono allo sviluppo di disordini metabolici. Il ruolo delle modifiche istoniche nella patogenesi dell'obesità e del DT2 è stato adeguatamente descritto altrove (6), e non sarà trattato nella presente rassegna.

L'attuale epidemia di obesità e DT2 è dovuta principalmente a inadeguate abitudini alimentari e allo stile di vita sempre più insalubre (7). Numerose evidenze suggeriscono infatti che la malnutrizione, intesa sia come denutrizione che

come ipernutrizione, nel corso della vita può indurre riprogrammazioni epigenetiche che si associano a un'aumentata incidenza di patologie metaboliche (8). Ad esempio, quando modelli murini sono alimentati con diete ricche di grassi (HFD, *High Fat Diet*), che forniscono agli animali il 60% delle calorie giornaliere, essi sviluppano obesità e DT2 accompagnate da specifiche alterazioni epigenetiche, le quali, cosa molto interessante, possono essere trasmesse anche per via transgenerazionale (9-10). Lo stesso trattamento altera la plasticità del *Metiloma* (cambiamenti nella metilazione del DNA dell'intero genoma) in soggetti umani con basso peso alla nascita (11). Va inoltre sottolineato che un'assunzione calorica subottimale durante le prime fasi dello sviluppo, (es. gravidanza e/o allattamento), può perturbare la corretta allocazione di marker epigenetici, contribuendo così ad aumentare il rischio di patologie metaboliche nella progenie (12). A questo proposito, la malnutrizione materna può avere effetti negativi sulla formazione del microbioma neonatale, causando *signature* epigenetiche che potrebbero potenzialmente predisporre allo sviluppo di obesità e DT2 in età adulta (13).

D'altro canto, e in maniera coerente, un regime alimentare adeguato si associa a un corretto pattern di metilazione del DNA di geni implicati nel metabolismo energetico, contribuendo così a ridurre il rischio di malattia (14). Infatti, recenti studi effettuati dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che l'obesità indotta da una HFD nei topi induce alterazioni nella metilazione del promotore del gene *Hoxa5* a livello del grasso viscerale. Il gene *Hoxa5* regola la funzione adipocitaria ed è implicato nel rimodellamento del tessuto adiposo. Evento più importante, la sostituzione della HFD con una dieta bilanciata è accompagnata dal miglioramento simultaneo del fenotipo metabolico e dal ripristino dei livelli normali di metilazione del DNA a carico del gene *Hoxa5* (15). Questi dati evidenziano chiaramente la capacità dell'epigenetica di rispondere in modo adattivo a condizioni nutrizionali differenti, e suggeriscono che "targettare" la plasticità dell'epigenoma potrebbe, in futuro, offrire nuove e realistiche opportunità per prevenire e trattare l'obesità e il DT2. Inoltre, numerose evidenze suggeriscono che, nell'uomo, le modifiche epigenetiche possono rappresentare potenziali biomarcatori di predizione del rischio individuale di obesità e DT2, ancor prima dello sviluppo del fenotipo patologico (16).

In questo articolo, ci concentreremo sulla metilazione del DNA e sul suo ruolo potenziale nel mediare il rischio di sviluppare disturbi metabolici indotti da regimi nutrizionali sbilanciati. Sarà anche discusso l'uso potenziale dei cambiamenti di metilazione del DNA nella valutazione del rischio individuale di sviluppare la malattia e della risposta al trattamento terapeutico.

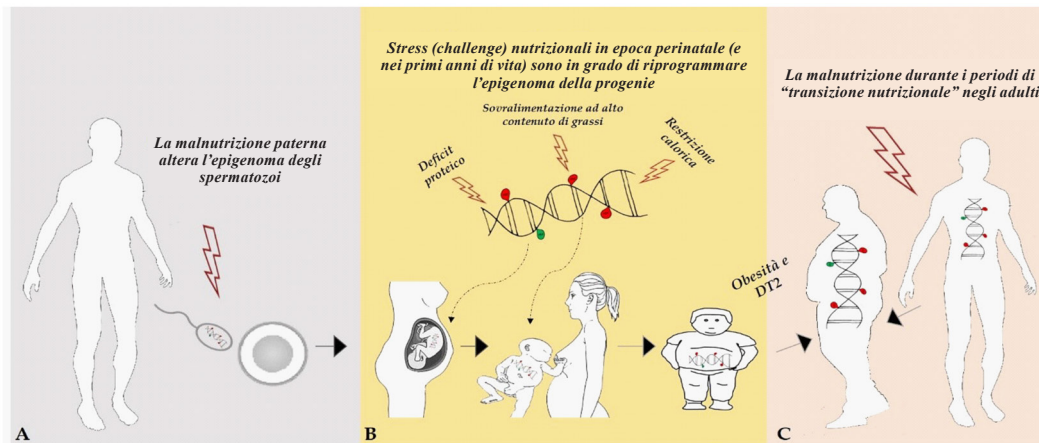
METILAZIONE DEL DNA

La metilazione del DNA è il meccanismo epigenetico più studiato ed è ben conservato nella maggior parte dei modelli vegetali, animali e fungini (17). Questa modifica consiste nel legame covalente di un gruppo metilico sul carbonio in posizione 5 dei residui di citosina con formazione di 5-metilcitosina. La reazione è catalizzata da una classe di enzimi, le DNA metiltransferasi (DNMT). Sono state identificate due classi di DNMT: DNMT1 e DNMT3. La DNMT1 svolge il ruolo di mantenimento e trasmette il profilo di metilazione dalla cellula madre alle cellule figlie. La famiglia delle DNMT3 comprende due membri: DNMT3a e DNMT3b. Esse stabiliscono i profili di metilazione nelle prime fasi dello sviluppo embrionale e nelle cellule germinali, e pertanto vengono definite DNMT *de novo* (18).

Nei mammiferi la metilazione avviene, prevalentemente, sulle citosine dei dinucleotidi CpG, comuni nelle regioni promotrici dei geni. Recenti evidenze hanno però rivelato che la metilazione del DNA si verifica anche in siti diversi dalle sequenze CpG (la cosiddetta metilazione non-CpG). Questo tipo di metilazione è prevalente nelle cellule staminali embrionali umane e nel cervello. Tuttavia, il suo significato funzionale nel genoma dei mammiferi è scarsamente compreso e non sarà ulteriormente discusso nel presente articolo (19).

La metilazione del DNA induce, spesso, silenziamento genico e formazione di eterocromatina (20). Essa può interferire con l'espressione genica attraverso due modalità. Questa modifica, infatti, può direttamente alterare il legame di fattori di trascrizione alla sequenza nucleotidica metilata o reclutare specifiche proteine che riconoscono e legano le citosine metilate (21).

Figura 1 ♦ **Disordini nutrizionali nel corso della vita sono associati a persistenti cambiamenti nella metilazione del DNA, che contribuiscono ad un aumento della suscettibilità all'obesità e al DT2**



A) La malnutrizione paterna altera l'epigenoma degli spermatozoi. Ciò potrebbe indurre una riprogrammazione della linea germinale che influenza il rischio di sviluppare disturbi metabolici nella progenie. B) Le prime fasi dell'ontogenesi sono finestre temporali particolarmente sensibili agli squilibri nutrizionali, i quali perturbano la corretta allocazione dei tratti epigenetici, predisponendo l'organismo alla malattia metabolica. C) L'esposizione, nel corso della vita, a periodi prolungati di malnutrizione causa alterazioni nella regolazione epigenetica dell'espressione genica, contribuendo all'insorgenza dell'obesità e del DT2

La metilazione del DNA è essenziale per lo sviluppo dei mammiferi e gioca un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica, nell'imprinting genomico, nell'inattivazione del cromosoma X, nello sviluppo embrionale e nel differenziamento cellulare (22). Pertanto, alterazioni nel pattern di metilazione del DNA possono attivare programmi di espressione genica aberranti, alterare l'omeostasi cellulare e contribuire allo sviluppo di una serie di gravi patologie, come il cancro, malattie autoimmuni, difetti neurologici e disordini metabolici (23-24).

La S-adenosil-L-metionina (SAM) è il principale donatore dei gruppi metilici attivi dei tessuti umani e degli altri mammiferi (25). La SAM è sintetizzata dalla metionina adenosiltransferasi a partire da adenosina trifosfato (ATP) e metionina e da svariati altri precursori presenti nella dieta, inclusi folati, colina, betaina e alcune vitamine del gruppo B (B2, B6 e B12). Carenze o cambiamenti nella disponibilità di questi substrati possono influenzare la sintesi della SAM, alterare l'azione delle DNMT e quindi contribuire ad attivare pattern di metilazione del DNA aberranti. La formazione e il mantenimento del *Metiloma* sono pertanto sensibili ai fattori nutrizionali. Infatti, gli squilibri nutrizionali che si verificano nel corso della vita di un individuo potrebbero impattare in maniera importante sulla costituzione del *Metiloma*, e quindi sullo stato di salute.

PLASTICITÀ DELL'EPIGENOMA

Regimi dietetici differenti sono potenzialmente in grado di alterare i processi epigenetici e contribuire all'aumentata suscettibilità individuale ai disturbi metabolici. Un ulteriore aspetto che deve essere affrontato riguarda i momenti temporali (*time points*), nel corso della vita, durante i quali l'epigenoma è più sensibile ai fattori nutrizionali. Numerose evidenze indicano che, nei mammiferi, le prime fasi dello sviluppo (es. sviluppo fetale e neonatale) costituiscono il periodo più critico per la definizione dei profili epigenetici. Ogni singolo squilibrio (*mismatches*) durante questo periodo di eccezionale "plasticità epigenetica" può indurre modifiche epigenetiche svantaggiose che si associano a letalità embrionale, malformazioni dello sviluppo e a un maggior rischio di patologie metaboliche (13). Questo periodo critico dello sviluppo è caratterizzato da processi di differenziamento cellulare eccezionalmente rapidi e da un complesso rimodellamento epigenetico, che rendono il processo di ontogenesi particolarmente vulnerabile agli insulti nutrizionali, che possono alterare la corretta programmazione dei *marker* epigenetici i quali, una volta fissati, rimangono

altamente stabili (26). È evidente, quindi, che le fasi iniziali dell'ontogenesi sono finestre temporali di straordinaria "plasticità epigenetica", e rappresentano un momento in cui gli errori epigenetici indotti dalla nutrizione potrebbero avere conseguenze importanti per la salute.

Tuttavia, evidenze relativamente recenti hanno messo in luce che gli effetti nutrizionali sull'epigenoma possono verificarsi nel corso dell'intera vita di un individuo, in particolare durante le cosiddette "transizioni alimentari" (27). Le transizioni alimentari sono periodi di tempo prolungati (che variano da settimane a mesi nei modelli animali, fino ad arrivare ad alcuni anni nei soggetti umani) durante i quali gli individui sono esposti a regimi alimentari caratterizzati da malnutrizione. Condizioni del genere potrebbero determinare alterazioni sofisticate e persistenti nell'espressione genica. Alcune di queste alterazioni sono mediate da meccanismi epigenetici che, pur essendo potenzialmente reversibili, potrebbero rimanere stabili e danneggiare gravemente il fenotipo metabolico di un individuo.

Pertanto, le esposizioni nutrizionali che si verificano durante tutte le fasi della vita possono avere conseguenze persistenti sulla salute o sul rischio di ammalarsi. In questa rassegna illustreremo recenti studi che evidenziano l'impatto di diversi regimi alimentari (es. restrizione calorica e consumo eccessivo di grassi) sulla determinazione dei profili di metilazione del DNA e su come queste interazioni contribuiscono al fenotipo di patologia metabolica (Fig. 1).

FATTORI NUTRIZIONALI CHE INFLUENZANO LA METILAZIONE DEL DNA

Restrizione calorica

Probabilmente le evidenze più esemplificative sull'impatto che l'alimentazione esercita nella definizione del profilo epigenetico individuale sono quelle fornite da studi effettuati sulle donne gravide sottoposte a restrizione calorica durante la carestia olandese del 1944 (il cosiddetto *Dutch Hunger Winter*), nel corso della seconda guerra mondiale. Emblematico, a questo proposito, è lo studio effettuato da Heijmans et al. (28) in cui hanno riportato che individui esposti a restrizione calorica (RC) durante il periodo prenatale mostravano una riduzione della metilazione a carico del gene *IGF2* (*Insulin Like Growth Factor 2*) rispetto ai soggetti non esposti. Studi successivi hanno poi descritto, in maniera indipendente, nel gruppo dei soggetti esposti alla carestia, alterazioni della metilazione del DNA in altri geni importanti per il metabolismo energetico, tra cui *INSIGF2*, *GNASAS1*, *MEG3*, *IL-10* e *LEP* (29). Questi studi avvalorano la tesi che la RC durante le prime fasi della vita induce variazioni del *Metiloma*, le quali contribuiscono allo sviluppo di patologie metaboliche nelle fasi adulte della vita (Fig. 1).

La RC ha suscitato enorme interesse da parte della comunità scientifica per i suoi effetti benefici sulla salute. La RC, per il momento, sembra essere una delle strategie nutrizionali più efficaci in grado di contrastare l'invecchiamento, migliorare la qualità della vita e, cosa importante, ritardare l'insorgenza delle malattie croniche non diffusibili, tra cui l'obesità ed il DT2 (Fig. 1; 30). Recenti evidenze suggeriscono che la RC può esercitare i suoi effetti benefici mediante meccanismi epigenetici. A questo proposito, in una coorte di soggetti obesi, la RC a breve termine è in grado di correggere profili di metilazione aberranti in geni obesogenici, tra cui *WT1* e *TNF-α* (31-32). In un altro studio, Bouchard et al. (33) hanno riportato differenze rilevanti nel profilo di metilazione del DNA e nel *Trascrittoma* a livello del tessuto adiposo di soggetti che rispondevano con successo (*high-responders*) alla riduzione dell'apporto calorico rispetto ai cosiddetti *non-responders* (*o low-responders*).

Parimenti alla RC, anche i periodi di digiuno potrebbero influenzare lo stato di salute e il rischio di malattia attraverso cambiamenti della metilazione del DNA. Ad esempio, gli individui con basso peso alla nascita (*Low Birth Weight*) presentano un maggiore rischio di sviluppare insulino-resistenza e DT2 durante la vita adulta, e rispondono in maniera significativamente differente al digiuno prolungato rispetto ai soggetti che avevano un peso alla nascita nella norma (*Normal Birth Weight*). Gli autori attribuiscono ciò all'aumento della metilazione a carico del gene *PPARGC1A* nel muscolo dei soggetti LBW (34). In uno studio più recente (35) gli stessi soggetti quando sottoposti a un periodo di digiuno di 36 ore mostravano differenze, a livello del grasso sottocutaneo, nel profilo di metilazione e di espressione di geni chiave del metabolismo, quali *ADIPOQ* e *LEP*. In particolare, i livelli di metilazione di *LEP* e *ADIPOQ* risultavano aumentati solo nei soggetti NBW, mentre nessuna differenza significativa si riscontrava nel grasso dei soggetti LBW. Questi dati supportano l'ipotesi secondo cui i soggetti con basso peso alla nascita mostrano una ridotta o minore capacità di adatta-

mento nel modificare il proprio assetto epigenetico quando sottoposti a *stress* metabolici. Ciò li esporrebbe a un rischio maggiore di sviluppare disturbi metabolici.

Alimentazione ad alto contenuto di grassi

Diversi sono anche gli studi, condotti sull'uomo e su modelli animali, che dimostrano come diete ad alto contenuto di grassi potrebbero innescare cambiamenti della metilazione del DNA a carico di geni coinvolti nel metabolismo energetico, i quali, una volta *disregolati*, predispongono all'insorgenza di disfunzioni metaboliche (Fig. 1; 36).

Soggetti umani, ad esempio, ipernutriti per cinque giorni con una dieta ricca di grassi sviluppavano alterazioni nel *Trascrittoma* e nel *Metiloma* sia a livello del tessuto adiposo che del muscolo scheletrico (11, 37-38). È molto interessante notare che, negli stessi soggetti, la sostituzione della dieta grassa con un regime alimentare normocalorico non era in grado di ripristinare profili epigenetici più favorevoli, suggerendo che cambiamenti nel pattern di metilazione in determinati *loci* possono accumularsi nel tempo rimanendo stabili. In un altro studio, la metilazione a carico del promotore del gene *PPARGC1A* nel muscolo scheletrico aumentava dopo cinque giorni di sovralimentazione da grassi (39). In questo caso, tuttavia, l'introduzione di una dieta a basso contenuto calorico ripristinava livelli normali di metilazione del gene *PPARGC1A*.

Numerosi altri studi hanno dimostrato che non solo la quantità, ma anche la composizione del grasso alimentare potrebbe avere profondi effetti sul rischio di sviluppare disturbi metabolici (40). A questo proposito, in uno studio controllato randomizzato Perfielyev et al. hanno confrontato gli effetti di una dieta ad alto contenuto di grassi saturi con quella ricca in grassi polinsaturi sui livelli globali di metilazione del DNA. Entrambi i trattamenti alimentari inducevano un aumento del peso corporeo accompagnato da un incremento dei livelli globali di metilazione del DNA a livello del tessuto adiposo. Tuttavia, in maniera sorprendente, i profili di metilazione del DNA a livello dei singoli geni mostravano una diversa regolazione a seconda del tipo di grasso somministrato. I geni implicati nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi risultavano particolarmente interessati da questi interventi nutrizionali (3, 41). Infine, Tobi et al. hanno dimostrato che l'esposizione in vitro di isole pancreatiche umane al palmitato causava profondi cambiamenti nel profilo di metilazione e di espressione di diversi geni, la cui alterata funzione comprometteva la secrezione insulinica osservata in questi studi (42).

METILAZIONE DEL DNA E MEDICINA DI PRECISIONE

Come illustrato nei paragrafi precedenti di questa rassegna, i cambiamenti nella metilazione del DNA nei tessuti metabolicamente rilevanti svolgono un ruolo importante nella patogenesi dell'obesità e del DT2. Queste evidenze hanno affascinato molti scienziati i cui sforzi, negli ultimi anni, sono stati finalizzati all'identificazione di biomarcatori epigenetici predittivi di suscettibilità all'insorgenza della malattia metabolica. Per conseguire tale obiettivo, la maggior parte degli studi si è concentrata sui tessuti facilmente accessibili, come ad esempio il sangue periferico e il cordone ombelicale (43). Ricerche recenti hanno infatti dimostrato che il sangue è un surrogato promettente per rilevare le modifiche epigenetiche che avvengono nei tessuti metabolicamente attivi e poco accessibili per le analisi (es. cellule β pancreatiche, tessuto adiposo, fegato e muscoli), quindi sembra rappresentare una fonte ideale e valida per l'individuazione di epibiomarcatori utilizzabili nella pratica clinica (43). A questo proposito, studi condotti su pazienti affetti da cancro hanno già dimostrato l'efficacia e l'accuratezza diagnostica dei marcatori molecolari basati sulla metilazione del DNA (44).

Numerosi sono anche gli studi prospettici che hanno indagato il potenziale utilizzo degli epigenotipi come biomarcatori per identificare soggetti che hanno maggior rischio di sviluppare obesità e DT2 (45). Significativo, a questo proposito, è lo studio prospettico effettuato da Godfrey et al. (46) su due coorti indipendenti. Esso ha dimostrato che, nel tessuto del cordone ombelicale, lo stato di metilazione del DNA nel promotore del gene che codifica per il recettore nucleare dei retinoidi (*RXRA*) è predittivo del grado di adiposità in età pediatrica e del rischio di DT2. In particolare, da questo studio è emerso che alti livelli di metilazione di uno specifico sito CpG nella regione promotrice del gene *RXRA* predico-

no una maggiore adiposità a 6 e a 9 anni. Parimenti importante è l'osservazione che una riduzione della metilazione a carico del gene *FTO* (*fat mass and obesity associated*) rappresenta un marcatore di rischio precoce per il DT2. *FTO* è un gene di rischio noto per lo sviluppo di obesità e DT2 (47). È interessante notare che il potere predittivo del pattern di metilazione dei loci *RXRA* e *FTO*, considerati nel loro insieme, è significativamente maggiore di quello di qualsiasi altra variante genetica finora descritta. Questi dati suggeriscono che le analisi epigenetiche nelle prime fasi della vita potrebbero identificare il rischio di sviluppo futuro di disturbi metabolici con un potere e un'accuratezza senza precedenti.

Più recentemente, altri studi hanno dimostrato un'associazione suggestiva tra alterazioni nella metilazione del DNA, adiposità e rischio di DT2. Infatti, il nostro gruppo ha dimostrato che la metilazione del gene *PTPRD*, già noto come locus di suscettibilità per il DT2, è alterata a livello dei preadipociti e nel sangue di individui con familiarità per il DT2. Il pattern di metilazione di *PTPRD* correlava in maniera significativa con l'aumentata ipertrofia adipocitaria a livello del grasso sottocutaneo degli individui analizzati. L'ipertrofia adipocitaria rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza di DT2 (48). Sempre nel nostro laboratorio, Desiderio et al. hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione inversa tra l'espressione di *ANKRD26*, gene associato allo sviluppo di obesità, e i suoi livelli di metilazione nei leucociti isolati da individui obesi (49). Da notare, il profilo epigenetico di *ANKRD26*, nei soggetti obesi, si associava ad un aumento di citochine pro-infiammatorie e ad un alterato metabolismo lipidico. In un altro studio, Sharp GC e collaboratori (50) hanno riportato che i figli di donne obese mostravano una serie di siti CpG differenzialmente metilati nel sangue del cordone ombelicale quando confrontati con i nati da madri normopeso. Coerentemente, come riportato in maniera elegante da Dalgaard et al., cambiamenti nella metilazione di geni appartenenti al *signaling* del gene *imprinato Trim28* nelle madri influenza in maniera significativa il rischio per la progenie di sviluppare malattie metaboliche (51). Senza dimenticare che il *Metiloma* nelle cellule ematiche è distinto tra obesi e individui di controllo, già in età pediatrica (52). In un altro studio, Dick KJ e collaboratori (53) hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione diretta tra aumento dell'IMC (Indice di Massa Corporea) e un incremento della metilazione a carico del gene *HIF3A* (*Hypoxia Inducible Factor 3A*) nelle cellule ematiche e nel tessuto adiposo degli stessi soggetti precedentemente analizzati (52). Ciò suggerisce che la perturbazione nella metilazione del DNA che coinvolge il network molecolare del gene *HIF3A* potrebbe rappresentare un marker di aumentata adiposità.

Altri studi hanno dimostrato che i cambiamenti nella metilazione del DNA potrebbero predire lo sviluppo futuro del DT2. Chambers et al. (54) ad esempio hanno analizzato i cambiamenti di metilazione del DNA associate al DT2 in campioni di sangue di 2664 indiani ed hanno replicato, in maniera sorprendente, i risultati dello studio in una popolazione indipendente di 1141 europei. Questi autori hanno evidenziato che le variazioni nella metilazione del DNA a carico dei loci *ABCG1*, *PHOSPHO1*, *SOC3*, *SREBF1* e *TXNIP* erano fortemente associate allo sviluppo futuro di DT2. Da notare, i livelli di metilazione a carico di questi geni quando considerati nel loro insieme sono in grado di predire il rischio futuro di DT2 indipendentemente dai fattori di rischio tradizionali per la malattia, tra cui la familiarità per il DT2, l'IMC e l'esercizio fisico. Questi epimarker di metilazione sono stati ulteriormente analizzati in un'altra coorte prospettica (*Botnia cohort*), dove è stata confermata solo l'associazione tra alterata metilazione dei geni *ABCG1* e *PHOSPHO1* e il rischio futuro di sviluppare DT2 (55). In particolare, questo studio ha evidenziato che il pattern di metilazione relativo al locus *ABCG1* è associato a un aumento del rischio, mentre i livelli di metilazione del gene *PHOSPHO1* si accompagnano a una riduzione del rischio di sviluppare DT2 in futuro. L'associazione tra i livelli di metilazione del gene *ABCG1* e l'incidenza di DT2 è stata riportata di recente anche in altri studi indipendenti (56-57). *ABCG1* gioca un ruolo importante nel trasporto del colesterolo e dei fosfolipidi (58). Da notare, le anomalie/alterazioni del metabolismo del colesterolo sono segni distintivi del DT2. Pertanto, un profilo di metilazione aberrante nel locus *ABCG1* potrebbe influenzare i livelli di colesterolo in circolo e contribuire così all'insorgenza e alla progressione del DT2 e di altri disturbi metabolici.

Anche l'invecchiamento è associato ad un maggiore rischio di sviluppare il DT2. A questo proposito, un recente EWAS (*Epigenome Wide Association Studies*) su profili di metilazione associati ad invecchiamento ha identificato siti CpG nei leucociti i cui livelli di metilazione rispecchiano quelli rilevati nelle isole pancreatiche umane. Alcune di queste alterazioni si associano a una compromessa capacità futura di secrezione insulinica e quindi al rischio futuro di sviluppare DT2 (59). Infine, in un altro studio EWAS, Wahl et al. (60) hanno identificato, in campioni di sangue intero ottenuti da circa

10.000 individui, 187 siti CpG significativamente associati all'obesità. Da notare, le variazioni di metilazione del DNA a carico di alcuni di questi siti predicevano il rischio futuro di ammalarsi di DT2.

La metilazione del DNA può essere utilizzata anche come biomarcatore predittivo di risposta al trattamento nutrizionale. Ad esempio, nello studio di intervento pubblicato da Cordero e collaboratori (61), 27 individui affetti da obesità sono stati sottoposti ad una dieta ipocalorica per 8 settimane. Al termine del trattamento, 21 soggetti manifestavano una risposta positiva all'intervento dietetico (calo ponderale maggiore del 5%), mentre i soggetti rimanenti sono stati considerati *non-responders*, dal momento che mostravano un calo ponderale inferiore al 5%. Da sottolineare che i soggetti che rispondevano al trattamento dietetico mostravano, al basale, una riduzione di metilazione nel promotore dei geni *LEP* e *TNFα* rispetto ai *non-responders*. Questi risultati suggeriscono che i livelli di metilazione di questi geni possono essere usati per predire la predisposizione al calo ponderale in seguito ad intervento nutrizionale. Inoltre, i soggetti definiti *responders*, che hanno mantenuto la riduzione del peso corporeo per i tre anni successivi dall'inizio del trattamento nutrizionale, mostravano livelli di metilazione del DNA simili ai soggetti normopeso, ma diversi rispetto alla loro controparte obesa (62).

Allo stesso modo, un intervento nutrizionale educativo per la perdita di peso in adolescenti sovrappeso e obesi ha evidenziato, in maniera interessante, che alterazioni dello stato di metilazione di geni correlati al metabolismo del glucosio, all'insulino-resistenza e all'infiammazione si associavano a disregolazione nel controllo del peso e a un alterato metabolismo glucidico e lipidico (63-64). Infine, Perfilyev et al. (41) hanno evidenziato un'associazione significativa tra la metilazione del DNA nel tessuto adiposo al basale e l'aumento di peso in risposta a un'assunzione di calorie in eccesso.

Molti marcatori epigenetici sono teoricamente reversibili, suggerendo che possibili terapie con molecole bioattive potrebbero favorire il ripristino di profili epigenetici più favorevoli. Quindi lo sviluppo di farmaci o il riconoscimento di componenti della dieta che possano modificare l'espressione genica mediante meccanismi epigenetici rappresentano una delle principali sfide dell'epigenetica. Finora sono stati identificati diversi agenti in grado di modificare i tratti epigenetici, inclusi gli inibitori delle DNMT (ad esempio l'azacitidina) e gli inibitori dell'istone deacetilasi, HDACi, (es. l'acido valproico, VPA) e la tricostatina A (TSA). I farmaci in grado di modulare i meccanismi epigenetici sono stati usati con successo e per lungo tempo in oncologia (65). Pertanto è ipotizzabile che taluni farmaci epigenetici possano avere effetti vantaggiosi o essere efficaci anche nel trattare le patologie metaboliche. Diverse sono infatti le evidenze che mostrano come gli HDACi regolano l'omeostasi del glucosio e la funzionalità delle isole pancreatiche umane (66). Ad esempio, l'MC1568, un inibitore selettivo di classe I delle HDACs, migliora la secrezione insulinica nelle isole pancreatiche di pazienti diabetici (67). L'MC1568 inibisce la HDAC7, la cui sovra-espressione nelle isole pancreatiche causa una compromissione della secrezione insulinica stimolata da glucosio che si accompagna ad una disfunzione mitocondriale (68). Uno degli epi-farmaci testati per il DT2 è il VPA, tuttavia i risultati dei test sinora ottenuti non hanno dato i risultati sperati (69-70). Di recente, invece, Bridgeman et al. hanno riesaminato gli effetti sulle modifiche epigenetiche della metformina (71). La metformina, noto agente antidiabetico, è in grado di modulare l'attività di numerosi enzimi modificatori dell'epigenoma come gli HDACi, l'istone acetiltransferasi (HAT) e le DNMTs, influenzando così la regolazione epigenetica dell'espressione genica. È stato suggerito che questi effetti possano essere alla base delle proprietà antidiabetiche della metformina. Nonostante i meccanismi molecolari responsabili dell'azione della metformina sull'epigenoma non sono stati completamente chiariti, l'utilizzo di questo farmaco appare molto promettente nel "targettare" l'epigenoma per trattare il DT2 e altri disturbi metabolici.

È bene ricordare che l'utilizzo dei farmaci epigenetici nella pratica clinica è fortemente influenzato dalla scarsa, o addirittura mancanza di specificità di azione che porterebbe all'insorgenza di effetti sistemici o globali avversi. Inoltre, il numero o la quantità di tratti epigenetici da correggere non è ad oggi noto. Tale problematica potrebbe non porsi nel trattamento del cancro, in quanto la metilazione del DNA è, nelle cellule cancerose rispetto a quelle normali, fortemente modificata e coinvolge aree genomiche più ampie; condizioni che permetterebbero di usare gli epifarmaci a dosi relativamente alte (72). Nei disturbi metabolici, invece, le differenze nella metilazione del DNA tra individui affetti e sani sono più modeste (circa il 10-20% al massimo), e principalmente avvengono in *loci* specifici (73). Pertanto,

lo sviluppo oppure il riconoscimento di molecole con un'azione modulatoria maggiormente selettiva sui processi epigenetici rappresenterebbe la strategia più efficace per sviluppare terapie di successo. Ad esempio, la ricerca di nutrienti e molecole presenti nel cibo in grado di modificare in maniera specifica l'epigenoma nei tessuti rilevanti per lo sviluppo dell'obesità e del DT2 potrebbe essere un approccio promettente per prevenire o trattare queste patologie.

CONCLUSIONI

In questa rassegna abbiamo citato numerosi studi che evidenziano una stretta connessione tra i fattori nutrizionali e cambiamenti nella metilazione del DNA nel contesto delle patologie metaboliche, in particolare l'obesità ed il DT2. Una migliore e profonda comprensione delle dinamiche molecolari che orchestrano la risposta epigenetica ai diversi regimi nutrizionali offrirà una nuova opportunità di indentificare predittori utili di rischio di DT2 e obesità, e di attuare una medicina preventiva, efficace e personalizzata. Tuttavia, molto rimane da risolvere poiché è necessario chiarire nel dettaglio i meccanismi di plasticità dell'epigenoma e come ciò determini lo sviluppo dei disordini metabolici.

BIBLIOGRAFIA

1. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, Powell C, Vedantam S, Buchkovich ML, Yang J, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 518: 197-206, 2015.
2. Raciti GA, Longo M, Parrillo L, Ciccarelli M, Mirra P, Ungaro P, Formisano P, Miele C, Béguinot F. Understanding type 2 diabetes: From genetics to epigenetics. *Acta Diabetol* 52: 821-827, 2015.
3. Cheng Z, Zheng L, Almeida FA. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: Nutritional factors and beyond. *J Nutr Biochem* 54: 1-10, 2018.
4. Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Béguinot F, Raciti, GA. Epigenetics: Spotlight on type 2 diabetes and obesity. *J Endocrinol Invest* 39: 1095-1103, 2016.
5. Multhaup ML, Seldin MM, Jaffe AE, Lei X, Kirchner H, Mondal P, Li Y, Rodriguez V, Drong A, Hussain M, et al. Mouse-human experimental epigenetic analysis unmasks dietary targets and genetic liability for diabetic phenotypes. *Cell Metab* 21: 138-149, 2015.
6. Szabó M, Máte B, Csép K, Benedek T. Epigenetic modification linked to T2D, the heritability gap, and potential targets. *Biochem Genet* 56: 553-574, 2018.
7. Cheng Z, Almeida FA. Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: An epigenetic link. *Cell Cycle* 13: 890-897, 2014.
8. Van Dijk SJ, Tellam RL, Morrison JL, Muhlhausler BS, Molloy PL. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clin Epigenetics* 7(66), 2015.
9. Leung A, Parks BW, Du J, Trac C, Setten R, Chen Y, Brown K, Lusis AJ, Natarajan R, Schones, DE. Open chromatin profiling in mice livers reveals unique chromatin variations induced by high fat diet. *J Biol Chem* 289: 23557-23567, 2014.
10. De Castro Barbosa T, Ingerslev LR, Alm PS, Versteyhe S, Massart J, Rasmussen M, Donkin I, Sjögren R, Mudry JM, Vetterli L, et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab* 5: 184-197, 2015.
11. Jacobsen SC, Gillberg L, Bork-Jensen J, Ribel-Madsen R, Lara E, Calvanese V, Ling C, Fernandez AF, Fraga MF, Poulsen P, et al. Young men with low birthweight exhibit decreased plasticity of genome-wide muscle DNA methylation by high-fat overfeeding. *Diabetologia* 57: 1154-1158, 2014.
12. Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* 6: 2165-2178, 2014.
13. Li Y. Epigenetic mechanism link maternal diets and gut microbiome to obesity in the offspring. *Front Genet* 9(342), 2018.
14. Zhang Y, Kutateladze TG. Diet and the epigenome. *Nat Commun* 9(3375), 2018.

15. Parrillo L, Costa V, Raciti GA, Longo M, Spinelli R, Esposito R, Nigro C, Vastolo V, Desiderio A, Zatterale F, et al. *Hoxa5* undergoes dynamic DNA methylation and transcriptional repression in the adipose tissue of mice exposed to high-fat diet. *Int J Obes* 40: 929-937, 2016.
16. Raciti GA, Nigro C, Longo M, Parrillo L, Miele C, Formisano P, Béguinot F. Personalized medicine and type 2 diabetes: Lesson from epigenetics. *Epigenomics* 6: 229-238, 2014.
17. Xiao FH, Wang HT, Kong QP. Dynamic DNA methylation during aging: A “prophet” of age-related outcomes. *Front Genet* 10(107), 2019.
18. Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci* 39: 310-318, 2014.
19. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes* 8(148), 2017.
20. Longo M, Raciti GA, Zatterale F, Parrillo L, Desiderio A, Spinelli R, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Hoffmann JM, Nigro C, et al. Epigenetic modifications of the *Zfp/ZNF423* gene control murine adipogenic commitment and are dysregulated in human hypertrophic obesity. *Diabetologia* 61: 369-380, 2018.
21. Fuks F, Hur, PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278: 4035-4040, 2003.
22. Robertson, KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6: 597-610, 2005.
23. Côté S, Gagné-Ouellet V, Guay SP, Allard C, Houde AA, Perron P, Baillargeon JP, Gaudet D, Guérin R, Brisson D, et al. *PPARGC1α* gene DNA methylation variations in human placenta mediate the link between maternal hyperglycemia and leptin levels in newborns. *Clin Epigenetics* 8 (72), 2016.
24. Andrews SV, Sheppard B, Windham GC, Schieve LA, Schendel DE, Croen LA, Chopra P, Alisch RS, Newschaffer CJ, Warren ST, et al. Case-control meta-analysis of blood DNA methylation and autism spectrum disorder. *Mol Autism* 9(40), 2018.
25. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab* 25: 27-42, 2017.
26. Langley-Evans SC. Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review. *J Hum Nutr Diet* 28: 1-14, 2015.
27. Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 94: 2242-2263, 2012.
28. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17046-17049, 2008.
29. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, Slagboom PE, Heijmans BT. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 18: 4046-4053, 2009.
30. Di Francesco A, Di Germanio C, Bernier M, de Cabo R. A time to fast. *Science* 362: 770-775, 2018.
31. Campión J, Milagro FI, Goyenechea E, Martínez JA. TNF- α promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity* 17: 1293-1297, 2009.
32. Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martínez JA. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. *Mol Asp Med* 34: 782-812, 2013.
33. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Pérusse L, Vohl MC. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 91: 309-320, 2010.
34. Jørgensen SW, Brøns C, Bluck L, Hjort L, Færch K, Thankamony A, Gillberg L, Friedrichsen M, Dunger D.B, Vaag AA. Metabolic response to 36 hours of fasting in young men born small vs. appropriate for gestational age. *Diabetologia* 58: 178-187, 2015.
35. Hjort L, Jørgensen SW, Gillberg L, Hall E, Brøns C, Frystyk J, Vaag AA, Ling C. 36 h fasting of young men influences adipose tissue DNA methylation of *LEP* and *ADIPOQ* in a birth weight-dependent manner. *Clin Epigenetics* 9(40), 2017.

36. Samblas M, Milagro FI, Martíne, A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. *Epigenetics* 14: 421-444, 2019.
37. Gillberg L, Perfilyev A, Brøns C, Thomasen M, Grunnet LG, Volkov P, Rosqvist F, Iggman D, Dahlman I, Risérus U, et al. Adipose tissue transcriptomics and epigenomics in low birthweight men and controls: Role of high-fat overfeeding. *Diabetologia* 59: 799-812, 2016.
38. Jacobsen SC, Brøns C, Bork-Jensen J, Ribel-Madsen R, Yang B, Lara E, Hall E, Calvanese V, Nilsson E, Jørgensen SW, et al. Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia* 55: 3341-3349, 2012.
39. Brøns C, Jacobsen SC, Nilsson E, Ronn T, Jensen CB, Storgaard H, Poulsen P, Groop L, Ling C, Asturp A, et al. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3048-3056, 2010.
40. Ludwig DS, Willett WC, Volek JS, Neuhouser ML. Dietary fat: From foe to friend? *Science* 362: 764-770, 2018.
41. Perfilyev A, Dahlman I, Gillberg L, Rosqvist F, Iggman D, Volkov P, Nilsson E, Risérus U, Ling C. Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: A randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 105: 991-1000, 2017.
42. Hall E, Volkov P, Dayeh T, Bacos K, Rönn T, Nitert MD, Ling C. Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Med* 12(103), 2014.
43. Willmer T, Johnson R, Louw J, Pfeiffer C. Blood-based DNA methylation biomarkers for type 2 diabetes: Potential for clinical applications. *Front Endocrinol* 9(744), 2018.
44. Oussalah A, Rischer S, Bensenane M, Conroy G, Filhine-Tresarrieu P, Debarb R, Forest-Tramoy D, Josse T, Reinicke D, Garcia M, et al. Plasma mSEPT9: A novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* 30: 138-147, 2018.
45. Gillberg L, Ling C. The potential use of DNA methylation biomarkers to identify risk and progression of type 2 diabetes. *Front Endocrinol* 6(43), 2015.
46. Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD, Lillycrop KA, Burdge GC, McLean C, Rodford J, Slater-Jefferies JL, Garratt E, Crozier SR, et al. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* 60: 1528-1534, 2011.
47. Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NF, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 20: 371-375, 2014.
48. Parrillo L, Spinelli R, Longo M, Desiderio A, Mirra P, Nigro C, Fiory F, Hedjazifar S, Mutarelli M, Carissimo A, Formisano P, Miele C, Smith U, Raciti GA, Beguinot F. Altered PTPRD DNA methylation associates with restricted adipogenesis in healthy first-degree relatives of Type 2 diabetes subjects. *Epigenomics* 2020 May; 12(10): 873-888. doi: 10.2217/epi-2019-0267. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32483983.
49. Desiderio A, Longo M, Parrillo L, Campitelli M, Cacace G, de Simone S, Spinelli R, Zatterale F, Cabaro S, Dolce P, Formisano P, Milone M, Miele C, Beguinot F, Raciti GA. Epigenetic silencing of the ANKRD26 gene correlates to the pro-inflammatory profile and increased cardio-metabolic risk factors in human obesity. *Clin Epigenetics* 2019 Dec 4; 11(1): 181. doi: 10.1186/s13148-019-0768-0. PMID: 31801613; PMCID: PMC6894277.
50. Sharp GC, Lawlor DA, Richmond RC, Fraser A, Simpkin A, Suderman M, Shihab HA, Lyttleton O, McArdle W, Ring SM, et al. Maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain, offspring DNA methylation and later offspring adiposity: Findings from the Avon longitudinal study of parents and children. *Int J Epidemiol* 44: 1288-1304, 2015.
51. Dalgaard K, Landgraf K, Heyne S, Lempradl A, Longinotto J, Gossens K, Ruf M, Orthofer M, Strogantsev R, Selvaraj M, et al. Trim28 haploinsufficiency triggers bi-stable epigenetic obesity. *Cell* 164: 353-364, 2016.
52. Rhee JK, Lee JH, Yang HK, Kim TM, Yoon KH. DNA Methylation profiles of blood cells are distinct between early-onset obese and control individuals. *Genom Inf* 15: 28-37, 2017.

53. Dick, KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, Medur, E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, et al. DNA methylation and body-mass index: A genome-wide analysis. *Lancet* 383: 1990-1998, 2014.
54. Chambers JC, Loh M, Lehne B, Drong A, Kriebel J, Motta V, Wahl S, Elliott HR, Rota F, Scott WR, et al. Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: A nested case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 3: 526-534, 2015.
55. Dayeh T, Tuomi T, Almgren P, Perflyev A, Jansson PA, de Mello VD, Pihlajamäki J, Vaag A, Groop L, Nilsson E, et al. DNA methylation of *loci* within ABCG1 and PHOSPHO1 in blood DNA is associated with future type 2 diabetes risk. *Epigenetics* 11: 482-488, 2016.
56. Kriebel J, Herder C, Rathmann W, Wahl S, Kunze S, Molnos S, Volkova N, Schramm K, Carstensen-Kirberg M, Waldenberger M, et al. Association between DNA methylation in whole blood and measures of glucose metabolism: KORA F4 study. *PLoS ONE* 11: e0152314, 2016.
57. Walaszczyk E, Luijten M, Spijkerman AMW, Bonder MJ, Lutgers HL, Snieder H, Wolffenbuttel BHR, van Vliet-Ostaptchouk JV. DNA methylation markers associated with type 2 diabetes, fasting glucose and HbA1c levels: A systematic review and replication in a case-control sample of the lifelines study. *Diabetologia* 61: 354-368, 2018.
58. Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arter Thromb Vasc Biol* 30: 139-143, 2010.
59. Bacos K, Gillberg L, Volkov P, Olsson AH, Hansen T, Pedersen O, Gjesing AP, Eiberg H, Tuomi T, Almgren P, et al. Blood-based biomarkers of age-associated epigenetic changes in human islets associate with insulin secretion and diabetes. *Nat Commun* 7(11089), 2016.
60. Wahl S, Drong A, Lehne B, Loh M, Scott WR, Kunze S, Tsai P.-C, Ried JS, Zhang W, Yang Y, et al. Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature* 541: 81-86, 2017.
61. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, Martinez JA. Leptin and TNF- α promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 67: 463-470, 2011.
62. Huang YT, Maccani JZJ, Hawley NL, Wing RR, Kelsey KT, McCaffery JM. Epigenetic patterns in successful weight loss maintainers: A pilot study. *Int J Obes* 39: 865-868, 2015.
63. Nicoletti CF, Nonino CB, de Oliveira, BA, Pinhel MA, Mansego ML, Milagro FI, Zulet MA, Martinez JA. DNA methylation and hydroxymethylation levels in relation to two weight loss strategies: Energy-restricted diet or bariatric surgery. *Obes Surg* 26: 603-611, 2016.
64. McEwen LM, Gatev EG, Jones MJ, MacIsaac JL, McAllister MM, Goulding RE, Madden KM, Dawes MG, Kobor MS, Ashe MC. DNA methylation signatures in peripheral blood mononuclear cells from a lifestyle intervention for women at midlife: A pilot randomized controlled trial. *Appl Physiol Nutr Metab* 43: 233-239, 2018.
65. Stathis A, Hotte SJ, Chen EX, Hirte HW, Oza AM, Moretto P, Webster S, Laughlin A, Stayner LA, McGill S, et al. Phase I study of decitabine in combination with vorinostat in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res* 27(3528), 2009.
66. Lundh M, Galbo T, Poulsen SS, Mandrup-Poulsen T. Histone deacetylase 3 inhibition improves glycaemia and insulin secretion in obese diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 17: 703-707, 2015.
67. Daneshpajoo M, Eliasson L, Bacos K, Ling C. MC1568 improves insulin secretion in islets from type 2 diabetes patients and rescues β -cell dysfunction caused by Hdac7 upregulation. *Acta Diabetol* 55: 1231-1235, 2018.
68. Daneshpajoo M, Bacos K, Bysani M, Bagge A, Ottosson Laakso E, Vikman P, Eliasson L, Mulder H, Ling C. HDAC7 is overexpressed in human diabetic islets and impairs insulin secretion in rat islets and clonal beta cells. *Diabetologia* 60: 116-125, 2017.
69. Zuo S, Fries B.E, Szafara K, Regal R. Valproic Acid as a potentiator of metabolic syndrome in institutionalized residents on concomitant antipsychotics: Fat chance, or slim to none? *Pharm Ther* 40: 126-132, 2015.
70. Avery LB, Bumpus NN. Valproic acid is a novel activator of AMP-activated protein kinase and decreases liver mass, hepatic fat accumulation, and serum glucose in obese mice. *Mol Pharm* 85: 1-10, 2014.

71. Bridgeman SC, Ellison GC, Melton PE, Newsholme P, Mamotte CDS. Epigenetic effects of metformin: From molecular mechanisms to clinical implications. *Diabetes Obes Metab* 20: 1553-1562, 2018.
72. Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer* 13: 497-510, 2013.
73. Kirchner H, Sinha I, Gao H, Ruby MA, Schönke M, Lindvall JM, Barrès R, Krook A, Näslund E, Dahlman-Wright K, et al. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Mol Metab* 5: 171-183, 2016.