



PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO

Epigenética y Ganadería

Inmaculada Martín Burriel

Facultad de Veterinaria

Universidad de Zaragoza

minma@unizar.es



Epigenética y Ganadería

1. Introducción a la epigenética
2. Mecanismos epigenéticos
3. Epigenética y herencia
4. Epigenética y producción animal
5. Epigenética y sanidad animal
6. Aplicación del estudio epigenético
7. Tecnologías para el estudio de modificaciones epigenéticas
8. Estudio de casos prácticos





1

Introducción a la epigenética


Definición y conceptos básicos

Genética vs epigenética

Epigenética y regulación de la expresión
génica

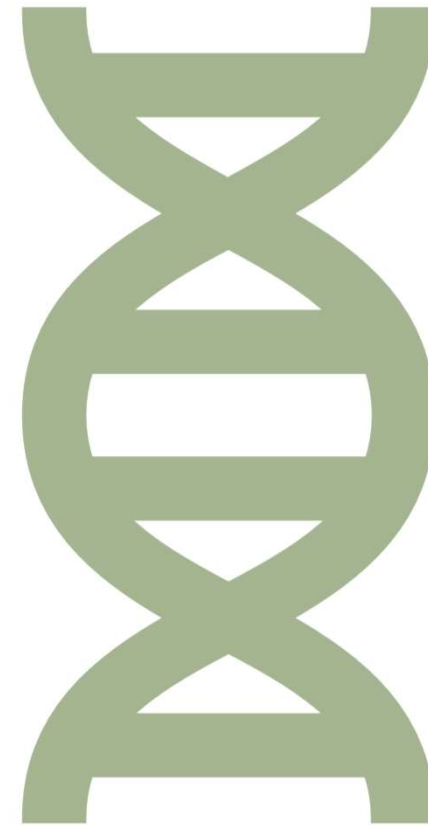


Epigenética

- La rama de la biología que estudia las **interacciones causales** entre los genes y sus productos que dan vida al **fenotipo** (Conrad Waddington, 1942).
 - El estudio de los cambios **hereditarios** en la **expresión génica** que **no** involucran **cambios en la secuencia de DNA** (Robin Holliday, 1987).
 - El estudio de los cambios en la **función genética** que son **heredables** mitótica y/o meióticamente y que **no** implican un **cambio en la secuencia de DNA** (Wu et al., 2001).
- 

Genética y Epigenética

- Estudian los genes
- Los cambios estudiados son heredables
- Ambas estudian el control de la formación y funciones de un determinado organismo





Genética y Epigenética ¿Qué estudian?

Genética (Nature)

- Los genes/caracteres y su herencia de una generación a otra
- La estructura y función de los genes (secuencia DNA)
- Las variaciones consecuencia de mutaciones
- La transmisión de caracteres basadas en la segregación y combinación de alelos

Epigenética (Nurture)

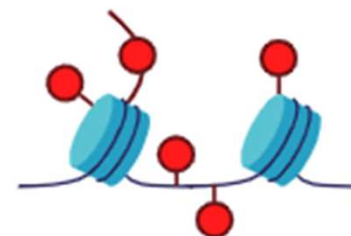
- Los cambios de expresión génica heredables independientes a la secuencia de DNA
- Las modificaciones químicas del DNA.
- Las variaciones consecuencia del ambiente
- Estudia los mecanismos que regulan la actividad génica



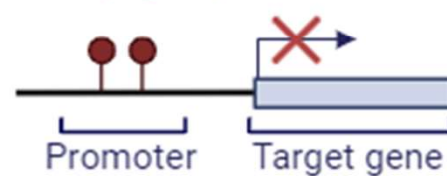


Cambios en la expresión génica

Modificaciones epigenéticas



Methyl group



Importancia en ganadería

- Salud / Sanidad animal

- Patogenia de las enfermedades
- Diagnóstico
- Respuesta a medicamentos
- Fertilidad y éxito reproductivo



- Producción

- Crecimiento
- Calidad de la carne
- Producción de leche
- Resistencia a enfermedades
- Adaptación a cambios ambientales





2

Mecanismos epigenéticos

Metilación del DNA

Modificación de histonas

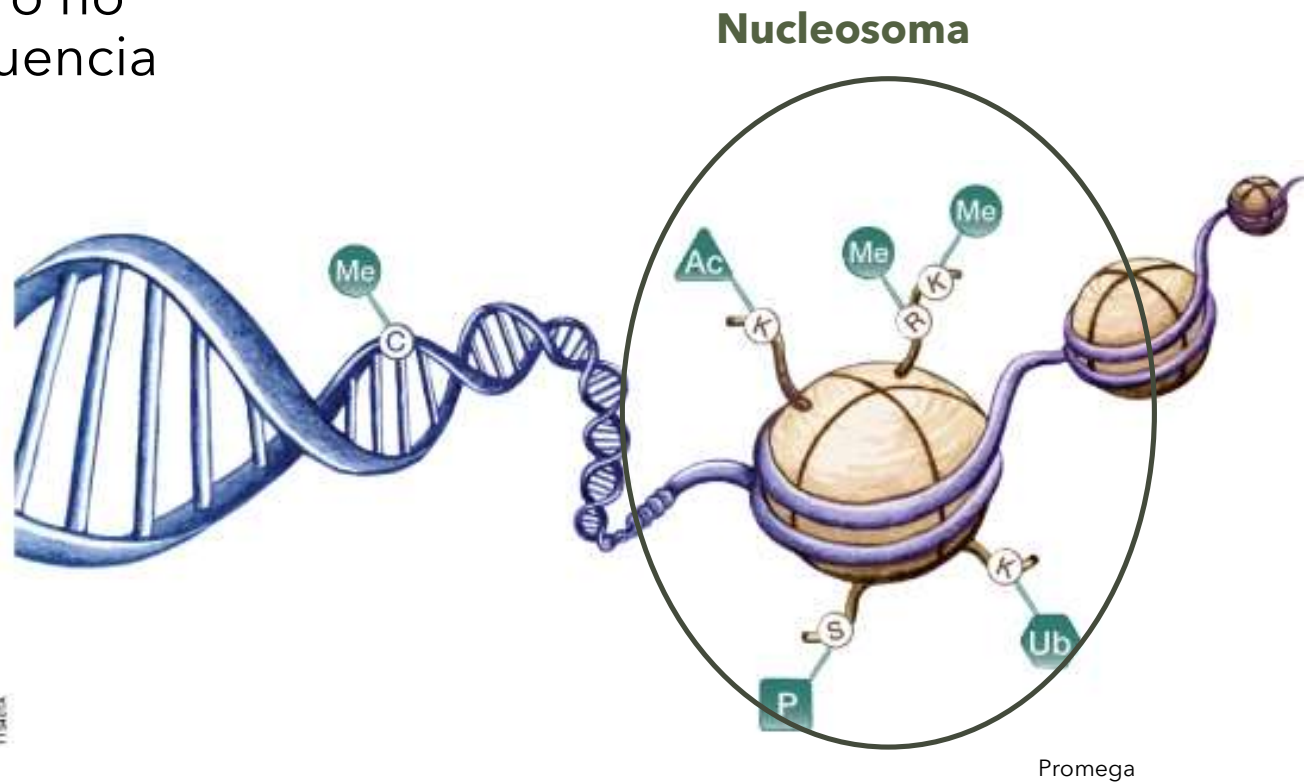
RNA no codificante

Organización genómica 3D

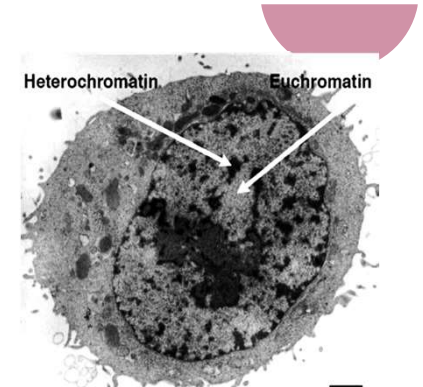
Metilación del RNA

Epigenética

- Cambios en la función/expresión de los genes que se heredan, pero no conllevan alteración de la secuencia



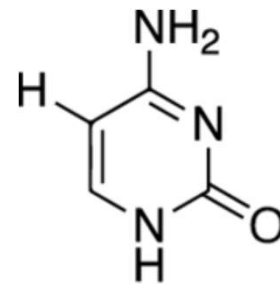
Recuerdo: Cromatina



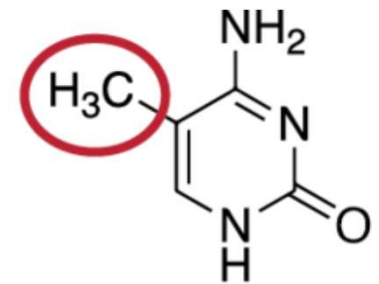
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00814265>

	HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA	HETEROCROMATINA FACULTATIVA	EUCROMATINA
Actividad transcripcional	Inactiva	Inactiva	Activa
Empaqueta- miento	Denso	Modificable	Laxo
Efectos	Genes silenciados permanentemente	Genes silenciados temporalmente	Accesible factores nucleares y transcripción
Ejemplo	Centrómero y Telómeros	Cromosoma X en hembras	Mayoría del DNA

Metilación del DNA $C \rightarrow 5mC$

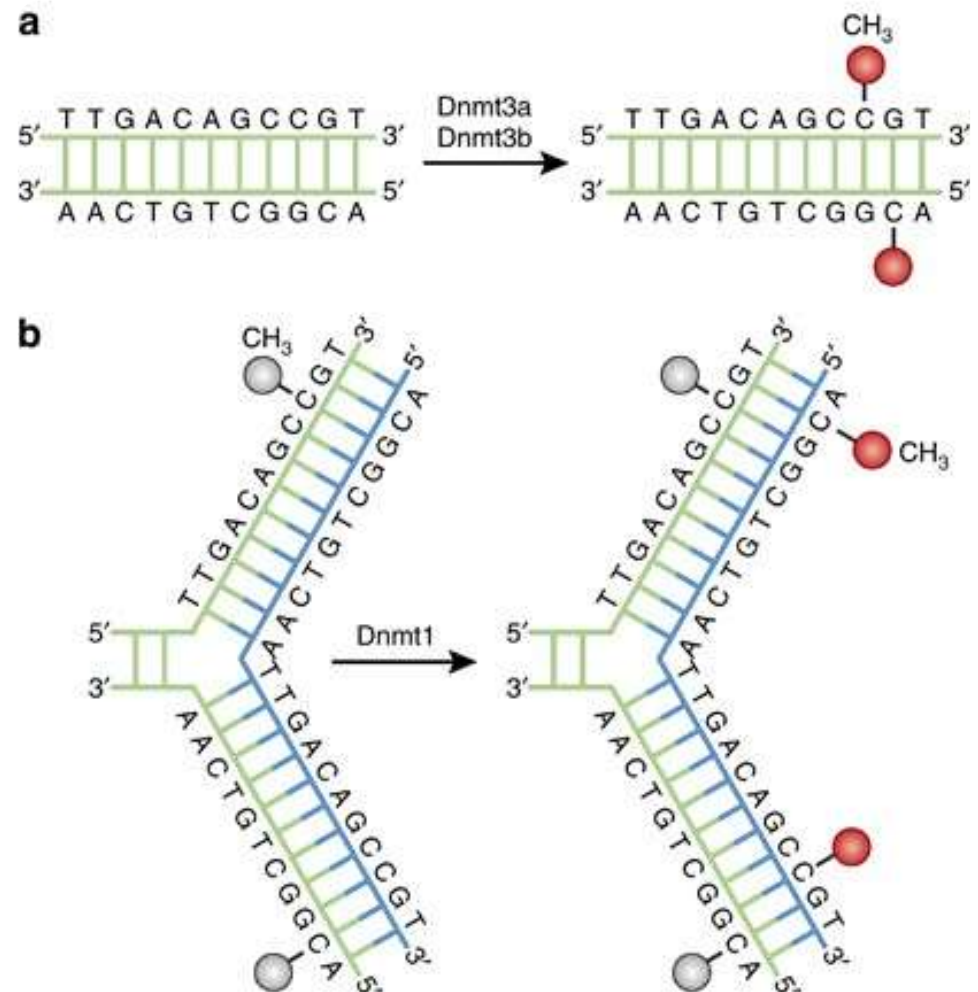


Cytosine



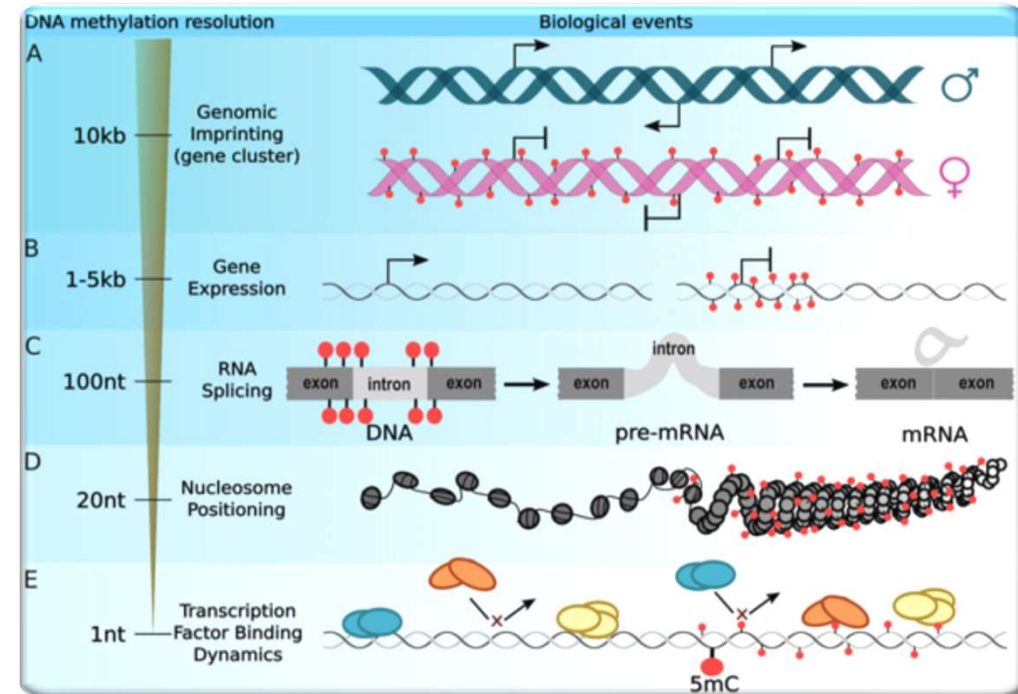
methylated Cytosine

Metilación del DNA



Funciones de la metilación del DNA

- Impronta génica
- Inactivación del cromosoma X
- La influencia en la expresión génica depende de la secuencia genética en la que se encuentre.
 - Región intergénica → Silenciar elementos retrovirales
 - Regular la expresión específica de tejido



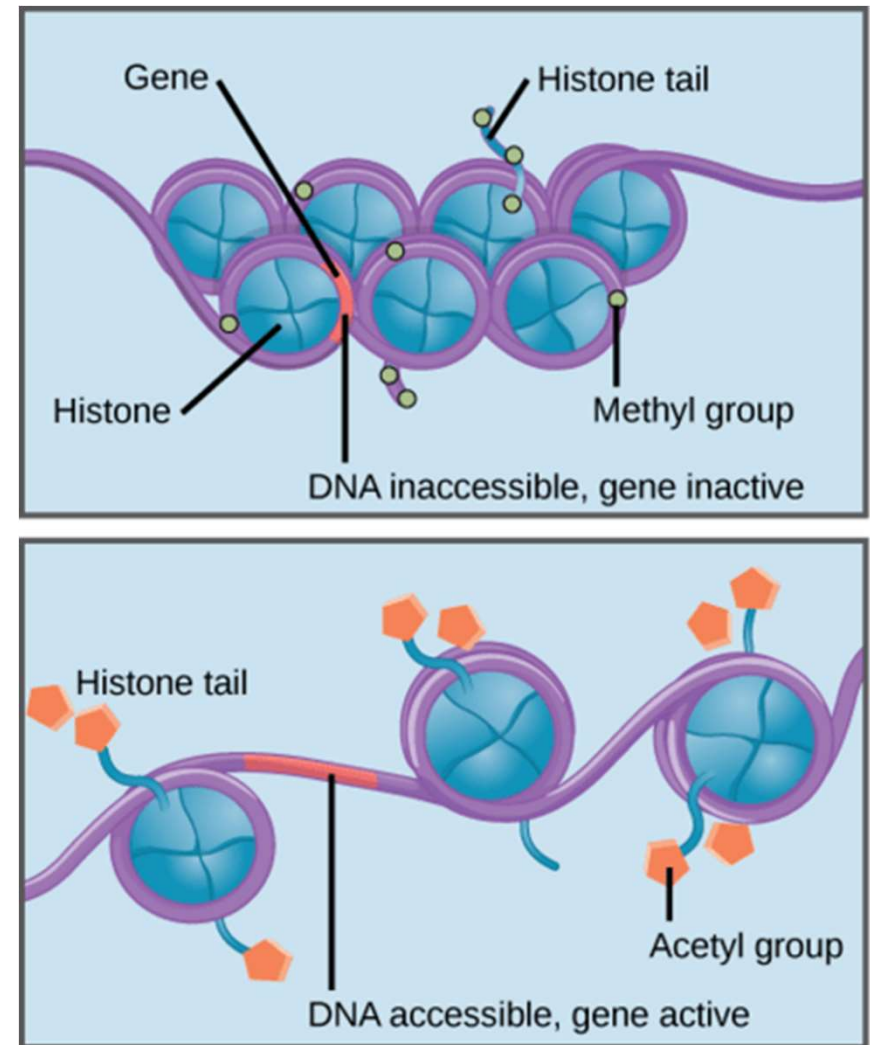
Metilación del DNA

- 5mC constituye únicamente ~1% del ácido nucleico del genoma humano
- En mamíferos: 70-80 % de C metiladas ocurre en los sitios CpG (5' C-fosfato-G-3')
- El genoma de mamíferos no tiene muchos sitios CpG por su potencial mutagénico (5mC → T por desaminación)
- La mayoría de los sitios CpG distribuidos por el genoma están metilados excepto las islas CpG.



Islas CpG

- Son extensiones de DNA de aproximadamente 1000 bp (inicialmente > 200 bp) con una alta densidad de C + G (> 65 %).
- Aproximadamente **el 70 % de los genes humanos presentan islas CpG en sus promotores:**
 - Todos los constitutivos
 - 50 % genes con expresión específica de tejido
- Las islas CpG asociadas a promotores están muy conservadas en mamíferos.
- Normalmente estas islas están **protegidas de la metilación.**
- Asociadas a modificaciones de histonas, regulan la estructura de la cromatina y la unión de factores de transcripción.






Islas CpG y expresión génica

La mayor parte se encuentran no metiladas, aunque no se exprese el gen.

Los promotores con islas CpG presentan múltiples sitios de inicio de transcripción (no cajas TATA). También constituyen orígenes de replicación.

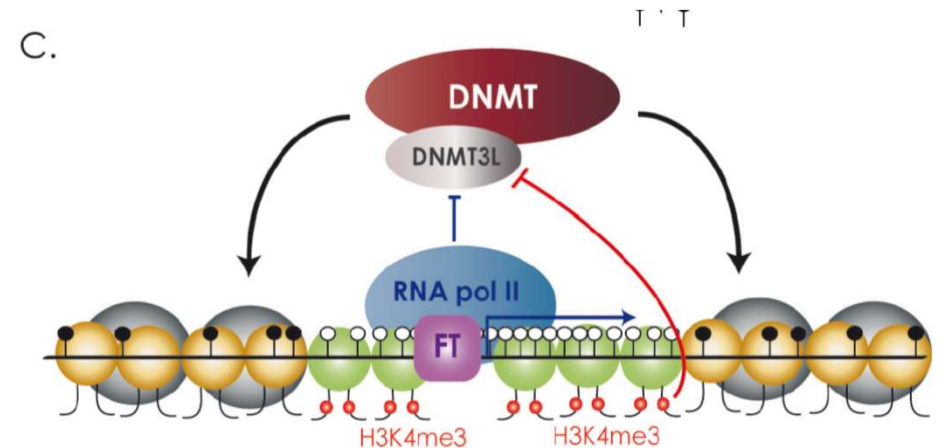
Las islas CpG asociadas a los inicios de expresión de la transcripción raramente muestran patrones específicos de metilación en distintos tejidos.

La metilación de regiones limítrofes (hasta 2kb) a las islas CpG (CpG island shores) tienen metilación específica de tejido. Estas regiones están relacionadas con la represión génica.



Islas CpG intragénicas

- Solo la mitad están relacionadas con inicios de transcripción y están anotadas, el resto son islas huérfanas: intergénicas e intragénicas.
- Identificadas con herramientas bioinformáticas (contenido en CpG > 50 % y más de 200 bp).
- Presentan sitios de unión de RNA Pol II → Promotores de genes no anotados, ncRNA
- Más probabilidad de estar metiladas y tener metilación específica de tejido.



Reverón Gómez .2011

Metilación en el cuerpo del gen



Metilación en sitios pasado el exón 1



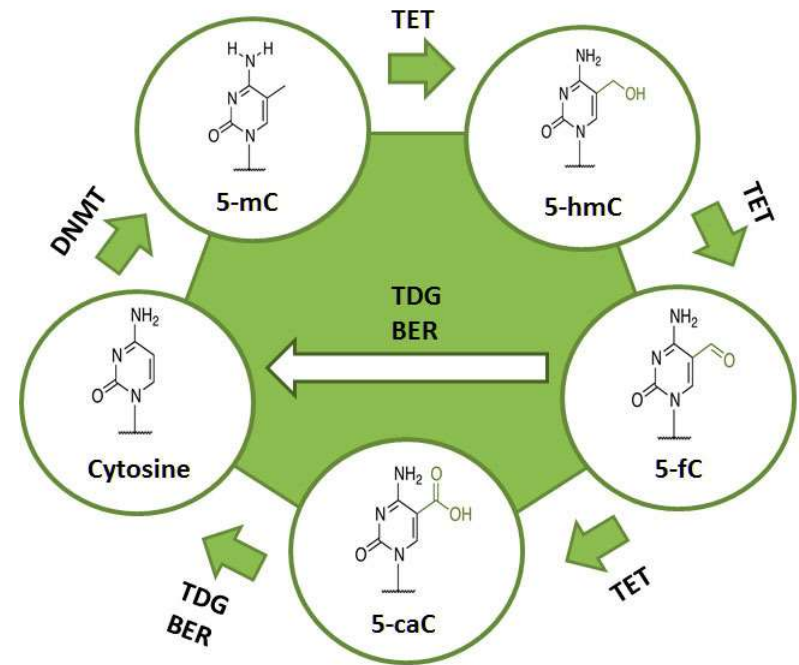
Asociado con incremento de expresión génica en células en división.



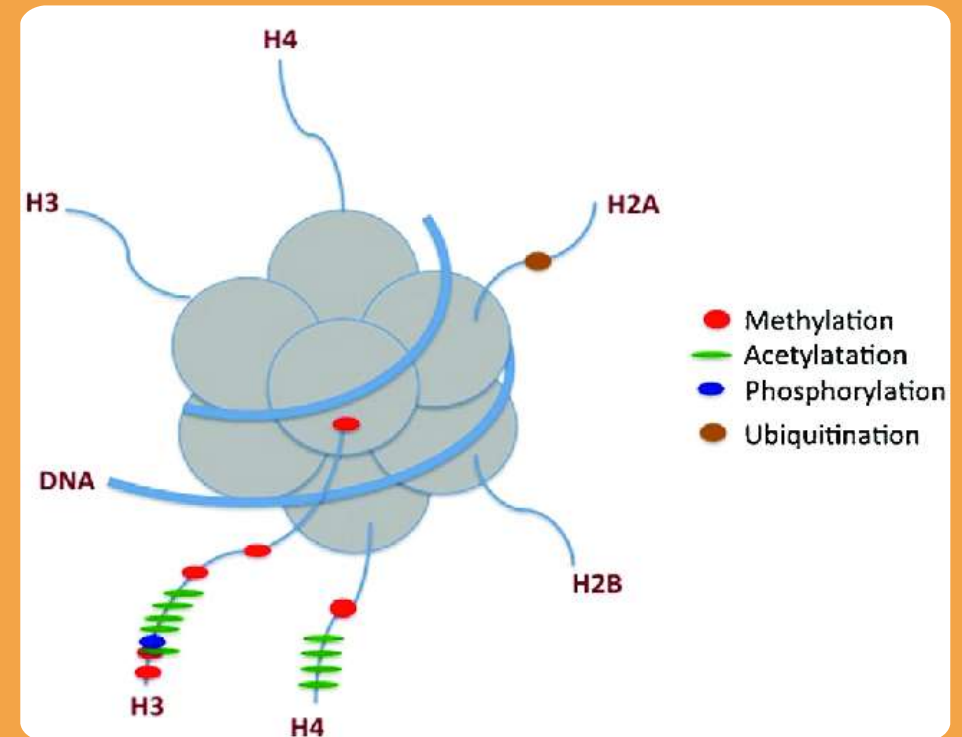
Controversia en su papel en la regulación: en algunos tejidos está asociado a la represión génica

Derivados oxidados de 5mC

- Función desconocida:
 - ¿Simple proceso de desmetilación o marcas epigenéticas?
 - 5hmC enriquecido en SINEs y LTR también en promotores, cuerpos génicos y áreas intergénicas en cerebro y ESC
 - 5fC, 5caC enriquecido en repeticiones satélites
 - Distinta afinidad por ciertas proteínas



Modificación de Histonas



Modificación de histonas (PTM)

¿Qué? Acetilación, Metilación, Ubiquitinación, Fosforilación, ADP-ribosilación, Sumoilación....

¿Dónde? En las colas de las histonas expuestas hacia el lumen del núcleo
(Acetilación: En los Aa lisina de grupos N-terminal)

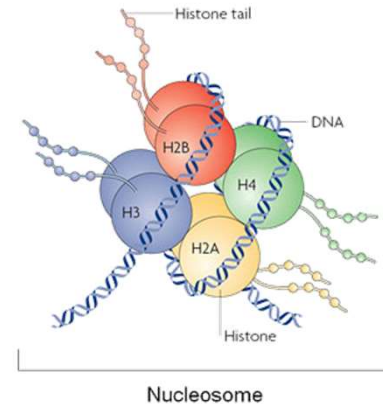
¿Quién? Proteínas específicas para cada residuo:

Writers: Añaden las modificaciones a las histonas. Pej. HATs, HPs, HMTs...

Erasers: Eliminan las modificaciones. Pej. HDACs, HDMTs.

Readers: Detectan la existencia de las PTMs en las histonas
si es necesario o no añadir/eliminar las modificaciones

Reclutan writers/erasers

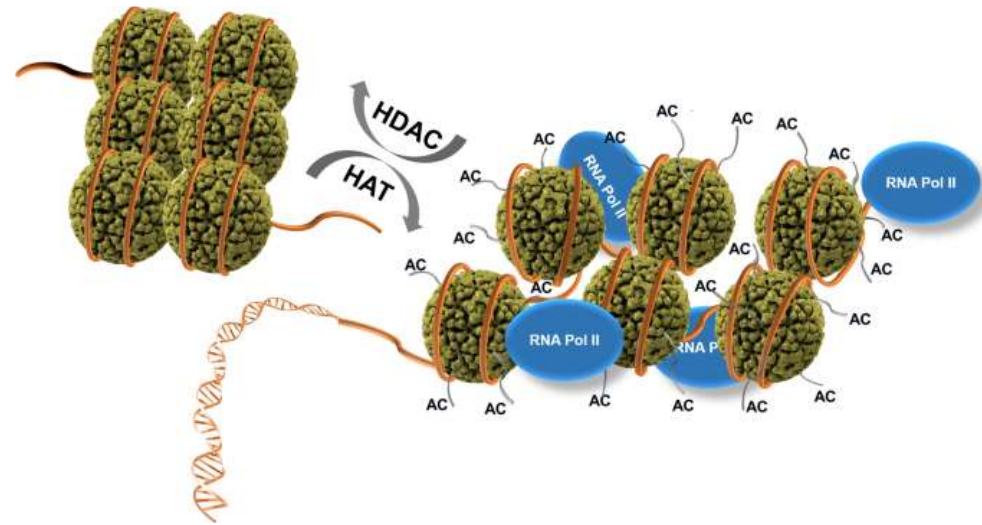


¿Cuándo? La mayoría ocurren durante la meiosis y primera fase preimplantación del feto.

— Durante la vida debido a factores como estrés, alimentación o mutaciones

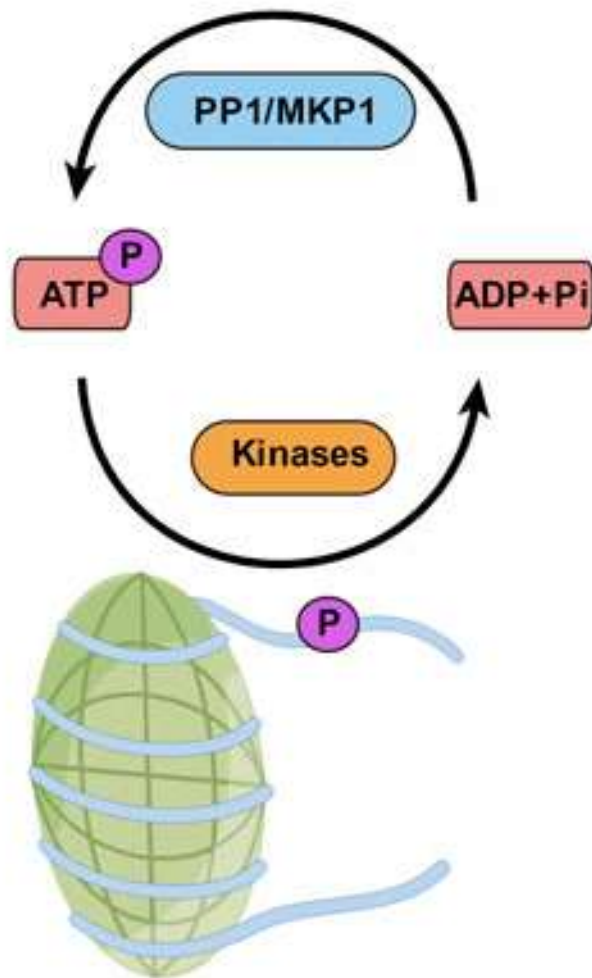
Acetilación de histonas

- **Neutraliza la carga positiva** de las **lisinas** y debilita la interacción entre el DNA y las histonas.
- Regulación altamente dinámica por la acción opuesta de las enzimas **Histona acetil transferasas (HATs)** y las **Histona deacetilasas (HDACs)**.
- Se acetilan múltiples sitios en la **cola de lisinas** N-terminal pero también en el **cuerpo** de la histona.
- Las **HDACs** estabilizan la cromatina y son represores transcripcionales.
- Enriquecimiento de **acetilación** en amplificadores (*enhancers*)



<https://www.nature.com/articles/s12276-020-0382-4>

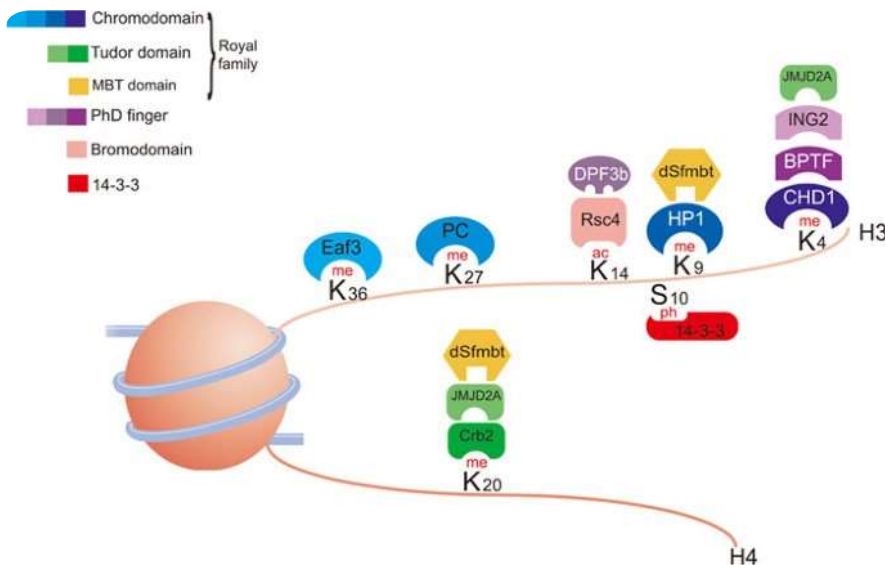
Histone Phosphorylation/dephosphorylation



Fosforilación de histonas

- Tiene lugar en **serinas, treoninas y tirosinas** de la **cola** N terminal, principalmente, aunque también han sitios en el **cuerpo** de la histona.
- Controlada por **quinasas y fosfatasa**s.
- Añade **carga negativa** a las histonas, influenciando la estructura de la proteína.
- Aunque hay menos sitios modificables que los sometidos a acetilación, producen **grandes cambios estructurales** de la cromatina.

Metilación de histonas

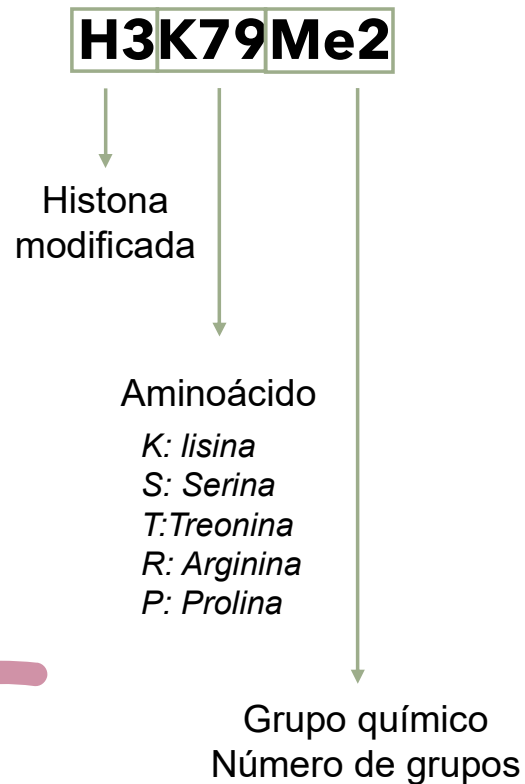


<https://www.nature.com/articles/cr201122>

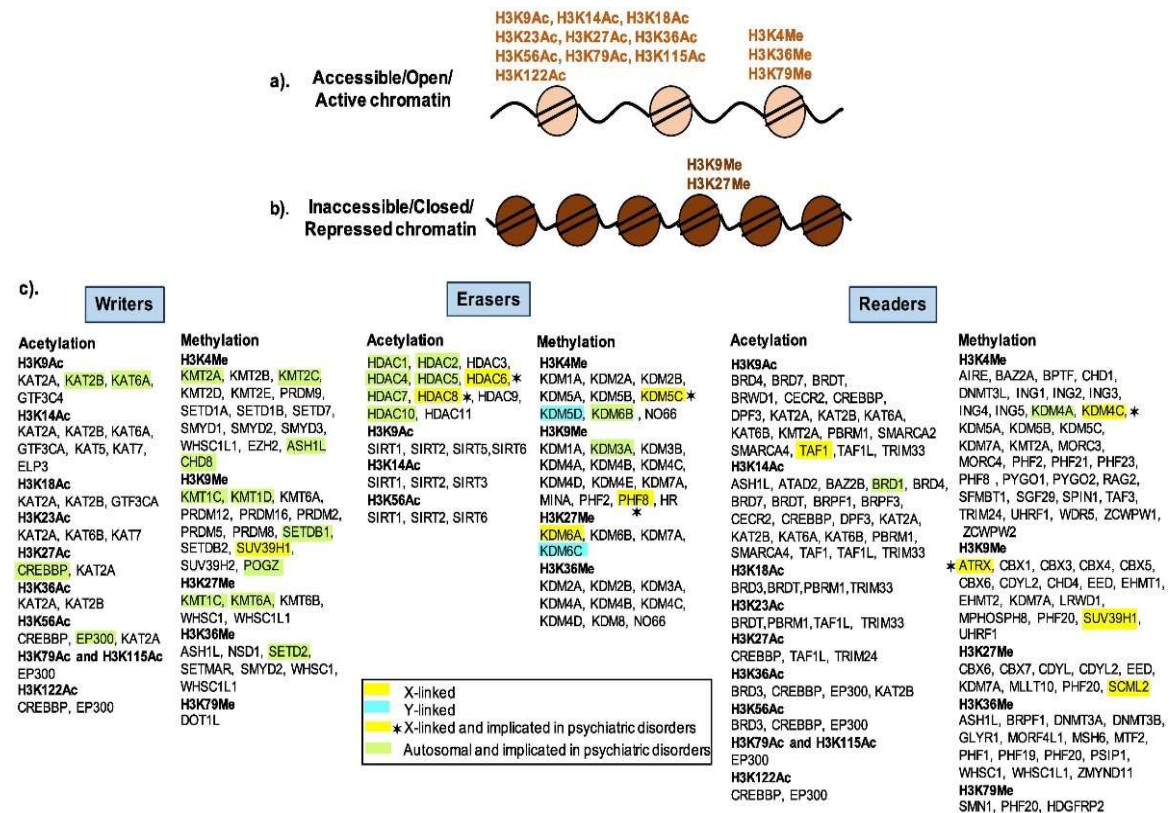
- Principalmente ocurre en **las cadenas de lisinas**.
- **No altera la carga** de las histonas.
- Complejidad en la modificación:
 - Lysinas mono-, di- o tri-metiladas
 - Argininas mono, simétricamente o asimétricamente di-metiladas.
- **Regulan la unión de factores** a la cromatina
 - hay más dominios que reconocen Kme que cualquier otro tipo de modificación

¿Qué efectos tiene cada PTM?

Nomenclatura PTM histonas



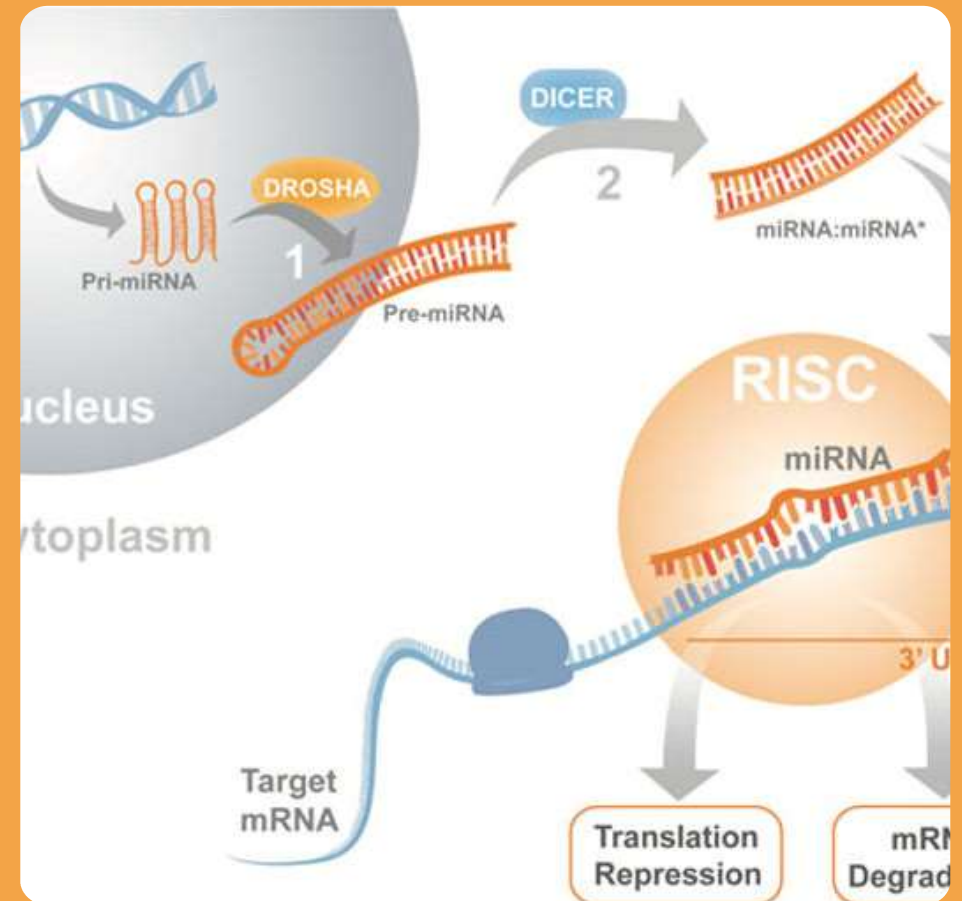
Ejemplo PTMs histona 3 (la más estudiada)



¿Qué efectos tiene cada PTM?

PTM	Histone (position)	Effects on transcription
Acetylated lysine (Kac)	H3 (9,14,18,56) H4 (5,8,13,16) H2A H2B	Activation
Phosphorylated serine/threonine (S/Tph)	H3 (3,10,28) H2A H2B	Activation
Methylated arginine (Rme)	H3 (17,23) H4 (3)	Activation
Methylated lysine (Kme)	H3 (4,36,79) H3 (9,27) H4(20)	Activation Repression
Ubiquitylated lysine (Kub)	H2B (123,120) H2A (119)	Activation Repression
Sumoylated lysine (Ksu)	H2B (6,7) H2A (126)	Repression
Isomerized proline (Pisom)	H3 (30-38)	Activation Repression

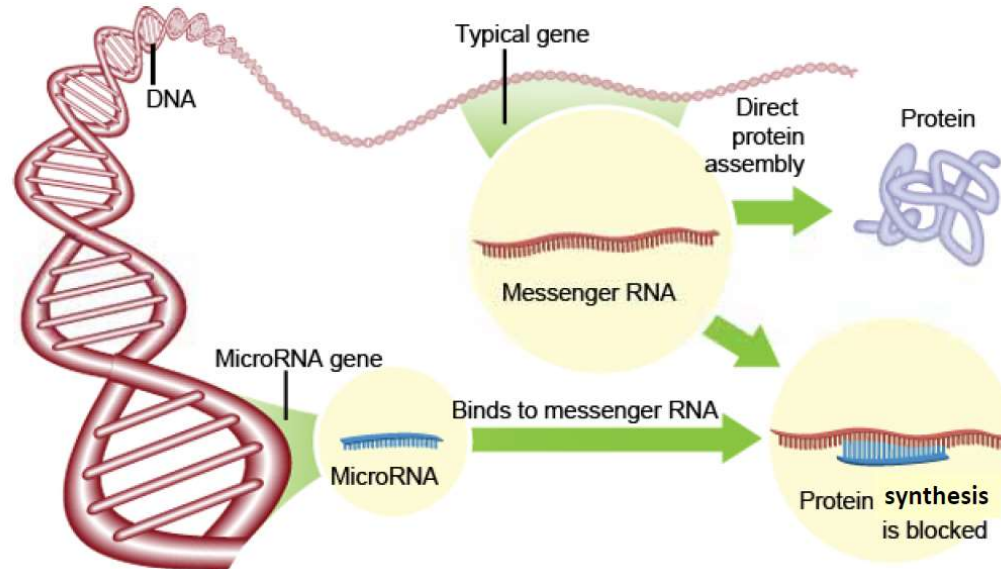
MicroRNAs



microRNAs

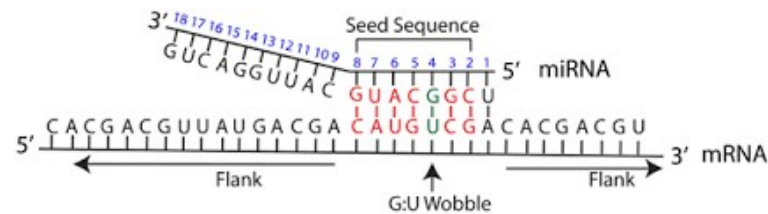


- Los microRNA (miRNA) son una clase de RNA no codificante pequeño (~ 22 nucleótidos) que regulan postranscripcionalmente la expresión génica al interactuar con los mRNA diana.
- Generalmente considerados como **reguladores negativos** de la expresión génica, disminuyendo la estabilidad de los mRNA diana o limitando su traducción.

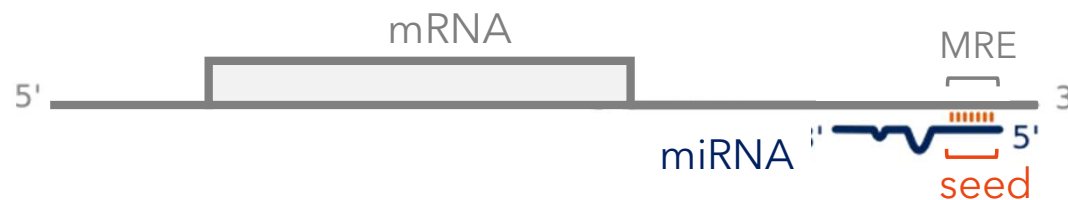


microRNA

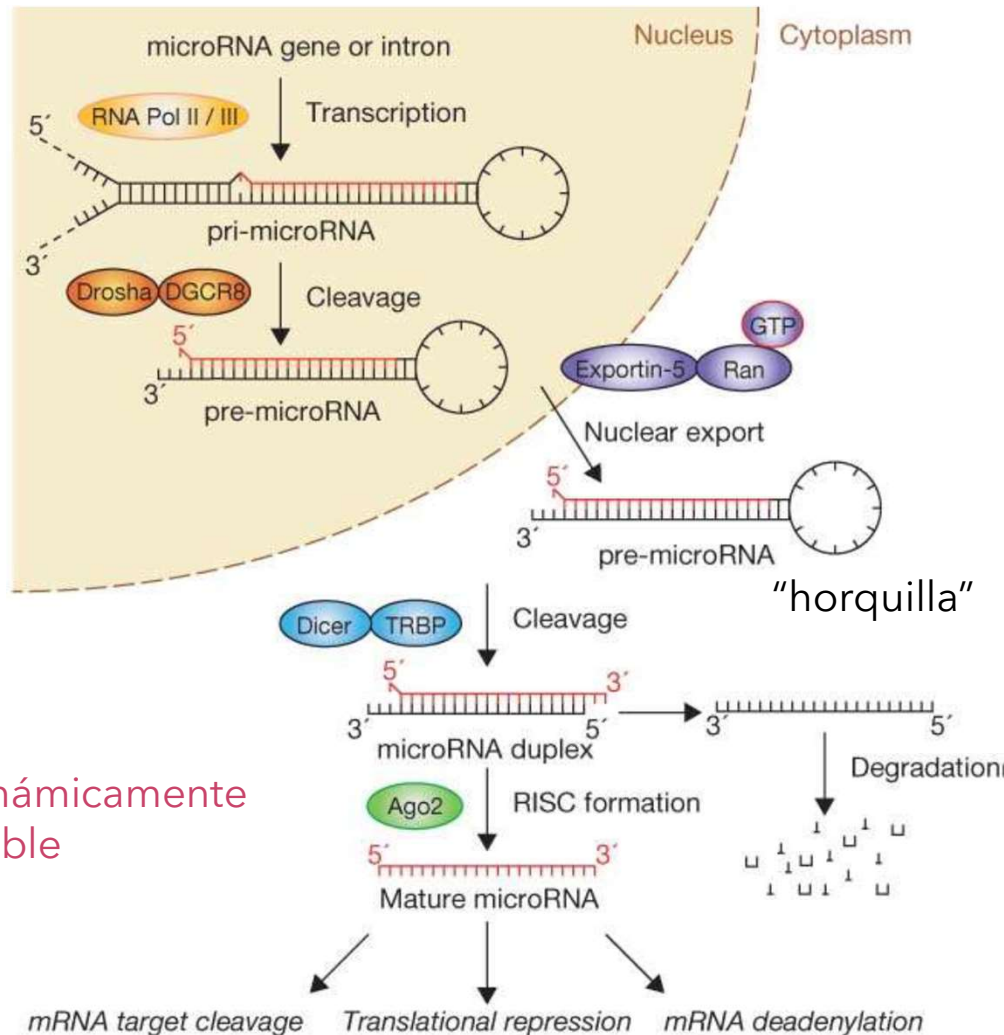
- Los miRNA actúan a través de la unión complementaria específica de su región "semilla" (seed) de 6 - 8 nucleótidos de longitud.



- Se unen normalmente con su mRNA diana en regiones no traducidas (UTR), llamadas elementos de respuesta de miRNA (MRE).



microRNA



cadena
termodinámicamente
más estable

Antes se nombraban el miRNA
mas estable “miR-XXX”, y lo
menos estable “miR-XXX*”

Ahora los nombres refieren a
Su posición relativa en la horquilla

En este caso:

miR-342* = miR-342-3p

miR-342 = miR-342-5p


cadena con menos
estabilidad
termodinámica

microRNAs



Aunque cualquiera de las dos cadenas del miRNA dúplex puede actuar potencialmente como un miRNA funcional, solo una hebra generalmente se incorpora en el miRISC donde el miRNA y su mRNA diana interactúa.

Stem-loop sequence hsa-mir-206

Accession	MI0000490 (change log)
Symbol	HGNC:MIR206
Description	<i>Homo sapiens</i> miR-206 stem-loop
Gene family	MIPF0000038; mir-1
Literature search	 292 open access papers mention hsa-mir-206 (1926 sentences)
Stem-loop	<pre> u c cc u g uu 5' gcuu ccgagggccacaugcuuuuuuuuu ccaua g a a 3' ugaa ggcuuu ggugugugaaggaaugua gguauc u c c g c -a - g uu</pre> <p>Get sequence</p>
Deep sequencing	45586 reads, 375 reads per million, 124 experiments
Confidence	Annotation confidence: not enough data Feedback: Do you believe this miRNA is real? <input type="button" value="Yes (+44)"/> <input type="button" value="No (-3)"/> <input type="button" value="Leave comment"/>

hsa-miR-342

[1355616](#) reads, [2.37e+03](#) reads per million, 160 experiments



hsa-miR-146a

[501920](#) reads, [777](#) reads per million, 159 experiments



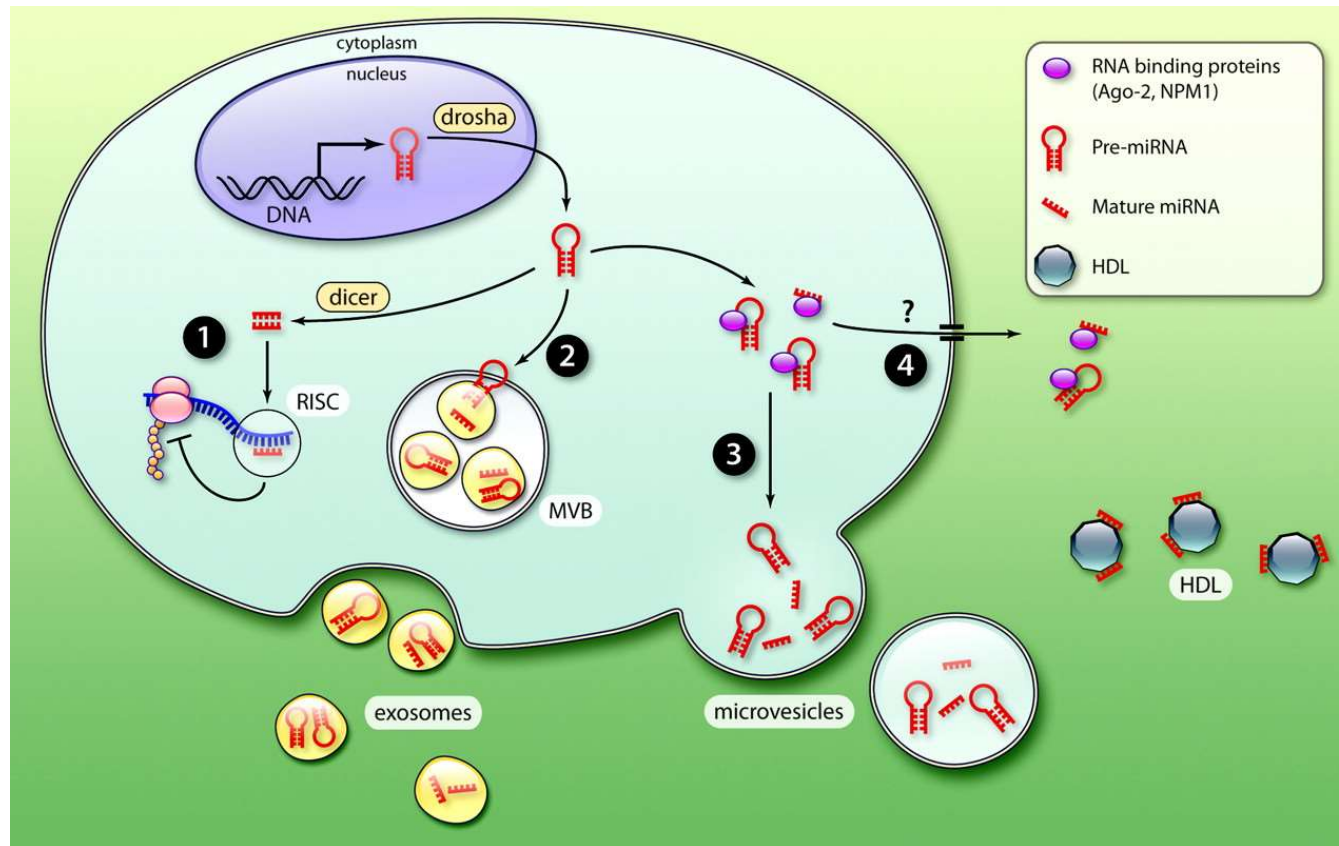
hsa-miR-100

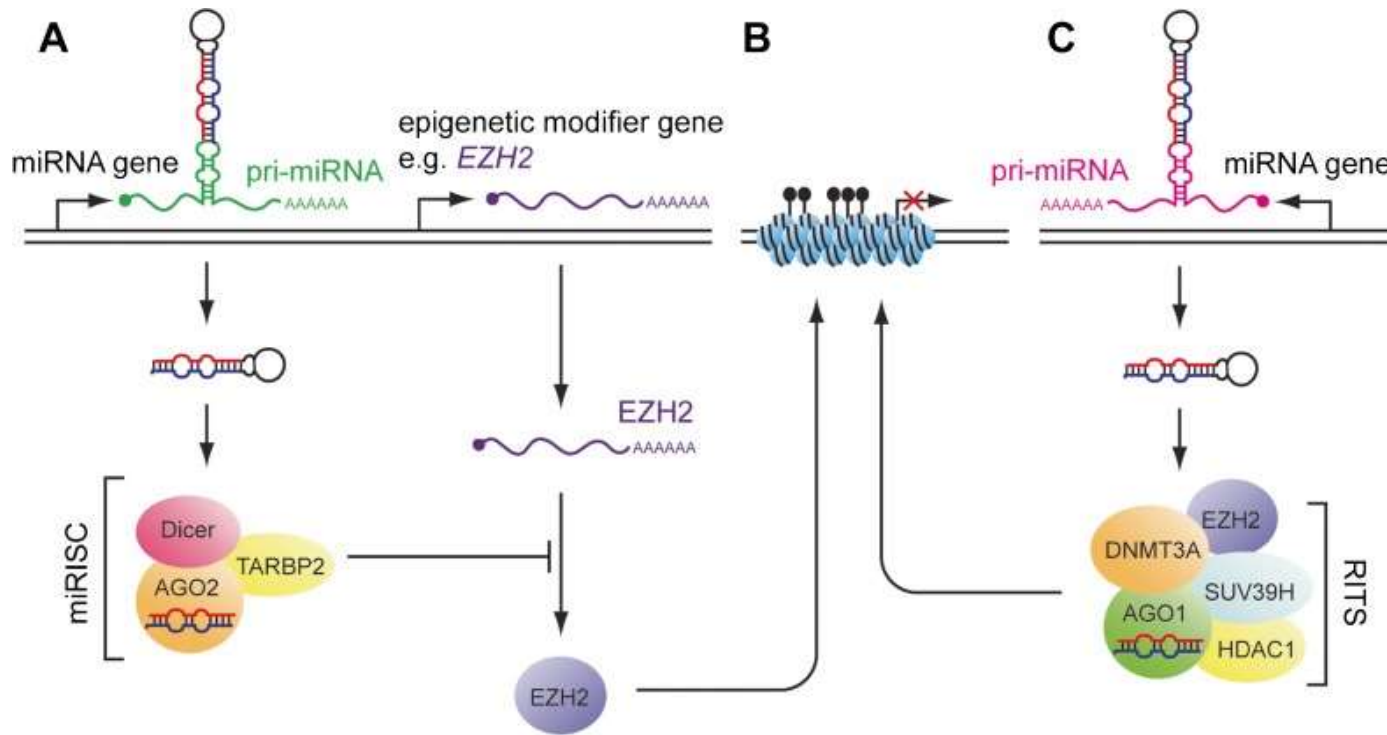
[5736096](#) reads, [1e+04](#) reads per million, 159 experiments



microRNAs

Además de su importante papel regulador en una variedad de procesos biológicos, los miRNA también **pueden ser liberados a la circulación** por tejidos patológicamente afectados y mostrar una notable estabilidad en los fluidos corporales.

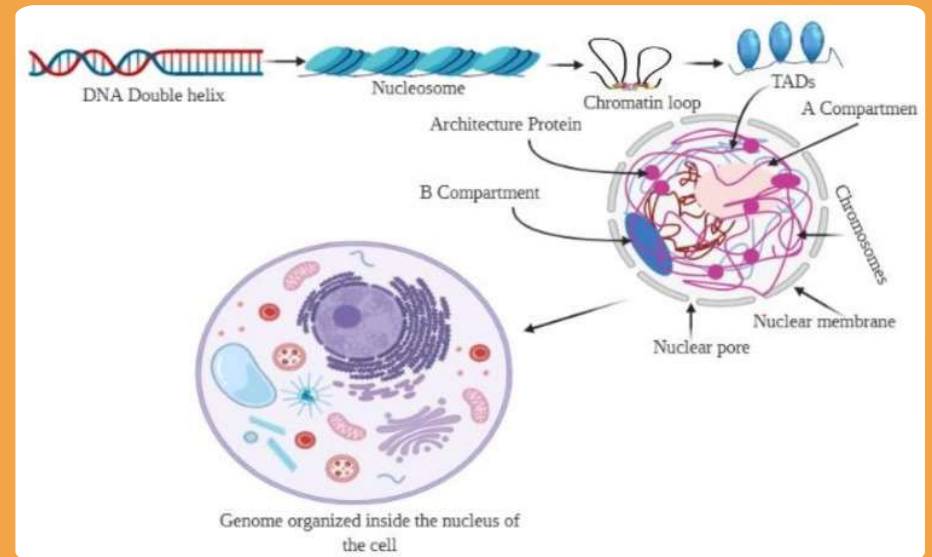




Varela et al. 2013

Control epigenético de los microRNA

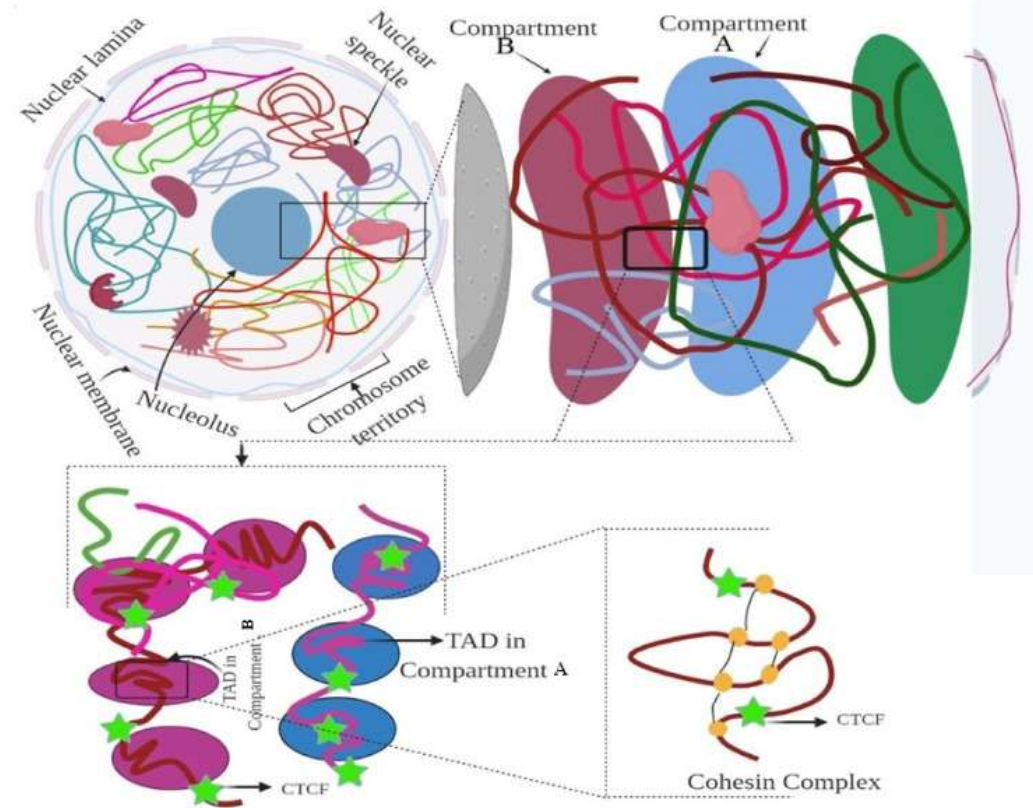
Organización 3D del genoma

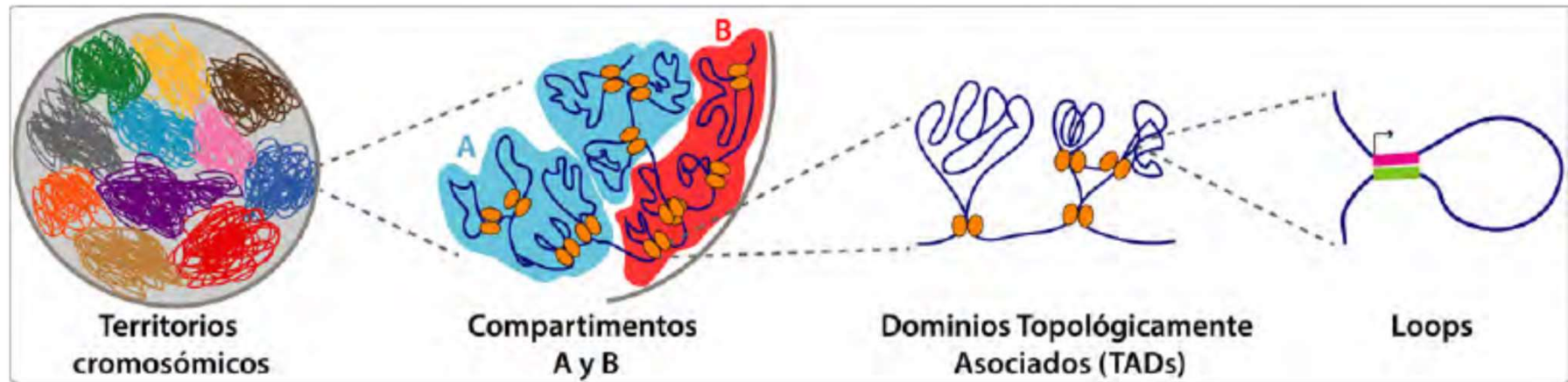


La posición de un locus dentro del núcleo está relacionada con su expresión.

Los genes de la periferia tienden a ser heterocromatina y no se expresan.

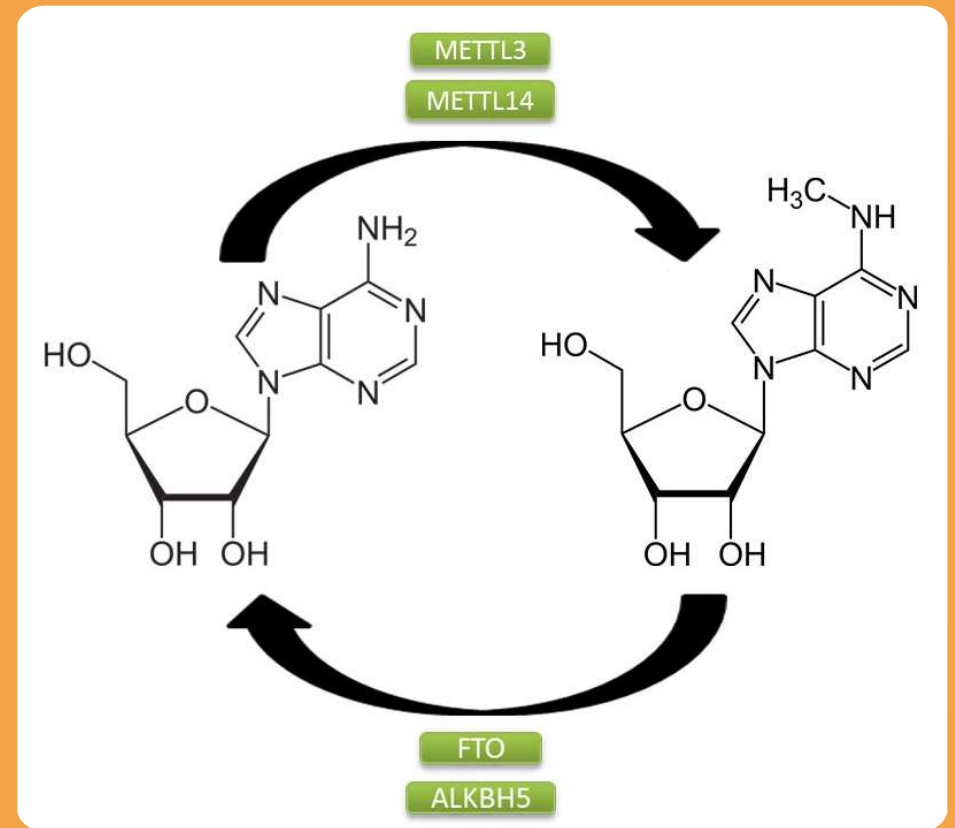
Los genes más en núcleo interior son eucromatina activa.

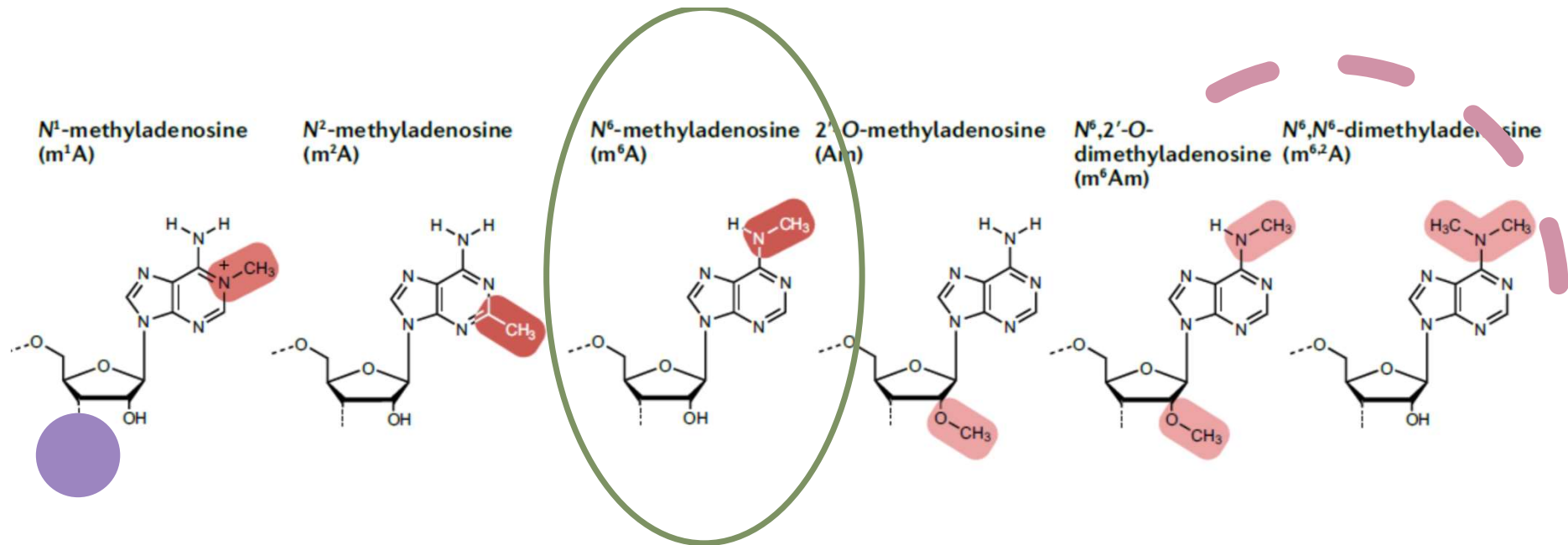




- **Territorio cromosómico:** espacio que ocupa cada cromosoma en el núcleo
- **Compartimentos:** Dentro de cada cromosoma hay regiones de eucromatina (cromatina abierta, compartimento A) y de heterocromatina (cromatina cerrada, compartimento B)
- Cada compartimento tiene **dominios topológicamente asociados (TAD)** donde se aíslan elementos del genoma (genes con sus elementos reguladores).
- Los TAD están separados por **aisladores** que generalmente contienen genes constitutivos de cromatina abierta.
- La alteración de las fronteras aisladoras impacta en la expresión de los genes.

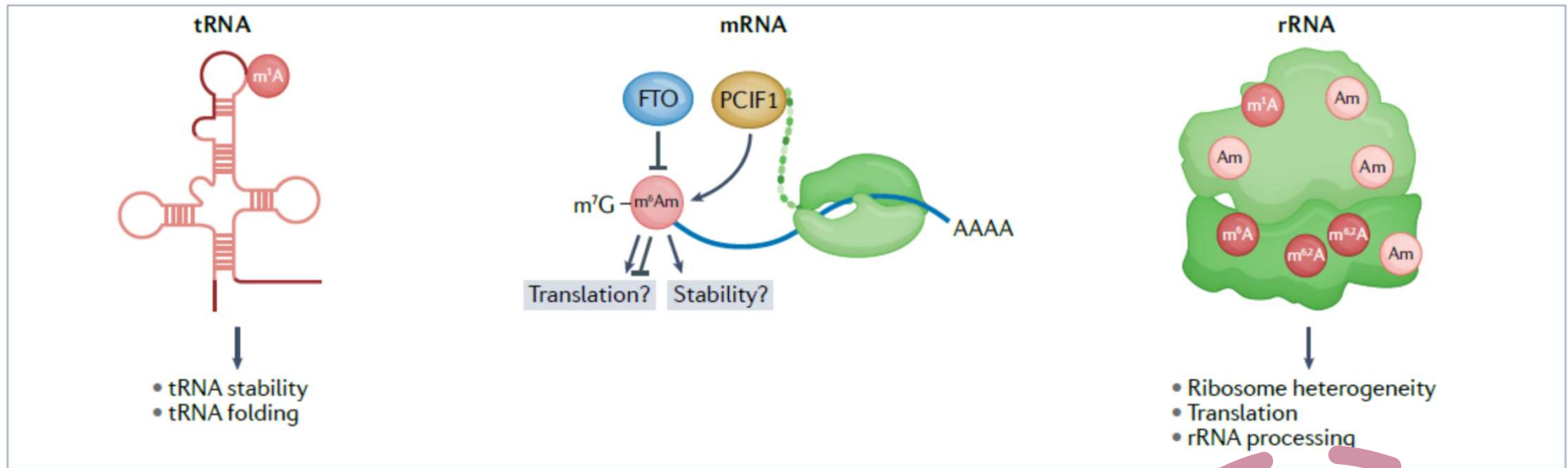
Metilación del RNA





Metilación de adenosina

El bloque de adenosina se puede metilar en distintas posiciones de N

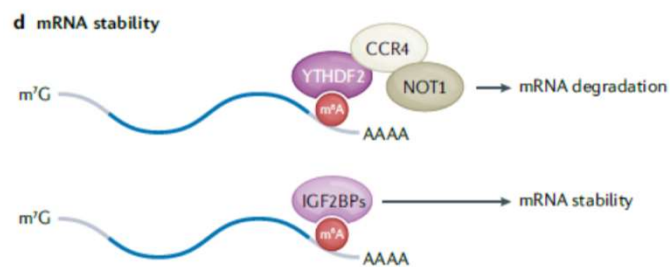
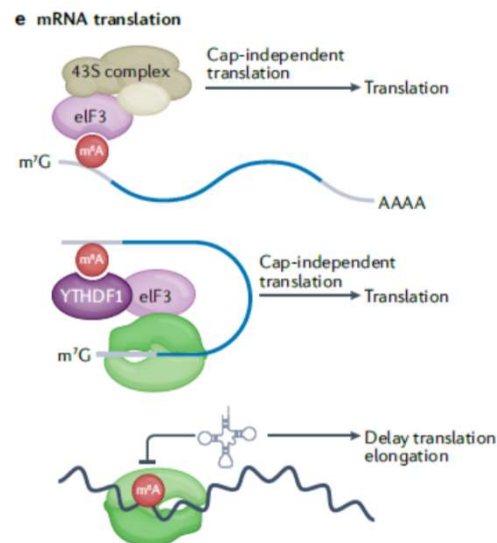
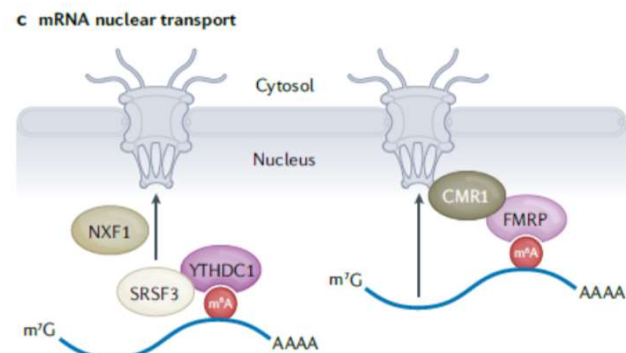
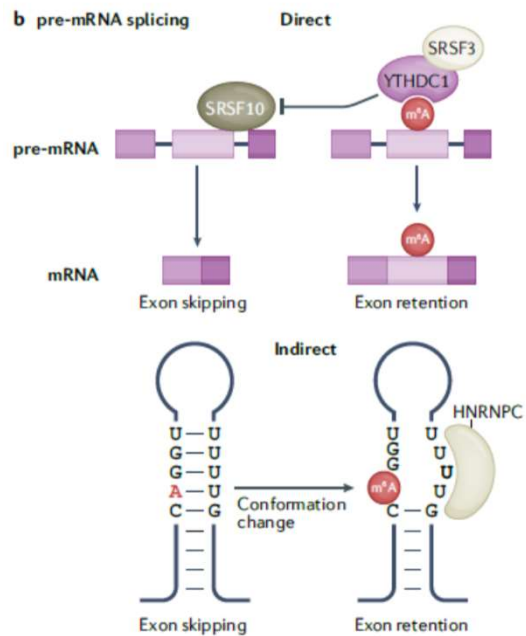


m⁶A: RNA N6 metiladenosina

Se ha detectado en muchos tipos de RNA: rRNA, mRNA, snRNA y varios RNAs regulatorios

m⁶A: RNA N⁶ metiladenosina

- **El 25 % de los mRNA de mamíferos contiene m⁶A**, con 1 a 3 modificaciones / transcrito de media
- Los **transcritos** modificados con m⁶A son muy **heterogéneos** entre células
- Para la mayoría de mRNA, small RNA y microRNA, el complejo de metiltransferasa METTL3-METTL14-WTAP es el responsable de la modificación en el núcleo
- Enriquecimiento de m⁶A en **3' UTR y cerca de los codones stop**
- Está disminuido en transcritos de genes housekeeping
- La modificación del **mRNA es reversible** mientras que la del rRNA parece ser constitutiva



Funciones de m⁶A



3

Epigenética y Herencia

Impronta génica

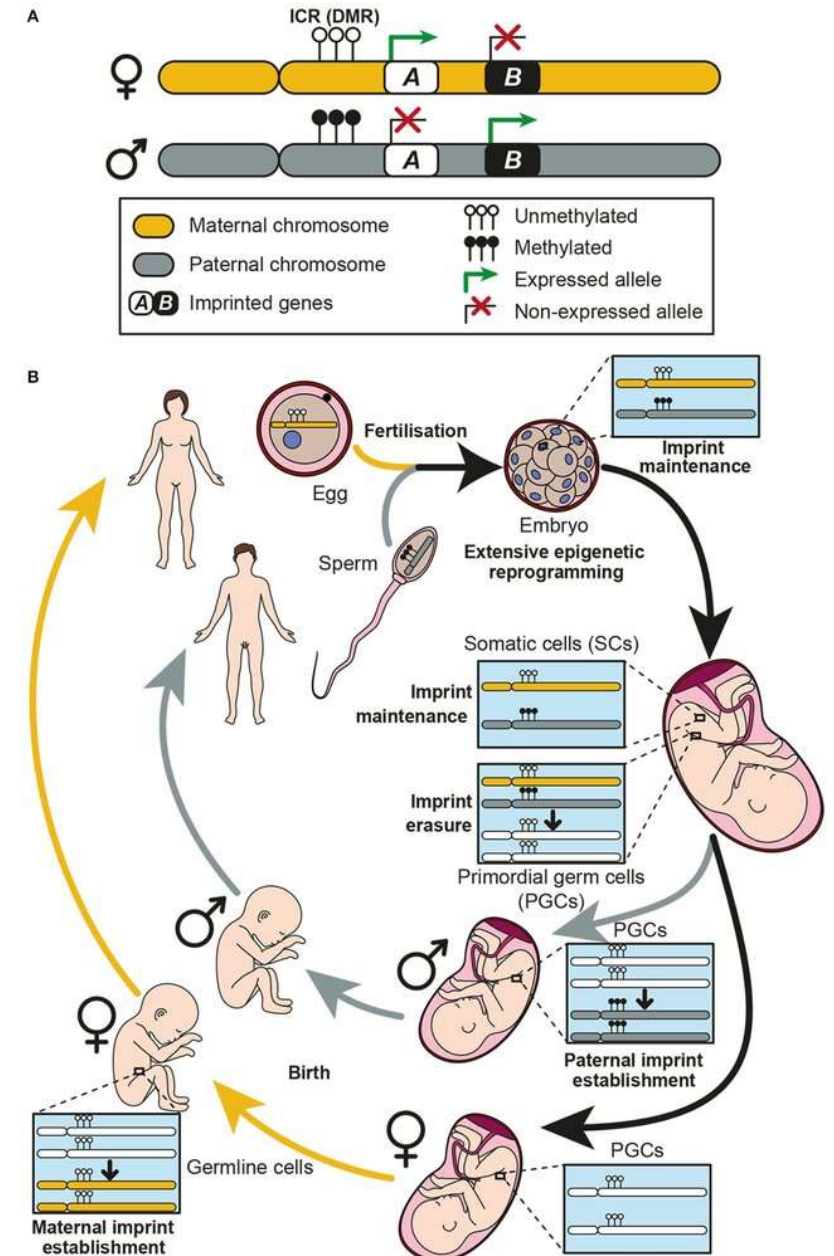
Herencia Intergeneracional

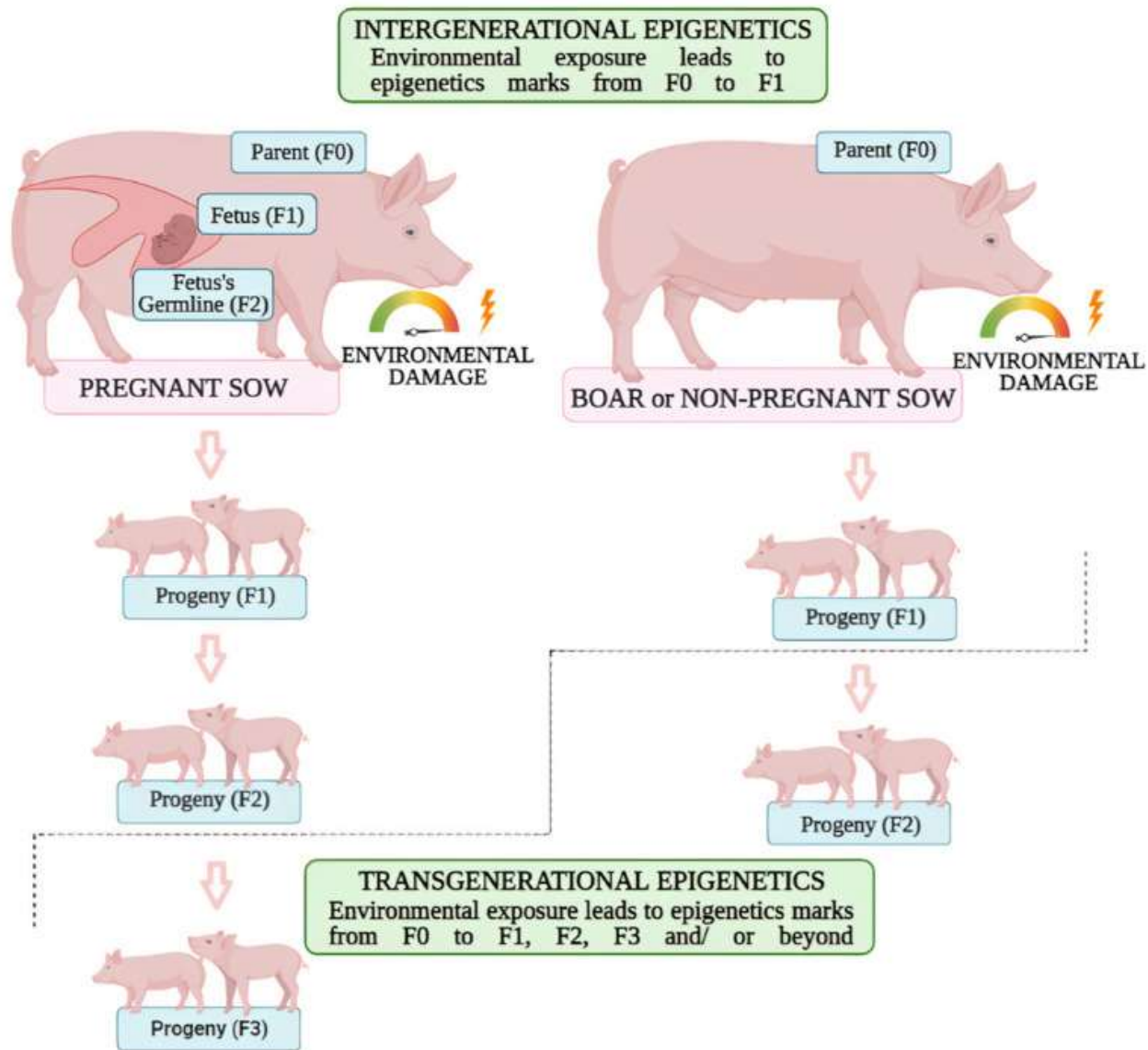
Herencia transgeneracional

Impronta genética

- Proceso por el cual un gen se encuentra silenciado en función del origen parental
- Estos genes se silencian en la formación de gametos
- El silenciamiento se produce por mecanismos epigenéticos
- El silenciamiento se mantiene en el individuo y se elimina en la línea germinal
- Cada individuo restablece los sellos correspondientes a su sexo

doi: 10.3389/fonc.2021.630482






Transmisión epigenética

doi: [10.3390/ani12010032](https://doi.org/10.3390/ani12010032)

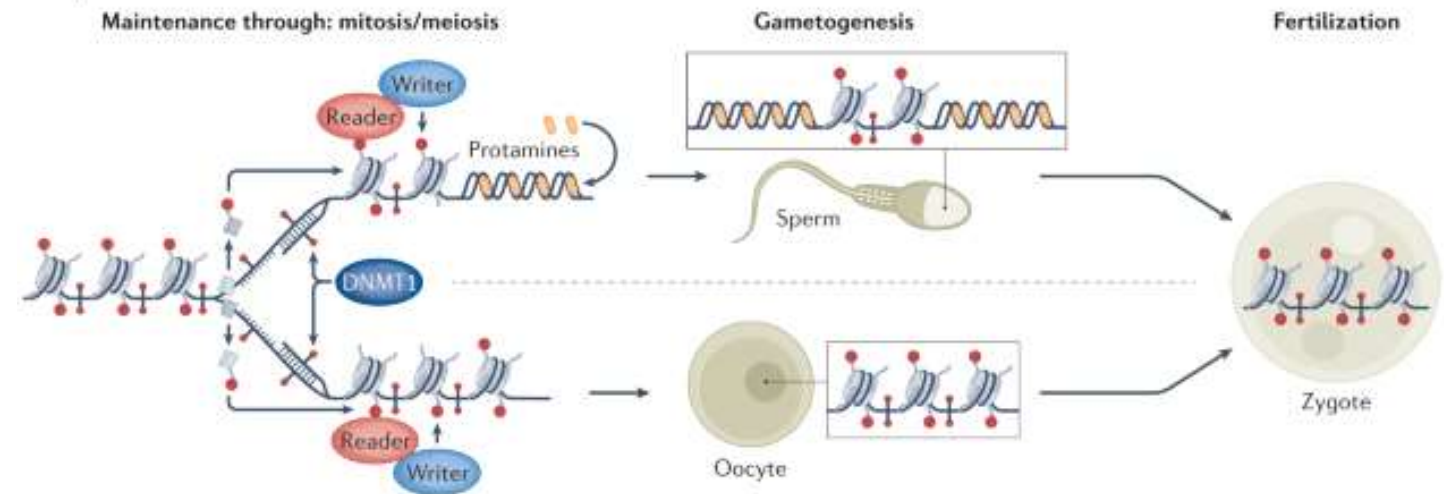


Herencia epigenética transgeneracional

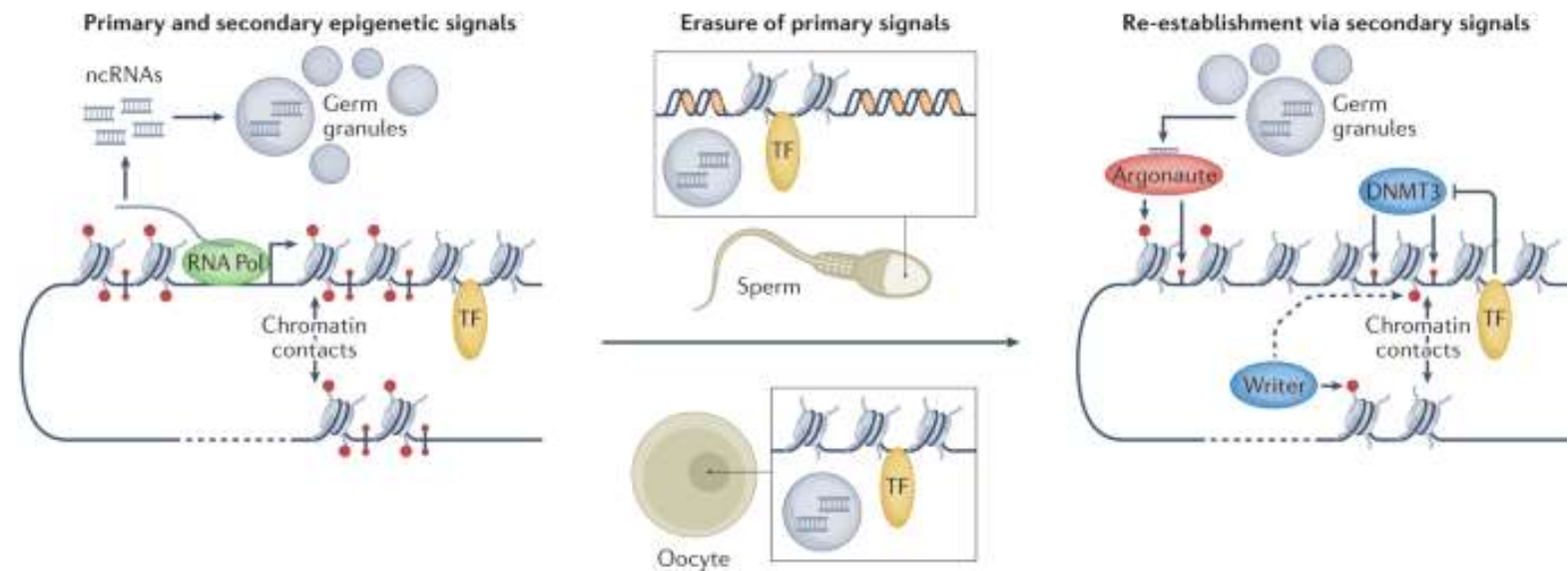
- En plantas, hongos y animales modelo como *Drosophila* o *C. elegans* se ha llegado a confirmar esta transmisión
 - Esta herencia es **difícil de confirmar en mamíferos** porque muchos fenómenos aparentemente epigenéticos podrían estar determinados genéticamente (proteínas, transposones y ncRNA están codificados en el genoma) y por la reprogramación que ocurre en el desarrollo.
 - Se debe demostrar que **otras moléculas distintas al DNA** pueden transmitir información hereditaria.
- 

Modelos de herencia epigenética

a Replicative inheritance

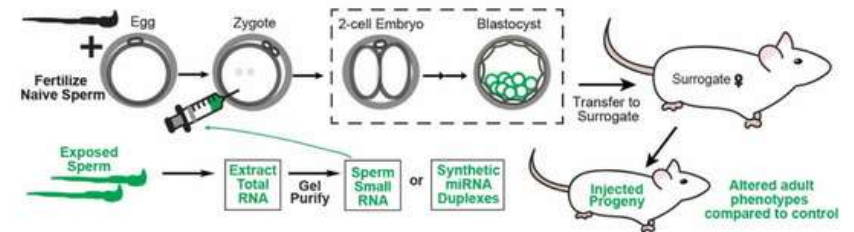
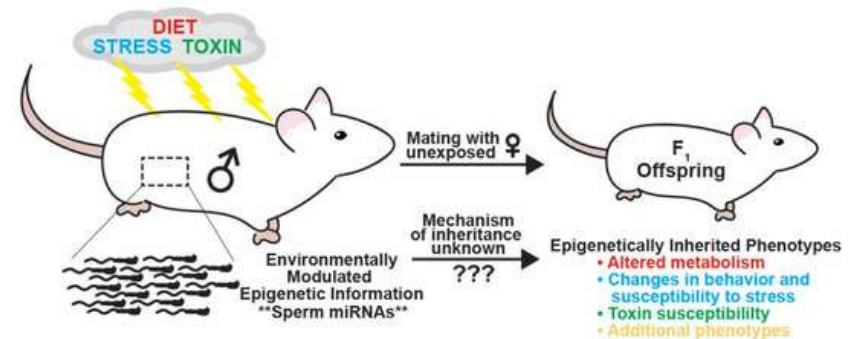


b Reconstructive inheritance



MicroRNAs espermáticos

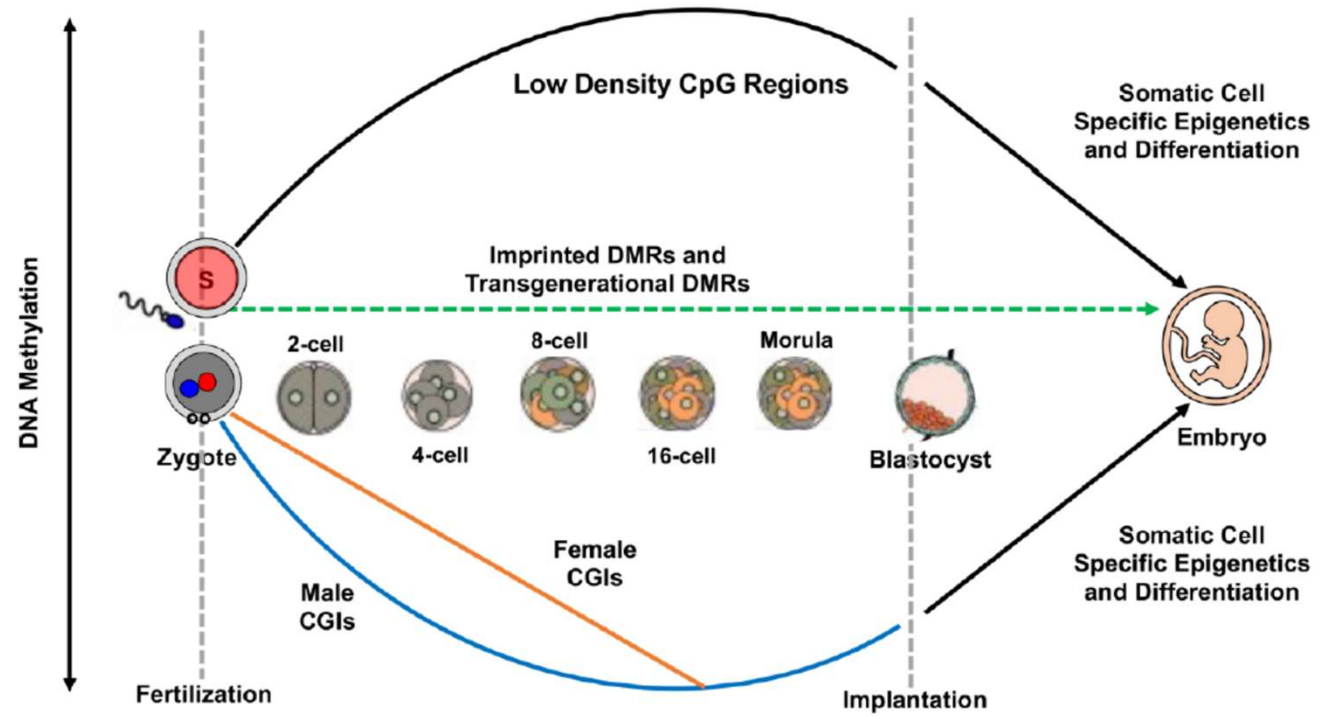
- Alteraciones en el contenido de RNA del espermatozoides tras una exposición paterna a daños o cambios en la dieta pueden transmitir una modificación fenotípica en los descendientes.
- Se ha demostrado por inyección de RNA de machos expuestos al "daño" en cigotas de individuos no expuestos.



Transgenerational sperm DMRs escape DNA methylation erasure during embryonic development and epigenetic inheritance

Millissia Ben Maamar^{1,3}, Yue Wang², Eric E. Nilsson¹, Daniel Beck¹, Wei Yan² and Michael K. Skinner^{1,2}

A DNA Methylation Development



Herencia epigenética en el gameto materno

- Difícil de estudiar:
 - Impacto directo del ambiente materno en el feto
 - Las hembras F1 completan la gametogénesis durante la gestación → los gametos que darán la F2 también están expuestos.
 - Es necesario eliminar efectos de confusión: cuidado materno → las F2 y F3 tendrían que estar criados por animales no expuestos.
- Alternativa:
 - Aislar los óvulos y someterlos a FIV e implantarlos en otras hembras





¿Herencia epigenética?

- Existe controversia sobre la herencia transgeneracional en humanos y otros mamíferos.
- La investigación en animales modelo sugiere que muchas enfermedades pueden ser consecuencia de daños ambientales en generaciones previas.
- Los estudios en humanos se basan en la observación y correlación entre el daño y la enfermedad.





4

Epigenética y producción animal

Nutrición

Caracteres productivos

Respuesta a estrés y patógenos

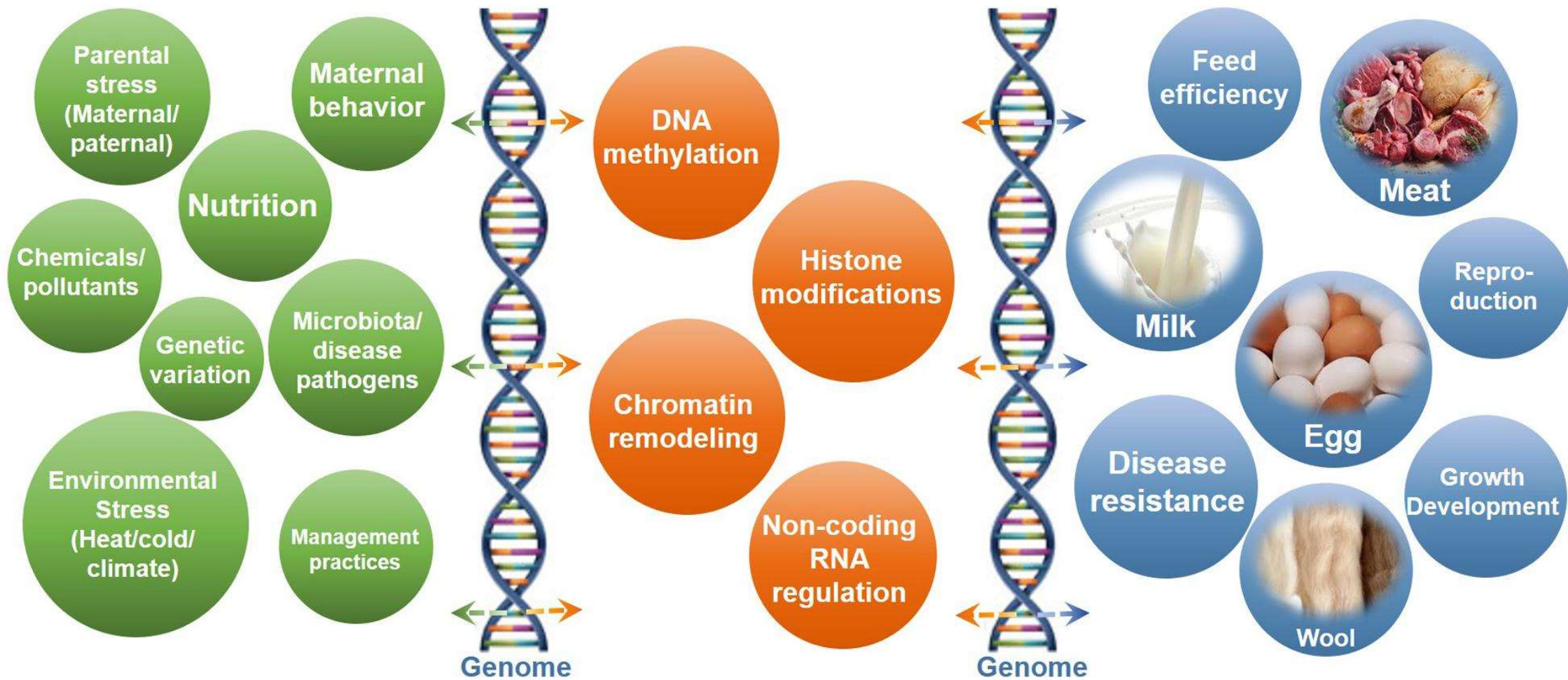




EXPOSOME

EPIGENETIC PROCESSES

PHENOTYPE



Epigenética y nutrición

- **La nutrición es el principal determinante ambiental** en el crecimiento y desarrollo.
- Se ha relacionado con herencia epigenética inter- y transgeneracional.
- Se han identificado **cambios epigenéticos en tejidos somáticos**.
- Las modificaciones de metilación de DNA en respuesta a estímulos nutricionales pueden causar alteraciones en producción o susceptibilidad a enfermedades.
- **Modificaciones nutricionales durante la gestación** producen cambios epigenéticos en la descendencia que influyen su producción.





Epigenética y reproducción

- Cambios epigenéticos en el espermatozoides tienen un impacto en la **fertilidad** de los machos y caracteres asociados.
- **Bovino:** Variaciones de metilación en genes de remodelación de la cromatina y elementos repetidos entre **espermatozoides con alta y baja motilidad**.
- La regulación epigenética (Metilación DNA) podría explicar las **diferencias de fertilidad** causadas por la **edad** y estresores como el **calor**.

Epigenética y producción de leche

- Las modificaciones epigenéticas constituyen un mecanismo de **regulación de la producción** de leche importante.
- Se han observado diferencias de metilación en sangre entre vacas con alta y baja producción de leche.
- Se ha asociado la **metilación anormal del promotor de α S1-caseína** que podrían afectar a **mastitis** y tiempo de ordeño diario.
- Se ha relacionado la metilación del DNA con la **expresión** de microRNAs en la regulación de la **producción de proteína**.




Epigenética y producción de carne

- La relación entre metilación del DNA y **desarrollo muscular** ha sido muy estudiada en distintas especies ganaderas.
- Se han encontrado regiones con metilación diferencial asociadas a la **terneza** de la carne.
- La metilación de **IGF2** cambia en respuesta a la restricción alimentaria.
- Se han identificado DMRs y DMGs entre **cerdos obesos y magros**.
- El **olor de la canal** en cerdos también se ha asociado a cambios epigenéticos.



Review | [Open Access](#) | Published: 23 October 2014

Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals

[Amanda Feeney](#), [Eric Nilsson](#) & [Michael K Skinner](#) 

[Journal of Animal Science and Biotechnology](#) 5, Article number: 48 (2014) | [Cite this article](#)

7519 Accesses | 54 Citations | 2 Altmetric | [Metrics](#)

From: [Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals](#)

Environmental epigenetics and domestic farm animals		
Bovine	Context	Ref.
Mammary gland-specific hypomethylation of Hpa II sites flanking the bovine alpha S1-casein gene.	Epigenetic regulation of lactation.	[24]
DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis.	Epigenetic regulation of lactation.	[25]
Transcriptome profiling of Streptococcus uberis-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model.	Epigenetic regulation of lactation.	[26]
Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos.	Epigenetic changes with assisted reproductive technologies	[35]
DNA methylation events associated with the suppression of milk protein gene expression during involution of the bovine mammary gland.	Epigenetic regulation of lactation.	[27]
Effect of maternal lactation during pregnancy	Epigenetic regulation of lactation.	[28]
Large offspring syndrome in cattle and sheep.	Epigenetic changes with assisted reproductive technologies	[33]
The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges.	Epigenetic changes with assisted reproductive technologies	[34]
Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning.	Epigenetic changes with assisted reproductive technologies	[35]
Epigenetic contribution to individual variation in response to lipopolysaccharide in bovine dermal fibroblasts.	Epigenetic role in immunity	[39]
Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals.	Epigenetic changes with regulation of nutrition	[29]
Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells.	Epigenetic changes with regulation of nutrition	[30]
Transcriptome Characterization by RNA-seq Unravels the Mechanisms of Butyrate-Induced Epigenomic Regulation in Bovine Cells.	Epigenetic changes with regulation of nutrition	[31]
In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring.	Epigenetic changes with assisted reproductive technologies	[32]
Porcine		
Sulforaphane causes a major epigenetic repression of myostatin in porcine satellite cells.	Histone deacetylase inhibitor affects myostatin <i>in vitro</i>	[41]
Maternal dietary protein affects transcriptional regulation of myostatin gene distinctively at weaning and finishing stages in skeletal muscle of Meishan pigs.	Maternal diet affects offspring epigenetics	[43]
HOX10 mRNA expression and promoter DNA methylation in female pig offspring after in utero estradiol-17beta exposure.	Maternal steroid exposure affects offspring epigenetics	[48]
Investigations on transgenerational epigenetic response down the male line in F2 pigs.	Paternal diet has transgenerational epigenetic effect	[49]
Dietary Sulforaphane, a Histone Deacetylase Inhibitor for Cancer Prevention	Epigenetic changes with regulation of nutrition	[40]
Neonatal estradiol exposure alters uterine morphology and endometrial transcriptional activity in prepubertal gilts.	Steroid exposure affects epigenetics	[47]
Maternal dietary protein restriction and excess affects offspring gene expression and methylation of non-SMC subunits of condensin I in liver and skeletal muscle.	Maternal diet affects offspring epigenetics	[44]
Diet, methyl donors and DNA methylation: Interactions between dietary folate, methionine and choline.	Epigenetic changes with regulation of nutrition	[45]
Ovine		
Periconceptional nutrition and the early programming of a life of obesity or adversity.	Maternal diet affects offspring epigenetics	[50]
The effect of maternal under-nutrition before muscle differentiation on the muscle fiber development of the newborn lamb.	Maternal diet affects offspring epigenetics	[51]
Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition.	Maternal diet affects offspring epigenetics	[52]
Gallus		
Comparison of the Genome-Wide DNA Methylation Profiles between Fast-Growing and Slow-Growing Broilers.	Differences in epigenetics between breeds	[55]
Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-132 during skeletal myogenesis.	Epigenetic effects during muscle development	[58]
Transgenerational epigenetic effects on innate immunity in broilers: An underestimated field to be explored?	Review on role of epigenetics in innate immunity	[59]
DNMT gene expression and methylome in Marek's disease resistant and susceptible chickens prior to and following infection by MDV.	Epigenetic role in immunity	[54]
Epigenetic transgenerational inheritance study in domestic farm animals		
Porcine		
Investigations on transgenerational epigenetic response down the male line in F2 pigs.	Paternal diet has transgenerational epigenetic effect	[49]

Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals

Investigations on Transgenerational Epigenetic Response Down the Male Line in F2 Pigs

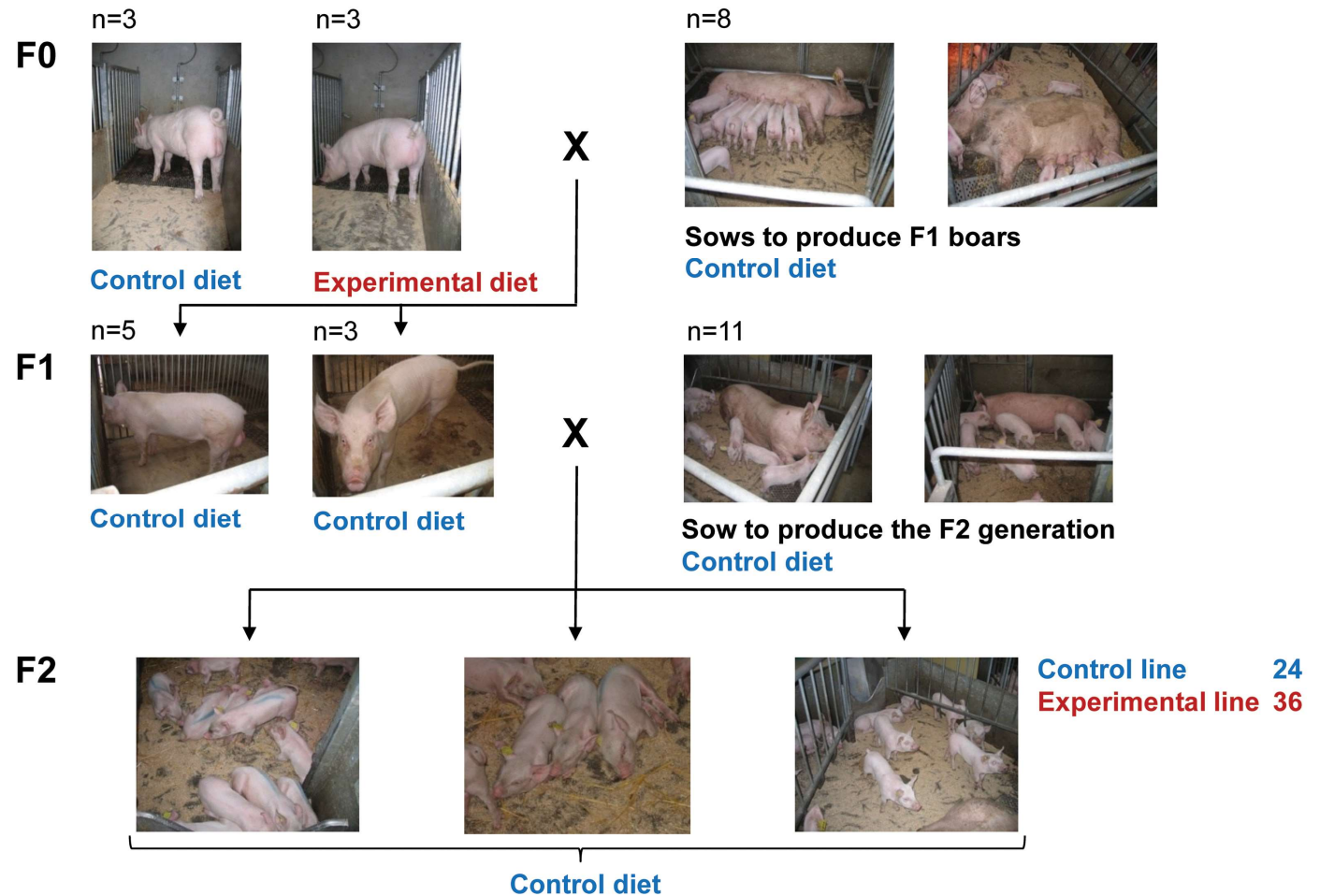
Martin Braunschweig , Vidhya Jagannathan, Andreas Gutzwiller, Giuseppe Bee

Published: February 16, 2012 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030583>

	Control diet				Experimental diet			
	Starter	Grower	Finisher	Boar	Starter	Grower	Finisher	Boar
Age, months	1–2.5	2.5–4	4–5	5–10	1–2.5	2.5–4	4–5	5–10
Methionine, g	4.4	3.3	2.5	3.3	11.6	8.5	6.6	8.5
Cysteine, g	3.3	3.5	3.2	2.9	3.2	3.4	3.2	2.9
Choline, mg	300		200		1300		1400	
Betaine, mg	0		0		1600		1600	
Vit. B6, mg	4		3		1600		1600	
Folate, mg	0.5		0.5		200		200	
Vit. B12, mg	0.02		0.02		8		8	

doi:10.1371/journal.pone.0030583.t005

Cambios en carcasas,
expresión génica y metilación
del promotor del gen *IYD* en
la F2 de animales con dieta E





5

Epigenética y sanidad animal

Estrés Ambiental

Respuesta a patógenos





Epigenética y estrés ambiental

- Se han descrito cambios epigenéticos (metilación de DNA, modificación de histonas) en **proteínas de choque térmico** en la respuesta del animal al estrés térmico.
- El estrés térmico afecta al **desarrollo embrionario y fertilidad** mediante modificaciones epigenéticas.
- El **estrés hipóxico** que afecta a cerdos en altitudes altas produce cambios de metilación.
- El **estrés materno** en transporte de vacas puede producir cambios en el epigenoma de los terneros.



Epigenética y respuesta a patógenos

- Las modificaciones epigenéticas afectan a la **regulación de la respuesta inmune** a la infección.
- Se han descrito cambios en metilación del DNA, enzimas de control epigenético, modificación de histonas y microRNAs en respuesta a la infección por muy diversos patógenos.



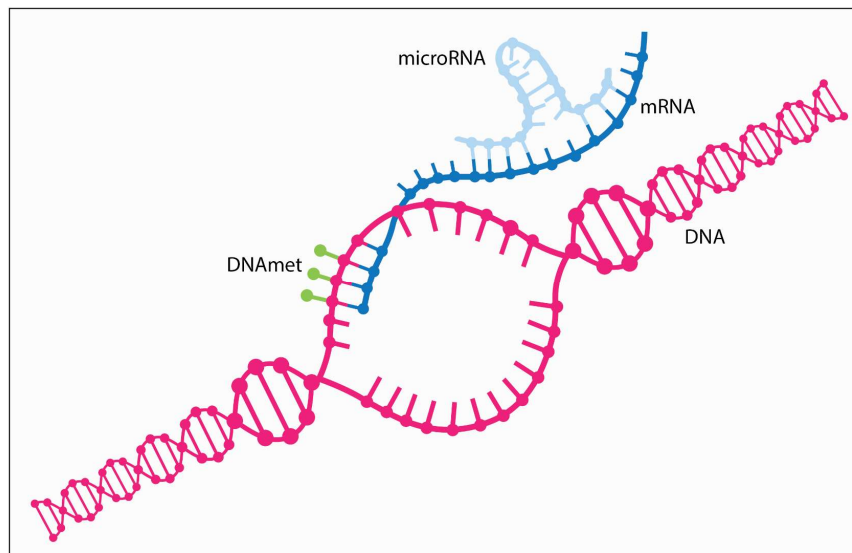
6

Aplicaciones de la epigenética

Biomarcadores

Mejora

Biomarcadores epigenéticos



- Cualquier marca epigenética medible en tejido o fluidos que pueda:
 - Identificar una condición de enfermedad (**diagnóstico**)
 - Predecir el desarrollo de una enfermedad (**pronóstico**)
 - Predecir respuesta a terapia (**predictivo**)
 - Monitorear una respuesta al tratamiento
 - Predecir el riesgo a padecer una enfermedad (**de riesgo**)
- Adecuados para la detección de enfermedades crónicas o silentes.
- En especies ganaderas se está en una etapa exploratoria, necesidad de validar biomarcadores.

Mejora de las producciones

- **Tratamientos epigenéticos** para procesos patológicos.
- **Suplementar datos genéticos** con los epigenéticos para la mejora de las producciones.
- No se ha demostrado **la herencia transgeneracional** de la mayoría de las modificaciones epigenéticas.
- Se **necesita conocer la contribución de las alteraciones epigenéticas a la herencia** de caracteres de producción y sanitarios en ganadería.
- Se necesitan **métodos estadísticos** para cuantificar la contribución de marcadores epigenéticos a la producción final





Tecnologías para el estudio de modificaciones epigenéticas

Metilación del DNA

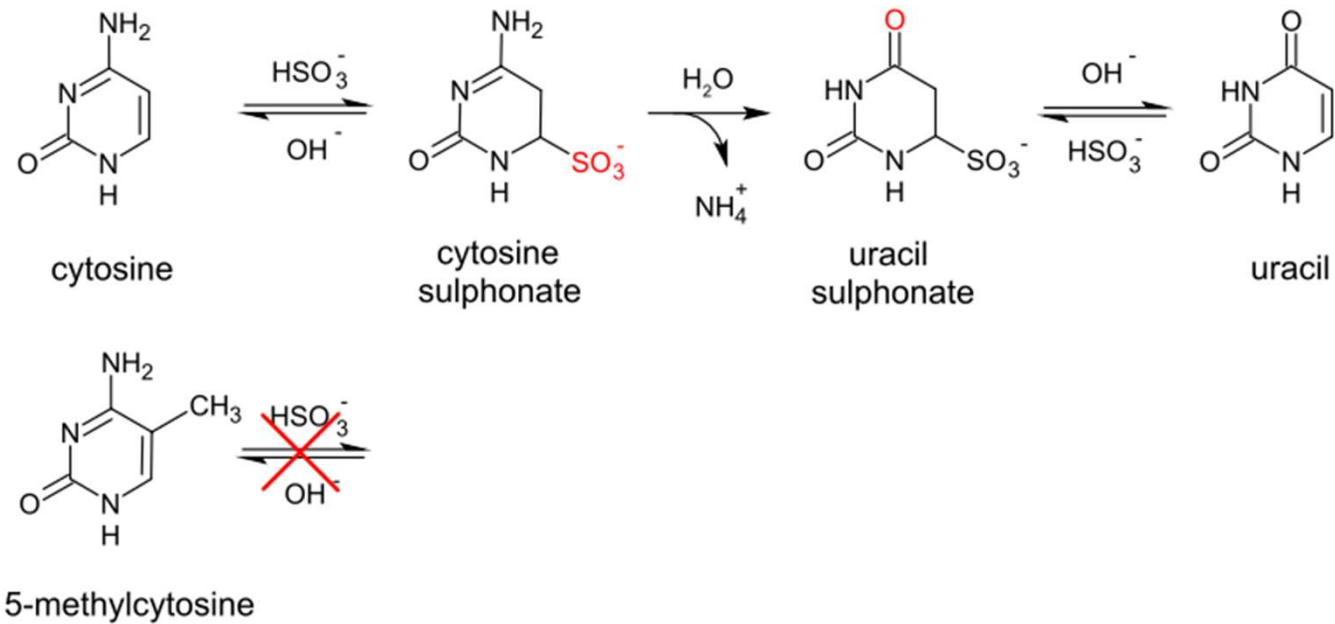
Acetilación de histonas

MicroRNAs



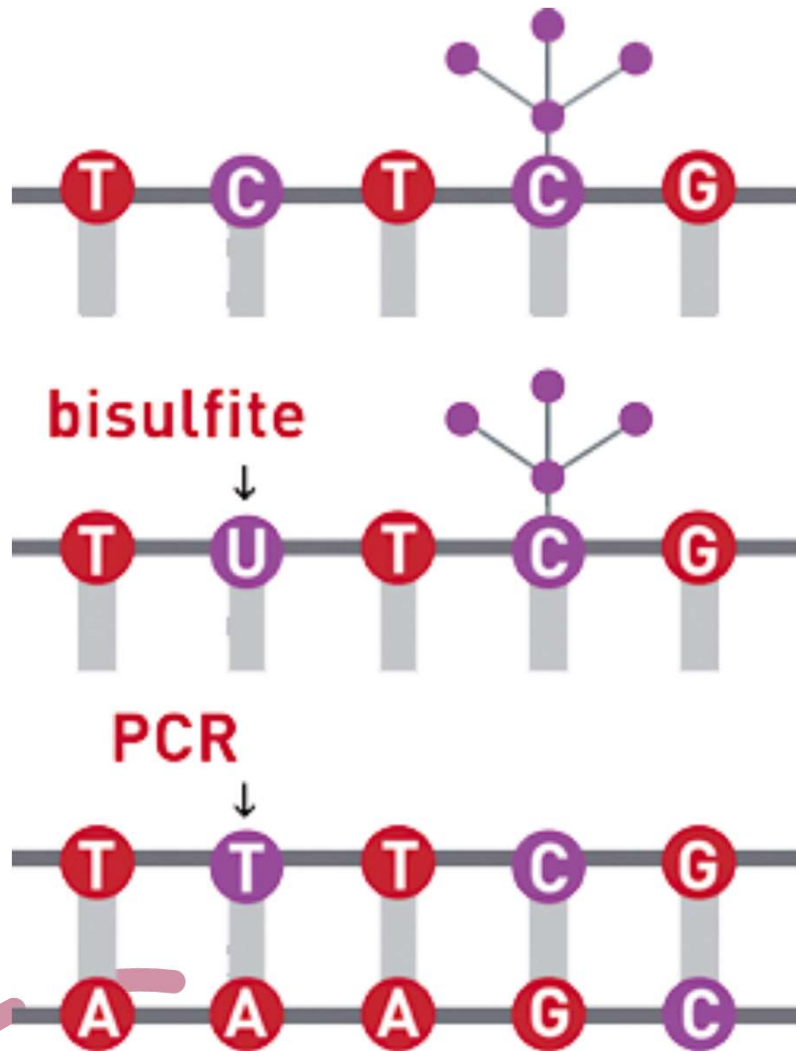
Metilación del DNA

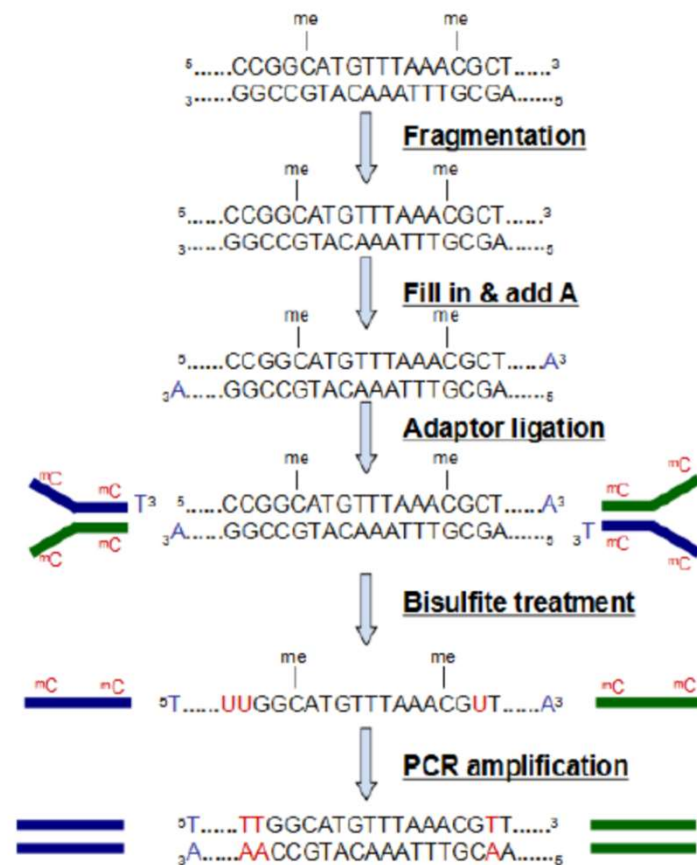
Conversión del DNA con bisulfito



Análisis de 5mC en genes específicos

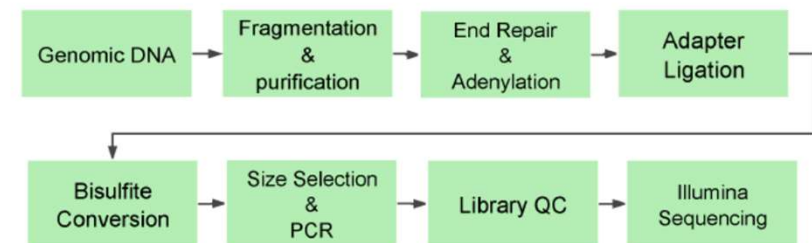
- PCR + secuenciación
- PCR específica de metilación: con primers específicos para determinar la forma metilada.
 - qPCR "*High resolution melting*"
- Pirosecuenciación: permite cuantificar la incorporación de nucleótidos específicos.
- Methylation-sensitive single-strand conformation analysis (MS-SSCA)
- Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (MS-SnuPE)





Perfiles de metilación a nivel genómico

• **WGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing)**

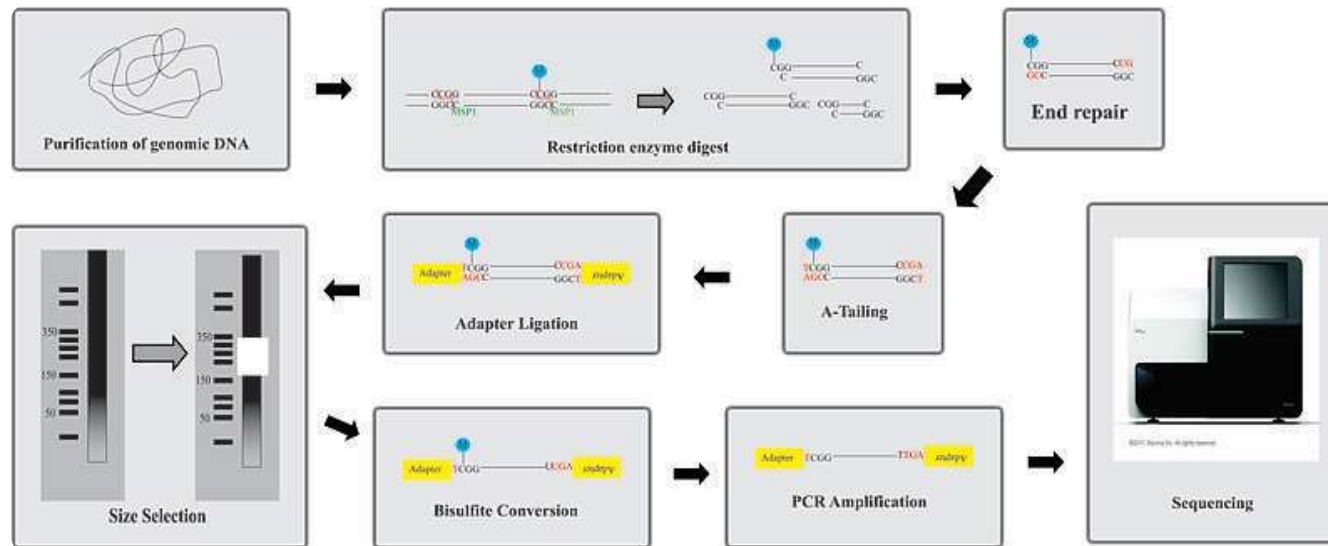


Bioinformatics

N= 3-4 individuos/grupo

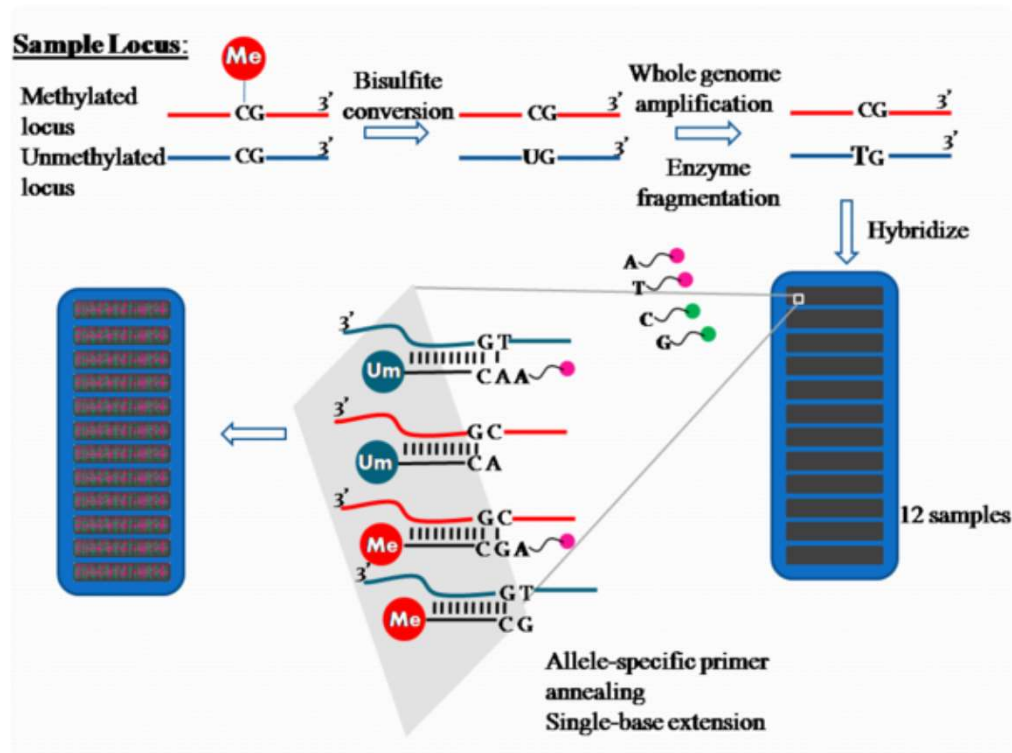
Profundidad de secuenciación: 30x





Reduced representation bisulfite sequencing

- Detecta el 85 % de las islas CpG
- Reduce costes de secuenciación



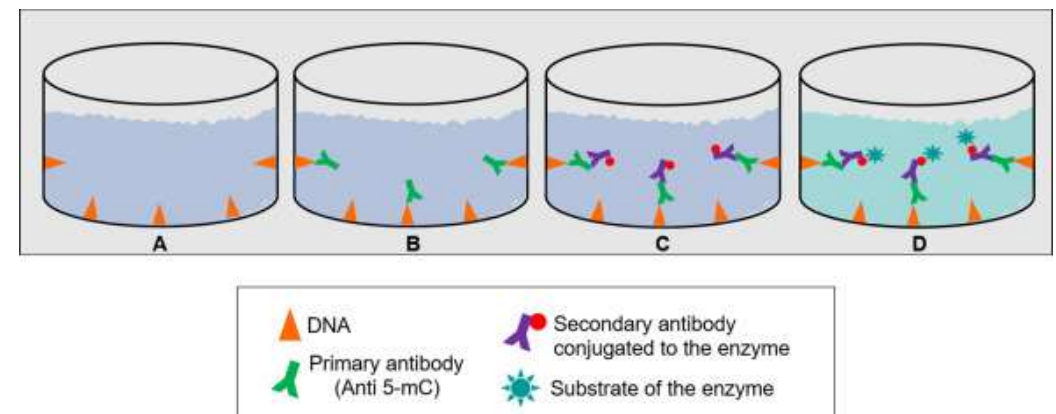
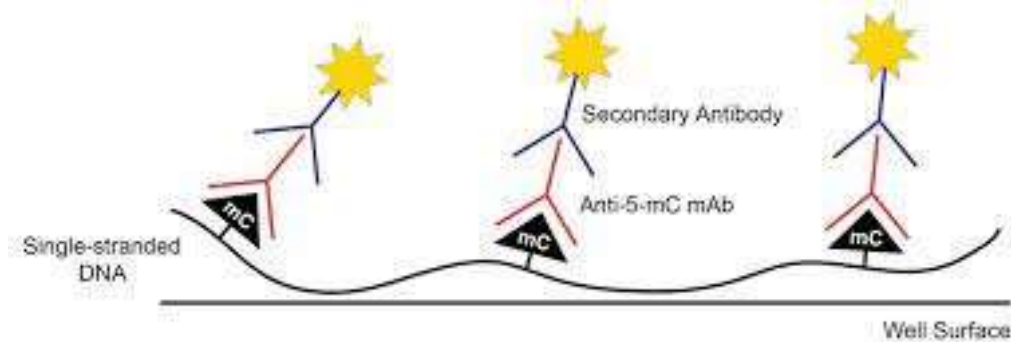
Arrays de metilación

- Solo disponible para humanos
- Analiza 450.000 sitios de metilación
- Cubre la mayoría de las islas CpG

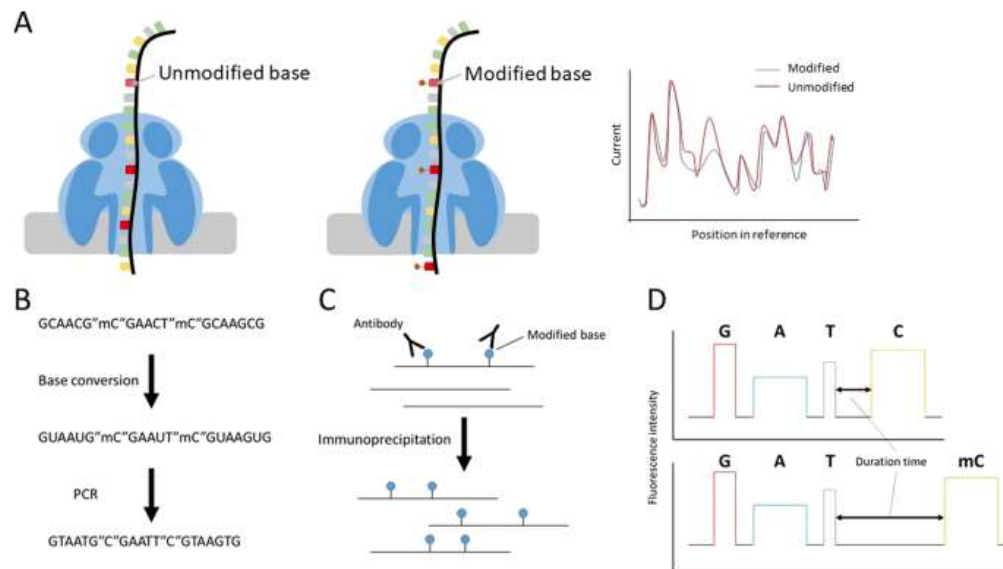
El desarrollo de esta metodología en animales facilitaría los estudios epigenéticos

Análisis global de metilación

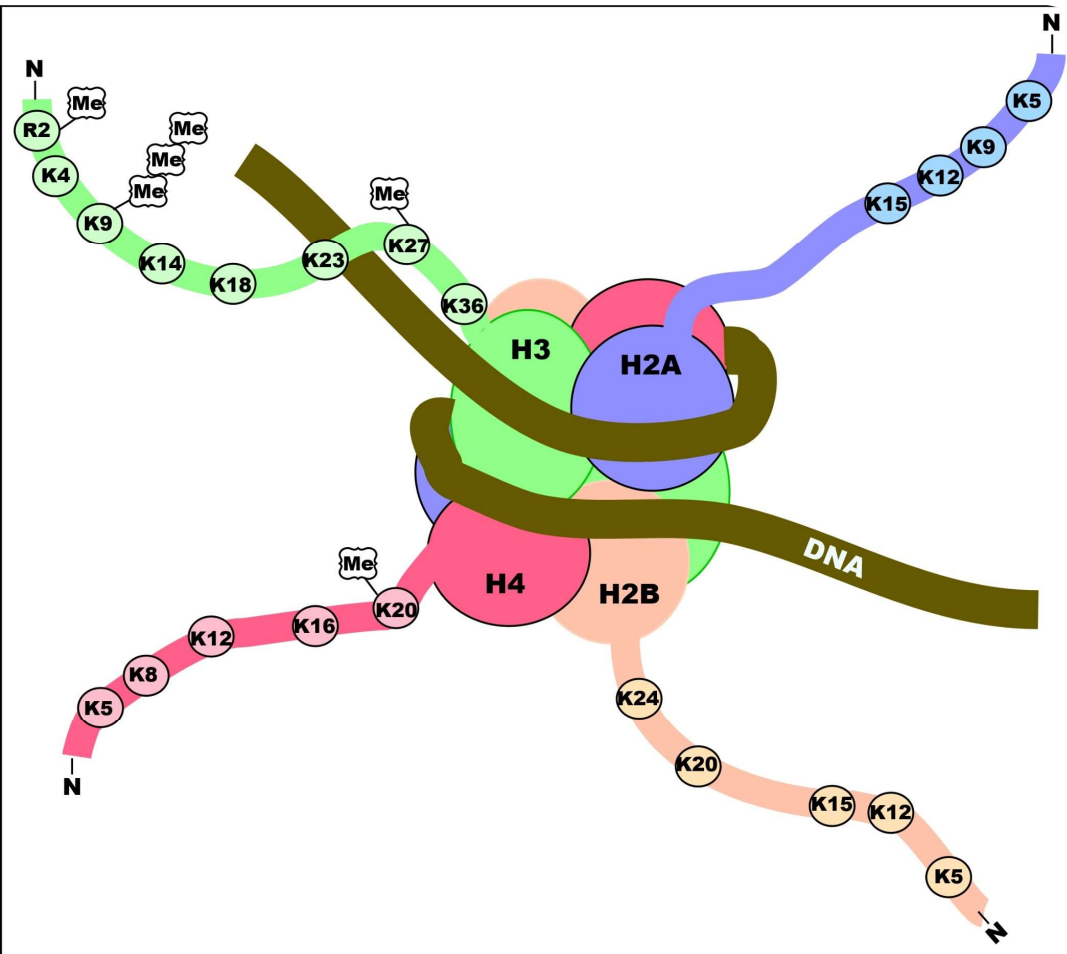
- ELISA
- Inmunohistoquímica.
- Detectan 5mC y 5 hmC



Nuevas tecnologías

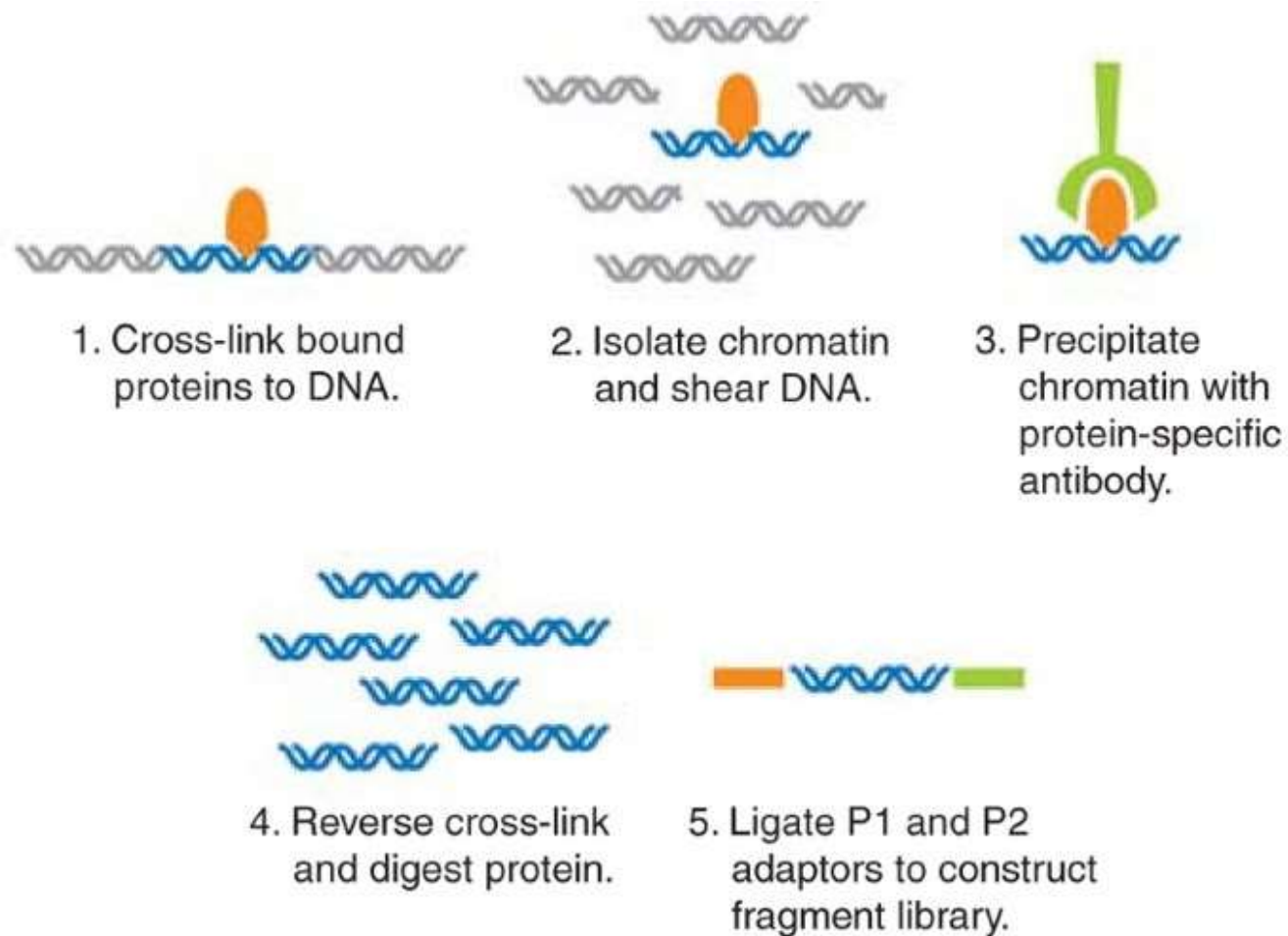


- Secuenciación de tercera generación (Nanopore)
 - Puede secuenciar el DNA sin tratar
 - Detecta las 3 variants de Citosina (C, 5mC and 5hmC) y las dos de Adenina (A and 6mA)
 - No se puede amplificar por PCR
- PacBio SMRT (single molecule real time sequencing):
 - 5mC, 5hmC, 6mA and 4mC simultáneamente
 - Ideal para genomas bacterianos



Análisis de histonas

Chromatin immunoprecipitation



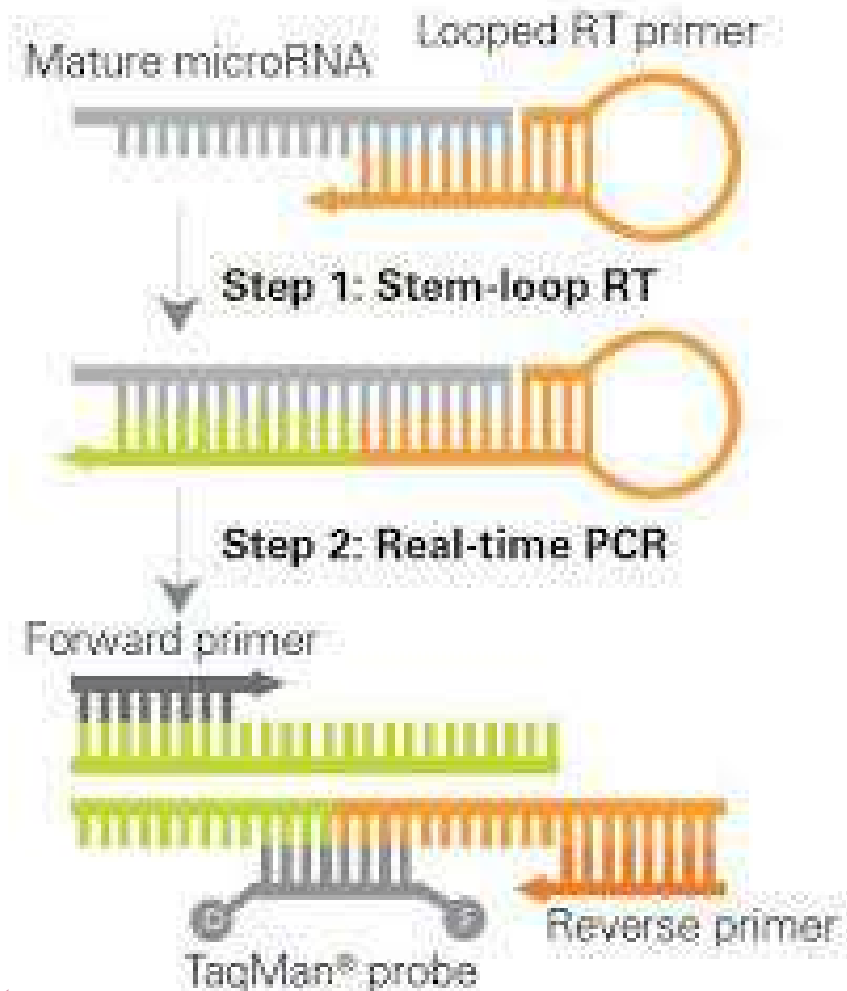
- Cuantificación por qPCR
- Secuenciación



Análisis de ncRNA



0 1
Sequence conservation



Análisis de small ncRNA

- qPCR para RNAs específicos
- Small RNAseq para identificar perfiles



Toma de muestras



Metilación del DNA y estudio de histonas

- Muestra en función del objetivo del estudio:
 - Músculo
 - Sangre (cuidado con las diferencias en poblaciones celulares)
 - Sistema nervioso
 - Intestino...
- Para métodos genómicos se necesita bastante cantidad de DNA y de buena calidad
- Siempre guardar muestra para validar resultados.
- Aconsejable tomar muestra de tejido para estudio de RNA y confirmación de cambios de expresión



Requerimientos de la muestra

81 Gb 30X
- 950 € /muestra
- 1500 € /muestra con
análisis

WGBS Specifications: DNA Sample Requirements

Sample Type	Required Amount	Purity
Genomic DNA	≥ 200 ng	A260/280=1.8-2.0

Note: Sample amounts are listed for reference only. Download the [Service Specifications](#) or [Sample Requirements](#) to learn more. For detailed information, please [contact us](#) with your customized requests.

RRBS Specifications: DNA Sample Requirements

Sample Type	Required amount	Purity
Genomic DNA	≥ 1 μ g	A260/280=1.8-2.0



Requerimientos de la muestra

ChIP-seq Specifications: DNA Sample Requirements

Sample Type	Required Amount	Fragment size	Purity
Enriched DNA Sample	≥ 20 ng (Concentration ≥ 2 ng/μL)	100 bp~500 bp	A260/280=1.8-2.0

Note: Sample amounts are listed for reference only. Download the [Service Specifications](#) or [Sample Requirements](#) to learn more. For detailed information, please [contact us](#) with your customized requests.



Calidad y cantidad

3 Epigenetics Sequencing

Library Type	Sample Type	Amount	Volume	Concentration	Purity (NanoDrop™/Agarose Gel)
Whole genome Methylation (WGBS) library	Genomic DNA	≥ 200 ng	≥ 20 µL	≥ 10 ng/µL	0 < OD260/230 < 3; no degradation, no contamination
Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) library	Genomic DNA	≥ 1 µg	≥ 20 µL	≥ 20 ng/µL	0 < OD260/230 < 3; no degradation, no contamination
ChIP-seq library	Enriched DNA	≥ 20 ng	≥ 20 µL	≥ 2 ng/µL	Main peak of 100 bp-500 bp
RIP-seq library	Enriched RNA	≥ 100 ng	≥ 20 µL	≥ 3 ng/µL	Fragments should be longer than 1000 bp

Recommended suspension buffer:
TE, EB and TB for DNA and enriched DNA
RNase-free ddH2O for enriched RNA



MicroRNA (ncRNA)

- El tejido dependerá del objetivo
- Biomarcadores:
 - fluidos biológicos fácilmente accesibles
 - Sangre entera (RNAlater) o suero/plasma (preferible)
- Evitar degradación de la muestra.
 - Congelar sangre/plasma o tejido inmediatamente tras su muestreo
 - Utilizar protectores frente a RNAsas





Requerimientos de la muestra

sRNA-seq Specifications: RNA Sample Requirements

Library Type	Sample Type	Amount	RNA Integrity Number (Agilent 2100)	Purity (NanoDrop)
Small RNA Library	Total RNA	$\geq 2 \mu\text{g}$	Animal ≥ 7.5 , Plant ≥ 7 , with smooth baseline	A260/280 = 1.8-2.2 A260/230 ≥ 1.8
Exosomal Small RNA Library	Exosomal RNA	$\geq 10 \text{ ng}$	Peak between 25-200 nt, FU > 10, no peak > 2000 nt	

Note: Sample amounts are listed for reference only. Download the [Service Specifications](#) or [Sample Requirements](#) to learn more. For detailed information, please [contact us](#) with your customized inquiry.

300 €/muestra con
análisis





8

Casos prácticos

Scrapie ovino

Epilepsia idiopática canina

Modelo Natural: scrapie ovino



Genome-Wide Methylation Profiling in the Thalamus of Scrapie Sheep

Adelaia Hernández¹, Arianna Sans², Sara Sente³, Beatriz Ravea⁴, Oscar López-Pérez^{1,5}, Pilar Zaragoza¹, Juan J. Badier⁶, Hicham Filali⁶, Rosa Bolea⁷, Jaume M. Tolonen^{1,6} and Irma Salazar^{1,6}

¹ Laboratorio de Genética Molecular y Biología Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, ICA, ICA, Zaragoza, Spain; ² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; ³ Centro de Investigación y Desarrollo en Neurociencias (CIN), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, ICA, Zaragoza, Spain; ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBER-EN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

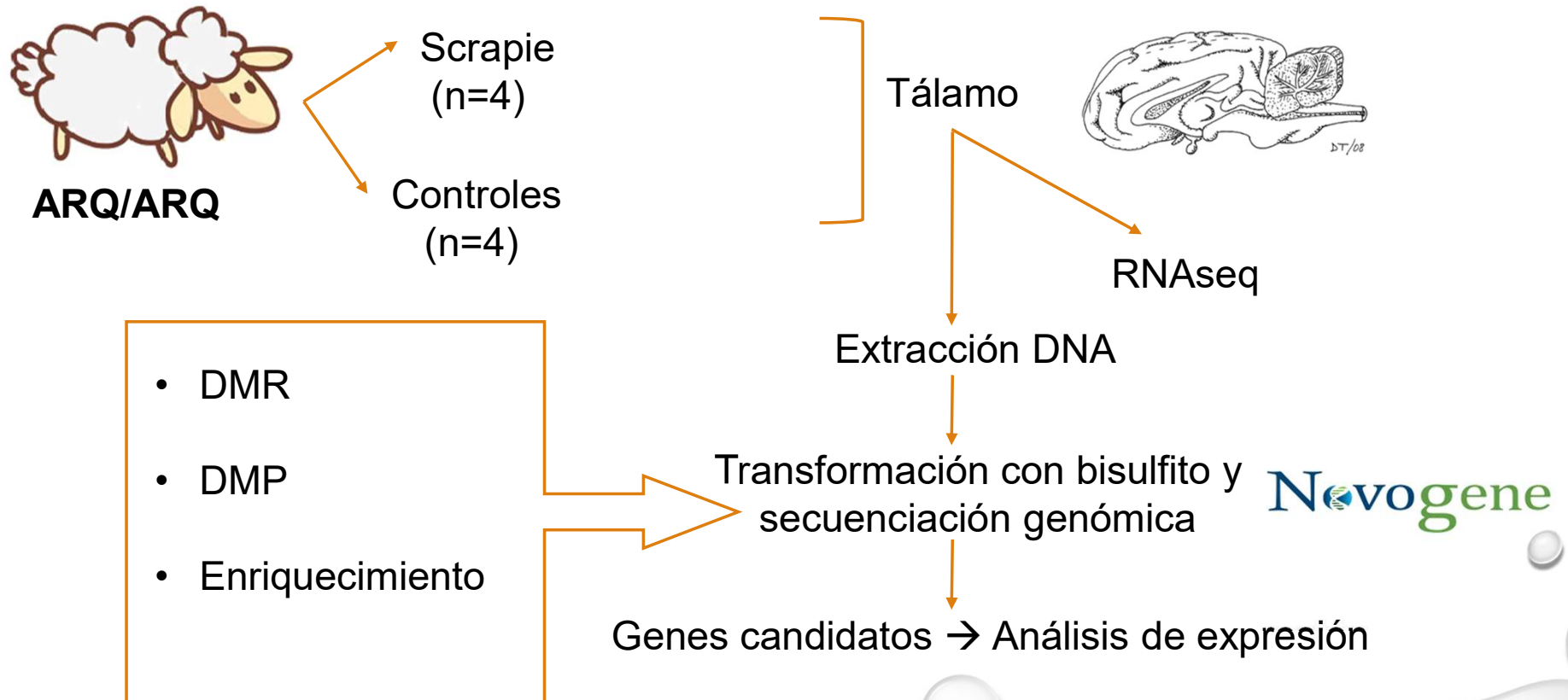
Scrapie is a neurodegenerative disorder belonging to the group of transmissible spongiform encephalopathy (TSE). Scrapie occurs in sheep and goats, which are considered good natural animal models of these TSE. Changes in DNA methylation occur in the central nervous system (CNS) of patients suffering from prion-like neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease. Nevertheless, potential DNA methylation alterations have not yet been investigated in the CNS of any prion disease model or naturally infected cases, neither in humans nor in animals. Genome-wide DNA methylation patterns were studied in the thalamus obtained from sheep naturally infected with scrapie at a clinical stage ($n = 4$) and from controls ($n = 4$) by performing a whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) analysis. Ewes carried the scrapie-susceptible ARQ/ARQ PrP^{Sc} genotype and were sacrificed at a similar age (4–6 years). Although the average genome methylation levels were similar between the control and the scrapie animals, we identified 8,907 significant differentially methylated regions (DMRs) and 39 promoters (PMs). Gene Ontology analysis revealed that hypomethylated DMRs were enriched in genes involved in transmembrane transport and cell adhesion, whereas hypermethylated DMRs were related to intracellular signal transduction genes. Moreover, genes highly expressed in specific types of CNS cells and those previously described to be differentially expressed in scrapie brains contained DMRs. Finally, a quantitative PCR (qPCR) validation indicated differences in the expression of five genes (PCDH19, SNCG, WDR55, PEX1, and CABIN1) that matched the methylation changes observed in the genomic study. Altogether, these results suggest a potential regulatory role of DNA methylation in prion neuropathology.

Keywords: DNA methylation, thalamus, ovine scrapie, prion, whole genome bisulfite sequencing

INTRODUCTION

Prion diseases are fatal and transmissible neurodegenerative disorders that occur in humans and animals (1). These diseases are caused by the conformational conversion of the cellular prion protein (PrP^C) to an infectious isoform PrP^{Sc}, which is partially resistant to proteases and prone to form aggregates (2). The accumulation of PrP^{Sc} in the central nervous system (CNS)

Extracción de DNA y secuenciación



Características de las muestras

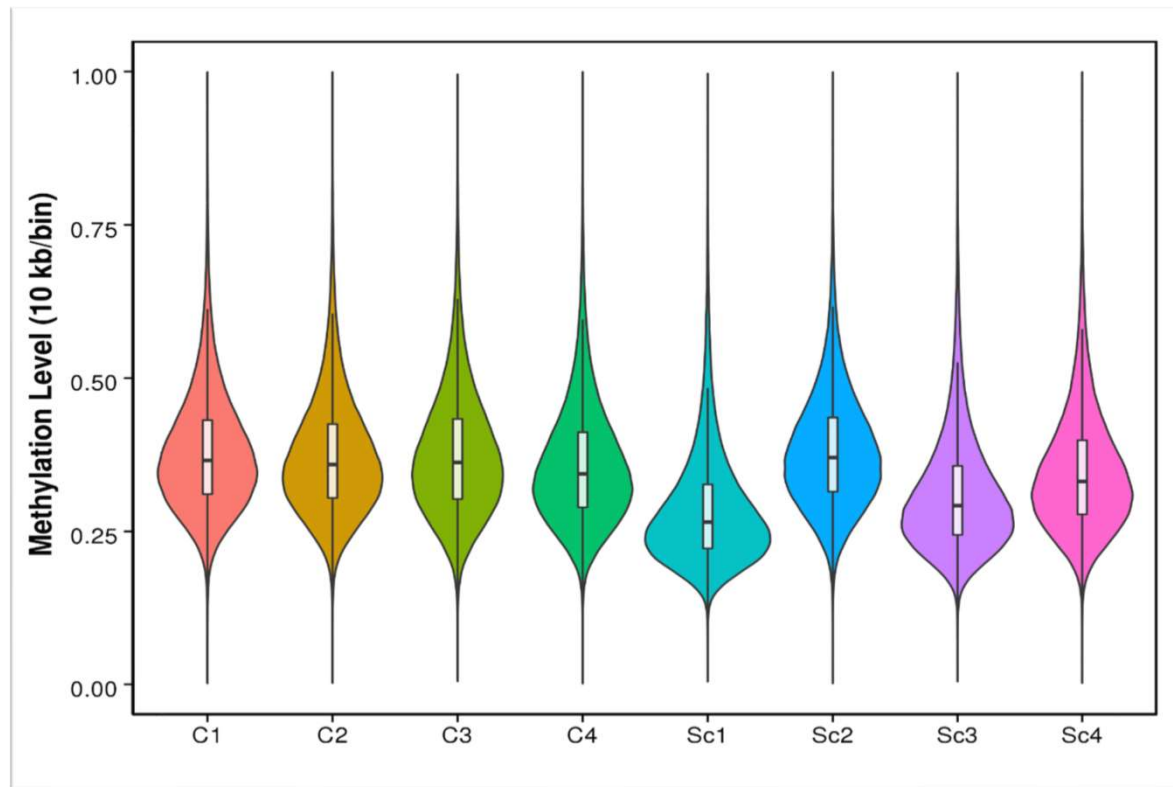
*Sample Name	* Vol (µl)	*Species	Pre-QC Method (qubit or nano)	*Conc. (ng/ µl)	*Total Amount (ng)	OD 260/280	OD 260/230
1_758	40	sheep	nano	76,24	3049,6	1,61	0,52
2_859	40	sheep	nano	76,01	3040,4	1,56	0,35
3_941	40	sheep	nano	87,01	3480,4	1,69	0,88
4_996	40	sheep	nano	80,01	3200,4	1,7	0,6
5_1075	40	sheep	nano	80,02	3200,8	1,63	0,79
6_1076	40	sheep	nano	79,07	3162,8	1,64	0,87
7_1078	40	sheep	nano	81,8	3272	1,67	0,95
8_1086	40	sheep	nano	84,5	3380	1,63	0,82

Perfil de metilación genómica

Summary of the genomic methylation profile. Percentage of methylated cytosines in all genome C (mC) or in the CpG, CHG and CHH regions, representing H to A, C or T. The results are shown as mean \pm standard deviation in the control group (n = 4), the scrapie group (n = 4) and the total.

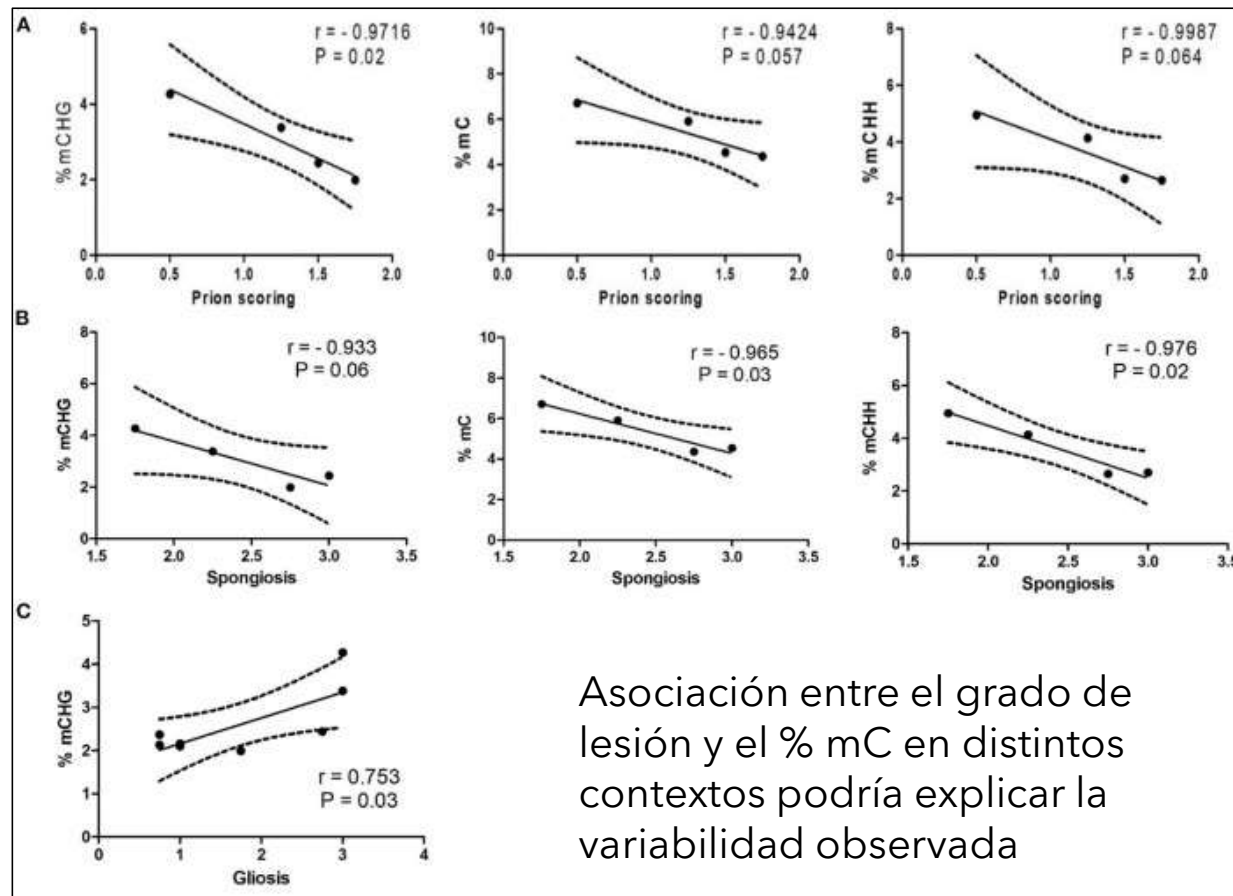
Groups	mC	mCpG	%mCHG	%mCHH
Control	4.60 \pm 0.16	41.21 \pm 0.37	2.19 \pm 0.12	2.84 \pm 0.21
Scrapie	5.38 \pm 1.12	41.78 \pm 1.64	3.02 \pm 1.01	3.61 \pm 1.13
Mean	4.99 \pm 0.85	41.50 \pm 1.14	2.61 \pm 0.80	3.22 \pm 0.86

Perfil de metilación genómica



Hernaiz et al. (2022) *Niveles de metilación global en tálamos control (C) y con scrapie (Sc).*

Correlación negativa entre metilación y lesiones de scrapie

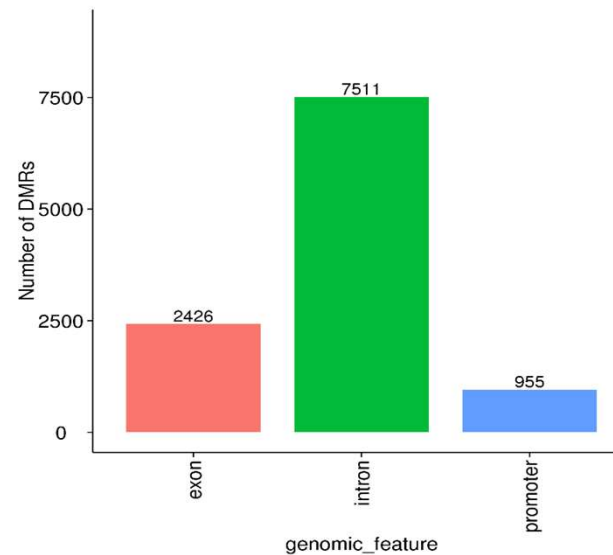


Identificación de DMR y DMP

Total DMR:
8,907

Hipermetiladas:
4,630

Hipometiladas:
4,277



1º Intrones

2º Exones

3º Promotores

DMR seleccionadas:
genes candidatos

CD81

SNX33

PCDH19

CABIN1

MAD1L1

A1BG

PEX1

PSMGA2

NARS

Hipermetiladas

Hipometilada

Identificación de DMR y DMP

Total DMP:
39

Hipermetiladas:
15

Hipometiladas:
24

Selected DMP : candidate genes

KCNK4

CAPN1

GSTA4

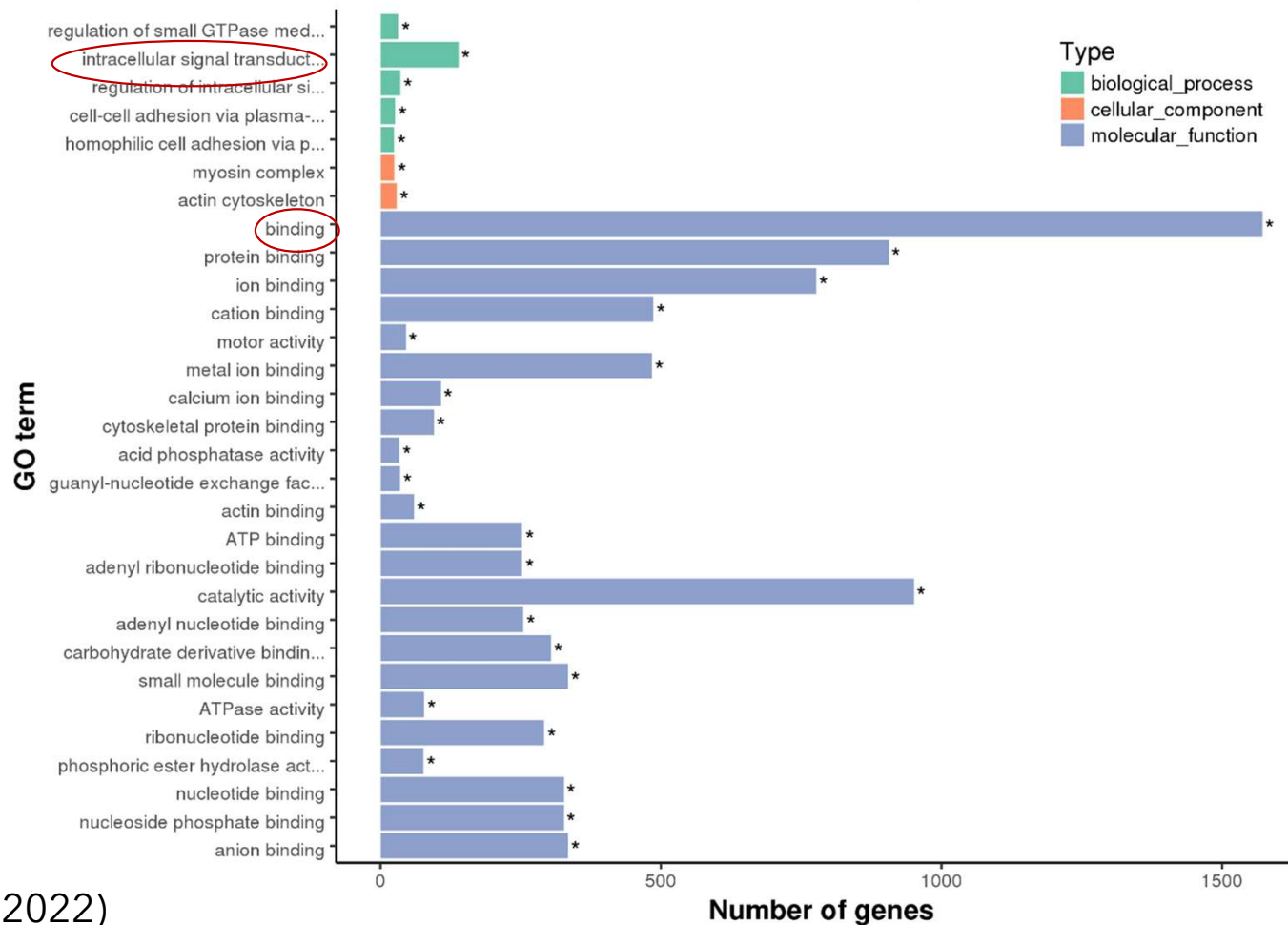
SNCG

Hipometiladas

Hipermetiladas

Análisis de enriquecimiento

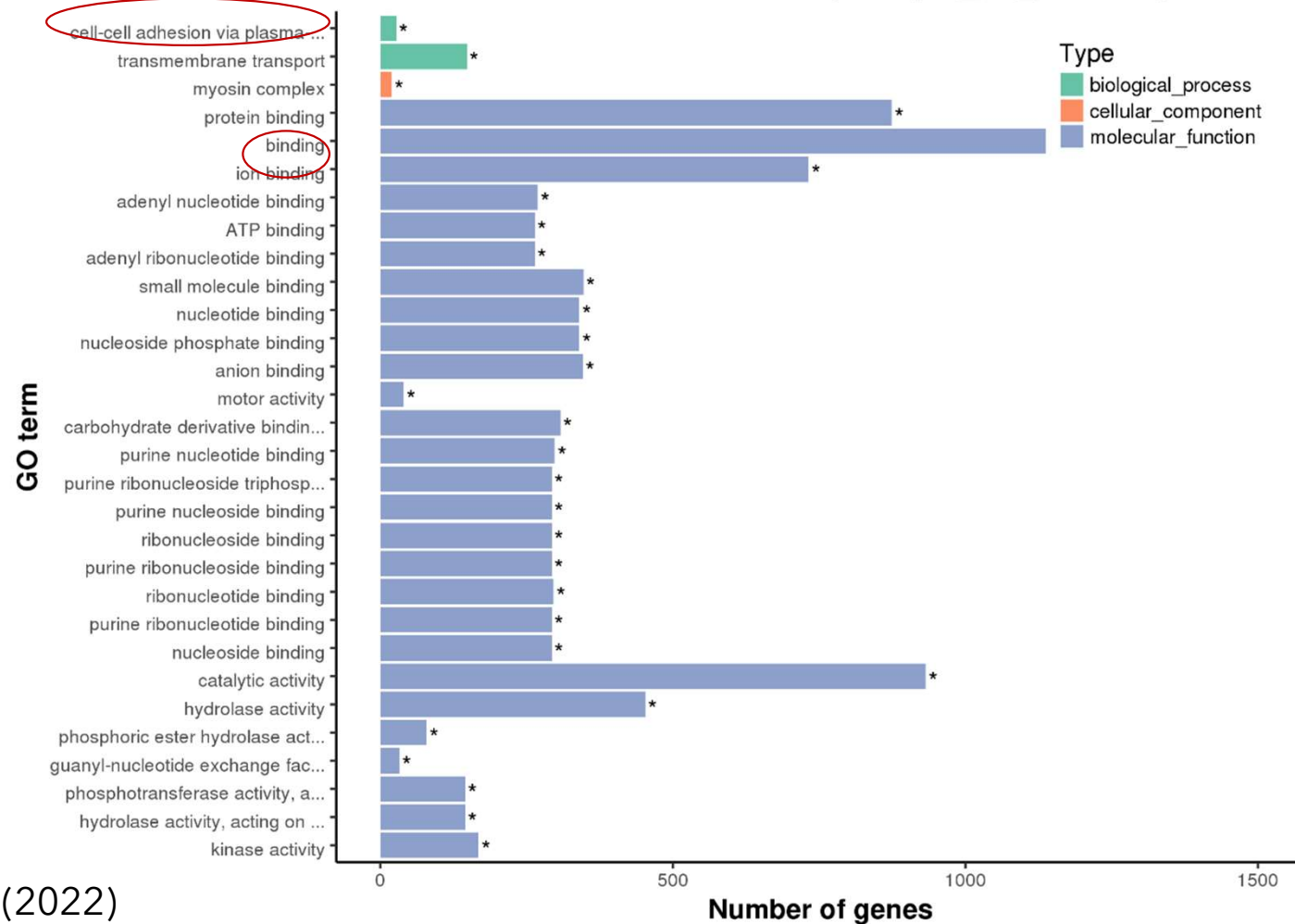
The Most Enriched GO Terms (Scrapie_vs_Control)



DMR
Hipermetiladas

Análisis de enriquecimiento

The Most Enriched GO Terms (Scrapie_vs_Control)



Hypomethylated
DMR

Análisis de enriquecimiento



→ **DMR hipermetiladas:** Transducción de señal intracelular y Unión.

→ **DMR hipometiladas:** Unión y transporte transmembrana.



→ **DMR Hipermetiladas:** Vías de Señalización del Ca y transportes ABC.

→ **DMR Hipometiladas:** Vía de señalización del Ca, arrastre circadiano, vía de señalización de cAMP y sinapsis colinérgicas

Epilepsia idiopática canina: aislamiento y caracterización de exosomas plasmáticos para su uso como biomarcadores



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

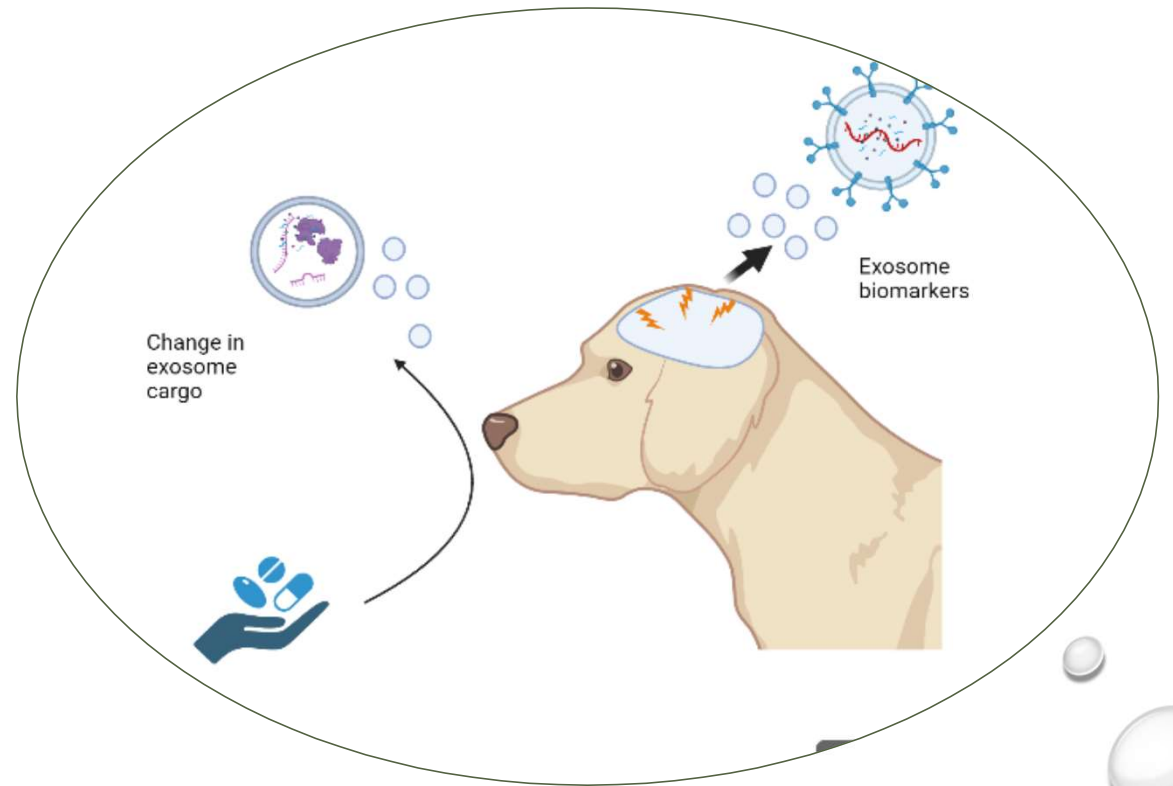


LAGENBIO
Laboratorio de
Genética Bioquímica
Universidad Zaragoza

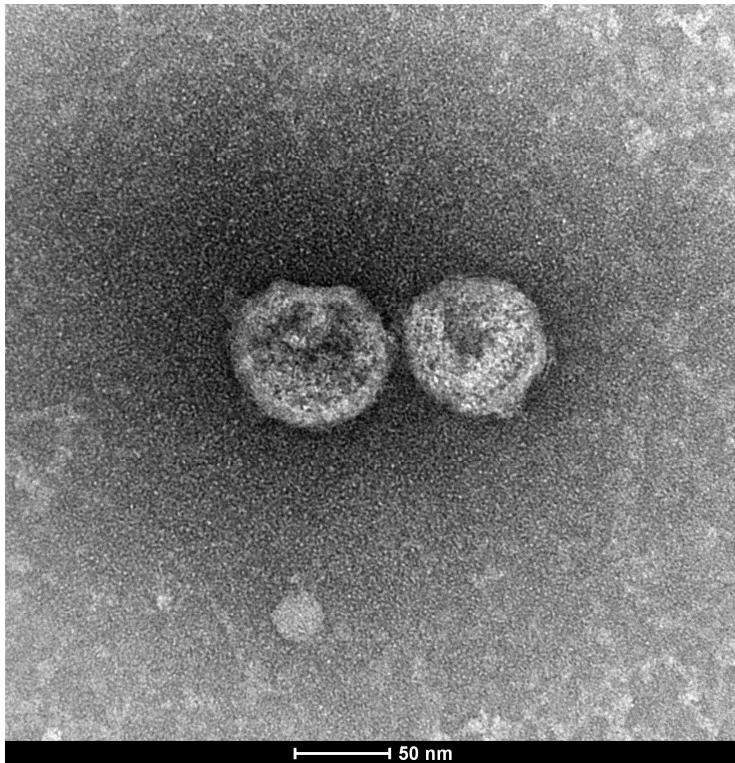


Epilepsia idiopática canina

- Forma más prevalente de epilepsia en humanos y perros (48-70 % de perros epilépticos).
- 30-40 % de perros con EI son refractarios al tratamiento.
- Los exosomas circulantes pueden ser Fuente de biomarcadores.
- Análisis del potencial biomarcadore de un set de microRNAs



Exosomas



Vesículas extracelulares esféricas de 30-150 nm de diámetro

Liberados por la mayoría de los tipos celulares

En fluidos biológicos de diferentes especies: sangre, líquido cefalorraquídeo, saliva

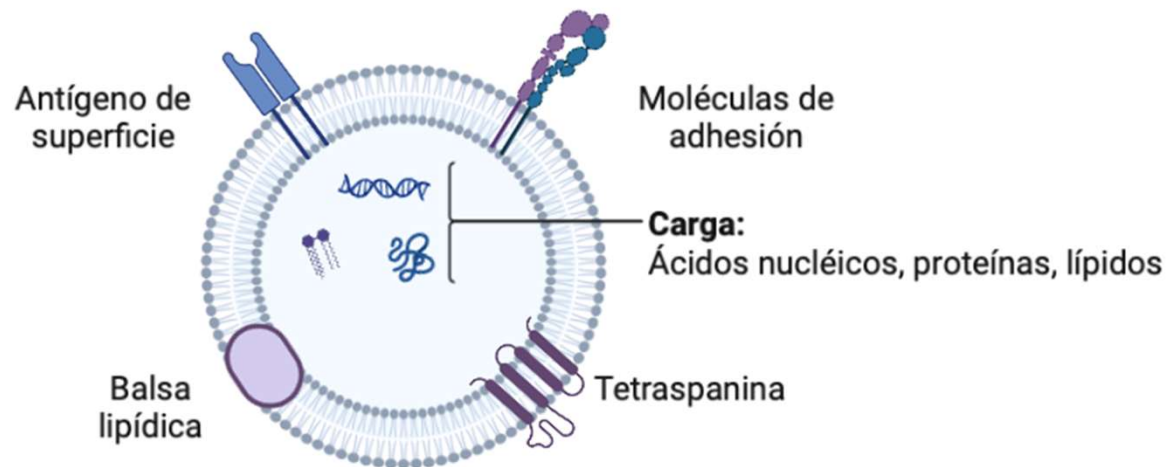
Mecanismo de comunicación intercelular a corta o larga distancia

Exosomas

Contenido varía según el tipo de célula de origen y el estado fisiológico o patológico

Fuente de biomarcadores

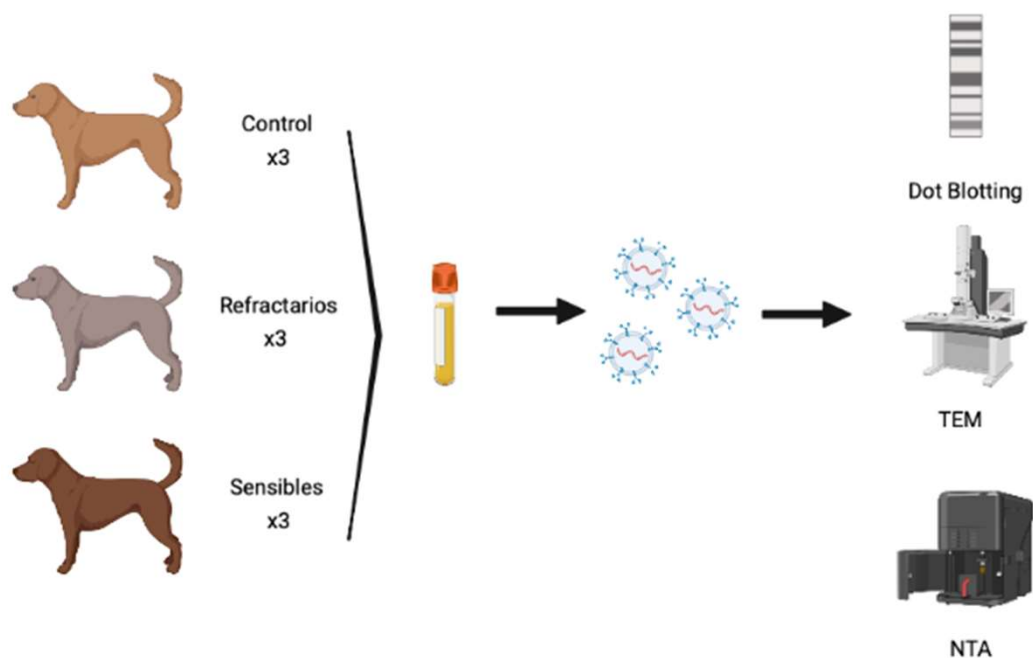
Atraviesan barrera hematoencefálica



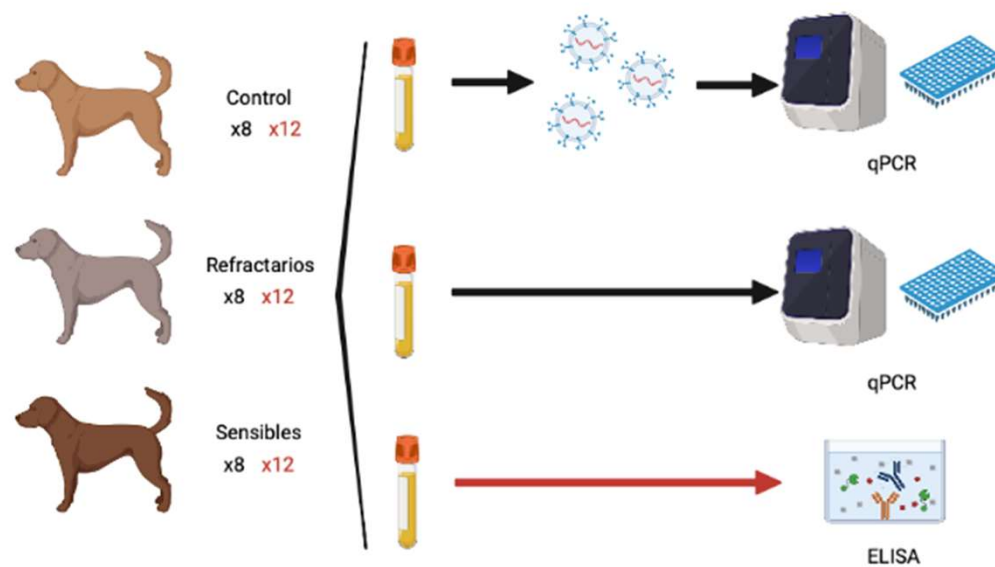
Carga depende de:
→ Célula de origen
→ Condiciones celulares
→ Tratamientos

Material y métodos

CARACTERIZACIÓN



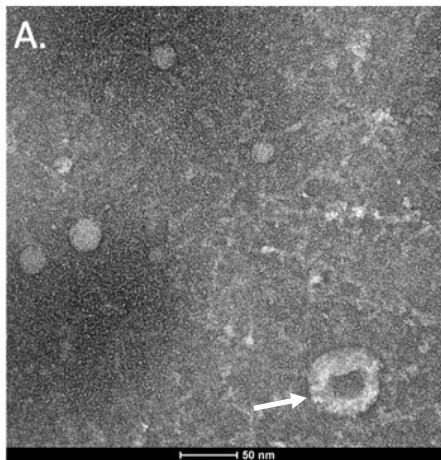
CUANTIFICACIÓN



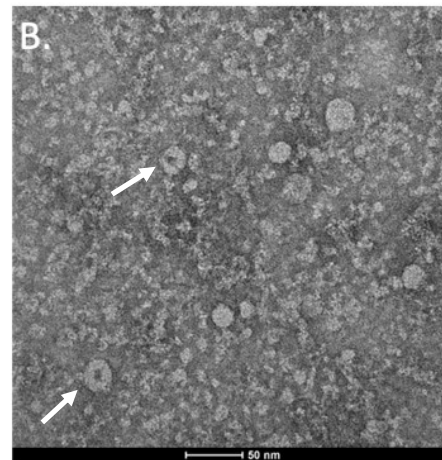
Imágenes realizadas con BioRender

Caracterización de exosomas

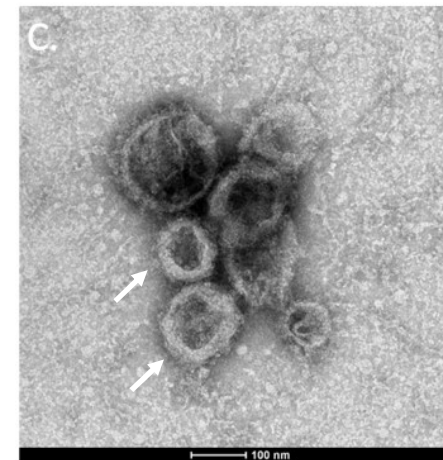
SENSIBLES



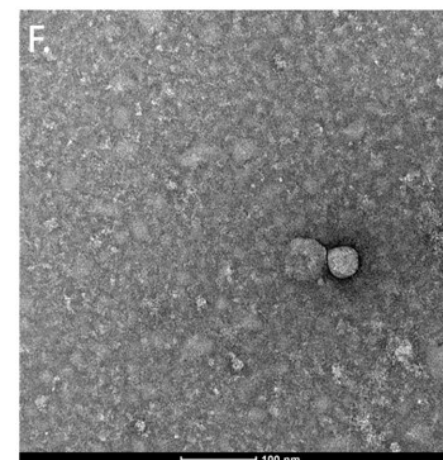
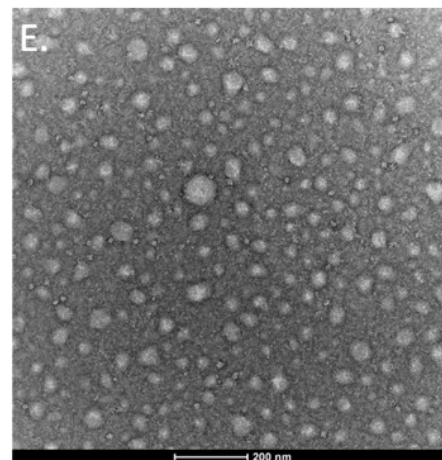
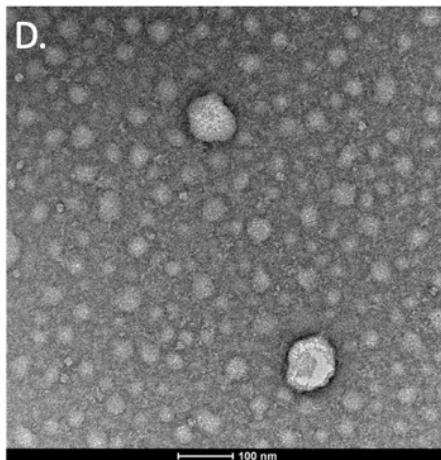
REFRACTARIOS



CONTROL

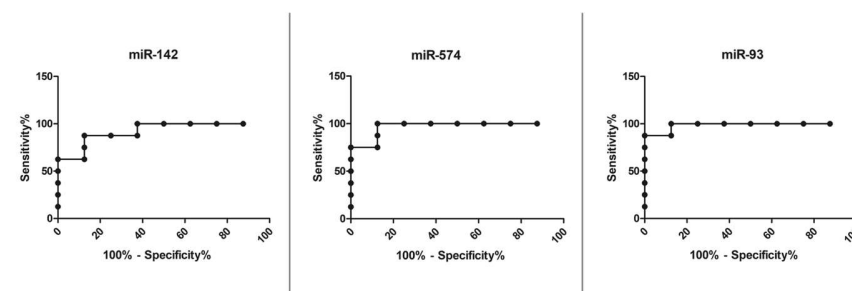
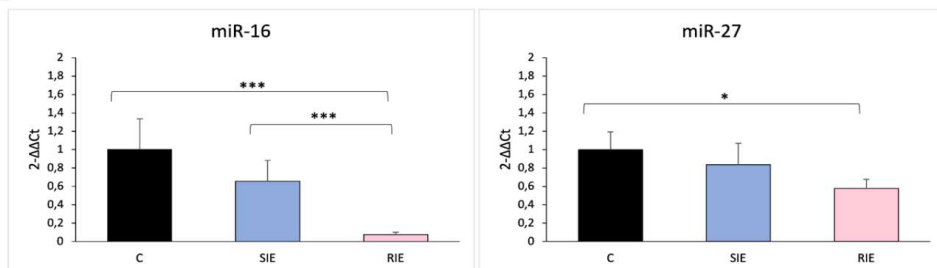


MUESTRAS
NO DILUIDAS

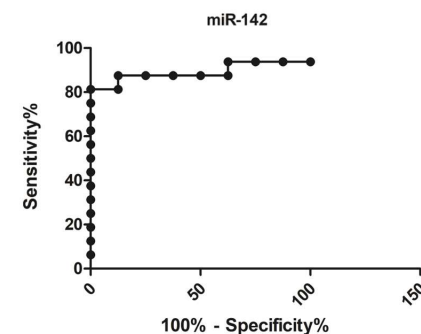
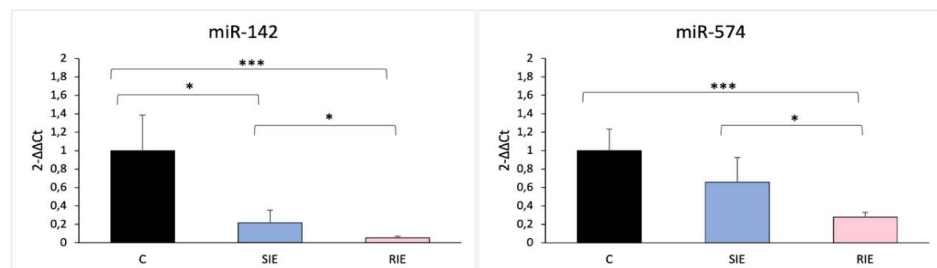
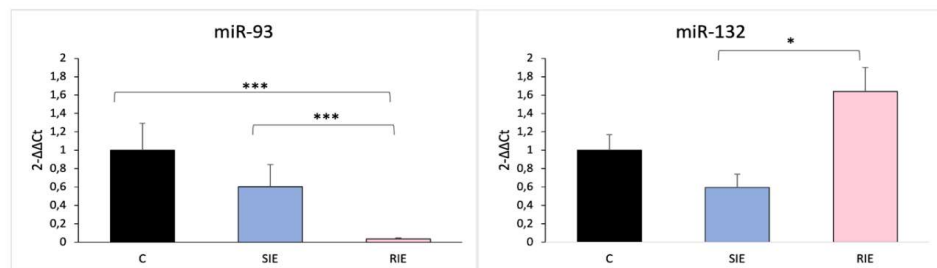


MUESTRAS
DILUIDAS 1:200

Análisis de los niveles de microRNAs

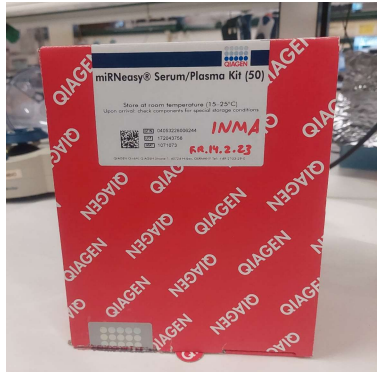


ROC sensibles vs resistentes



ROC control vs EI

sRNAseq plasma perros El



Sample Quantity	Grade	Suggestion
36	【FAIL】	The quality of the sample is not up to our standards. We recommend that you resend the samples. If you are willing to accept the possibility of a reduction in the amount or quality of data, we can proceed with caution.

3.QC Results

3.1 QC Results Summary

Qc Report

No.	Sample Name	Nucleic Acid ID	Concentration(ng/ul)	Volume(ul)	Total amount(ug)	Integrity value	Sample QC Results	Sample QC Memo	Sample volume for electrophoresis(ul)
1	R1	FKRN230245504-1A	0.149	10.00	0.00149	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
2	S1	FKRN230245505-1A	16.000	8.60	0.13760	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
3	C1	FKRN230245506-1A	2.000	7.90	0.01580	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
4	R2	FKRN230245507-1A	3.000	8.50	0.02550	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
5	S2	FKRN230245508-1A	0.372	7.90	0.00294	2.40	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
6	C2	FKRN230245509-1A	2.851	8.20	0.02338	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
7	R3	FKRN230245510-1A	8.000	9.50	0.07600	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
8	S3	FKRN230245511-1A	1.473	10.00	0.01473	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
9	C3	FKRN230245512-1A	0.238	10.00	0.00238	2.40	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
10	R4	FKRN230245513-1A	7.000	6.90	0.04830	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
11	S4	FKRN230245514-1A	29.000	8.60	0.24940	2.80	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
12	C4	FKRN230245515-1A	0.040	8.70	0.00035	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
13	R5	FKRN230245516-1A	3.000	7.70	0.02310	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
14	S5	FKRN230245517-1A	0.660	8.60	0.00568	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
15	C5	FKRN230245518-1A	0.839	8.70	0.00730	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
16	R6	FKRN230245519-1A	4.000	7.00	0.02800	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
17	S6	FKRN230245520-1A	4.000	5.80	0.02320	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
18	C6	FKRN230245521-1A	3.000	7.40	0.02220	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
19	R7	FKRN230245522-1A	1.933	8.40	0.01624	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
20	S7	FKRN230245523-1A	3.000	4.50	0.01350	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
21	C7	FKRN230245524-1A	0.431	6.20	0.00267	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
22	R8	FKRN230245525-1A	2.000	6.70	0.01340	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
23	S8	FKRN230245526-1A	3.000	6.50	0.01950	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
24	C8	FKRN230245527-1A	0.828	10.00	0.00828	2.40	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
25	R9	FKRN230245528-1A	6.000	7.90	0.04740	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
26	S9	FKRN230245529-1A	4.000	8.00	0.03200	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
27	C9	FKRN230245530-1A	4.000	6.40	0.02560	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
28	R10	FKRN230245531-1A	3.000	10.00	0.03000	1.00	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	1.00
29	S10	FKRN230245532-1A	0.339	10.00	0.00339	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
30	C10	FKRN230245533-1A	0.358	9.70	0.00347	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
31	R11	FKRN230245534-1A	8.000	9.40	0.07520	1.30	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
32	S11	FKRN230245535-1A	3.471	10.00	0.03471	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
33	C11	FKRN230245536-1A	0.760	9.00	0.00684	2.40	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
34	R12	FKRN230245537-1A	2.039	7.40	0.01509	2.30	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
35	S12	FKRN230245538-1A	0.584	9.00	0.00526	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00
36	C12	FKRN230245539-1A	0.307	7.60	0.00233	2.50	Fail	Unqualified RIN,Insufficient total amount	2.00

1.2 Data Quality Summary

Data Quality Summary: **Table 1.**

Muestra	Total µg	Integrity value
R1	0,00149	2,5
C1	0,01580	1
R3	0,07600	1
R11	0,07520	1,3

Table 1 Data Quality Summary

Sample	Raw reads	Raw data(G)	Error(%)	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
R1	15211114	0.8	0.01	99.34	97.62	52.63
C1	10376410	0.5	0.01	99.32	97.56	53.06
R3	17870873	0.9	0.01	99.30	97.36	52.98
R11	11831736	0.6	0.01	99.33	97.67	52.52

Sample: sample ID.

Raw reads: Four rows as a unit to calculate the sequence number of each raw data file.

Raw bases: (Number of sequences) * (sequence length), use G for unit.

Error rate: base error rate.

Q20, Q30: (Base number of Phred value > 20(> 30)) / (Total base number).

GC content: (G&C base number) / (Total base number).



????