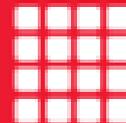


GENÉTICA Y HERENCIA

**La reversibilidad de la
hipometilación global heredada en
espermias, según cambios
nutricionales.**

Costarelli, Eugenia
Pérez, M. Juncal
Sadovsky, Daniela
Toro, Carla



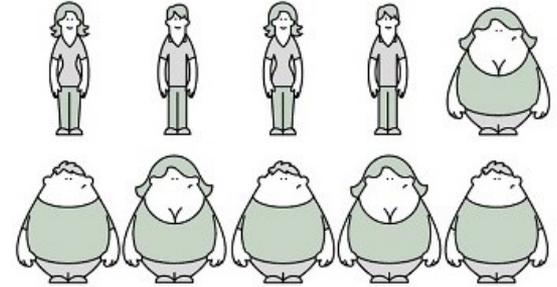
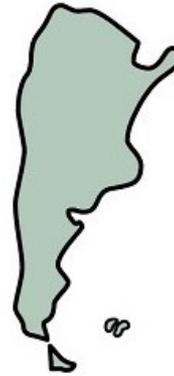
**FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES**
Naturaleza, Ciencia y Humanismo

PROBLEMÁTICA DE LA OBESIDAD

Acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.



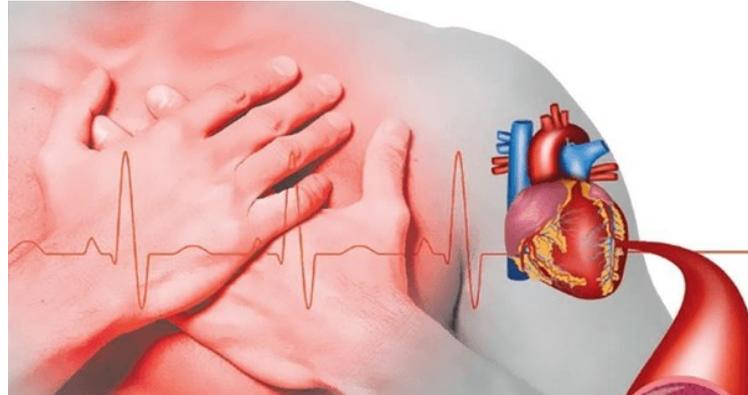
Cada año fallecen alrededor de 3,4 millones de personas adultas en el mundo



PROBLEMÁTICA DE LA OBESIDAD

Atribuye a enfermedades como:

- diabetes (44%)
- cardiopatías isquémicas (23%)
- entre el 7% y el 41% de la carga de ciertos tipos de cánceres



PROBLEMÁTICA DE LA OBESIDAD

El IMC se utiliza para clasificar el estado ponderal (del peso) de la persona, y se calcula a partir de la fórmula: **peso(kg)/talla(m²)**

IMC	Clasificación
<18,5	Peso insuficiente
18,5-24,9	Normopeso
25-26,9	Sobrepeso grado I
27-29,9	Sobrepeso grado II (preobesidad)
30-34,9	Obesidad de tipo I
35-39,9	Obesidad de tipo II
40-49,9	Obesidad de tipo III (mórbida)
>50	Obesidad de tipo IV (extrema)

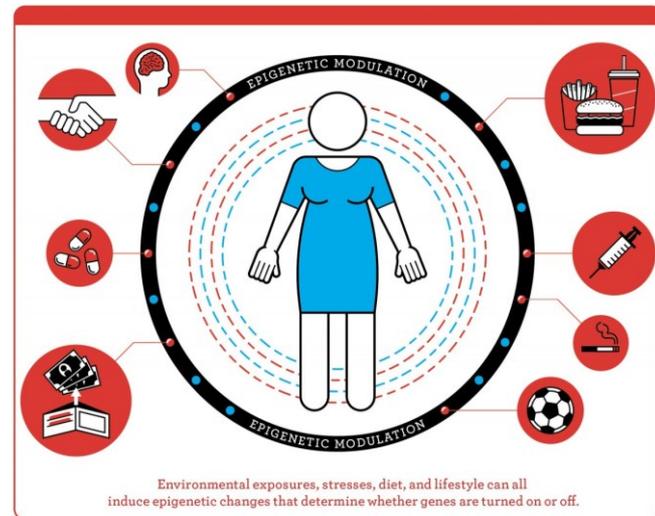
HERENCIA DE MARCAS EPIGENÉTICAS

- © Epigenética: cambios heredables en la estructura y organización del ADN que no involucran cambios en la secuencia genómica y que modulan la expresión génica.
- © Factor = desarrollo de obesidad.
- © *EWAS* (estudios de asociación del epigenoma completo).
- © Estilo de vida de los

PROGENITORES



DESCENDENCIA



INVESTIGACIONES

El miedo inducido por el olor de los padres induce una respuesta de miedo y cambios neuronales en las crías que no tienen olor.

**nature
neuroscience**

Article | Published: 01 December 2013

Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations

Brian G Dias  & Kerry J Ressler 

Nature Neuroscience **17**, 89–96 (2014) | [Download Citation](#) 

El consumo de grasa paterna conduce a un riesgo modificado de cáncer de mama en hijas.

Paternal programming of breast cancer risk in daughters in a rat model: opposing effects of animal- and plant-based high-fat diets

Camile Castilho Fontelles, Luiza Nicolosi Guido, Mariana Papaléo Rosim, Fábila de Oliveira Andrade, Lu Jin, Jessica Inchauspe, Vanessa Cardoso Pires, Inar Alves de Castro, Leena Hilakivi-Clarke, Sonia de Assis and Thomas Prates Ong 

Breast Cancer Research 2016 **18**:71

<https://doi.org/10.1186/s13058-016-0729-x> | © The Author(s). 2016

Received: 20 January 2016 | Accepted: 17 June 2016 | Published: 26 July 2016

La exposición a la heroína paterna induce un comportamiento ansioso en la descendencia.

Transgenerational effects of paternal heroin addiction on anxiety and aggression behavior in male offspring

Mohd Zaki Farah Naquiah, Richard Johari James , Suraya Suratman, Lian Shien Lee, Mohd Izhar Mohd Hafidz, Mohd Zaki Salleh and Lay Kek Teh 

Behavioral and Brain Functions 2016 **12**:23

PROGRAMACIÓN METABÓLICA PATERNA

- © El estudio de la **programación metabólica** de los padres en modelos animales se remonta al año 1965, a partir de un estudio en crías de animales con diabetes inducida químicamente (*Okamoto 1965*).
- © Los últimos estudios han analizado puntualmente las marcas epigenéticas en las **células germinales**:
 - Se estudió cómo la **obesidad paterna inicia trastornos metabólicos en dos generaciones de ratones y la alteración en el perfil del testículo**. Se indujeron a la obesidad ratones a partir del suministro de una dieta HFD (dieta alta en grasas) (*Fullston et al . 2013* , *Wei et al . 2014*).
 - Obesidad genética (*Cropley et al . 2016*).
 - Restricción calórica (*Anderson et al . 2006*).
 - Restricción de proteínas (*Watkins & Sinclair 2014*).



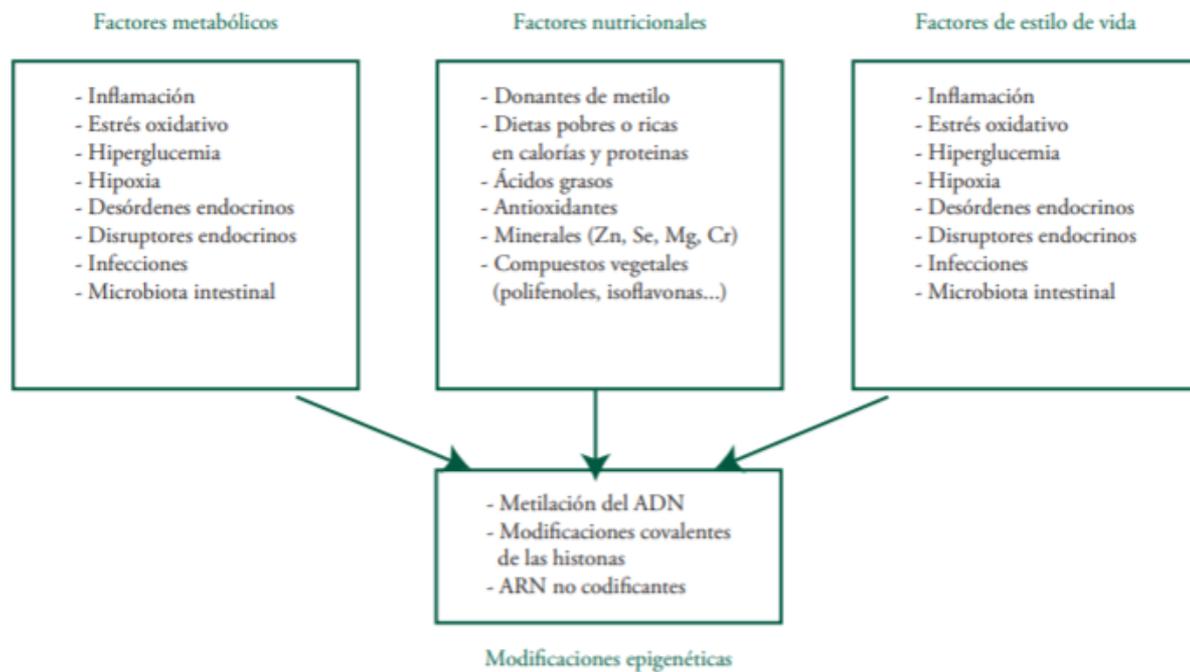
NUTRIEPIGENÉTICA

Rama de la ciencia que estudia los efectos de los nutrientes y los alimentos sobre la salud humana a través de las modificaciones epigenéticas.



COMPUESTOS PRESENTES EN LOS ALIMENTOS VINCULADOS A LA APARICIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS:

- Grupos dadores de metilo (ácido fólico, metionina, colina, betaína, vitamina B12).
- La ingesta excesiva o deficiente de calorías y proteínas.
- Las dietas ricas en grasa, los ácidos grasos de cadena corta (butirato, acetato y propionato).
- Algunos minerales y vitaminas antioxidantes (vitaminas A, E y C)
- Diversos compuestos de origen vegetal, como distintos polifenoles, catequinas, isoflavonas o isotiocianatos.



MARCA EPIGENÉTICA

Principales mecanismos epigenéticos:

- Modificaciones covalentes de las histonas
- Metilación del ADN
- ARN no codificantes (como los miRNA)

Estudio del epigenoma de la obesidad



centrado principalmente en el análisis de los patrones de metilación del ADN

¿POR QUÉ ELEGIMOS ESTUDIAR EN ESPERMAS?

- © Evidencia que los cambios metabólicos inducidos por la dieta paterna se transmiten a su descendencia, y esto sugiere que está mediada por los espermatozoides.
- © El epigenoma del esperma es dinámico y vulnerable a los cambios ambientales.

(Donkin I, et al. Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. *Cell Metab.* 2015. Doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.004)

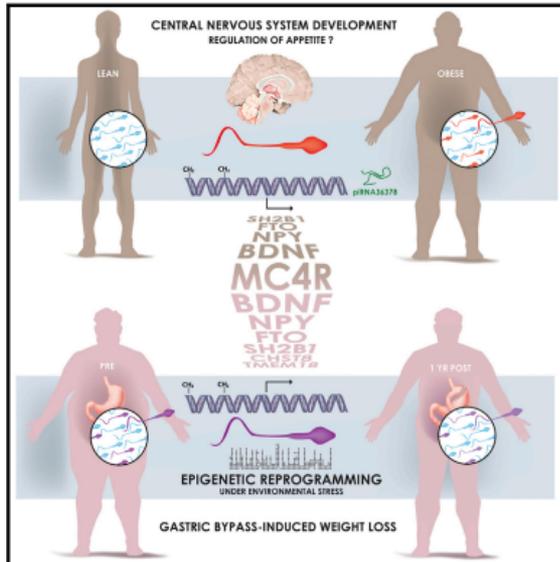


¿POR QUÉ ELEGIMOS ESTUDIAR LOS ESPERMAS?

Cell Metabolism

Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans

Graphical Abstract



Authors

Ida Donkin, Soetkin Versteijhe, Lars R. Ingerslev, ..., Christopher T. Workman, Juleen R. Zierath, Romain Barrès

Correspondence

barres@sund.ku.dk

In Brief

Donkin et al. show that spermatozoa from obese men carry a distinct epigenetic signature compared to lean men, in particular at genes controlling brain development and function. The sperm methylome is dynamically remodeled after gastric-bypass-induced weight loss, notably at gene regions implicated in the central control of appetite.

La metilación del ADN de los espermatozoides es remodelada rápidamente después de la cirugía de GBP



La pérdida de peso induce una alteración del epigenoma del espermatozoa



PREGUNTAS



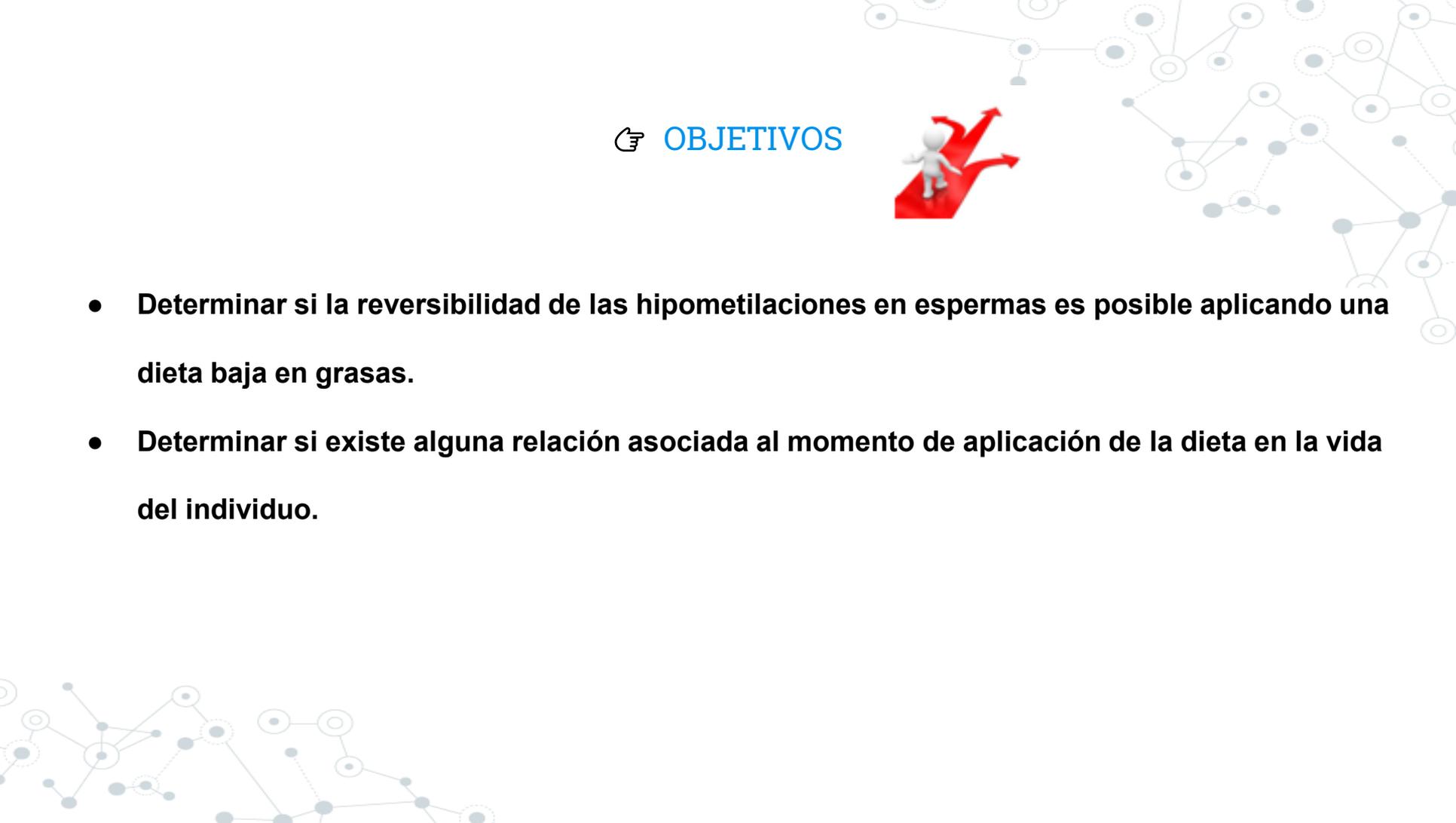
- **¿Se pueden revertir las hipometilaciones en espermias aplicando una dieta extrema baja en grasas?**
- **En caso de ser posible una reversión, ¿En qué etapa del individuo se debe aplicar la dieta para lograr una descendencia sana?**



HIPÓTESIS



La reversibilidad de la hipometilación global heredada en espermias, como consecuencia de una dieta reducida en grasas.

A decorative background consisting of a network of interconnected nodes and lines, with some nodes highlighted in blue and others in grey. The nodes are arranged in a complex, non-linear pattern across the top and bottom of the slide.

↳ OBJETIVOS



- **Determinar si la reversibilidad de las hipometilaciones en espermias es posible aplicando una dieta baja en grasas.**
- **Determinar si existe alguna relación asociada al momento de aplicación de la dieta en la vida del individuo.**

EFECTO DE LA OBESIDAD PATERNA INDUCIDA POR LA DIETA SOBRE LA SALUD METABÓLICA DE DOS GENERACIONES RESULTANTES.

The FASEB Journal article fj.12-224048. Published online July 11, 2013.

The FASEB Journal • Research Communication

Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F₂ generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content

Tod Fullston,^{*†} E. Maria C. Ohlsson Teague,^{*} Nicole O. Palmer,^{*} Miles J. DeBlasio,^{*} Megan Mitchell,^{*} Mark Corbett,[†] Cristin G. Print,^{‡,§} Julie A. Owens,^{*} and Michelle Lane^{*‡}

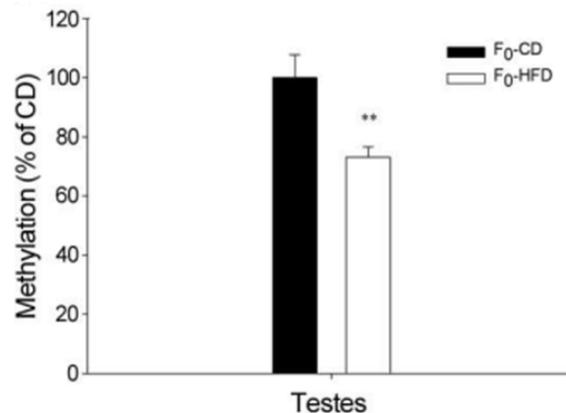
^{*}Discipline of Obstetrics and Gynaecology and [†]Discipline of Paediatrics, School of Paediatrics and Reproductive Health, Robinson Institute, The University of Adelaide, Adelaide, South Australia, Australia; [‡]Department of Molecular Medicine and Pathology and [§]New Zealand Bioinformatics Institute, University of Auckland, Auckland, New Zealand; and [¶]Repromed, Adelaide, South Australia, Australia

TABLE 1. Composition of CD and HFD

Component	CD, SF04-057	HFD, SF00-219
Ingredient (%)		
Sucrose	34.1	34.1
Casein acid	19.5	19.5
Canola oil	6.0	—
Clarified butterfat	—	21
Cellulose	5.0	5.0
Wheat starch	30.5	15.5
Vitamins/minerals	4.9	4.9
Energy		
Digestible energy (kJ/g)	16.1	19.4
Digestible energy from lipids (%)	21.0	40.0
Digestible energy from protein (%)	14.0	17.0

Values are expressed as means \pm SE. *Ad libitum* consumption of feed per 24 h was 3.44 ± 0.05 g ($n=6$ male mice measured for daily feed intake over a 10-wk period).

45% grasa (HFD)
21% grasa (CD)





DISEÑO EXPERIMENTAL

PROTECCIÓN HACIA LOS ANIMALES

En la República Argentina existe la Ley 14346 sobre la Protección de los Animales.

hay distintas entes relacionadas con el cuidado de animales de laboratorio:

- CICUAL: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio .
Pertenece a IIByT, CONICET - UNC, entre otras
- CICUAE: Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación, pertenece al INTA
- SNB: Sistema Nacional de Bioterios



PROTECCIÓN HACIA LOS ANIMALES

Refinamiento
técnicas con menor sufrimiento
posible

Reemplazo

Por otro modelo experimental

3R

Reducción

menor número de
animales



Temperatura	19 - 21°C.
Superficie mínima del suelo de la jaula (cm²)	<u>330</u>
Superficie mínima del suelo de la jaula / animal (cm²)	60 (0-20 g) 70 (20-25 g) 80 (25-30 g) 100 (> 30 g)
Zona de cría (cm²)	330
Altura mínima de la jaula (cm)	12

Utilizaremos las cepas de ratones **C57BL/6** (llamados también “black 6”)

Modelo Taconic B6

Rendimiento reproductivo superior en comparación con otros grupos B6



MODELO BIOLÓGICO

Vamos a necesitar ur

- 5 (obesos-expe
- 10 hembras sar
- 5 ratones mach

TABLE 1. *Composition of CD and HFD*

Component	CD, SF04-057	HFD, SF00-219
Ingredient (%)		
Sucrose	34.1	34.1
Casein acid	19.5	19.5
Canola oil	6.0	—
Clarified butterfat	—	21
Cellulose	5.0	5.0
Wheat starch	30.5	15.5
Vitamins/minerals	4.9	4.9
Energy		
Digestible energy (kJ/g)	16.1	19.4
Digestible energy from lipids (%)	21.0	40.0
Digestible energy from protein (%)	14.0	17.0

les:

Values are expressed as means \pm SE. *Ad libitum* consumption of feed per 24 h was 3.44 ± 0.05 g ($n=6$ male mice measured for daily feed intake over a 10-wk period).

MODELO BIOLÓGICO

❑ Dieta que se aplicará:

- ✓ 45% grasa (HFD),
- ✓ 21% grasa (CD),
- ✓ 6% grasa (LFD)



❑ Ejercicio basal: 1 hora de rueda por día.

❑ Medidas de obesidad: Pasada la edad de madurez sexual, se realizará un chequeo utilizando el método “Lee”, análisis bioquímicos de sangre periférica y análisis del estado de epigenético del esperma.

ETAPAS

F0

- MÉTODO LEE.
- AN. BIOQUÍMICO.
- ESTADO EPIGENÉTICO GLOBAL DE ESPERMAS (EEGE).

Machos obesos

5 ejemplares
HFD



Hembras magras

5 ejemplares
CD

F1

Machos obesos-Experimental



Hembras magras

CD

CD

CD/LFD

F2

Machos/Control-Obeso

Machos D1/D2/D3

Machos magros

5 ejemplares
CD



Hembras magras

5 ejemplares
CD

Machos magros

CD



Hembras magras

CD

CD

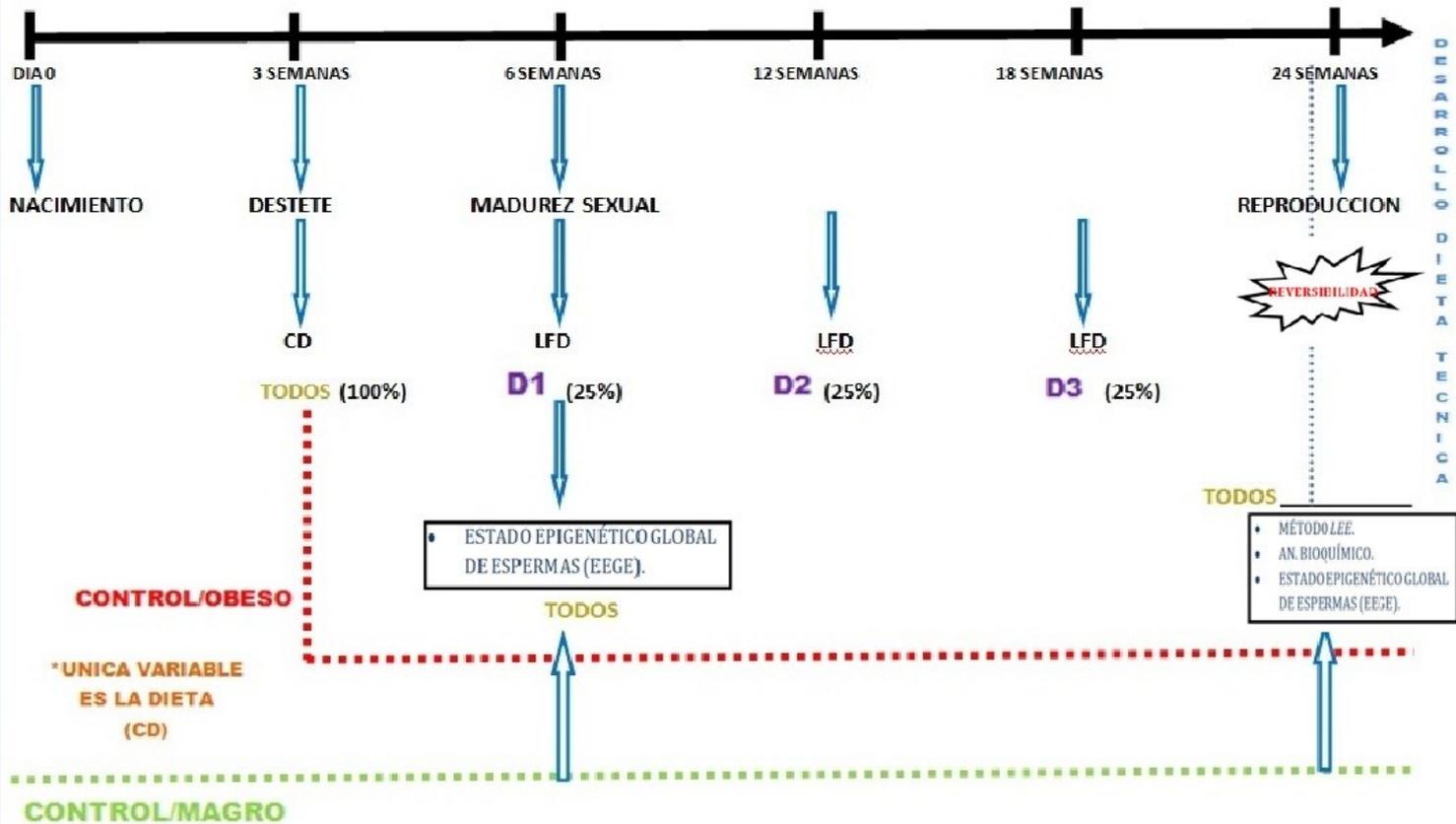
Machos magros

ETAPAS

F1

RATONES

OBESOS-EXPERIMENTAL



CONTROL/MAGRO

*UNICA VARIABLE ES LA DIETA (CD)

CONTROL/OBESO

ESTADO EPIGENÉTICO GLOBAL DE ESPERMAS (EEGE).

MÉTODO LEE.
AN. BIOQUÍMICO.
ESTADO EPIGENÉTICO GLOBAL DE ESPERMAS (EEGE).

REVERSIBILIDAD

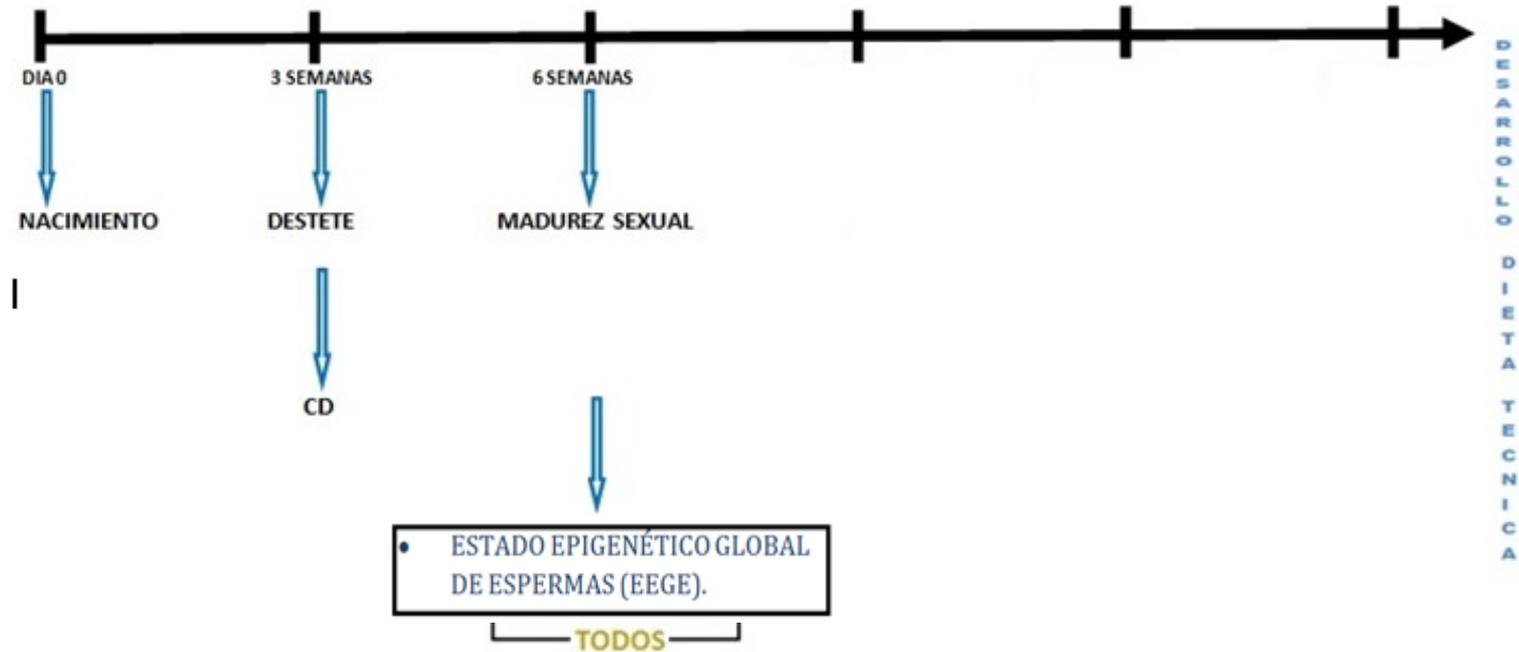
DESARROLLO DIETA TECNICA

F2

- **MAGROS/EXPERIMENTAL**

- **CONTROL/OBESOS**

- **CONTROL/MAGRO**



MÉTODO “LEE”

La obesidad será evaluada calculando la raíz cúbica del peso corporal (g) dividido entre la longitud hocico-ano (LHA)(cm)

Definimos como:

- © Un valor igual o menor a 0,300 es considerado como **normal/magro.**
- © mayor que 0,300 son considerados **obesos.**

(Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón, La Habana, La Habana, Cuba)

Tomaremos muestr

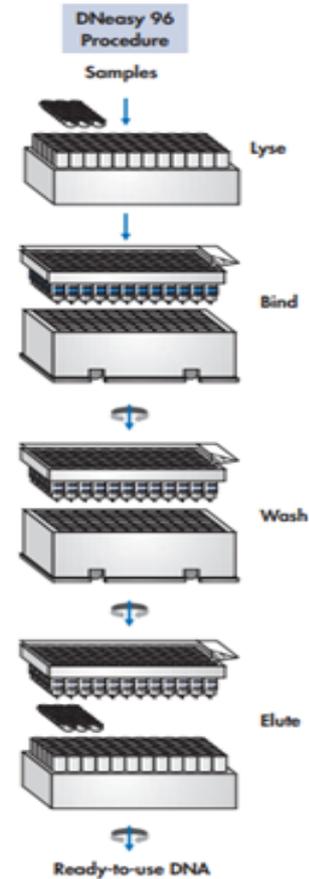
TABLE 2. F_0 generation body composition, blood metabolite profile, and fecundity

Parameter	CD	HFD	P
<i>n</i>	10	10	
F_0 total body weight (g)	29.80 ± 0.54	34.24 ± 0.98	0.002
Adiposity			
Peritoneal fat (g)	1.28 ± 0.08	1.79 ± 0.13	0.005
Peritoneal fat (%) ^a	4.25 ± 0.31	5.36 ± 0.24	0.01
Retroperitoneal fat (g)	0.40 ± 0.02	0.47 ± 0.05	NS
Retroperitoneal fat (%)	1.31 ± 0.08	1.40 ± 0.10	NS
Sum of adipose deposits (g)	1.68 ± 0.10	2.26 ± 0.18	0.01
Sum of adipose deposits (%)	5.56 ± 0.39	6.76 ± 0.33	0.03
Organ weights			
Testis (g)	1.69 ± 0.03	1.64 ± 0.11	NS
Testis (%)	0.56 ± 0.02	0.50 ± 0.04	NS
Epididymis (g)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	NS
Epididymis (%)	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.03	NS
Seminal vesicles (g)	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS
Seminal vesicles (%)	1.22 ± 0.05	1.07 ± 0.06	NS
Liver (g)	1.38 ± 0.08	1.77 ± 0.19	NS
Liver (%)	4.57 ± 0.34	5.26 ± 0.41	NS
Pancreas (g)	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	NS
Pancreas (%)	0.49 ± 0.04	0.42 ± 0.02	NS
Kidney (g)	0.44 ± 0.01	0.40 ± 0.05	NS
Kidney (%)	1.33 ± 0.00	1.20 ± 0.15	NS
Blood metabolites			
Glucose (mM)	10.98 ± 0.87	12.77 ± 0.70	NS
Cholesterol (mM)	3.60 ± 0.20	5.21 ± 0.23	0.0001
Triglyceride (mM)	0.75 ± 0.05	0.79 ± 0.02	NS
NEFAs (μEq/ml)	0.88 ± 0.04	0.92 ± 0.04	NS
Leptin (ng/ml)	2.90 ± 0.10	4.50 ± 0.49	0.05
Insulin (ng/ml)	0.37 ± 0.07	0.53 ± 0.10	NS
Fecundity			
Proportion of males generating a litter (%)	100.00	60.50	0.04
Time to mate (d)	2.90 ± 0.40	3.60 ± 0.40	NS
Offspring gestational length (d)	21.40 ± 0.47	20.60 ± 0.26	NS
Litter size	8.50 ± 1.41	9.50 ± 2.15	NS

Values are expressed as means ± SE. NS, not significant ($P > 0.05$ by Student's *t* test, Mann-Whitney *U* test for nonparametric data, or a univariate general linear model using cohort of animals as a

ANÁLISIS GLOBAL DEL EPIGENOMA DE LOS ESPERMATOZOIDES

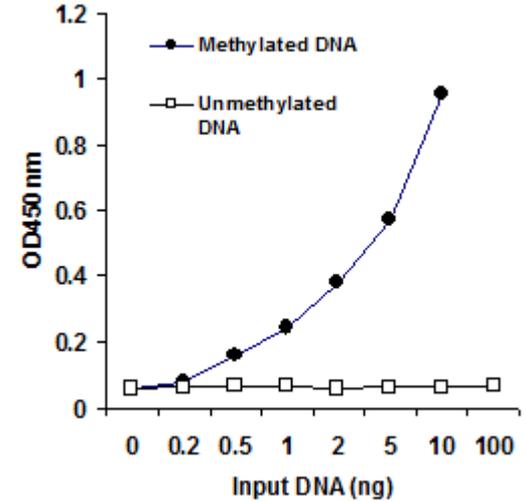
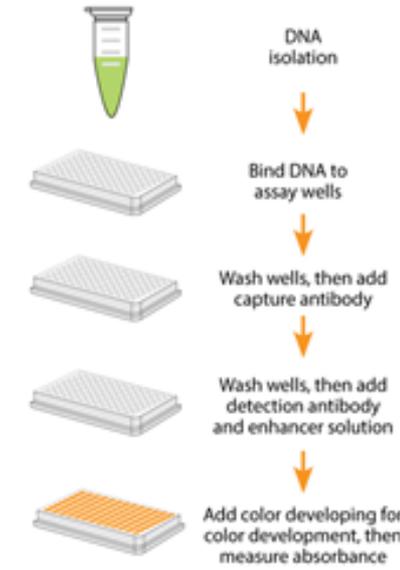
DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)



ANÁLISIS GLOBAL DEL EPIGENOMA DE LOS ESPERMATOZOIDES

Kit de cuantificación de ADN metilado (colorimétrico)

Components	48 tests	96 tests
10X Wash Buffer	1 x 14ml	1 x 28ml
8-Well Assay Strips (with Frame)	6 units	12 units
Binding Solution	1 x 5ml	1 x 10ml
Capture Antibody, 1000 µg/ml	1 x 4µl	1 x 8µl
Detection Antibody, 400 µg/ml	1 x 8µl	1 x 16µl
Developer Solution	1 x 5ml	1 x 10ml
Enhancer Solution	1 x 8µl	1 x 16µl
Negative Control, 20 µg/ml	1 x 10µl	1 x 20µl
Positive Control, 20 µg/ml	1 x 10µl	1 x 20µl
Stop Solution	1 x 5ml	1 x 10ml



5-mC % =

$$\frac{(\text{Sample OD} - \text{Negative Control OD}) \div S}{(\text{Positive Control OD} - \text{Negative Control OD}) \times 2 + P} \times 100\%$$

S is the amount of input sample DNA in ng.

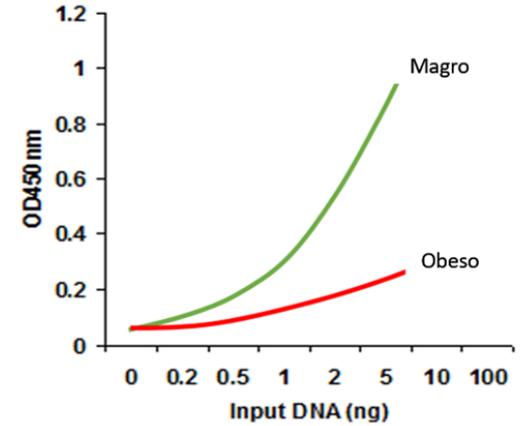
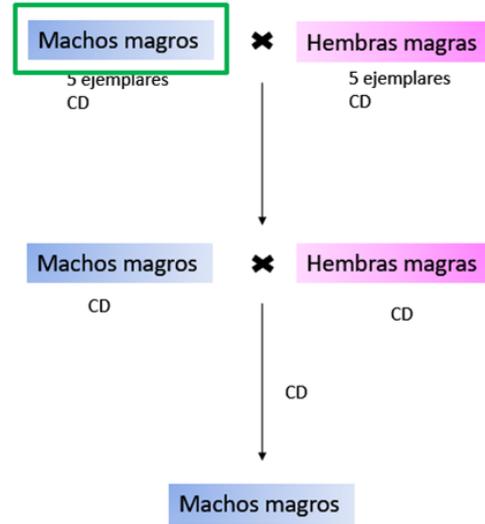
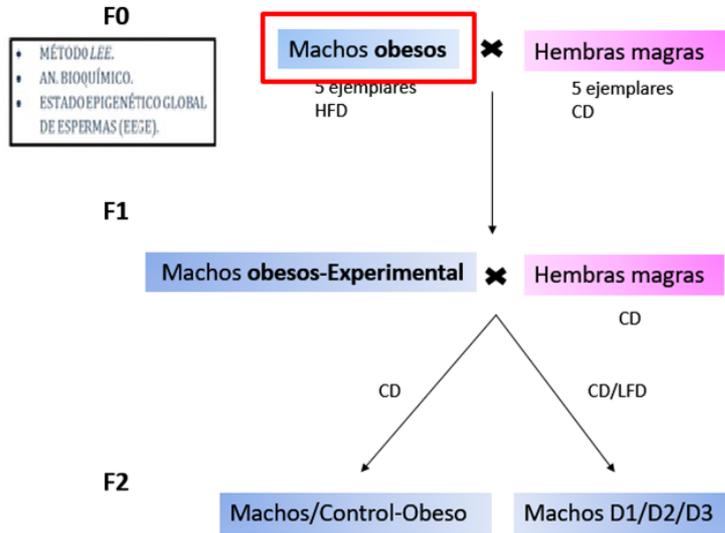
P is the amount of input positive control in ng.

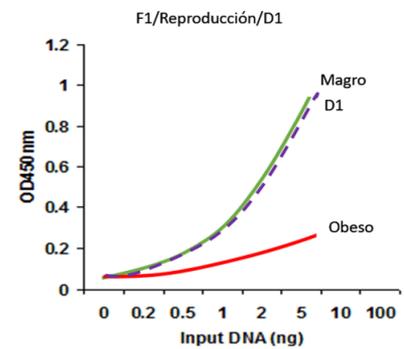
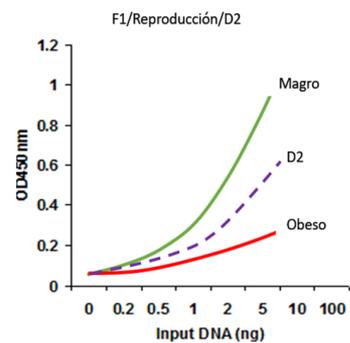
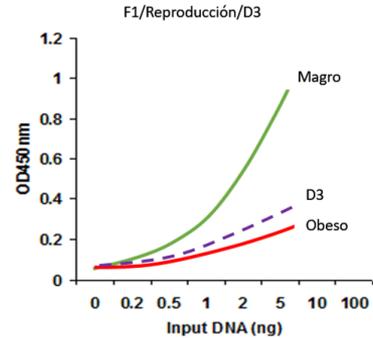
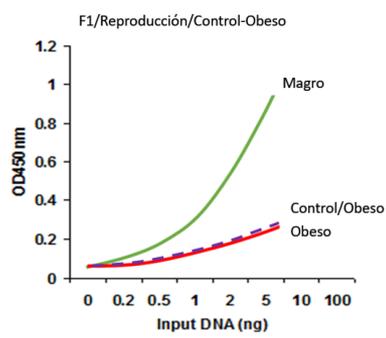
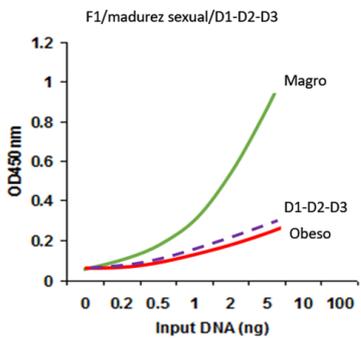
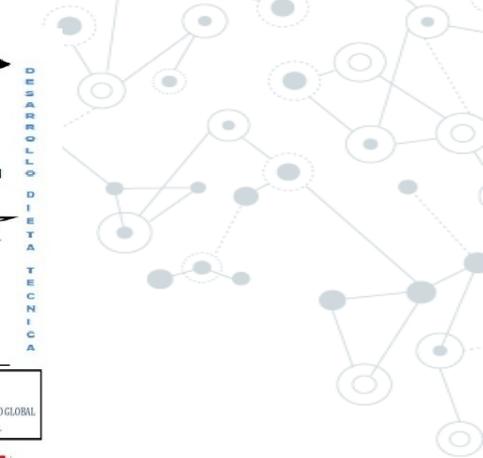
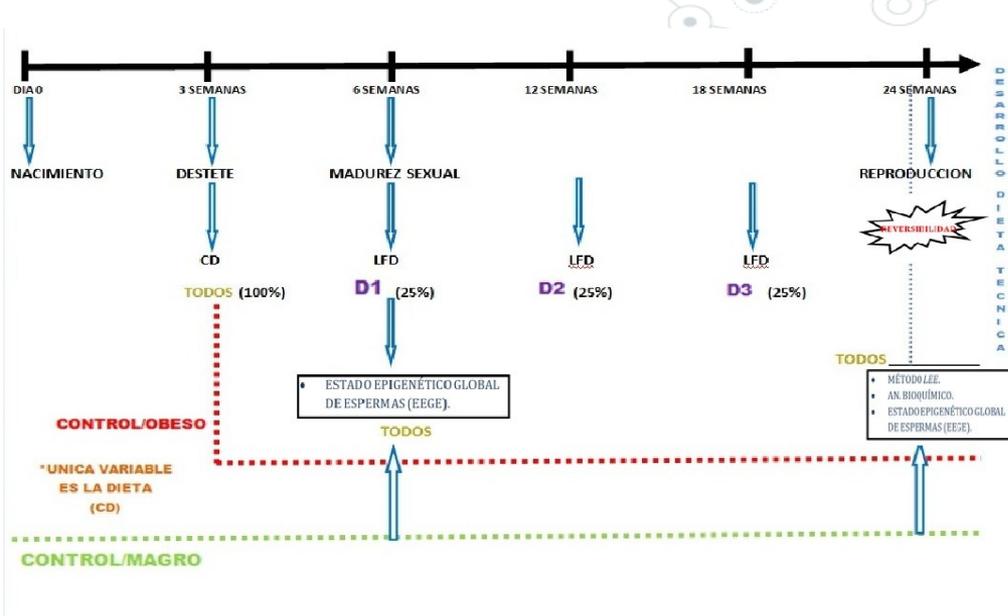
* 2 is a factor to normalize 5-mC in the positive control to 100%, as the positive control contains only 50% of 5-mC.



RESULTADOS ESPERADOS

ANÁLISIS GLOBAL DEL EPIGENOMA DE LOS ESPERMATOZOIDES





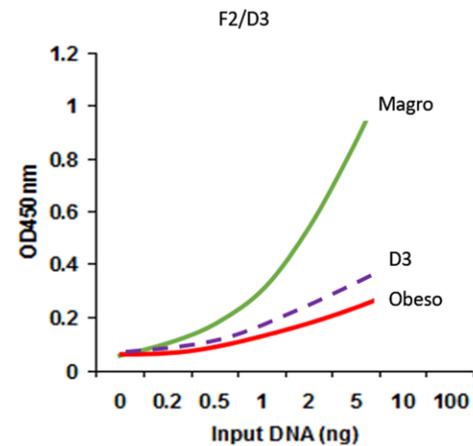
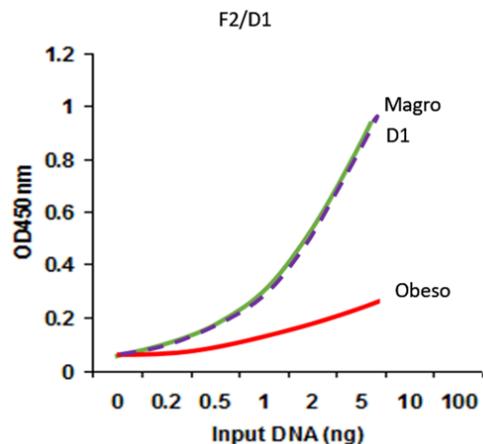
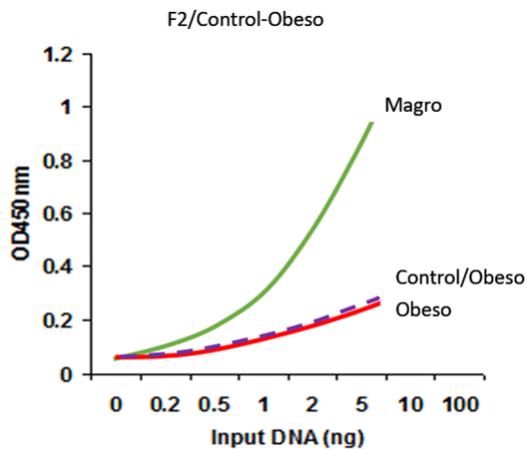
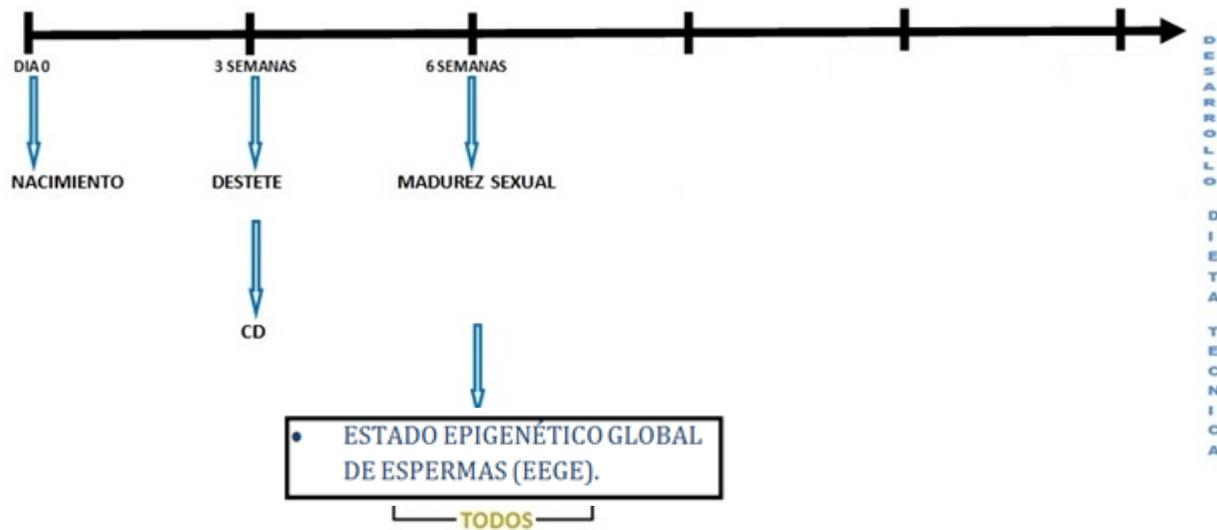


TABLE 2. *F*₀ generation body composition, blood metabolite profile, and fecundity

Parameter	CD	HFD	<i>P</i>
<i>n</i>	10	10	
<i>F</i> ₀ total body weight (g)	29.80 ± 0.54	34.24 ± 0.98	0.002
Adiposity			
Peritoneal fat (g)	1.28 ± 0.08	1.79 ± 0.13	0.005
Peritoneal fat (%) ^a	4.25 ± 0.31	5.36 ± 0.24	0.01
Retroperitoneal fat (g)	0.40 ± 0.02	0.47 ± 0.05	NS
Retroperitoneal fat (%)	1.31 ± 0.08	1.40 ± 0.10	NS
Sum of adipose deposits (g)	1.68 ± 0.10	2.26 ± 0.18	0.01
Sum of adipose deposits (%)	5.56 ± 0.39	6.76 ± 0.33	0.03
Organ weights			
Testis (g)	1.69 ± 0.03	1.64 ± 0.11	NS
Testis (%)	0.56 ± 0.02	0.50 ± 0.04	NS
Epididymis (g)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	NS
Epididymis (%)	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.03	NS
Seminal vesicles (g)	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS
Seminal vesicles (%)	1.22 ± 0.05	1.07 ± 0.06	NS
Liver (g)	1.38 ± 0.08	1.77 ± 0.19	NS
Liver (%)	4.57 ± 0.34	5.26 ± 0.41	NS
Pancreas (g)	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	NS
Pancreas (%)	0.49 ± 0.04	0.42 ± 0.02	NS
Kidney (g)	0.44 ± 0.01	0.40 ± 0.05	NS
Kidney (%)	1.33 ± 0.00	1.20 ± 0.15	NS
Blood metabolites			
Glucose (mM)	10.98 ± 0.87	12.77 ± 0.70	NS
Cholesterol (mM)	3.60 ± 0.20	5.21 ± 0.23	0.0001
Triglyceride (mM)	0.75 ± 0.05	0.79 ± 0.02	NS
NEFAs (μEq/ml)	0.88 ± 0.04	0.92 ± 0.04	NS
Leptin (ng/ml)	2.90 ± 0.10	4.50 ± 0.49	0.05
Insulin (ng/ml)	0.37 ± 0.07	0.53 ± 0.10	NS
Fecundity			
Proportion of males generating a litter (%)	100.00	60.50	0.04
Time to mate (d)	2.90 ± 0.40	3.60 ± 0.40	NS
Offspring gestational length (d)	21.40 ± 0.47	20.60 ± 0.26	NS
Litter size	8.50 ± 1.41	9.50 ± 2.15	NS

Values are expressed as means ± SE. NS, not significant ($P > 0.05$ by Student's *t* test, Mann-Whitney *U* test for nonparametric data, or a univariate general linear model using cohort of animals as a covariate). ^aWeight is expressed as a proportion (%) of total body weight.

A network diagram background consisting of interconnected nodes and lines. The nodes are represented by circles of varying sizes and colors, including grey, blue, and white. Some nodes are highlighted with a blue border. The lines connecting the nodes are thin and grey, forming a complex web structure. The diagram is positioned in the corners of the page, with a larger concentration on the left side and a smaller one on the bottom right.

CONTRIBUCIONES

CONTRIBUCIONES A LA SOCIEDAD Y A LA CIENCIA

➤ Concientizar

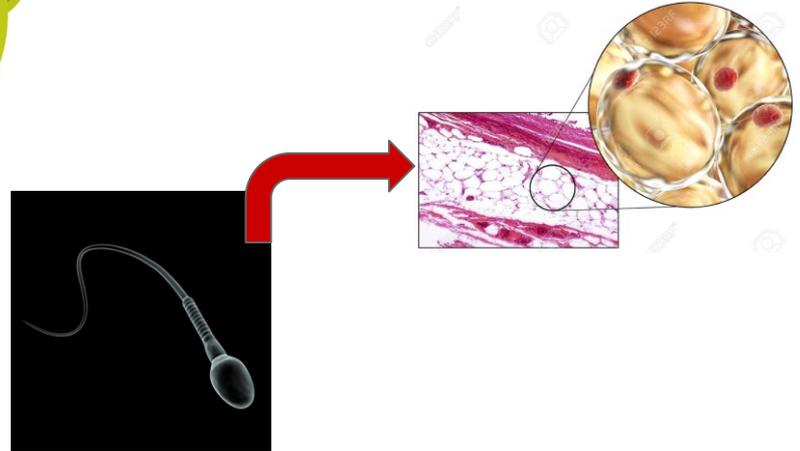


➤ Contribuir a la nutriepigénomica



➤ Nuevos campos de estudio:

- Seguir la vía de desarrollo.
- Técnicas específicas sobre genes relacionados a la obesidad.



BIBLIOGRAFÍA

- Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón, La Habana, La Habana, Cuba
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2013000500014
- Obesity and Bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans.
https://www.eurekalert.org/pub_releases/2015-12/cp-sci112515.php
- DMRfinder: efficiently identifying differentially methylated regions from MethylC-seq data
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5817627/>
- La nutrición personalizada a través de la epigenómica. - <https://www.publicacionescajamar.es/pdf/publicaciones-periodicas/mediterraneo-economico/27/27-740.pdf>
- Epigenética de la obesidad Concepción María Aguilera, Augusto Anguita-Ruiz. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix”. Lab. 120. Centro de Investigación Biomédica, CIBM. Universidad de Granada.
- Paternal epigenetic programming: evolving metabolic disease risk. *Journal of Molecular Endocrinology*.
<https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/58/3/R159.xml>
- Fullston et al . 2013 , Wei et al . 2014.
- Cropley et al . 2016 .
- Anderson et al . 2006 .
- Watkins & Sinclair 2014.

A decorative background featuring a network diagram with nodes and connections. The nodes are represented by circles of varying sizes and colors (blue, grey, white), connected by thin lines. The diagram is positioned in the corners of the page, with a larger concentration on the left side and a smaller one on the bottom right.

**¡MUCHAS
GRACIAS!**