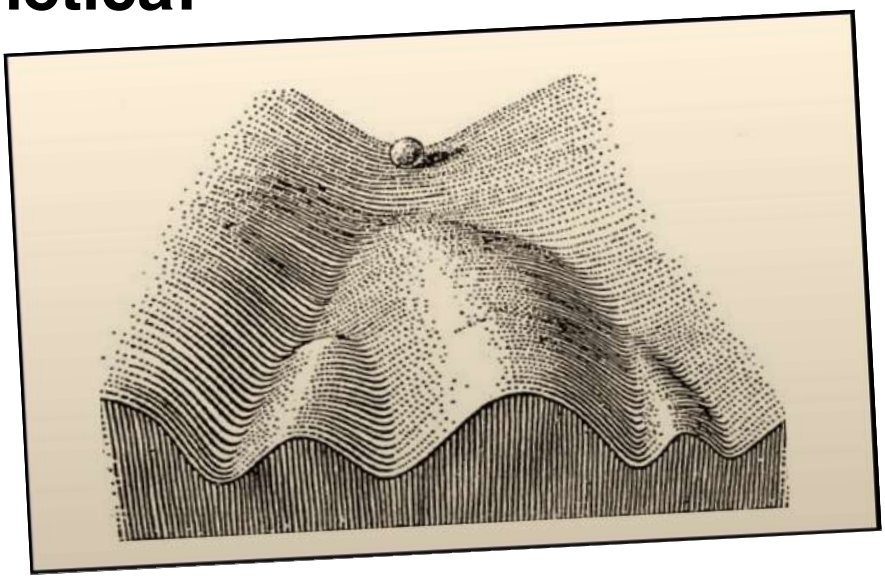
Universidad de Oviedo
Departamento de Biología de Organismos y Sistemas

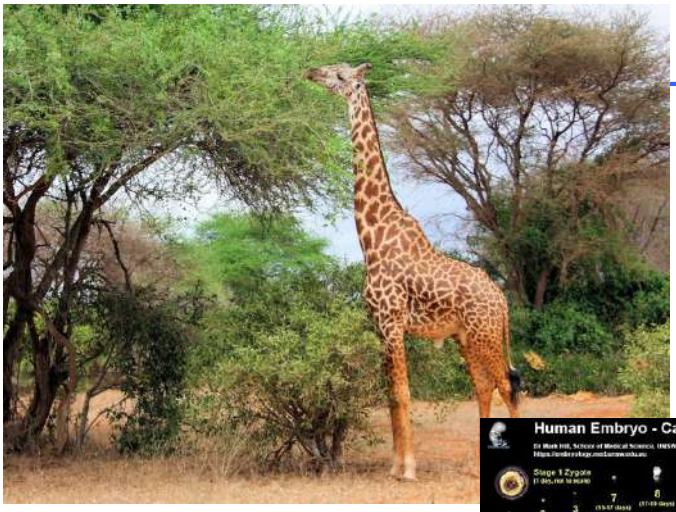
Epigenética:



La esencia del cambio está en el ambiente

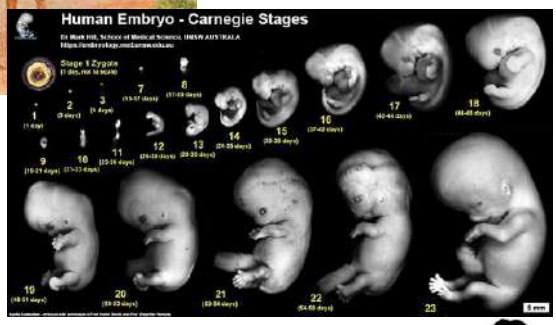
Dr. Luis Valledor González
Área de Fisiología Vegetal. Dpto. de Biología de Organismos y Sistemas.
Facultad de Biología e Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias
valledorluis@uniovi.es

¿Cómo nos afecta el ambiente?



Ambiente

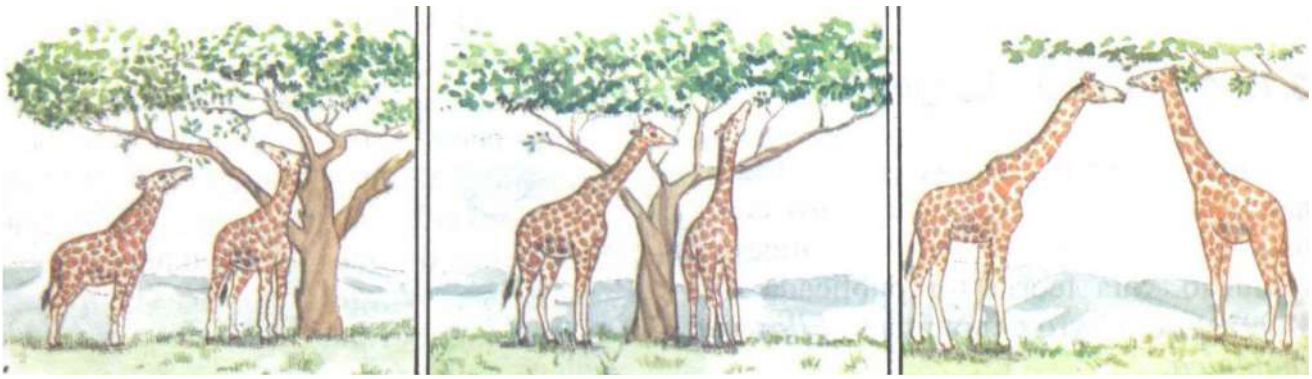
EVOLUCIÓN



Microambiente

ONTOGENIA

¿Influye el ambiente sobre los organismos y los hace evolucionar?

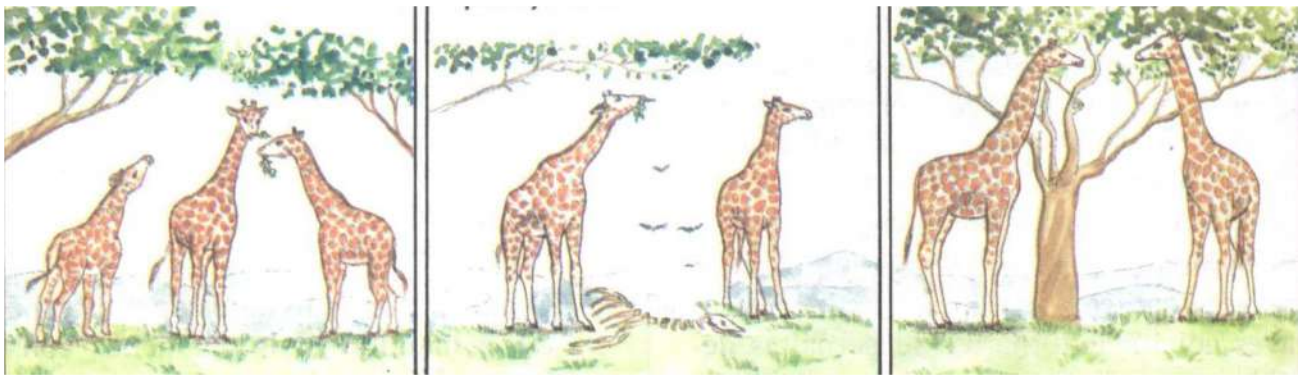


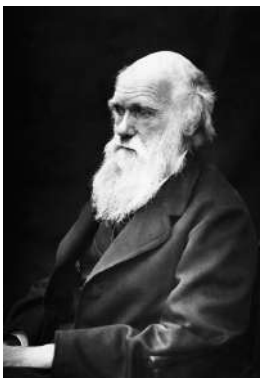
1809 *Philosophie Zoologique, JB Lamarck*
Primera teoría evolutiva articulada

Las formas más simples surgen con frecuencia por generación espontánea y posteriormente presentan una tendencia a la complejidad

Ley del uso y desuso:
Cambio ambiental -> modificaciones (adaptaciones), fijadas por la actividad de ciertos "fluidos". Cambios heredables.

O… ¿Evolucionamos "al azar" y "lo mejor" se selecciona?





1855 *On the Law Which has Regulated the Introduction of Species (Wallace)*
1859 *On the origin of species (Darwin)*
(y varios trabajos posteriores de ambos autores)

Las poblaciones se reproducen más rápido que sus alimentos (Teoría Poblacional de Malthus, 1798).

Dentro de las poblaciones los distintos individuos presentarán una variación, las cuales aparecerán de forma aleatoria –no dirigida- mediante mutaciones

Ante la escasez de recursos el mecanismo de la evolución es la competencia, y solo aquellos con mejores características sobrevivirán y se reproducirán (**Selección natural**)

¡Pongámonos de acuerdo!

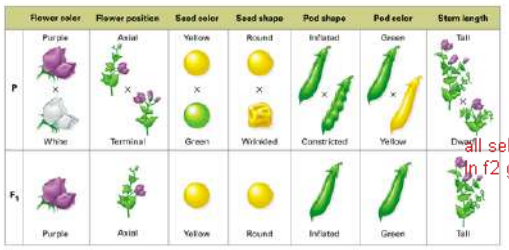
1896 *A new factor in evolution (Baldwin)*

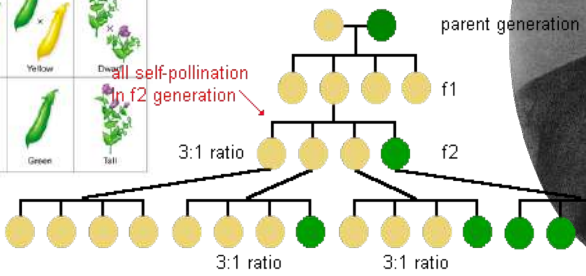
Caminando hacia la teoría sintética de la evolución

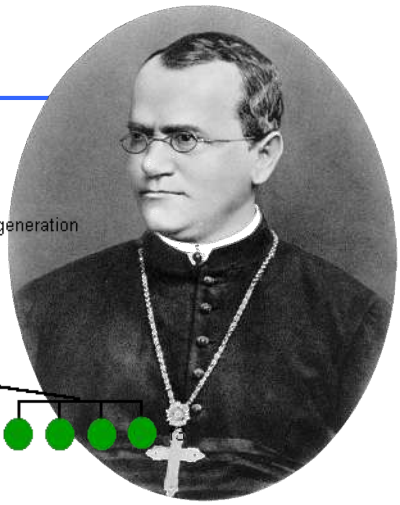
”Supongamos una especie amenazada por un nuevo predador y un comportamiento que hace más difícil al predador la caza de su presa. Los individuos que aprenden más rápidamente estarán en ventaja. A medida que el tiempo avance, la habilidad para aprender el comportamiento mejorará por selección genética hasta que en cierto momento parezca ser un instinto”

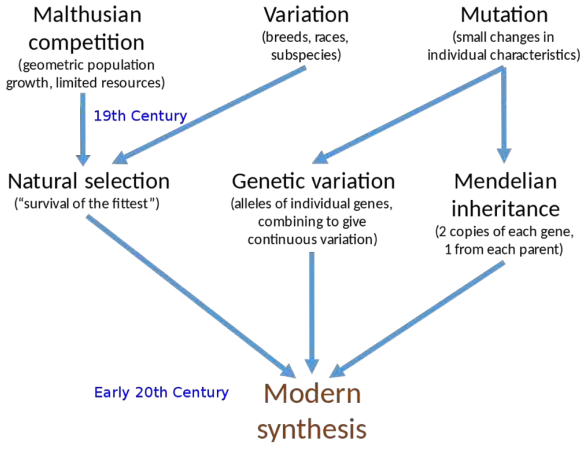
Los comportamientos se desarrollarían de forma no dirigida, sin mediar el ambiente, y fijándose por selección natural.

Teorías evolutivas más desarrolladas

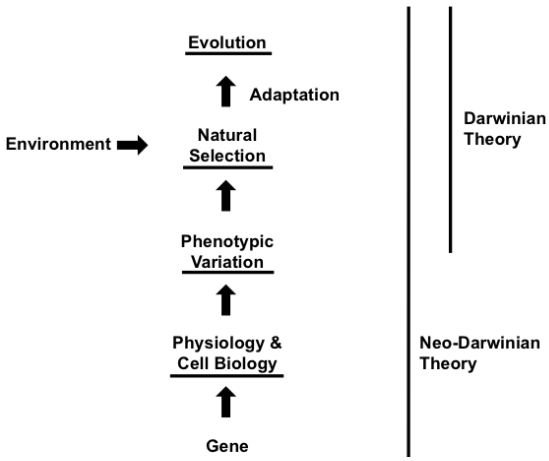








Teoría neo-darwinista



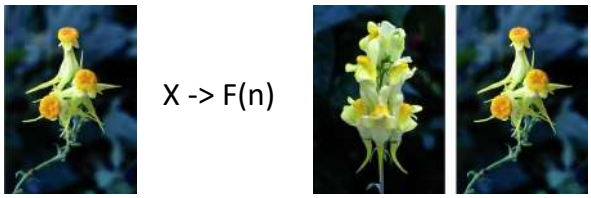
Las teorías clásicas presentan muchas luces, pero algunas sombras

Linaria vulgaris El gen Lcyc controla la simetría bilateral.

Típica X Pelórica

F1 (3:1)

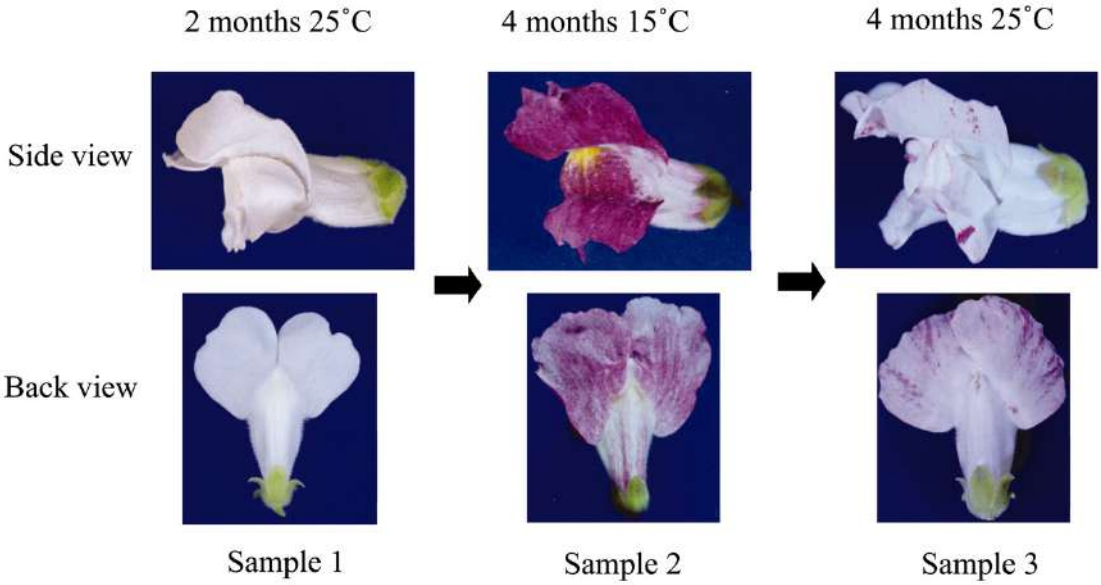
X



F2 X -> F(n) (1:3)

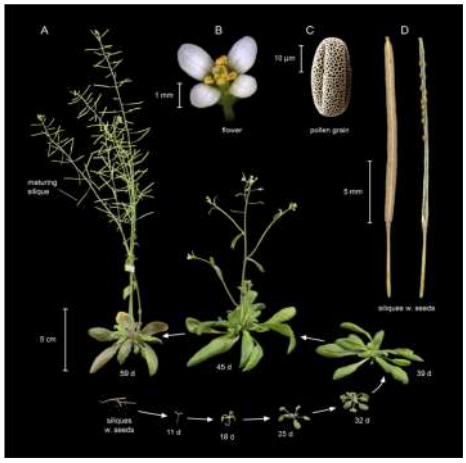
Las teorías clásicas presentan muchas luces, pero algunas sombras

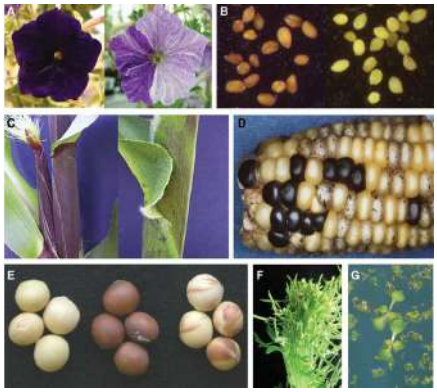
Antirrhinum majus **¿Fenotipo = Genotipo x Ambiente?**



La temperatura tiene un efecto sobre Tam3-nivea (chalcona sintasa) que causa distinta coloración en las flores.

Para saber mas: Hashida et al. 2006. The Plant Journal. DOI: 10.1105/tpc.105.037655





La paradoja de los gemelos y del envejecimiento

Homo sapiens

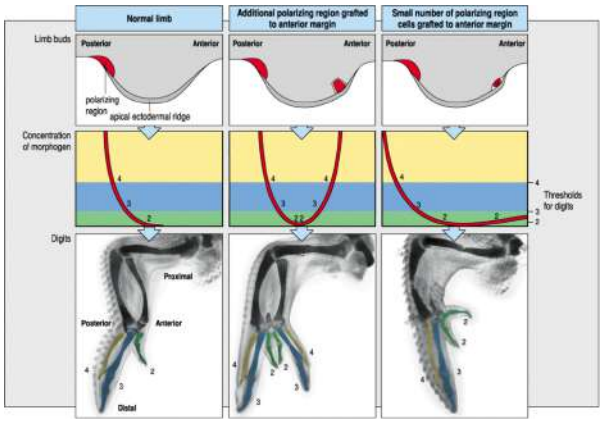
Gemelos zigóticos, idénticos en el momento del nacimiento, se van diferenciando a medida que su desarrollo avanza

El envejecimiento causa cambios fenotípicos evidentes

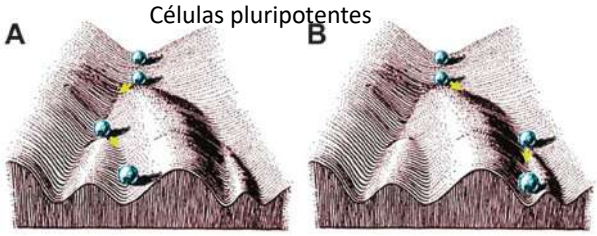
El epigenotipo y la metáfora del paisaje epigenético

Conrad Hal Waddington (1905–1975)

1940 Organizers and genes

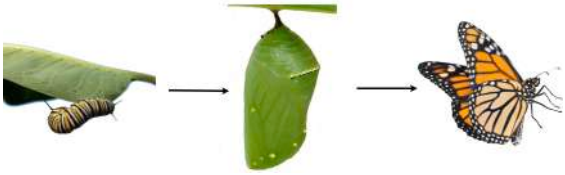


Paisaje epigenético

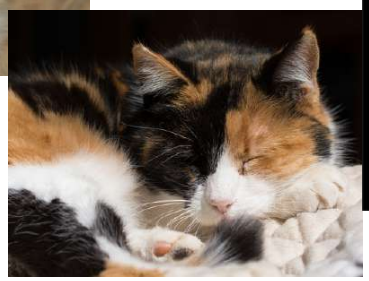


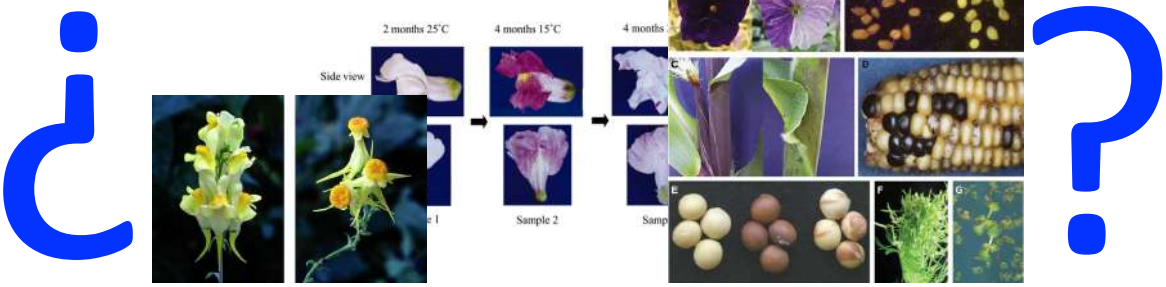
Células pluripotentes

Células diferenciadas



Para saber mas: Noble et al. 2015. Journal of Experimental Biology. DOI: 10.1242/jeb.120071



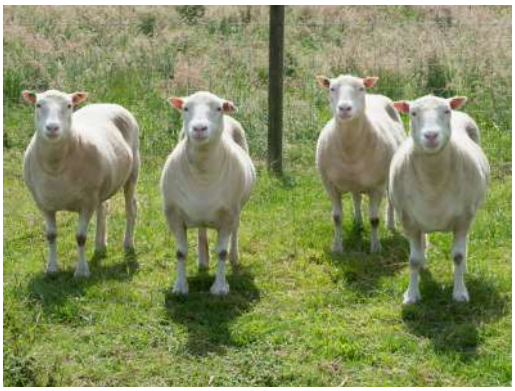


¿Clones? ¿Epigenética? ¿"Clones"?

Dolly ✝
(1996-2003)

Artritis
Paraplejia
Envejecimiento prematuro

Primeros primates clonados, Enero 2018
(21 madres, 70 embriones, 2 clones)



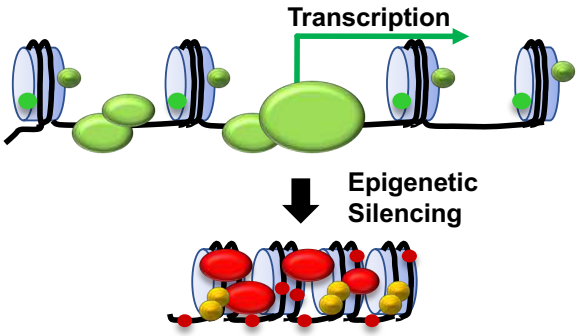
Clones de Dolly, Envejecen con normalidad

Plantas ¿XXXX A.C.?
1 madre, clones ilimitados

Epigenética

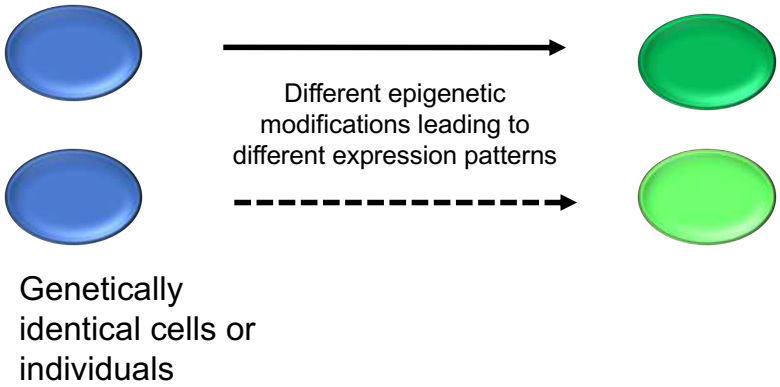
Literalmente,
Epi: *sobre*
Epigenética: *por encima de la genética*

"Mecanismos moleculares implicados en la regulación del genoma que provocan cambios potencialmente estables y heredables que ocurren sin cambios en la secuencia del ADN"

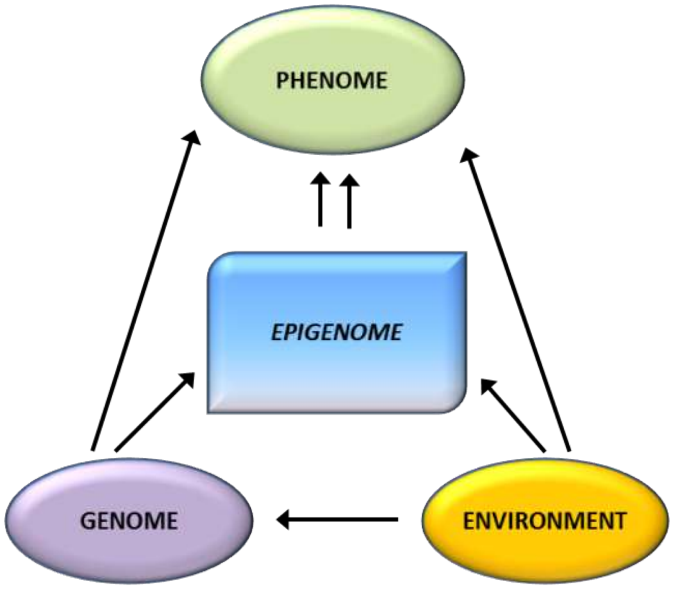


Epigenética

En la práctica, la epigenética explica, entre otras cosas, por qué células u organismos genéticamente idénticos expresan diferencialmente sus genomas, produciéndose diferencias fenotípicas



¿Ha de interpretarse el genoma considerando el ambiente Modula el ambiente la expresión génica/cómo?



Cambios mínimos pueden cambiar el fenotipo

Examen de Epigenética
Alumnos de Máster.

Caracter "Estudiar Epigenética". Presente en TODOS los alumnos con la secuencia:

noestudieepigenetica

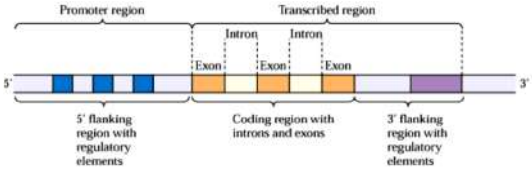
Ambiente

¡No estudié epigenética! ≠ No, ¡estudié epigenética!

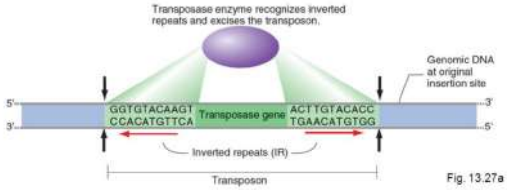
Componentes del Genoma

Cromosoma: ADN + proteínas

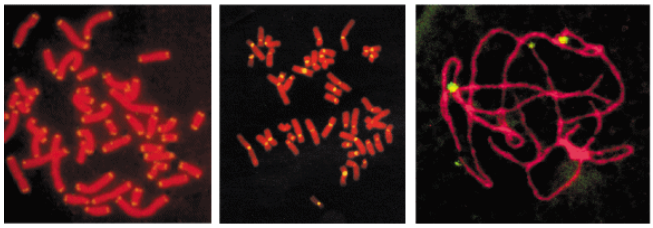
- **Secuencias únicas**: genes con una única copia por genoma haploide



- **Secuencias repetidas**. Telómeros, centrómeros, microsatélites, secuencias dispersas.



- **Proteínas:** histonas y matriz nuclear.



El ADN es muy largo… pero ocupa un volumen muy pequeño

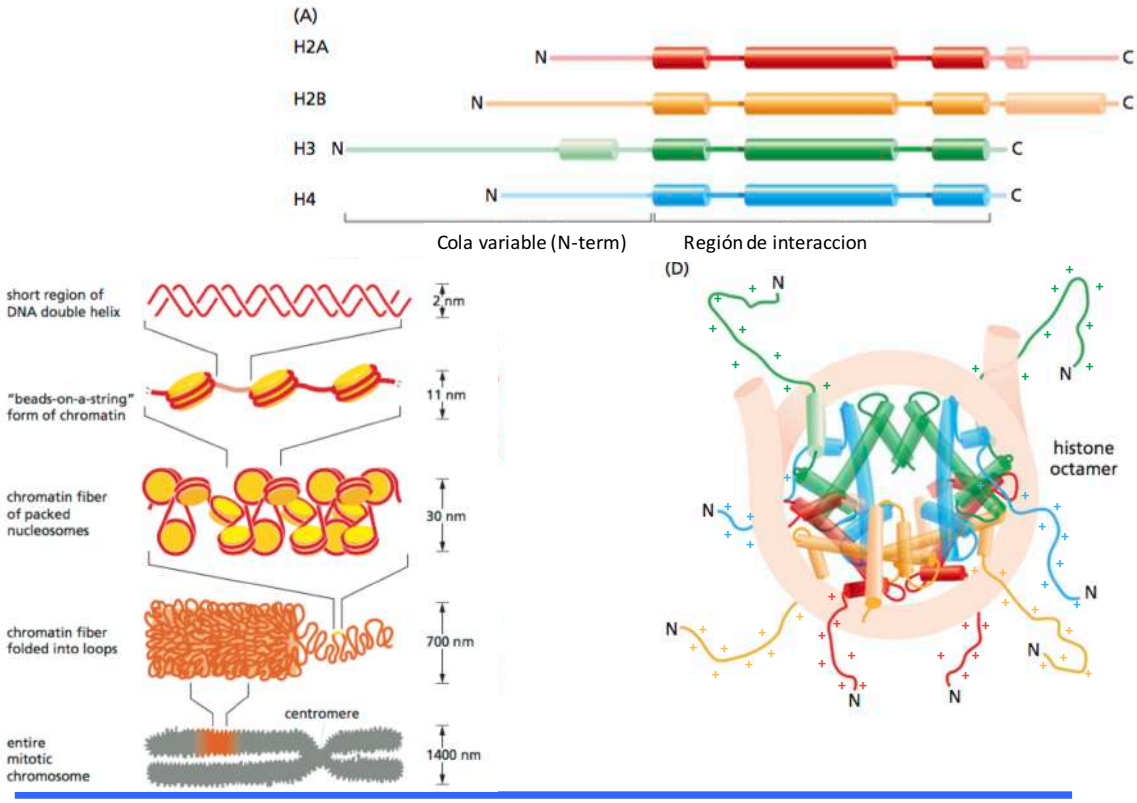
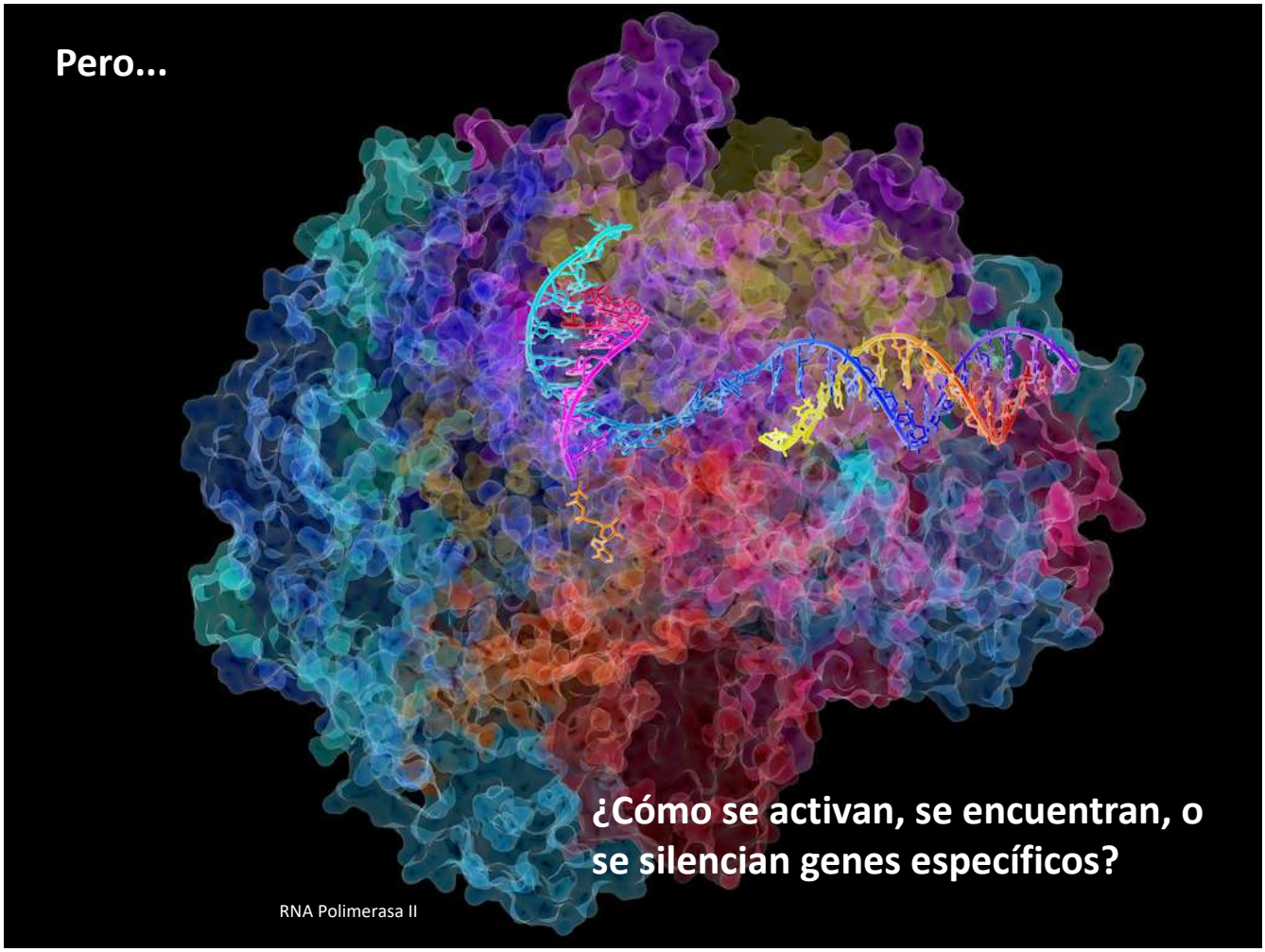
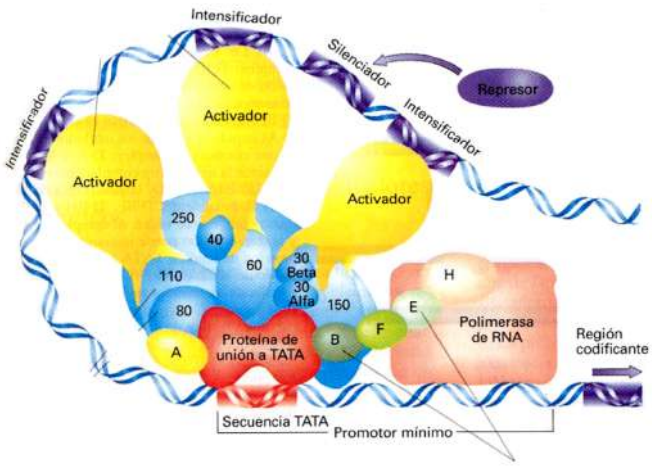


Imagen adaptada de: Alberts, Molecular Biology of the Cell (6th Edition, 2015)



¡Hagamos un poco de memoria!

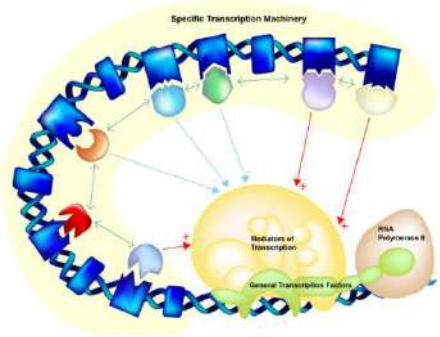


Elementos reguladores del complejo ARNPol II

Mecanismos de regulación de la expresión génica

Regulación de la transcripción

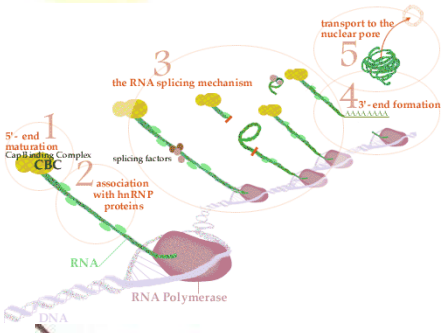
- Factores de transcripción específicos
- Represores
- Factores de transcripción "generales"
- Activadores
- Potenciadores



Regulación post transcripcional

- Splicing (Ayuste, corte y empalme)
- Adicción de una caperuza (Capping)
- Poliadenilación

Mecanismos epigenéticos



Modificación del ADN

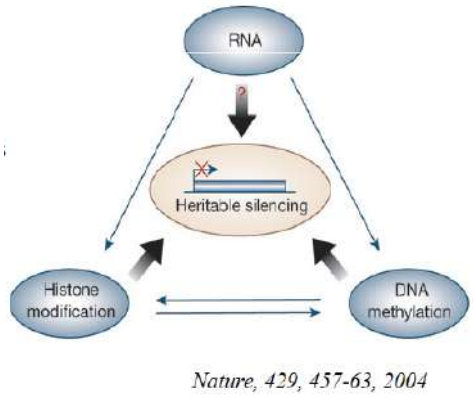
- Química (Metilación)
- Estructural (Compactación de la cromatina, alteraciones en los nucleosomas)
- RNAs pequeños

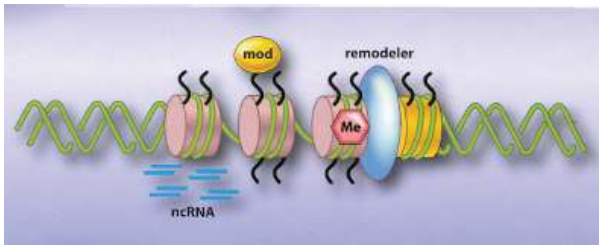
Mecanismos epigenéticos

Las modificaciones epigenéticas (**código epigenético**) definen el patrón de transcripción celular y mantienen la estabilidad cromosómica.

Mecanismos epigenéticos:

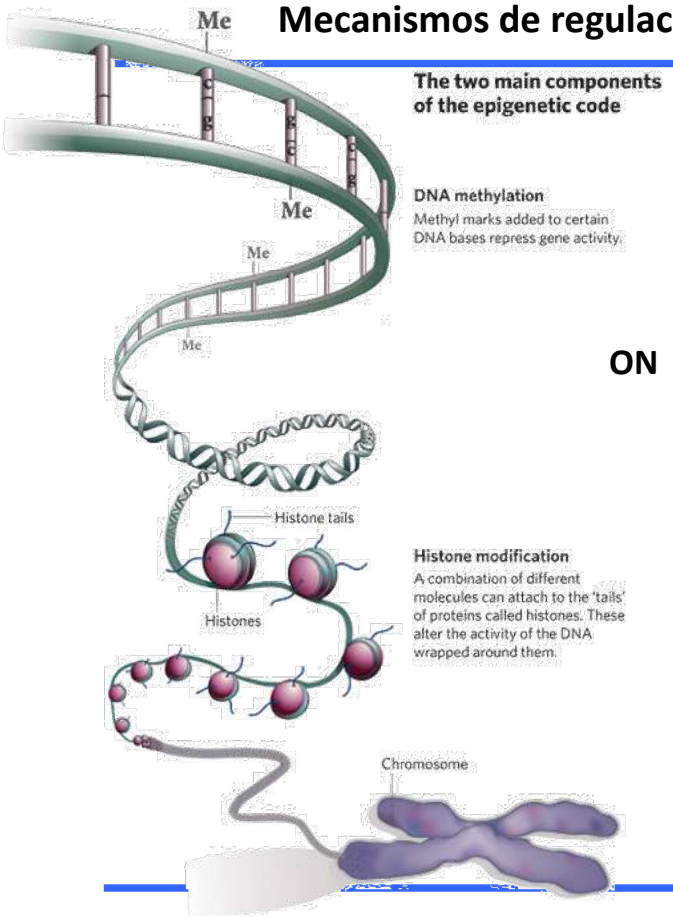
- Metilación del ADN
- Modificaciones postraduccionales de las histonas
- RNAs no codificantes (ncRNA): miRNAs y siRNAs.

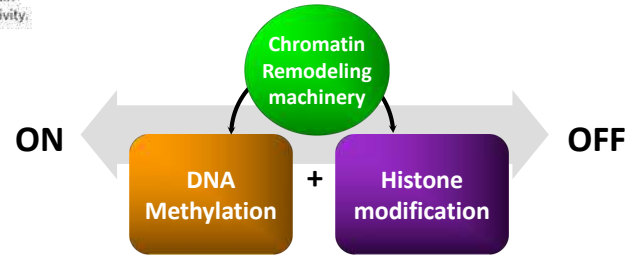


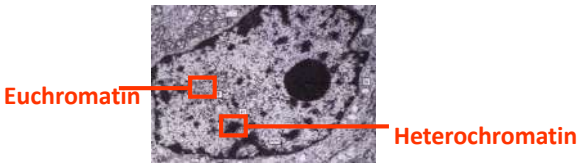


Cambios reversibles. Reflejo de la historia celular: interacción con el medio ambiente y decisiones tomadas (huellas del albedrío por encima del acervo genético)

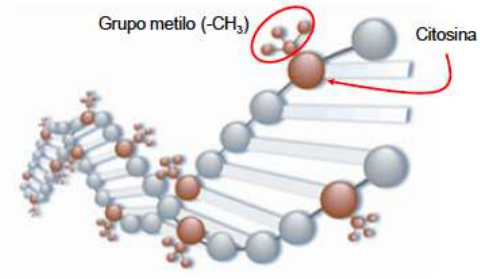
Mecanismos de regulación epigenética







Mecanismos de regulación epigenética

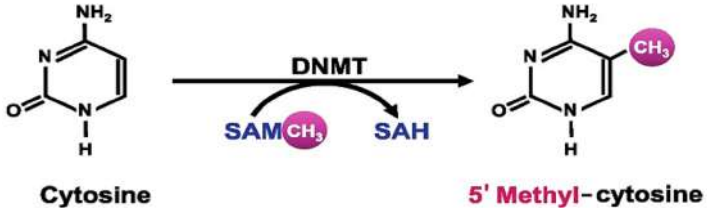


Metilación del ADN

- Controla el inicio de transcripción, los elementos móviles y algunos genes de expresión constitutiva.
- Intimamente relacionado con las modificaciones de histonas y el ARNi.

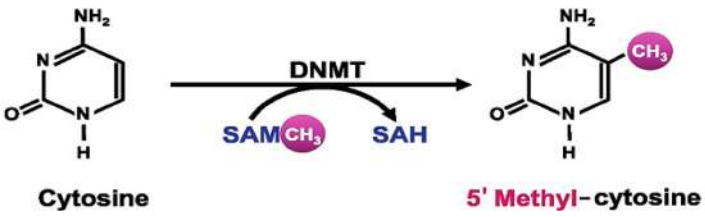
DNMT1
DNMT3a
DNMT3b

MET1
DRM2
CMT3



5-metil citosina, la quinta base del ADN

Mecanismos de regulación epigenética



DNMT1, DNA metiltransferasa de mantenimiento

DNMT3a, DNA metiltransferasa de metilación de novo

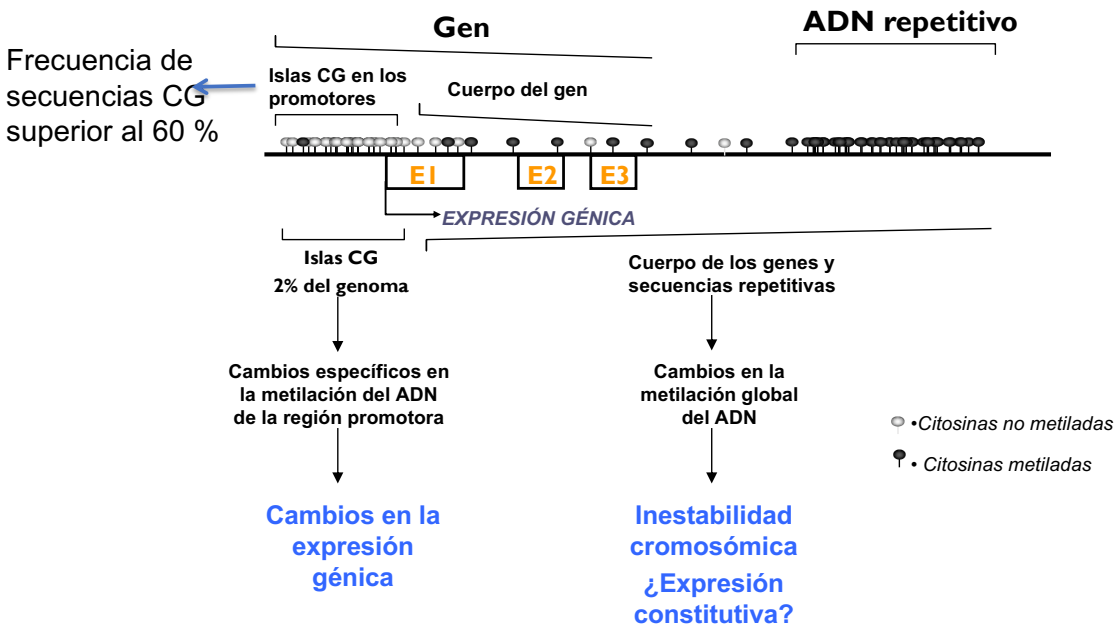
DNMT3b, DNA metiltransferasa de metilación de novo

MET1, DNA metiltransferasa de mantenimiento

DRM2, DNA metiltransferasa de reorganización de dominios, metilación de *novo*

CMT3, DNA cromometiltransferasa, metilación de *novo*, exclusiva de plantas.

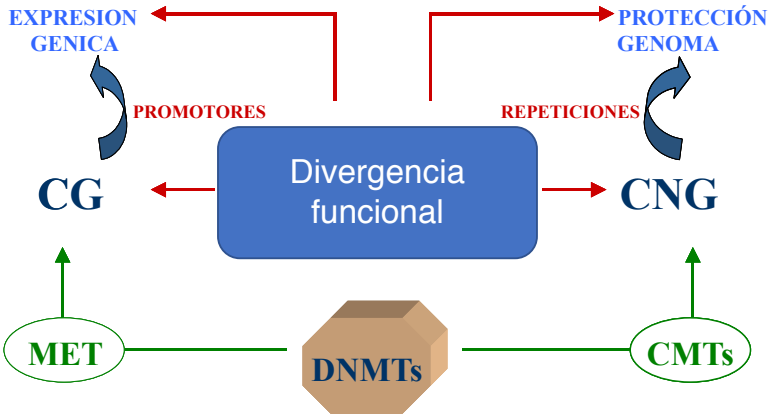
¿Dónde se produce la metilación del ADN?



¿Dónde se produce la metilación del ADN?

Contextos de metilación

CG (islas CG en promotores)
CNN
CNG (mucho más frecuente en plantas)



La hipermetilación de promotores (CG) es un mecanismo conservado entre animales y plantas asociado con una pérdida de capacidad de (des)diferenciación y proliferación incontrolada.

Los cambios epigenéticos son heredables

Linaria vulgaris El gen Lcyc controla la simetría bilateral.

Típica (Lcyc NM) X Pelórica (Lcyc M)

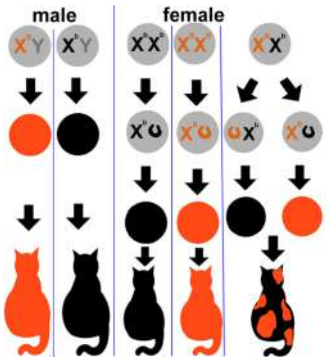
F1 (3:1)

X

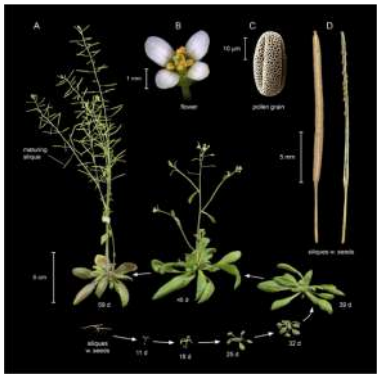
F2 X -> F(n) (1:3)

Metilación del ADN y diferenciación celular

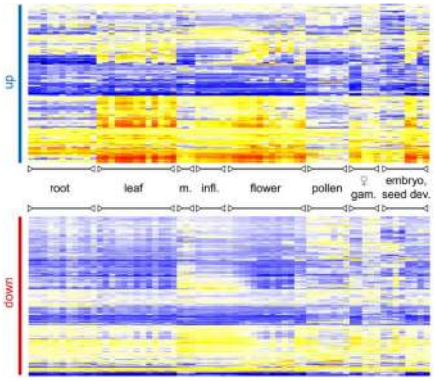
Impronta



Diferenciacion celular



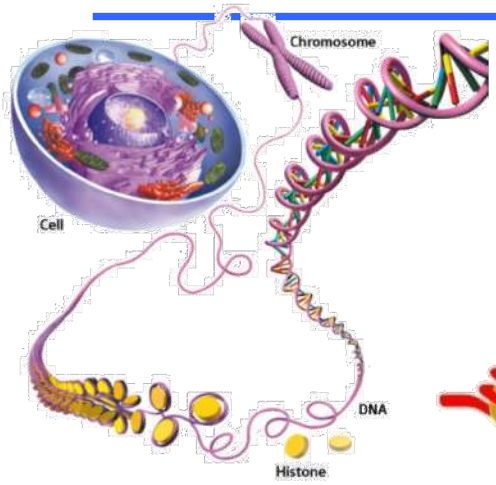
Distintos tejidos = Distinta metilación



Distinta metilación = Distinta expresión

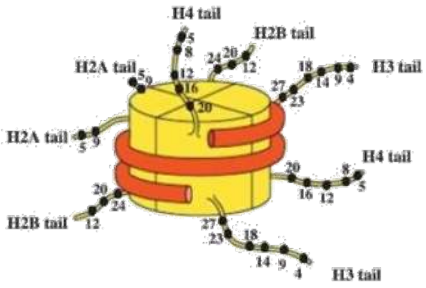
Expresión de un gen morfogenético en Arabidopsis

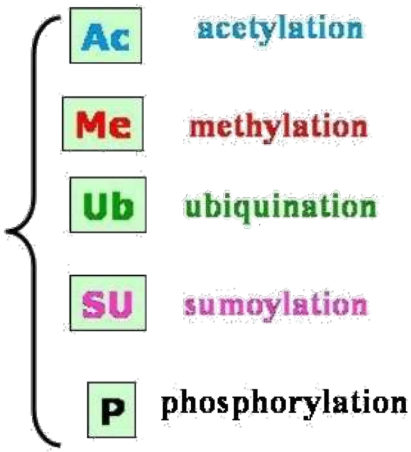
Mecanismos de regulación epigenética



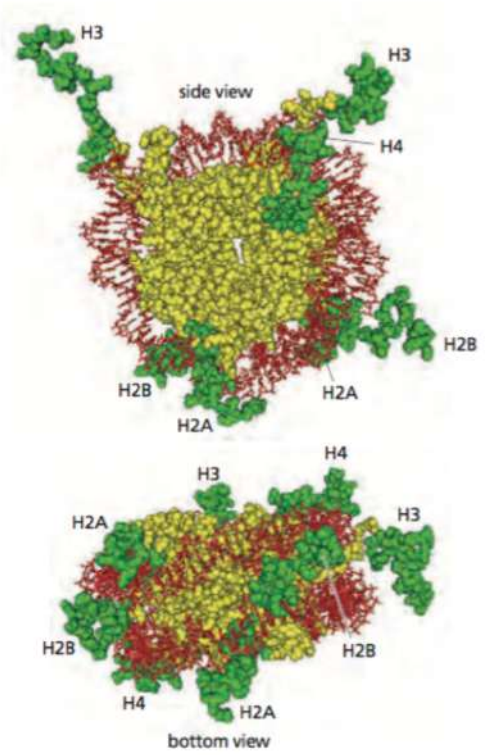
Modificaciones de histonas

- Función estructural, compactación de la cromatina (Acetilación)
- Control de la transcripción (Metilación, Ubiquitinación , Acetilación, Fosforilación, Sumoilación)





Modificaciones Post-traduccionales de histonas



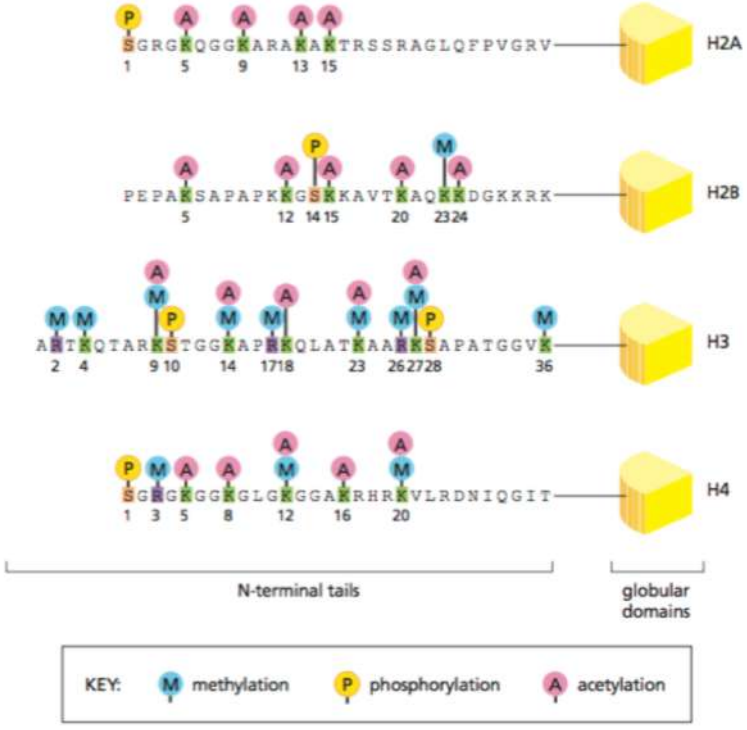
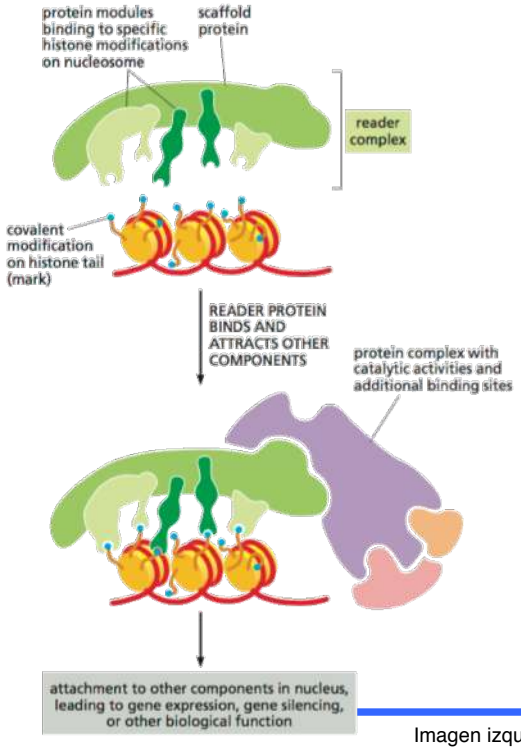


Imagen tomada de: Alberts, Molecular Biology of the Cell (6th Edition, 2015)

Los diferentes dominios pueden combinarse

…Para conseguir una elevedada especificidad



No todos las marcas se distribuyen de igual forma en los cuerpos de los genes

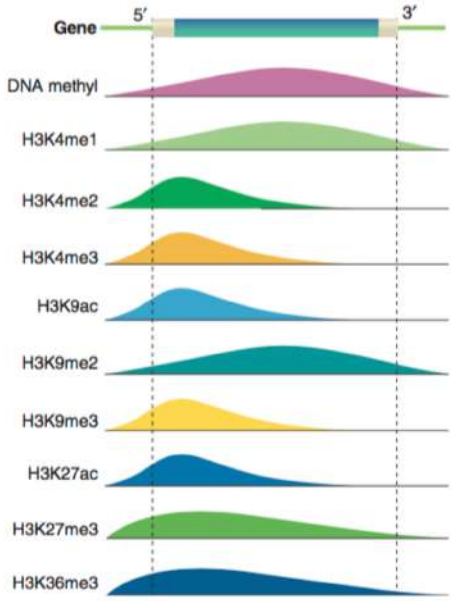
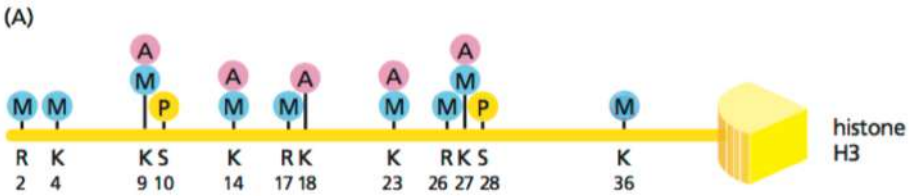


Imagen izquierda tomada de: Alberts, Molecular Biology of the Cell (6th Edition, 2015)
Imagen derecha tomada de: Plant Genes, Genomes, and Genetics (1st Edition, 2015)

Distintas combinaciones de marcas: distinto significado
Misma marca, en lugares diferentes: distinto significado



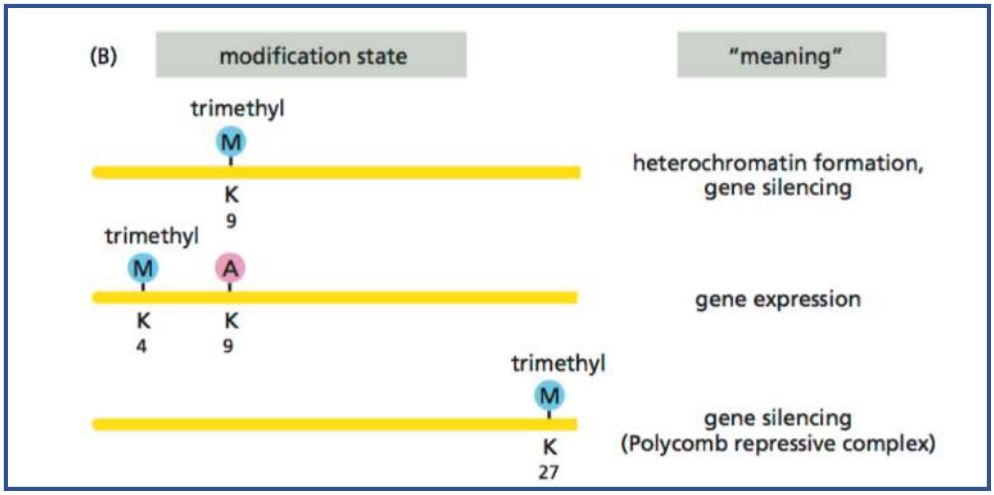
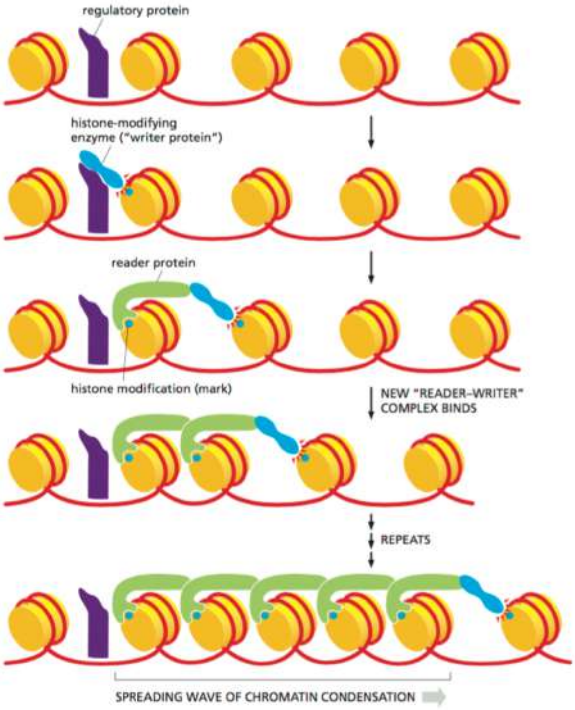


Imagen tomada de: Plant Genes, Genomes, and Genetics (1st Edition, 2015)

El reclutamiento de un solo complejo remodelador…

… puede transmitirse a lo largo de la cromatina ...

… Hasta que encuentra una barrera!!!!



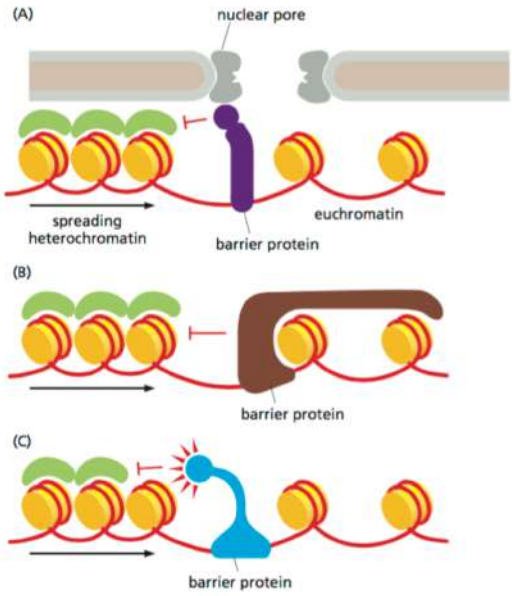
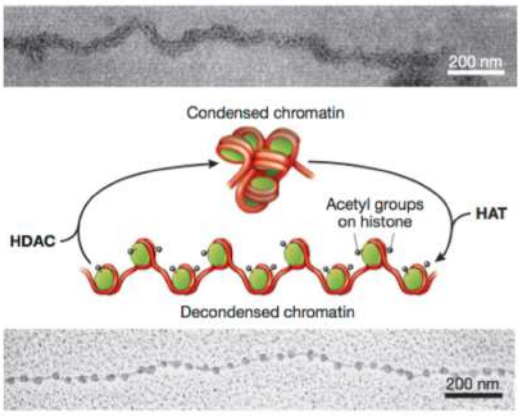
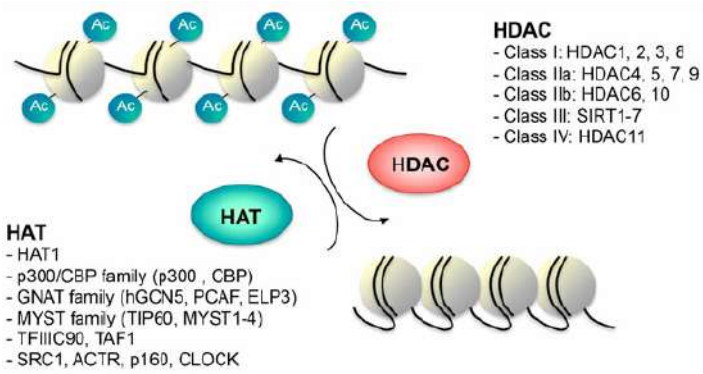


Imagen tomada de: Alberts, Molecular Biology of the Cell (6th Edition, 2015)

Existen enzimas específicos para modificar las histonas





Fosfatasas
Lisina HMTs
Lisina HDM
Argininina HDM

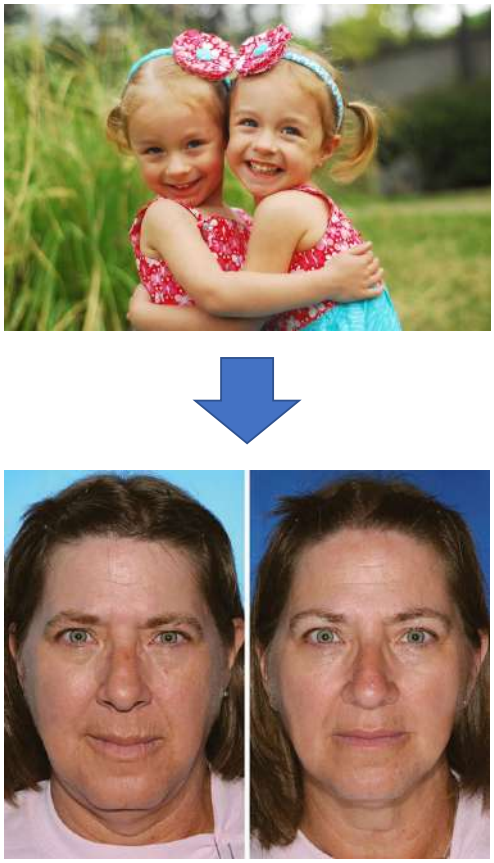
Eucromatina activa → Heterocromatina silenciada

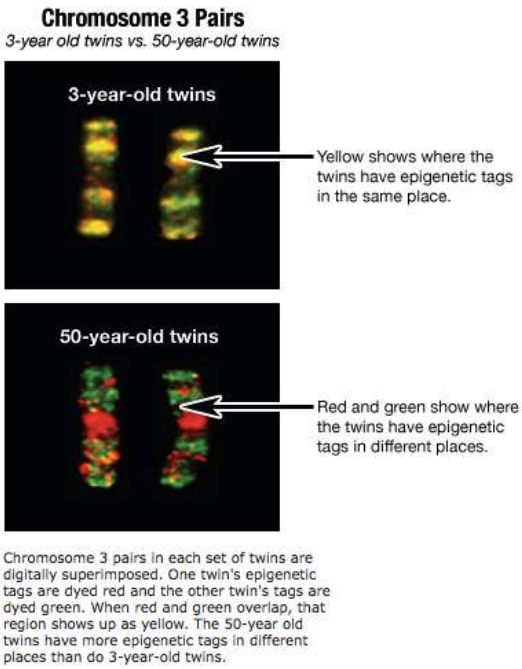
Eucromatina activa ← Heterocromatina silenciada

Lisina HMTs
Argininina HMTs
Kinasas

Imagen derecha tomada de: Schneider et al. 2013. DOI: 10.1007/s13311-013-0204-7
Imagen izquierda tomada de: Freeman's Biological Science (5th Edition, 2014)

Las marcas epigenéticas "sufren" la trayectoria vital del organismo

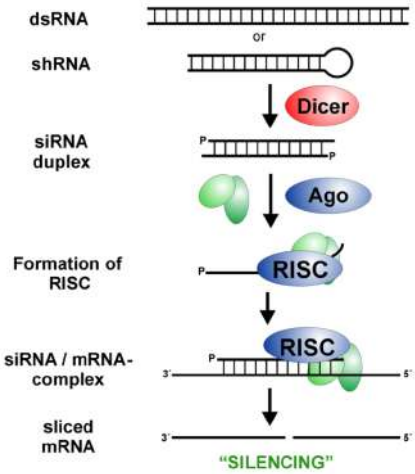




Mecanismos de regulación epigenética

RNAs no codificantes: miRNAs y siRNAs

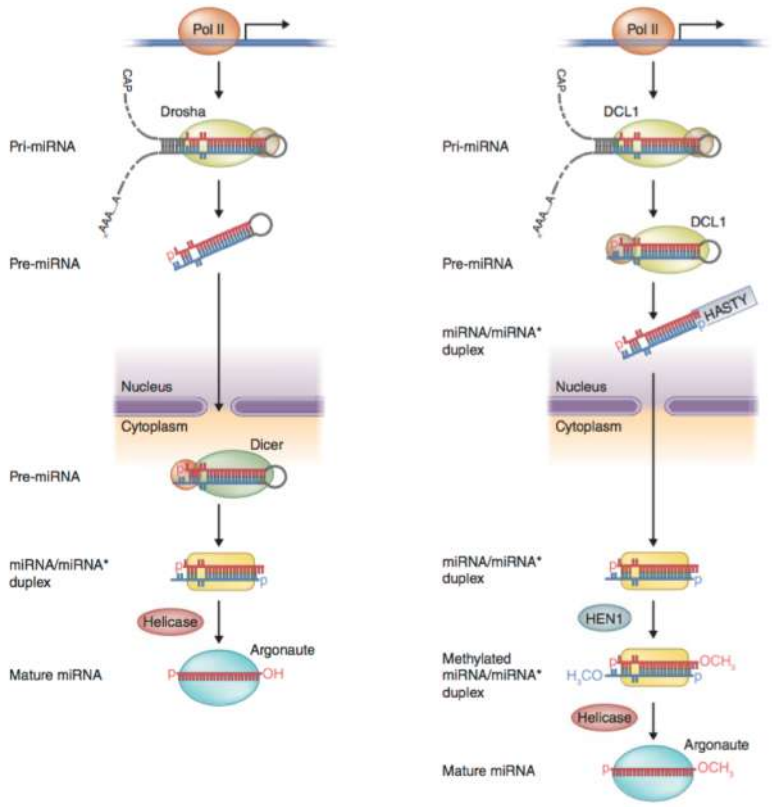
- Pueden unirse a otros mRNAs incrementando o disminuyendo su capacidad para transcribirse.
- El siRNA puede inducir el silenciamiento total del gen mediante una metilación dirigida del mismo (**RdDM**).



Esquema simplificado del silenciamiento post transcripcional (PTGS)

El mecanismo miARN en plantas es más complejo que en animales

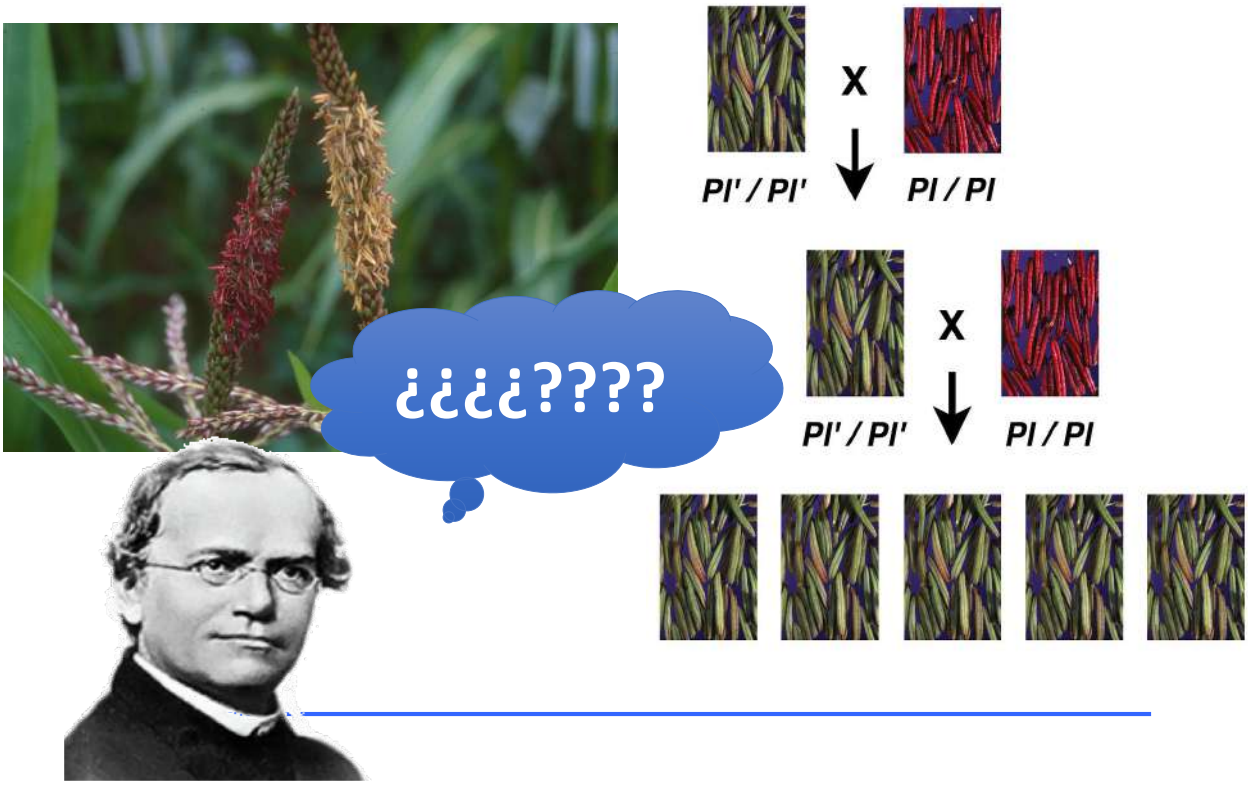
Animales



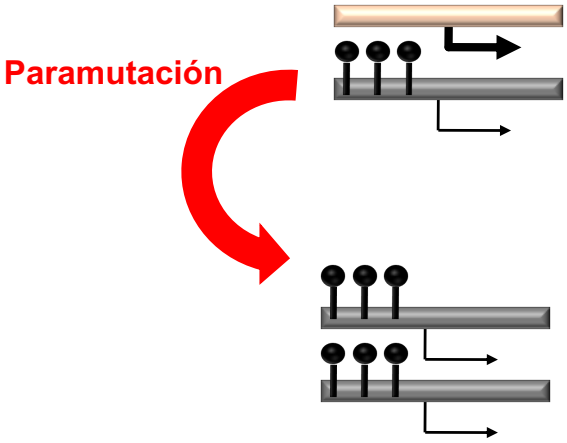
Plantas

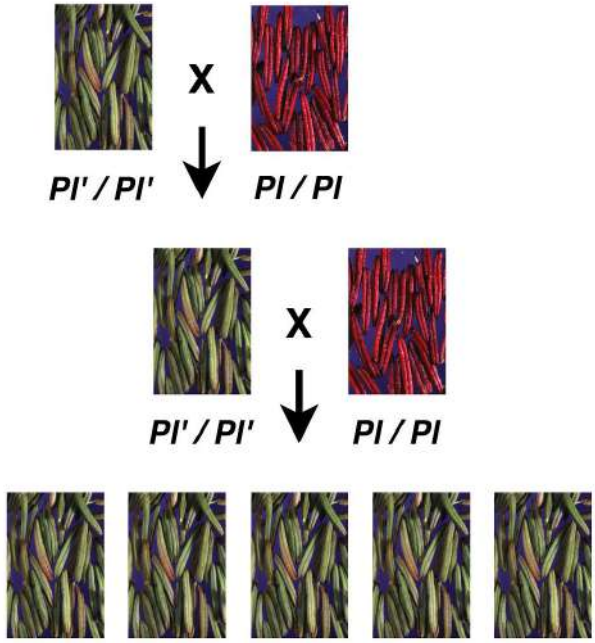
Imagen tomada de: Plant Genes, Genomes, and Genetics (1st Edition, 2015)

"Extrañas" herencias no mendelinanas



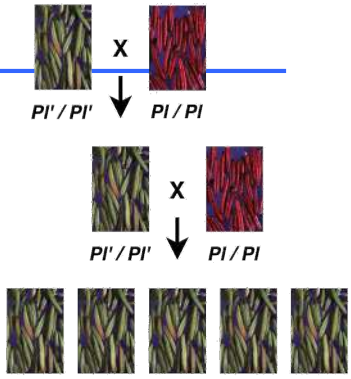
Epialelos y paramutaciones





Numerosos estudios han mostrado que siRNAs actuando en trans son la base de esta paramutación.

Epialelos y paramutaciones



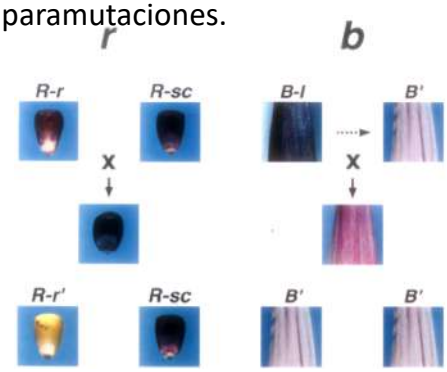
Esta **paramutación** es:

Un cambio del fenotipo heredable **meioticamente**, que no es consecuencia de una mutación en la secuencia genética, sino en los mecanismos de control de su expresión.

Recordemos a Mendel: "Los dos alelos que llegan a un nuevo organismo de sus progenitores **lo acompañaran el resto de su vida**".

En este caso, esta afirmación no se cumple. El alelo PI' causa el silenciamiento del alelo PI, y este silenciamiento se mantiene tras la meiois.

Los genes r y b también pertencientes a la ruta de biosíntesis de antocianinas también sufren paramutaciones.



JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH

VOL. 37 WASHINGTON, D. C., AUGUST 1, 1928 No. 3

HOSTS AND SYMPTOMS OF RING SPOT, A VIRUS DISEASE OF PLANTS[1]

By S. A. WINGARD[2]

Associate Plant Pathologist, Virginia Agricultural Experiment Station

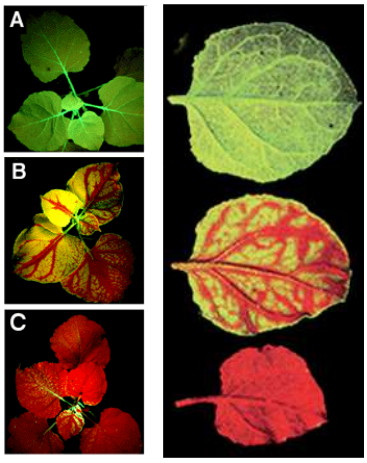
INTRODUCTION

Los siRNAs pueden transportarse a lugares recónditos

En plantas…

- *via* plasmos
- a lo largo del floema
- De forma pasiva, difusión o dirección de la corriente

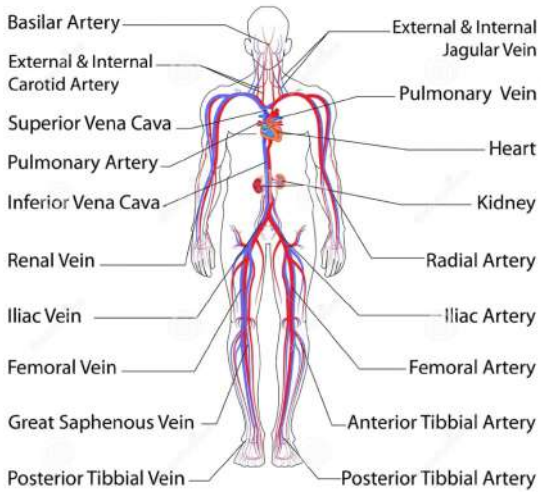
Silenciamiento de GFP por siRNAs vía vascular



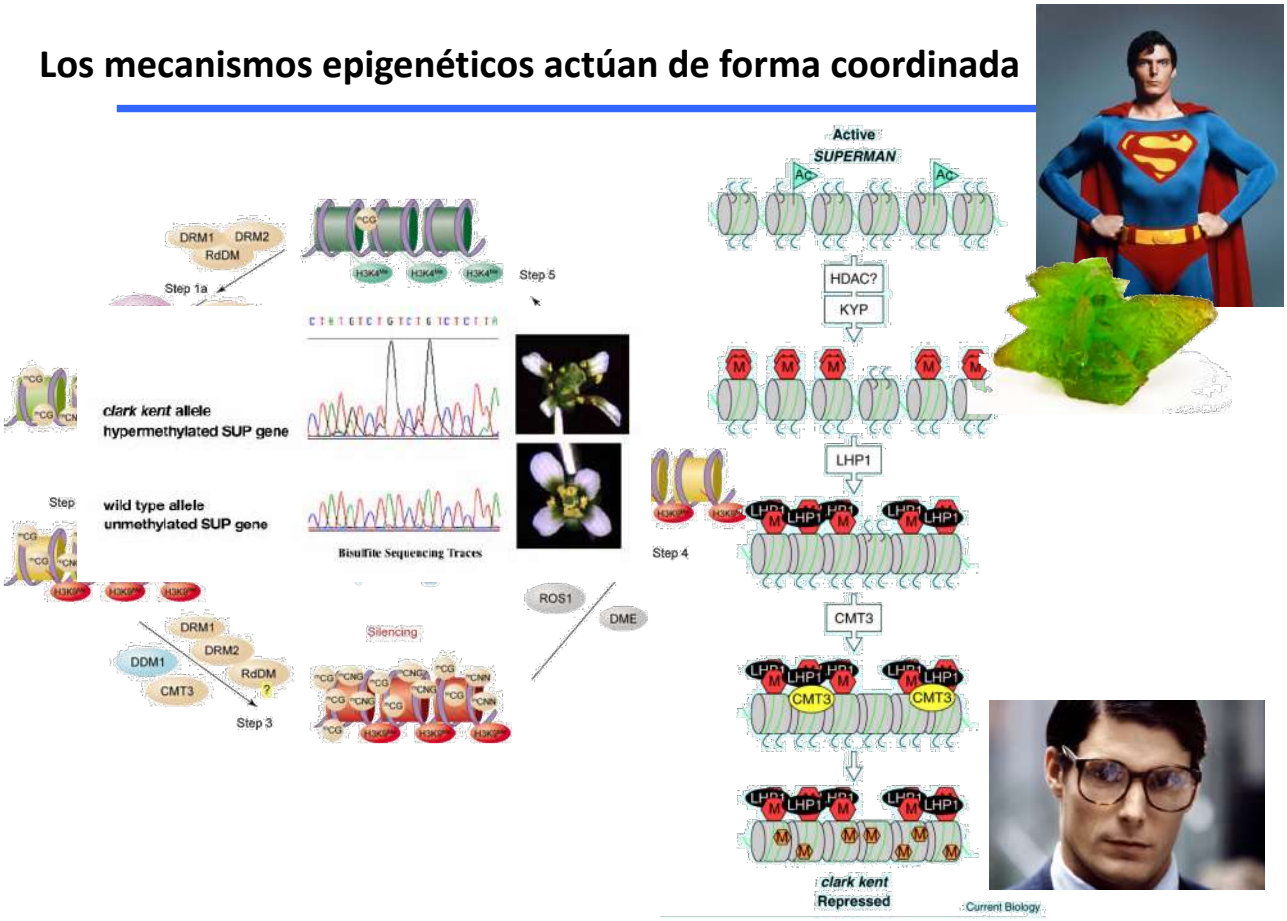
Verde: fluorescencia de GFP, Rojo: Autofulorescencia de la clorofila

En animales…

A través del torrente circulatorio los RNAs pequeños pueden incluso superar la barrera hematoencefálica!



Los mecanismos epigenéticos actúan de forma coordinada



¿Cómo puede una mazorca tener granos de distinto color?

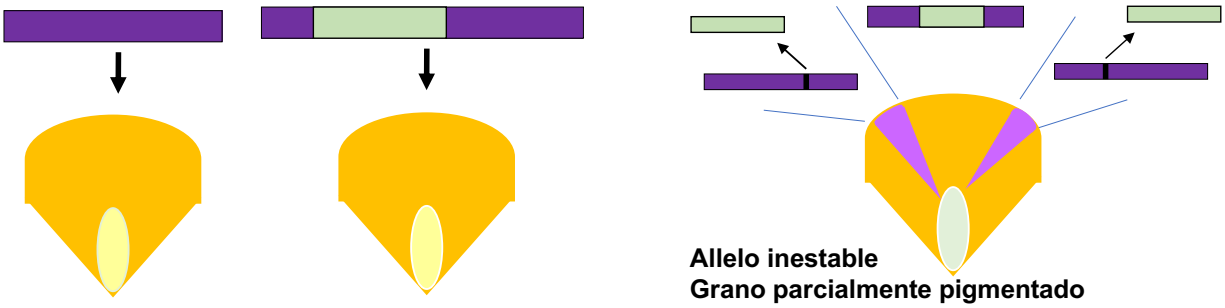
Los transposones fueron descritros por primera vez en Maíz por la investigadora Bárbara McClintock (Nobel en 1983) al buscar la explicación a esta pregunta.

Transposones, alelos inestables e inactivos

Gen requerido para la síntesis de un pigmento

Gen interrumpido por un transposón

La excisión del transposón origina alelos inestables.



Alelo "salvaje"
Grano pigmentado

Alelo mutante
Grano apigmentado

Los transposones suponen una gran parte del genoma de las plantas desde el 14% Arabidopsis o arroz hasa el 60% en maiz.

Transposón de *Antirrhinum* que solo se activa a bajas temperaturas

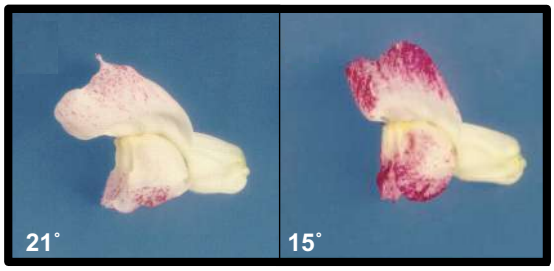
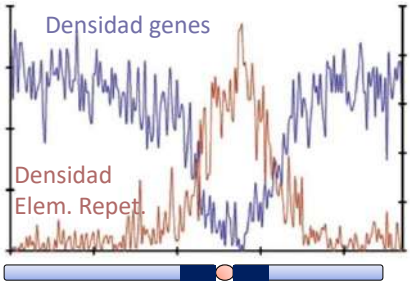


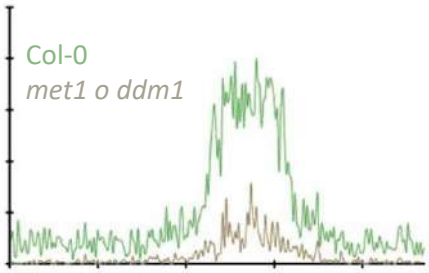
Figura superior: Adaptación de Williams et al. 2013; DOI: 10.1105/tpc.110.tt0110.
Imagen inferior: Hashida et al. 2006; DOI: 10.1105/tpc.105.037655

Silenciamiento de transposones

Cromosoma 3, Arabidopsis

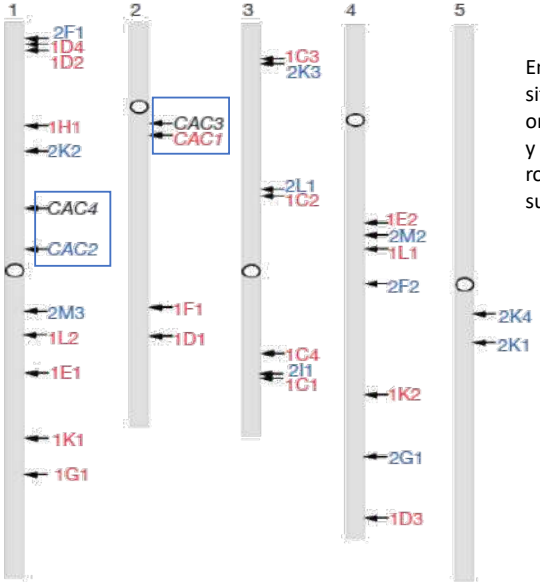


Metilación del ADN



ddm1: Decrease in DNA methylation 1.
Requerido para el funcionamiento de met1

¿Que efecto tendrá una reducción en la metilación del ADN en relación al movimiento de transposones?



En un recuadro: sitios de inserción originales de CAC1 y CAC2. En azul y rojo puede verse su expansión.

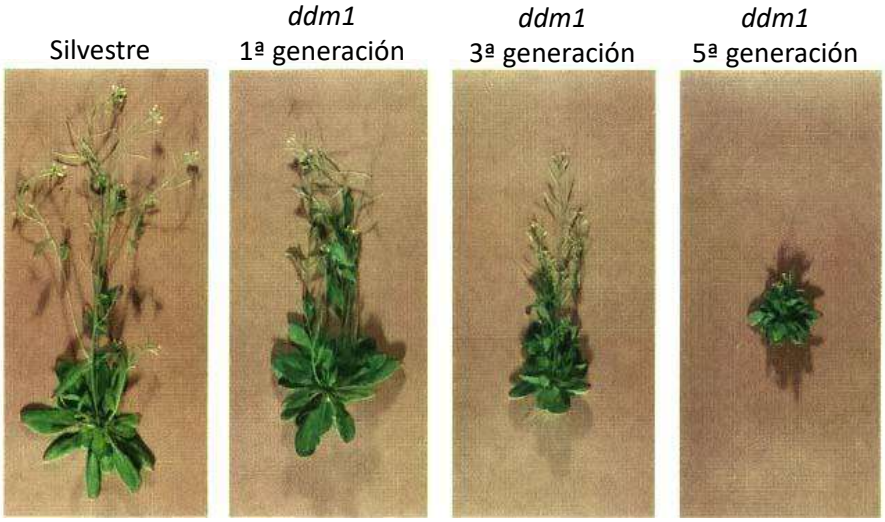
Tras 6 generaciones con una metilación del ADN reducida (*ddm1*), nuevos transposones se distribuyeron a lo largo del genoma

*DDM1, remodelador nucleosómico que permite el acceso a las DNMTs

Miura et al. (2001) DOI: 10.1038/35075612

Silenciamiento de transposones

Los transposones "saltan" en entornos hipometilados pero, ¿tienen esto consecuencias para la supervivencia del individuo?

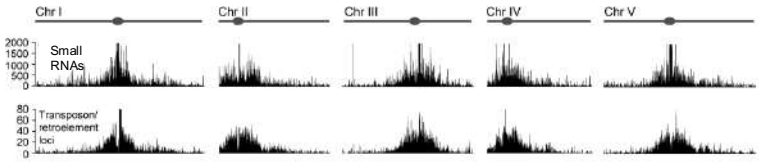


Las plantas exhiben fenotipos cada vez más aberrantes a medida que acumulan mutaciones causadas por los transposones.
Es tan importante para los organismos el tener a **los transposones** controlados que estos **se silencian de forma activa**.

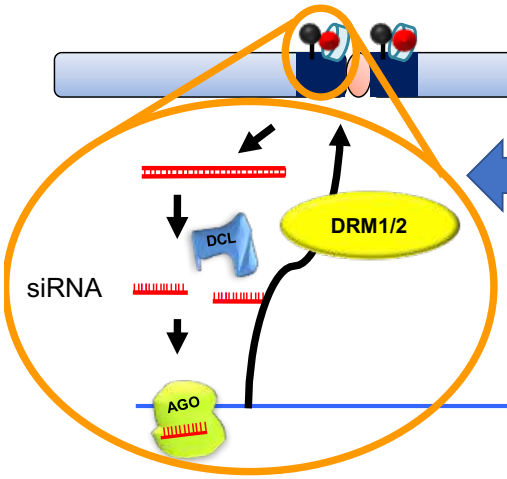
Adaptado de Kutani et al. 1996. DOI 10.1073/pnas.151255998

Silenciamiento de transposones

¡Los transosones deben ser silenciados! pero,
¿Cómo reconoce el genoma y silencia a los elementos repetitivos?



La densidad de loci siRNA es más alta en la región pericentromérica, la cual contiene una alta densidad de secuencias repetitivas incluyendo transposones.



El ambiente (estrés térmico, por ejemplo) puede reducir la eficiencia, o inhibir, estos mecanismos. Causando un salto de estos transposones.

AMBIENTE

Dicer-like (DLC) produce siRNAs que se unen a AGO, proteina que reclutará DRM1 y DRM2 y las trasladará a sus dianas moleculares específicas.

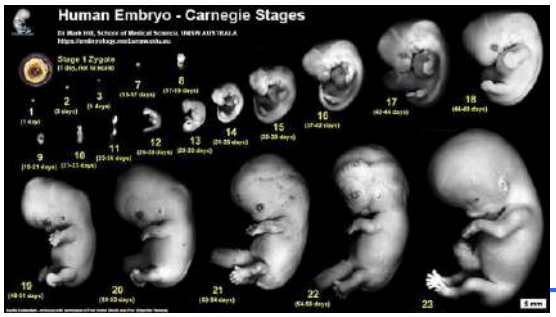
Adaptado de Kasschau et al. 1996. DOI 10.1371/journal.pbio.0050057
y de Pumplin y Voinnet 20013. DOI 10.1038/nrmicro3120

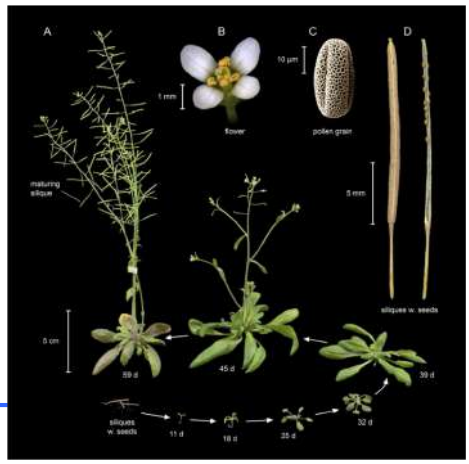
Cómo nos cambia el tiempo y el ambiente: Desarrollo

El desarrollo implica procesos de diferenciación celular mediante diferentes programas de expresión génica, en contextos espacio-temporales específicos, modulados por factores epigenéticos.

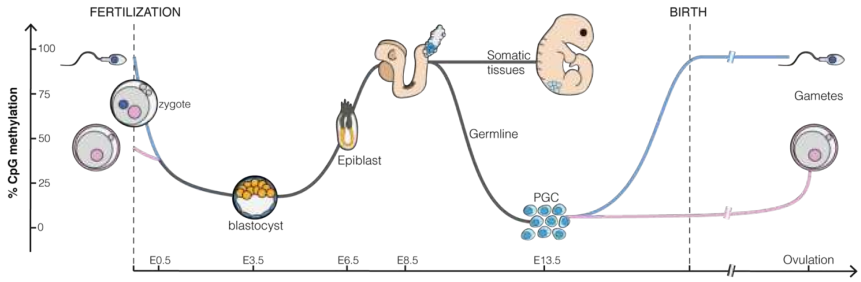
Cada célula tiene su propia "firma epigenética" que refleja su genotipo, historia de desarrollo e influencias ambientales, la cual en último término determina el fenotipo celular.

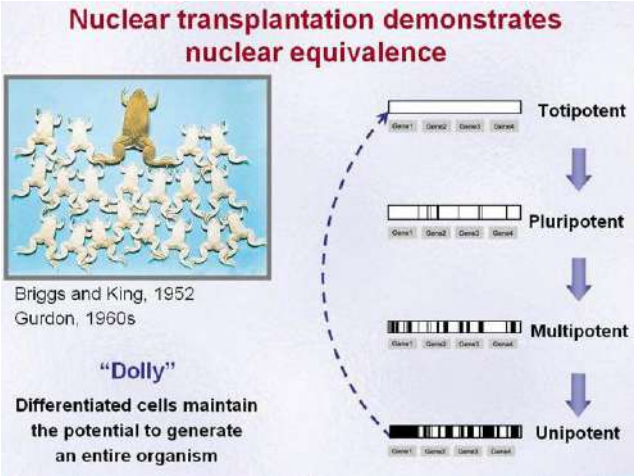
La diferenciación es el resultado de microambientes distintos para núcleos genéticamente idénticos

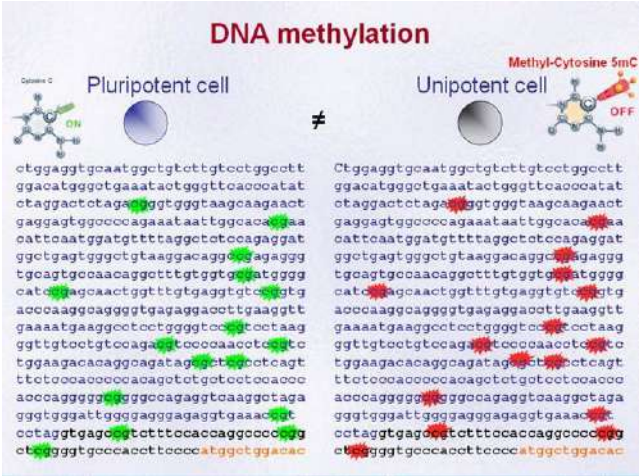




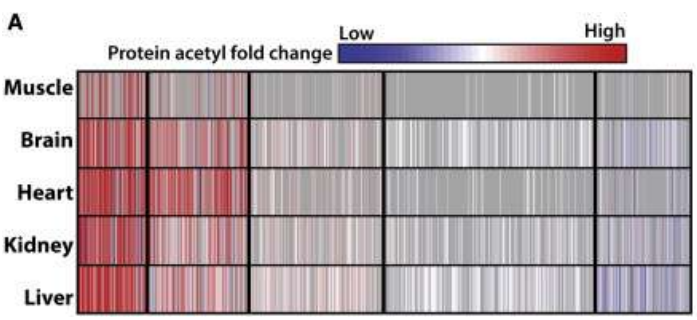
Durante la ontogenia se exhiben patrones específicos de metilación

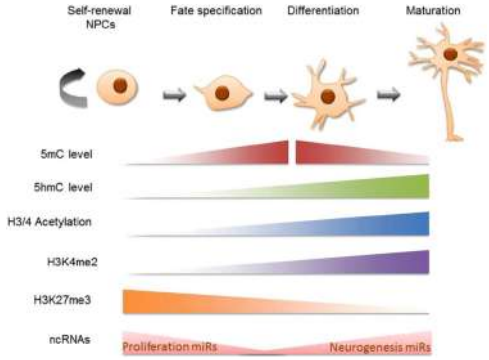


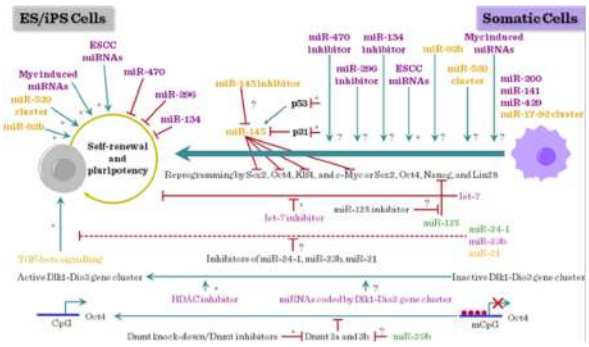


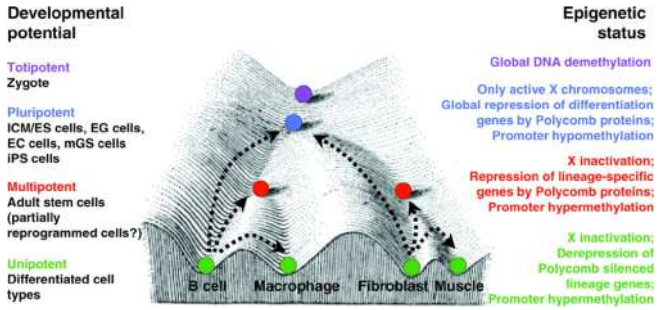


Diferenciación y cultivo de células madre



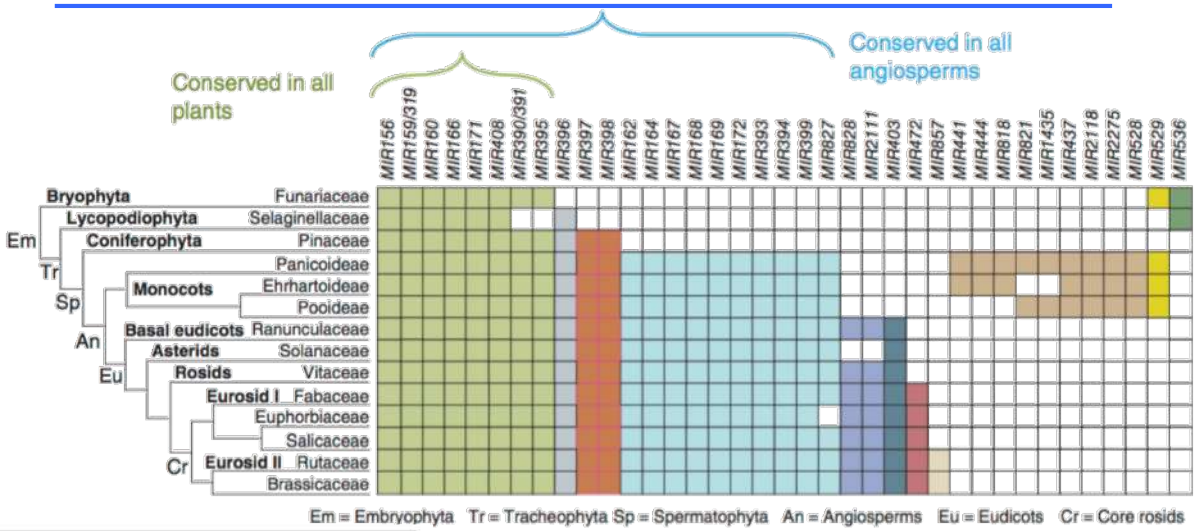






Vescovi et al (1999). Experimental Neurology DOI: 10.1006/exnr.1998.6998
Shi et al (2017). Nature Reviews Drug Discovery. DOI: 10.1038/nrd.2016.245

En plantas, algunos MIR están conservados a lo largo de la evolución



miRNA	Targets	Function
miR156	SPL transcription factors	Vegetative phase change
miR160	ARF transcription factors	Auxin hormone transport
miR165/166	HD-ZIPIII transcription factors	Development, polarity
miR172	AP2 transcription factors	Developmental timing, floral organ identity
miR390	TAS3	Auxin response, development
miR395	Sulfate transporter	Sulfate uptake
miR399	Protein ubiquitination	Phosphate uptake

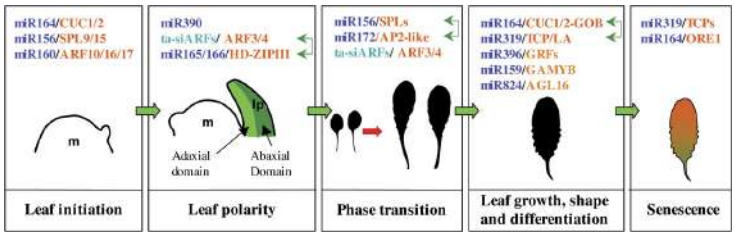
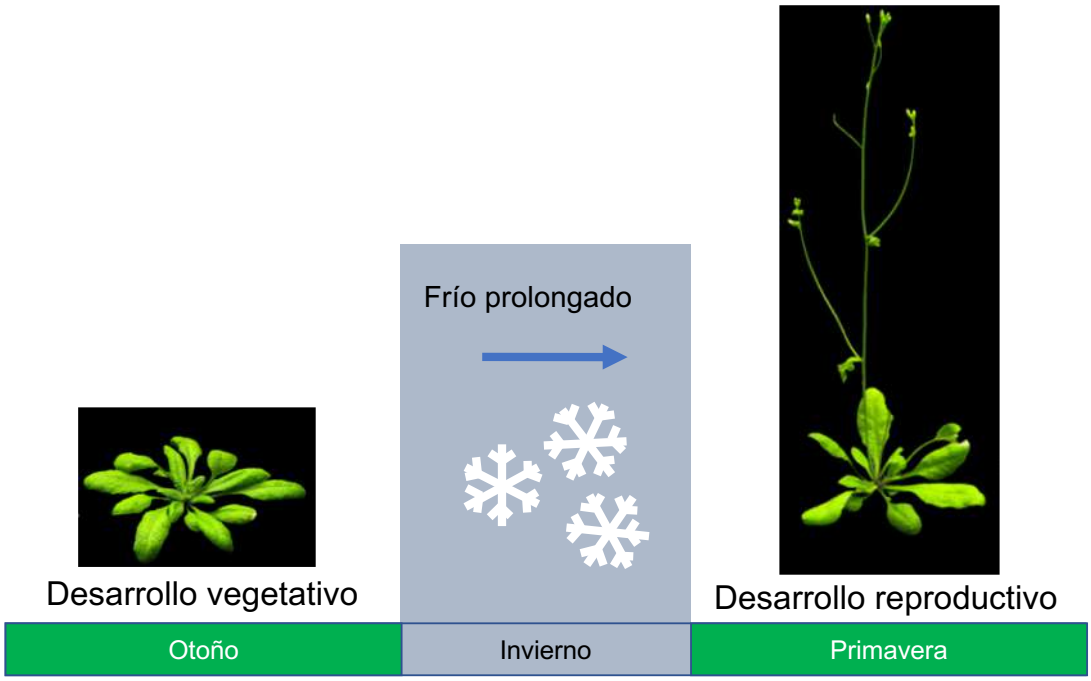


Imagen tomada de: Plant Genes, Genomes, and Genetics (1st Edition, 2015)

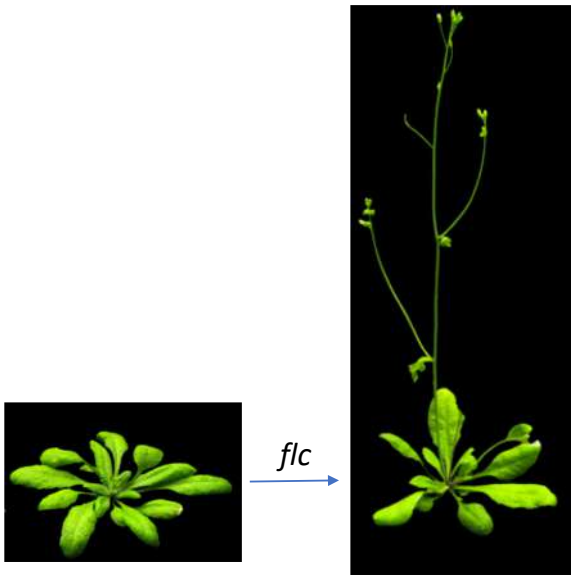
Floración: ¡En tiempo y forma!

Vernalización: Periodo de frío requerido por las plantas para poder florecer

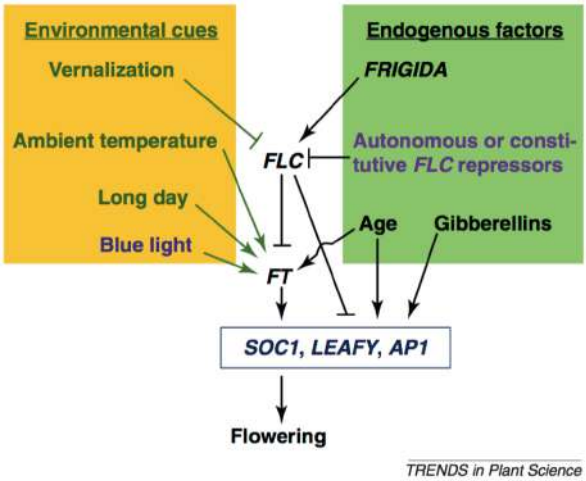


Floración: Flowering Locus C (FLC)

Las plantas mutantes para FLC florecen primero.



FLC es un inhibidor de la floración.

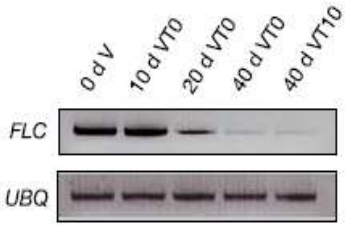


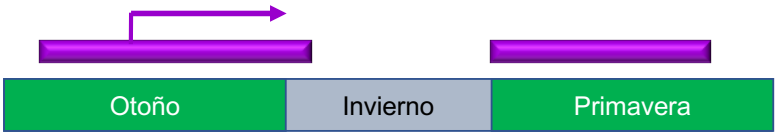
Otoño	Invierno	Primavera

Adaptado de He 2012. DOI 10.1016/j.tplants.2012.05.001

Floración: FLC se inhibe tras la vernalización

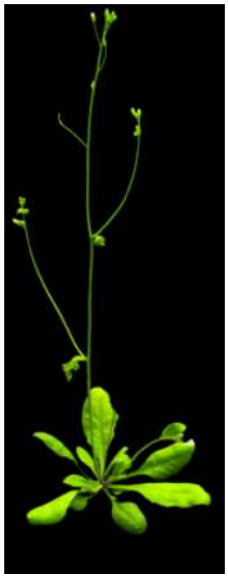
Tras 40 dias a 4 ºC, FLC no se expresa. 10 días despues del retorno a 22 ºC sigue sin expresarse.





FLC activo

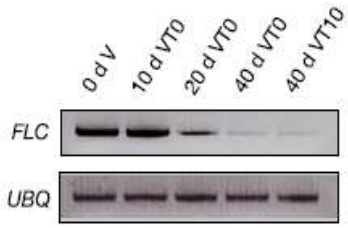
FLC silenciado

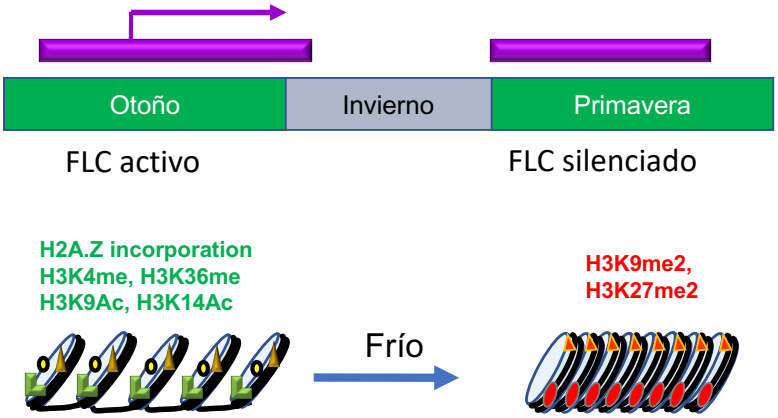


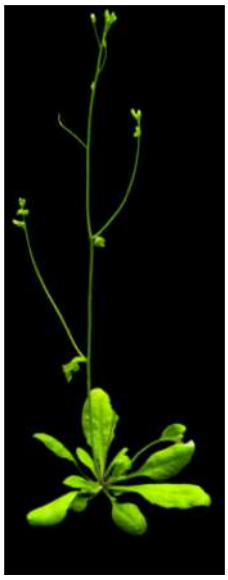
Adaptado de Sung y Amasino, 2004. DOI 10.1016/j.pbi.2003.11.010

Floración: FLC está regulado por modificaciones epigenéticas

Tras 40 dias a 4 ºC, FLC no se expresa. 10 días despues del retorno a 22 ºC sigue sin expresarse.

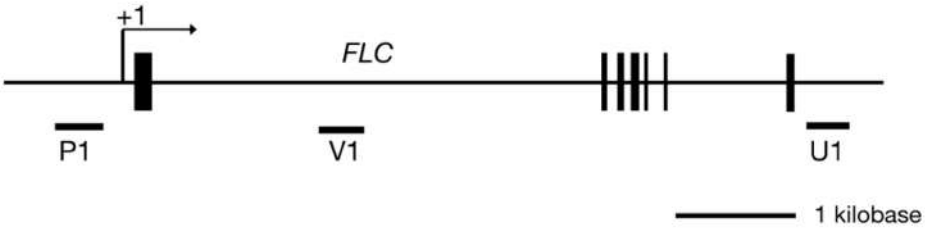


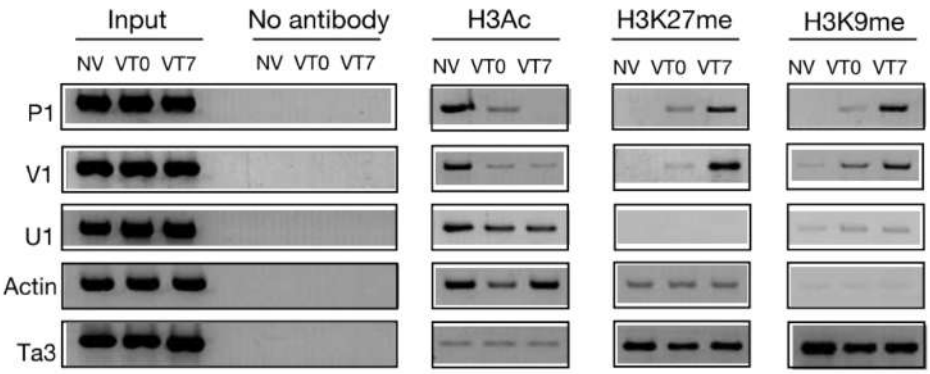




Adaptado de Sung y Amasino, 2004. DOI 10.1016/j.pbi.2003.11.010

Floración: FLC está regulado por modificaciones epigenéticas

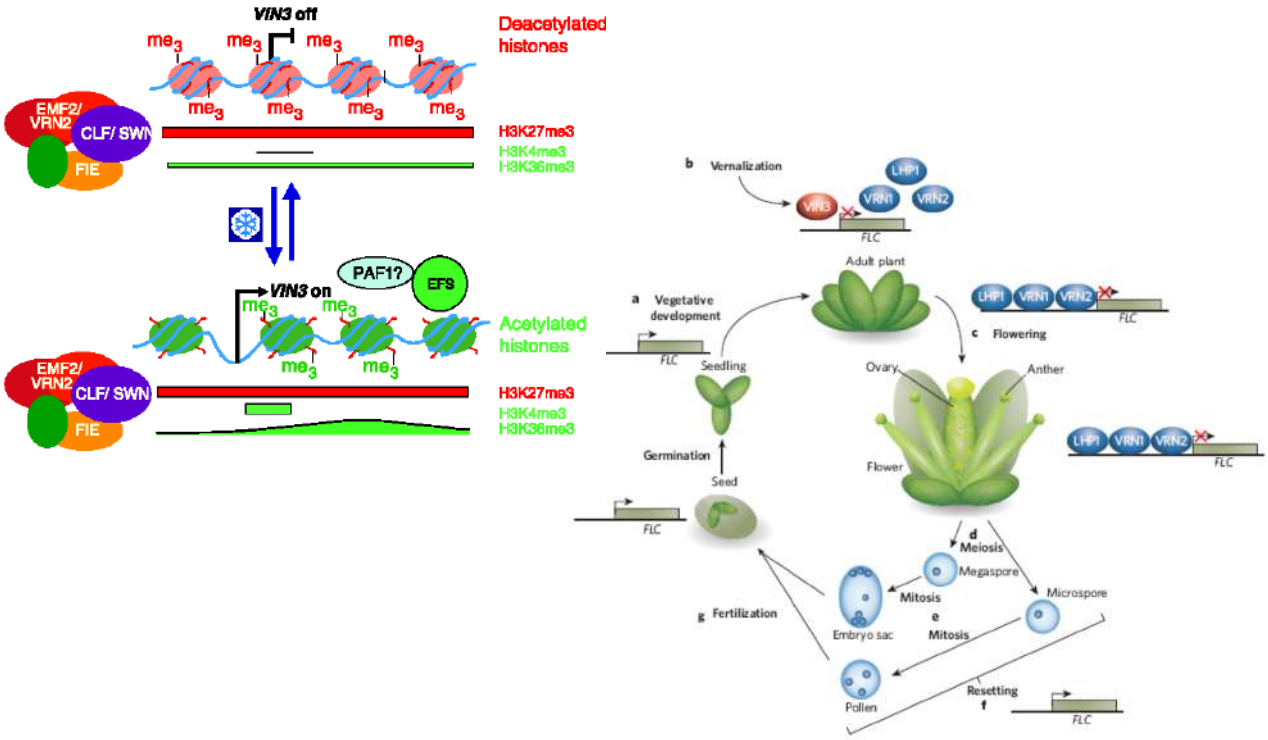




NV = no vernalización
VT0 = 40 dias a 4º
VT7 = 40 dias a 4º seguidos de 7 dias a 22˚

Adaptado de Sung y Amasino, 2004. DOI 10.1038/nature02195

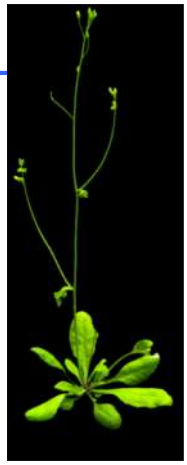
Floración: En silenciamiento de FLC participan múltiples mecanismos



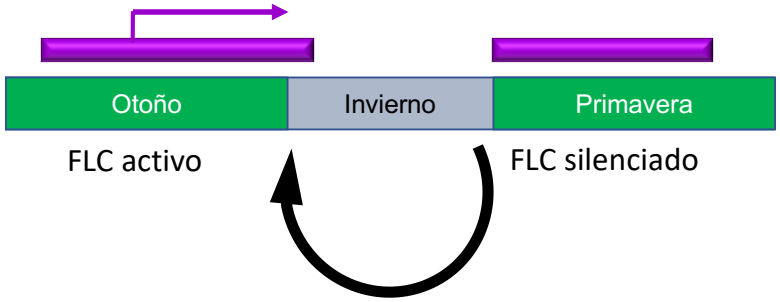
VIN3 – deacethylation of histons, VRN2 – induction of H3K27 methylation

Adaptado de Sung y Amasino, 2004. DOI 10.1016/j.pbi.2003.11.010

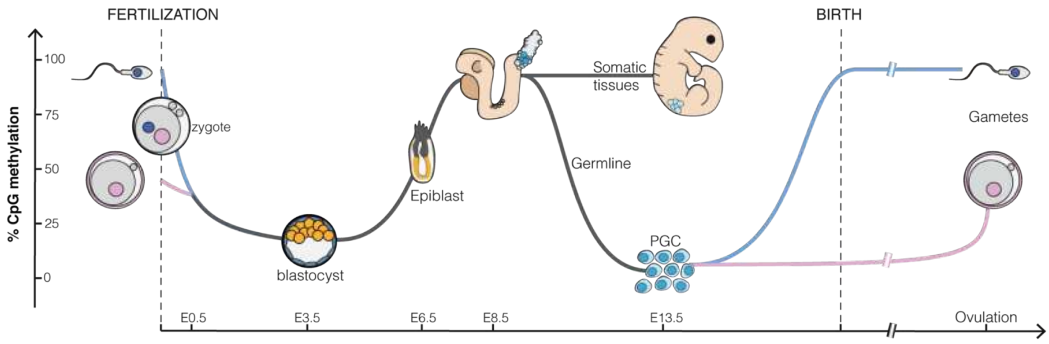
Restableciendo las marcas epigenéticas

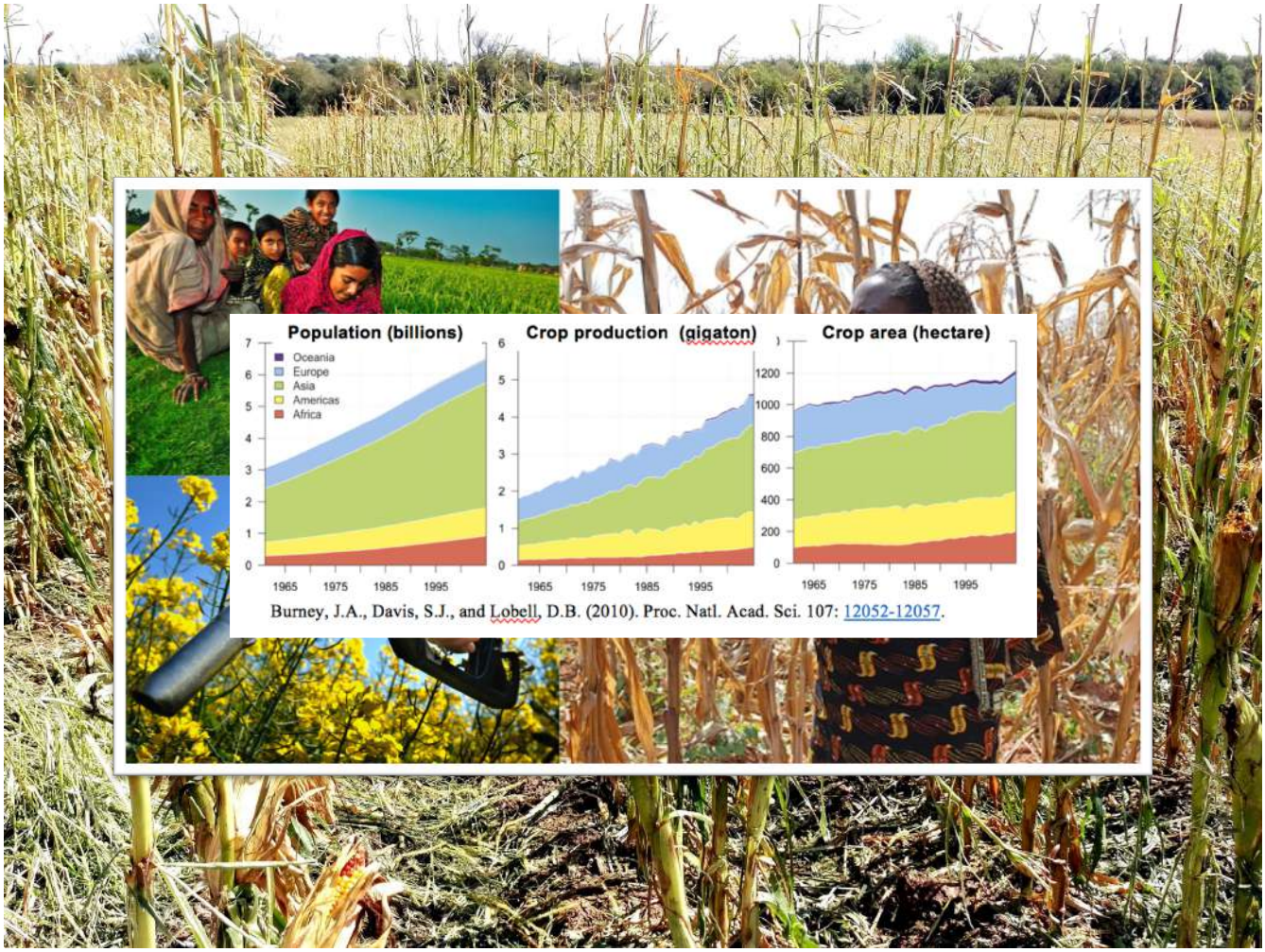


La mayoría de las marcas epigenéticas se resetean tras la fusión gamética.

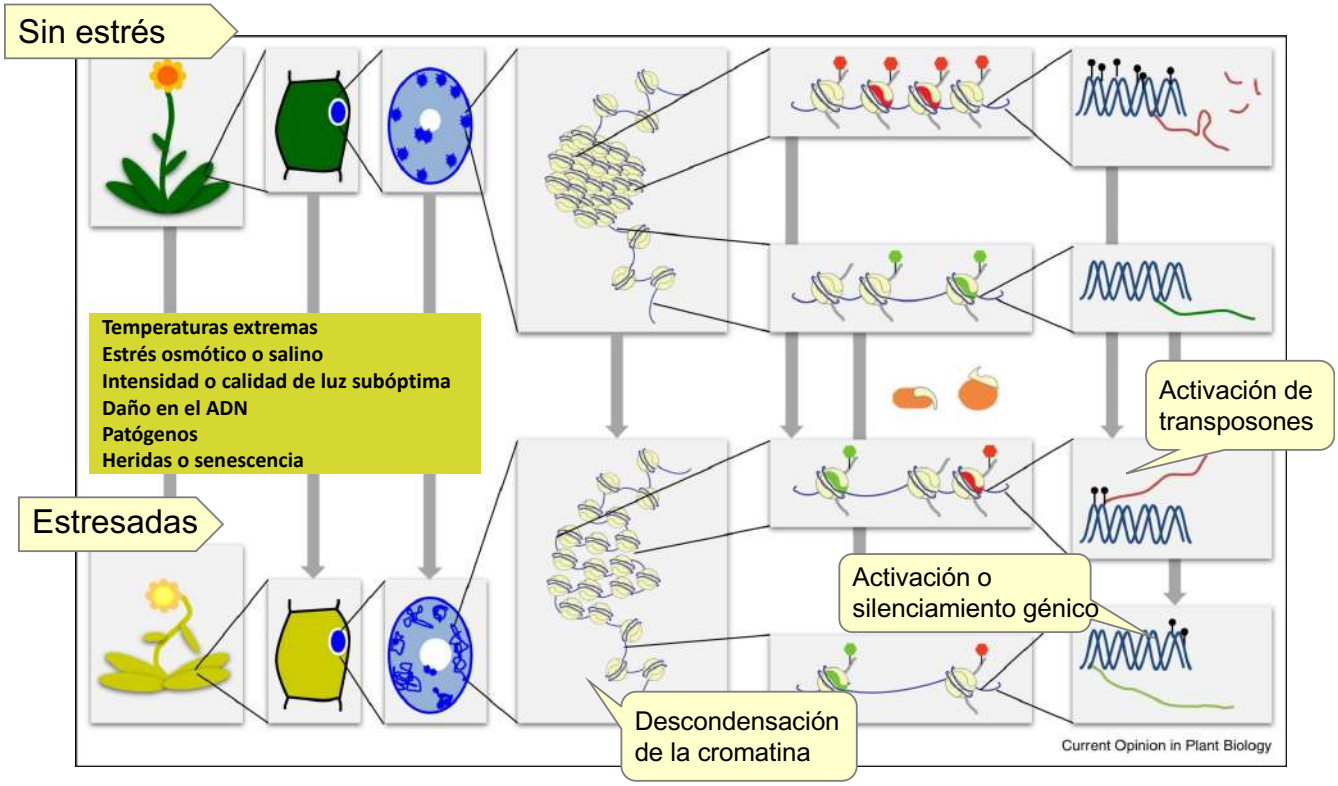


Hasta no hace mucho tiempo se asumía que las marcas epigenéticas se resetaban en su totalidad durante la embriogénesis



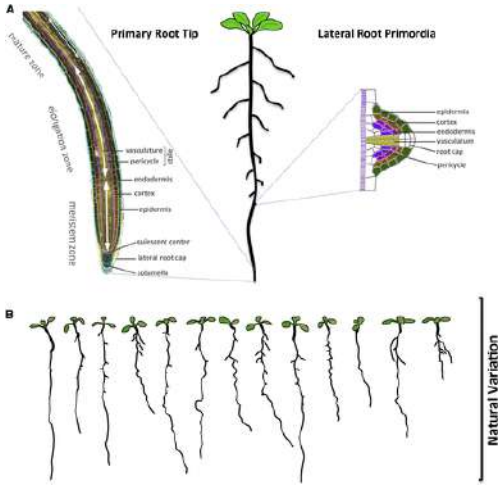


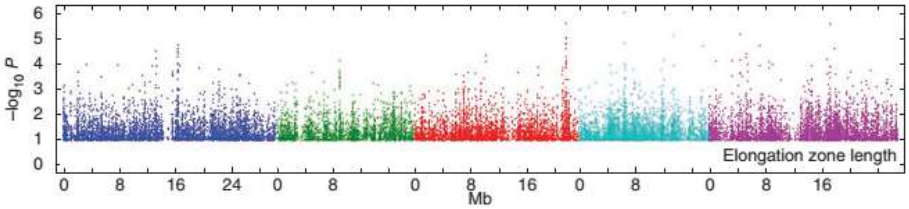
Epigenética y ambiente, ¿Cómo responde una planta al estrés?



Adaptado de Probst y Mittelsten-Scheid DOI: 10.1016/j.pbi.2015.05.011

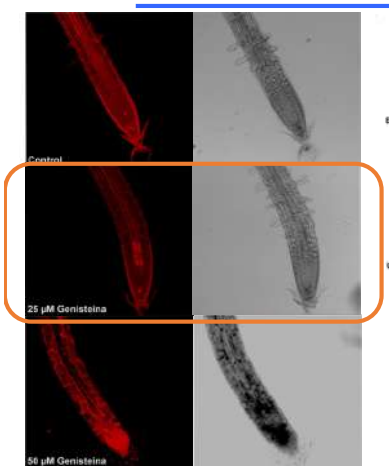
Variación natural radical: Desarrollo, nutrición y productividad

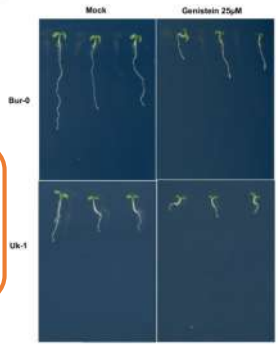




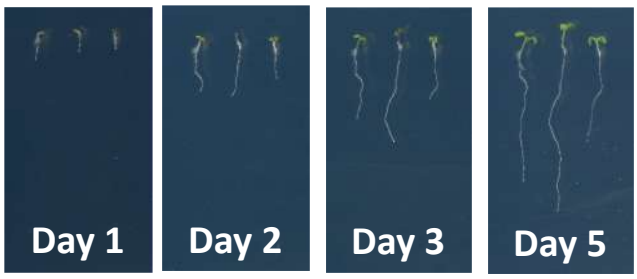
Meijón et al. Nature Genetics 2014

Desenmascaramiento químico y GWAS

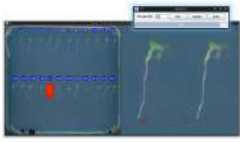




Más de 2000 plantas fueron analizadas, empleando más de 200 ecotipos diferentes.



Then, the BRAT software was used to analyze the images of the scanned plates.

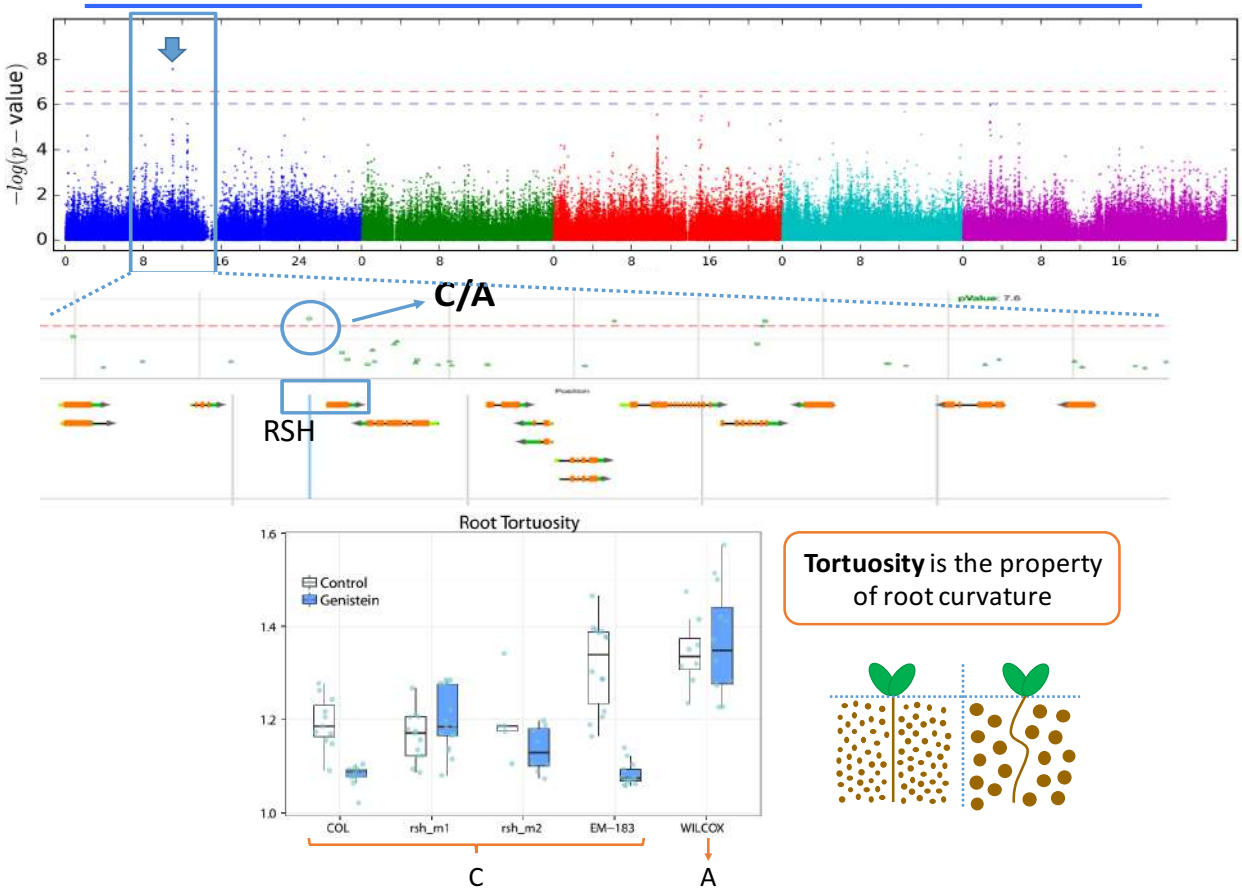


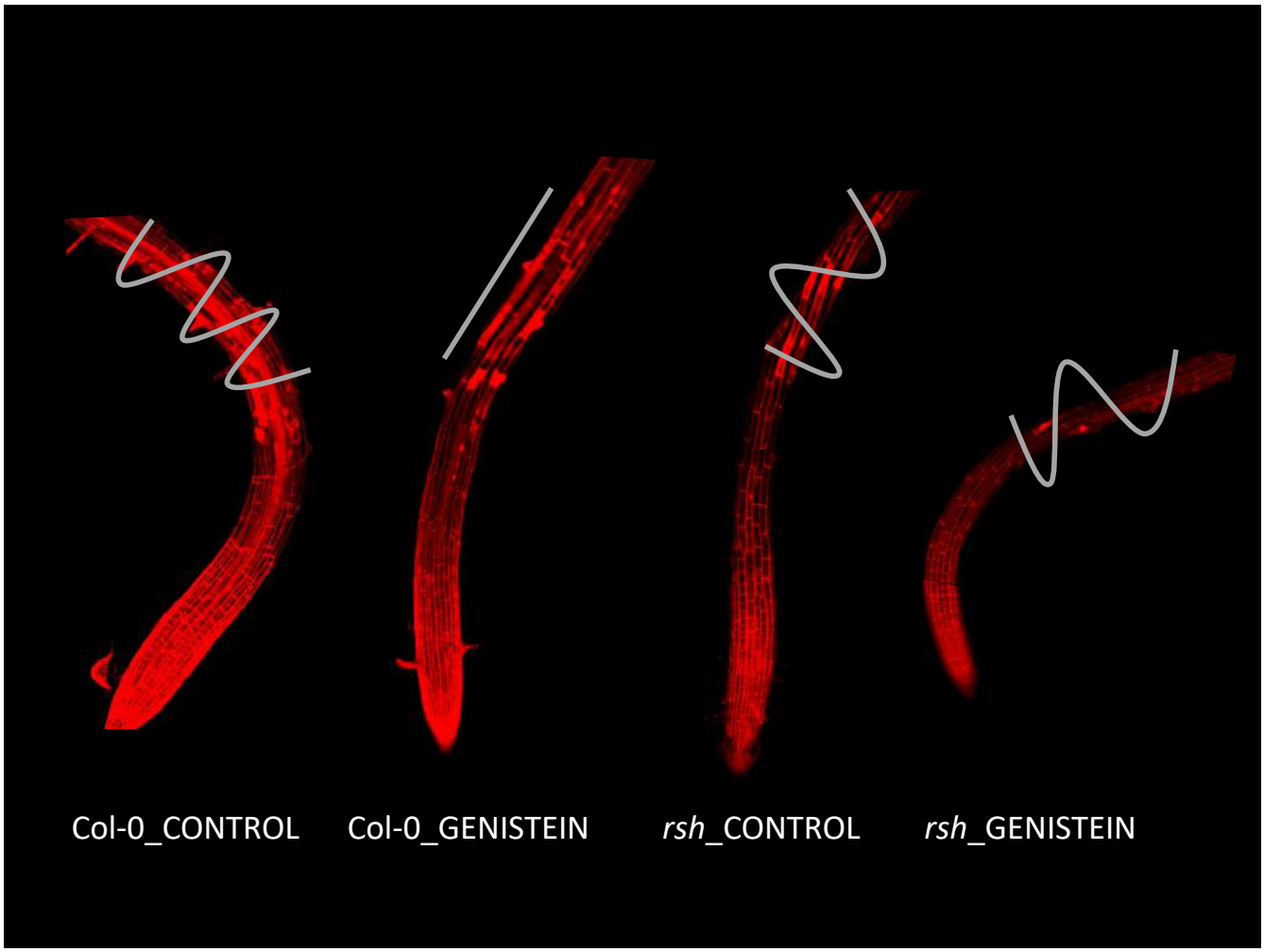
Total length	Root vertical index
Euclidian length	Root linearity
Root tortuosity	Average root width
Root growth rate	Root width 20
Relative root growth rate	Root width 40
Root angle	Root width 60
Root direction index	Root width 80
Root horizontal index	Root width 100

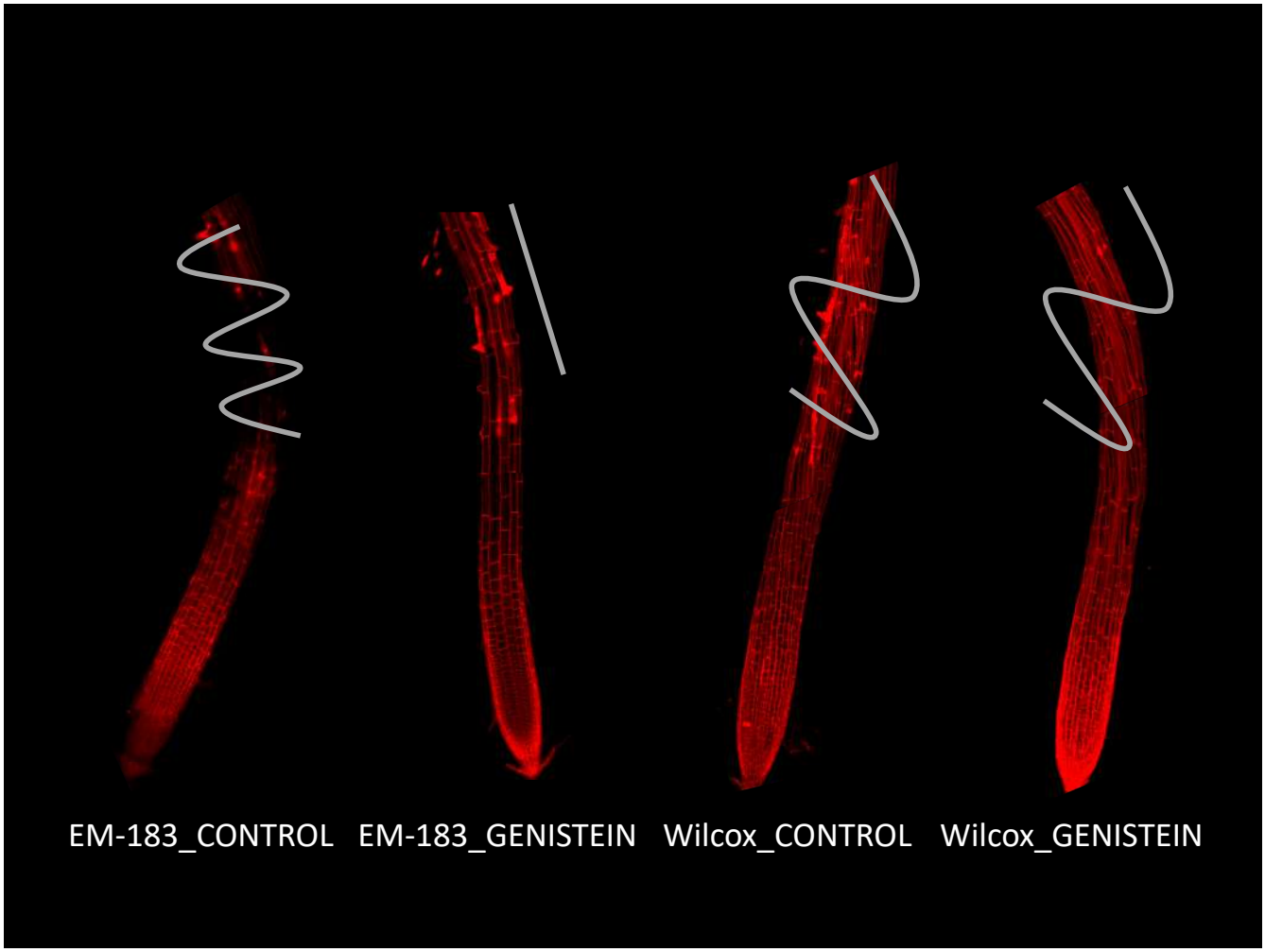
Finally, GWAPP was employed to perform the GWAS analysis.

Arabidopsis 250K SNPs array

Desenmascaramiento químico y GWAS

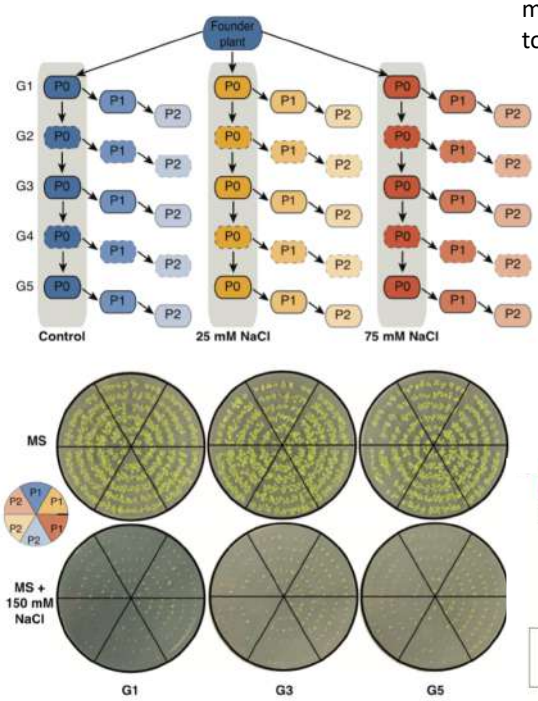




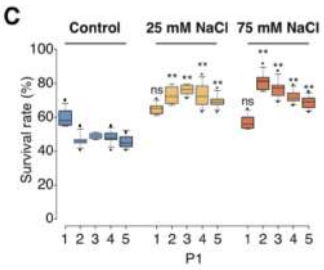


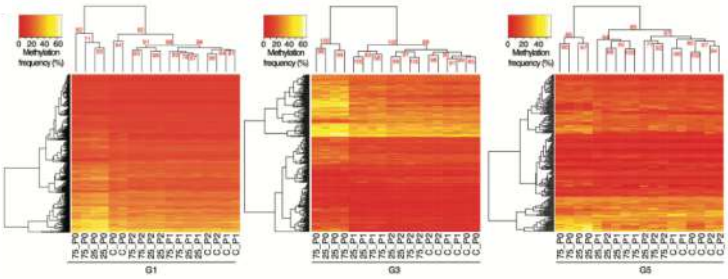
Memoria epigenética y evolución dirigida

Las plantas de arabidopsis sometidas a estrés salino producen semillas más tolerantes a este estrés a partir de la primera generación. Esta tolerancia se mantiene al menos 2 generaciones



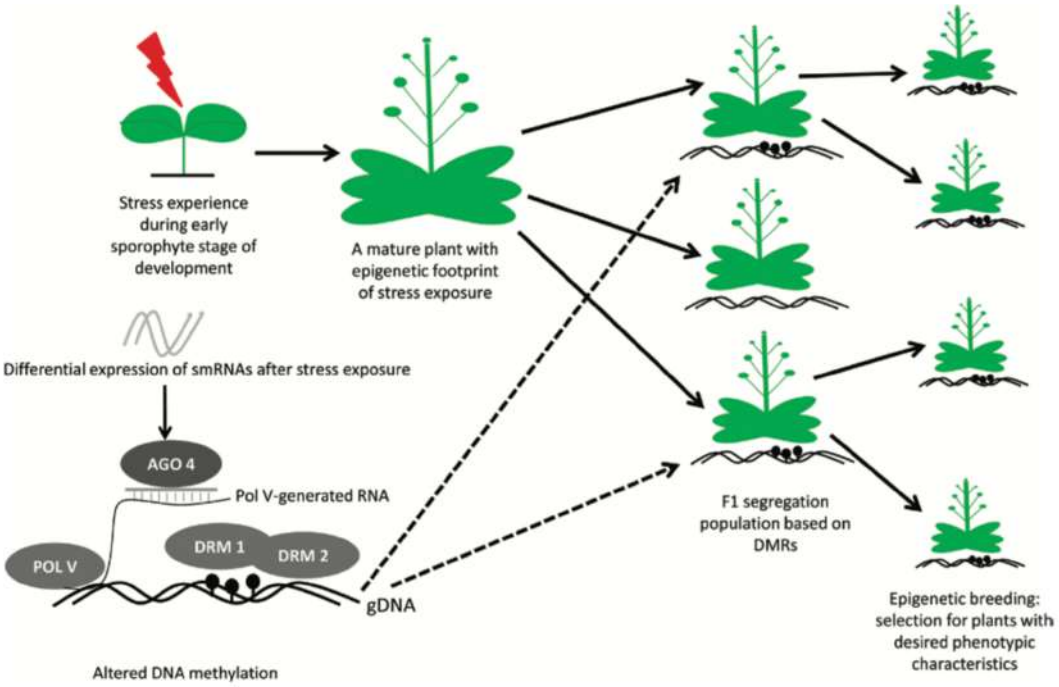
Las plantas son mas tolerantes a estrés salino





Tomado de Wibowo et al. 2016 DOI: 10.7554/eLife.13546

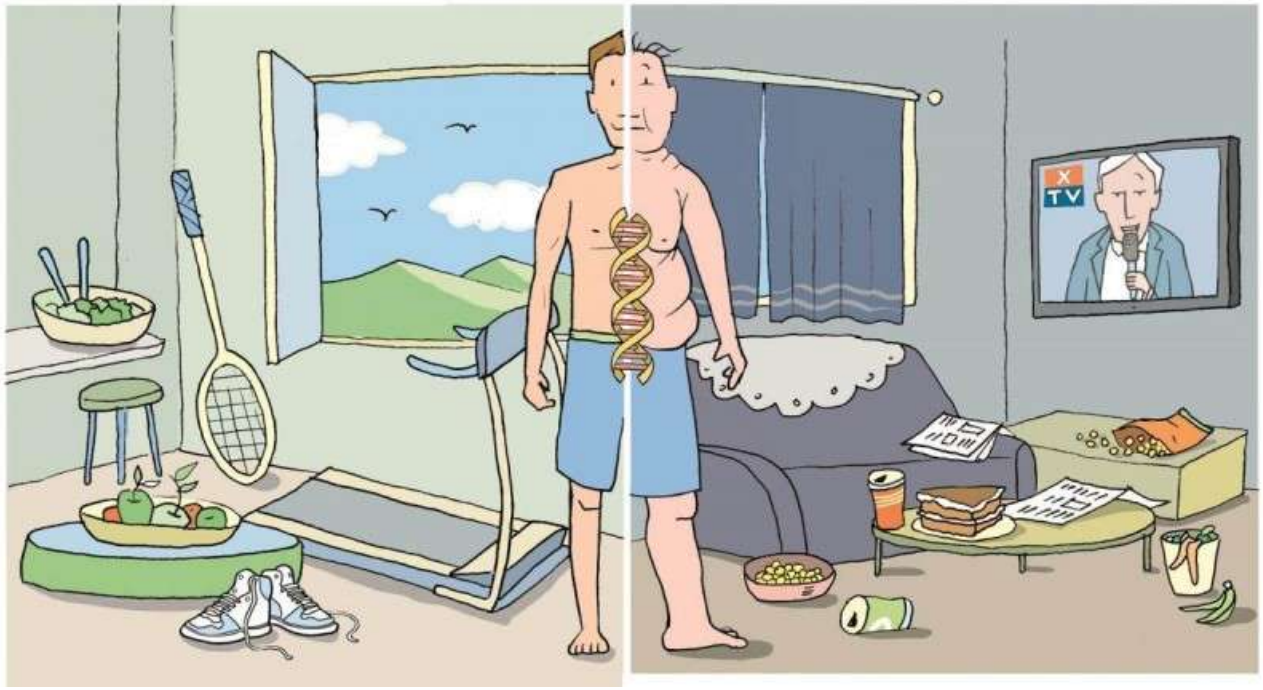
Epigenética y mejora



Tomado de Bilichak y Kovalchuck. 2016 DOI: 10.1093/jxb/erw066

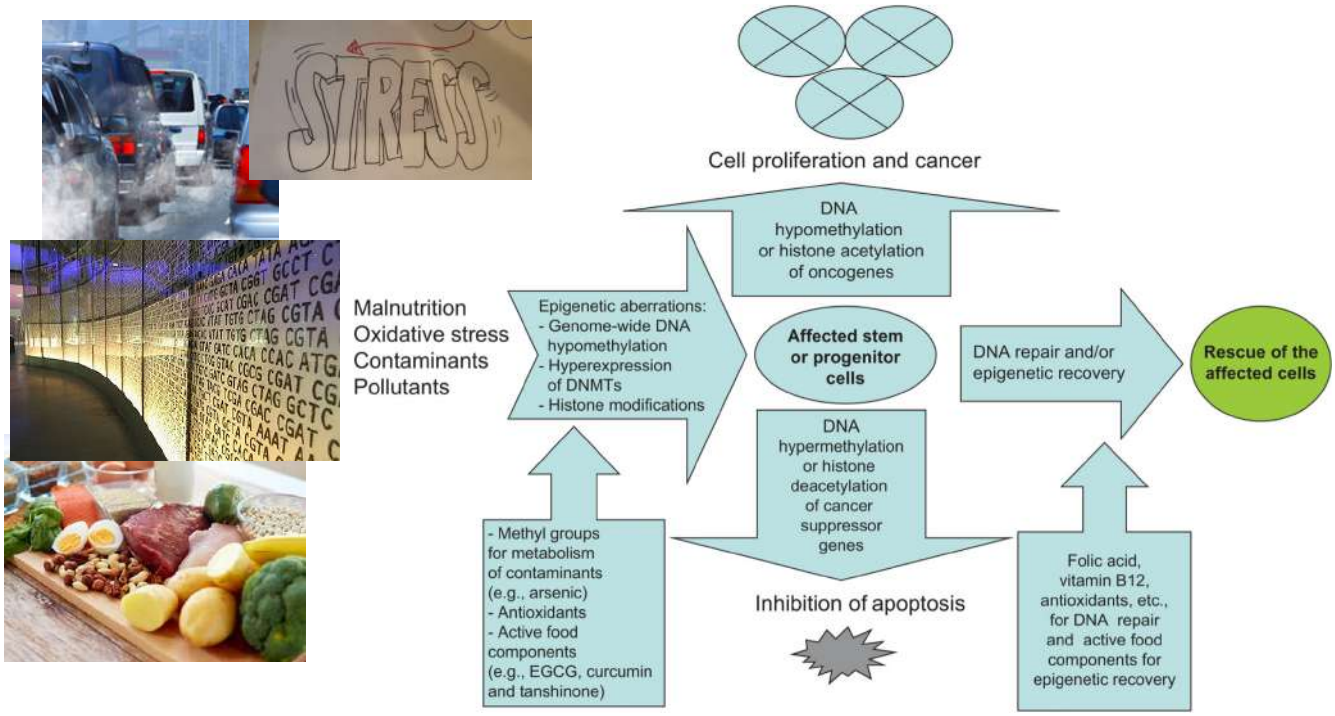
Epigenética y ambiente

¿Cómo puede afectar el ambiente al patrón epigenético en animales?



Epigenética y ambiente

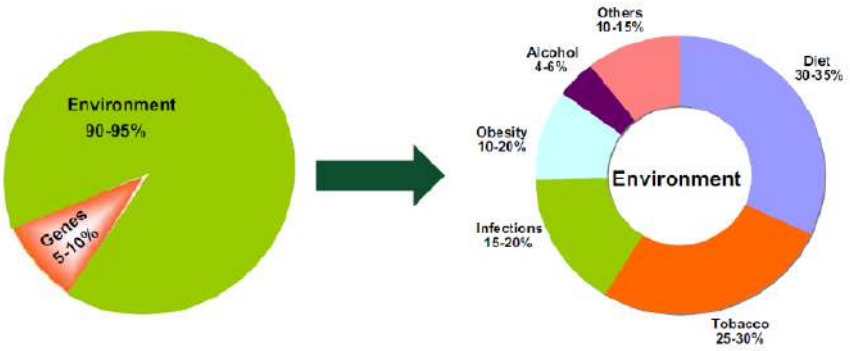
¿Cómo puede afectar el ambiente al patrón epigenético en animales?



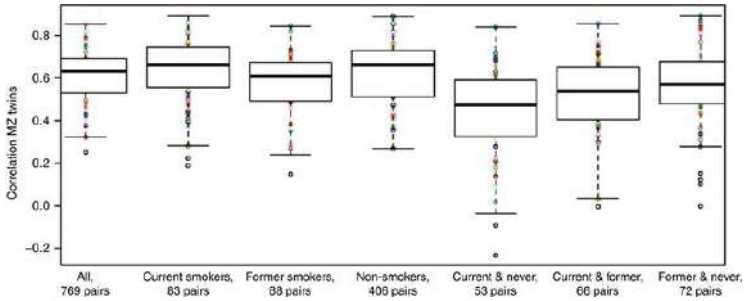
Epigenética y cáncer

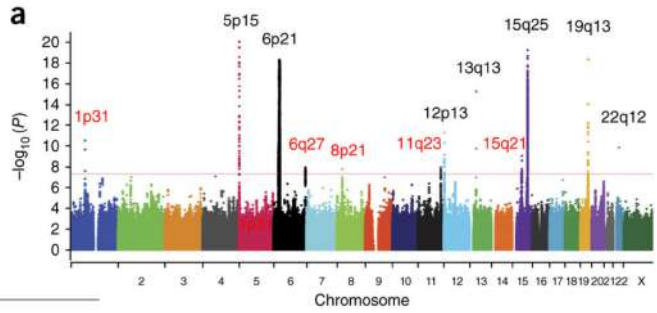
90-95% of all cancers are due to diet and lifestyle factors, like poor nutrition or tobacco smoking.

These are factors that we have control over on a day to day basis.



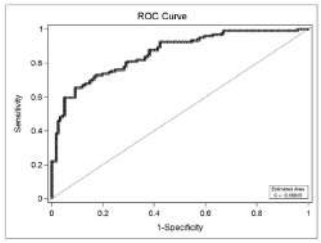
Epigenética y cancer, exposición a tóxicos





Differential methylations between 138 SCLC cases and 138 matched controls: Validation study

Gene Symbol	Illumina CpG IDs	CpG Island	Adjusted p-value	Control: Mean methylation level	Control: SD[a]	Case: Mean methylation level	Case: SD[a]	Case/control Difference
IL10	IL10_P85_F	no	<0.0001	0.116	0.032	0.077	0.035	-0.039
PECAM1	PECAM1_E32_R	yes	<0.0001	0.343	0.089	0.242	0.104	-0.101
S100A2	S100A2_E36_R	no	<0.0001	0.288	0.076	0.211	0.063	-0.077
MMP9	MMP9_P189_F	no	<0.0001	0.058	0.020	0.037	0.021	-0.021
ERCC1	ERCC1_P440_R	yes	<0.0001	0.135	0.044	0.085	0.037	-0.050
EMR3	EMR3_E61_F	no	<0.0001	0.161	0.043	0.115	0.050	-0.046
SLC22A18	SLC22A18_P216_R	no	<0.0001	0.227	0.059	0.155	0.074	-0.072
TRIP6	TRIP6_P1090_F	yes	0.0003	0.44	0.255	0.319	0.259	-0.121
CSF3R	CSF3R_P472_F	no	<0.0001	0.277	0.066	0.18	0.084	-0.097
CAV1	CAV1_P169_F	yes	0.3577	0.1	0.063	0.109	0.07	0.009



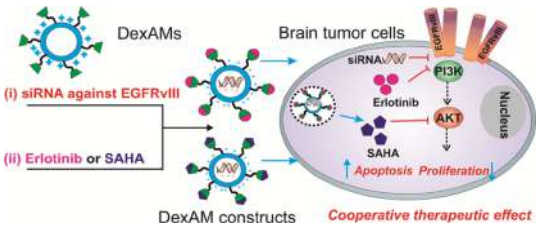
Epigenética y medicina personalizada

Modificación global de marcas epigenéticas

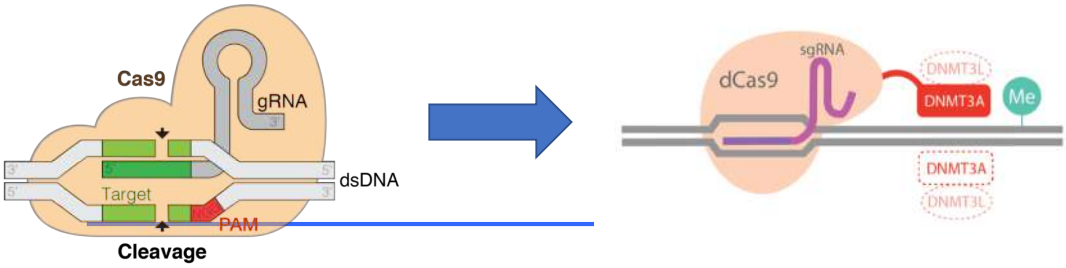
Combinación de drogas específicas (desmetilasas, inhibidores de enzimas modificadores de histonas, etc.). → Quimioterapia clásica

Modificación de dianas epigenéticas específicas:

Introdución de siRNAs específicos para silenciar oncogenes



Híbridos de CRISPR/Cas9



La gran hambruna holandesa (Invierno de 1944-1945)

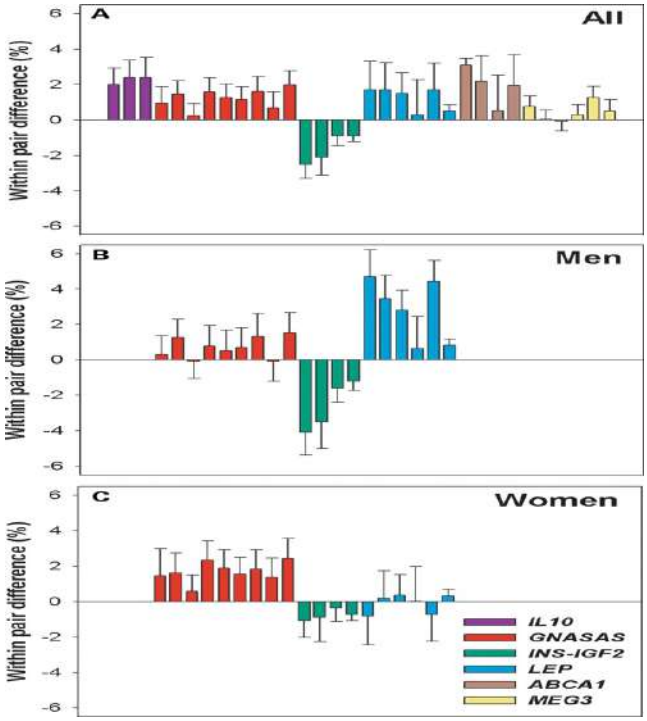
La hambruna en los Países Bajos hacia el final de la Segunda Guerra Mundial, causada por la ocupación nazi y un invierno severo provocó desnutrición grave en la población.

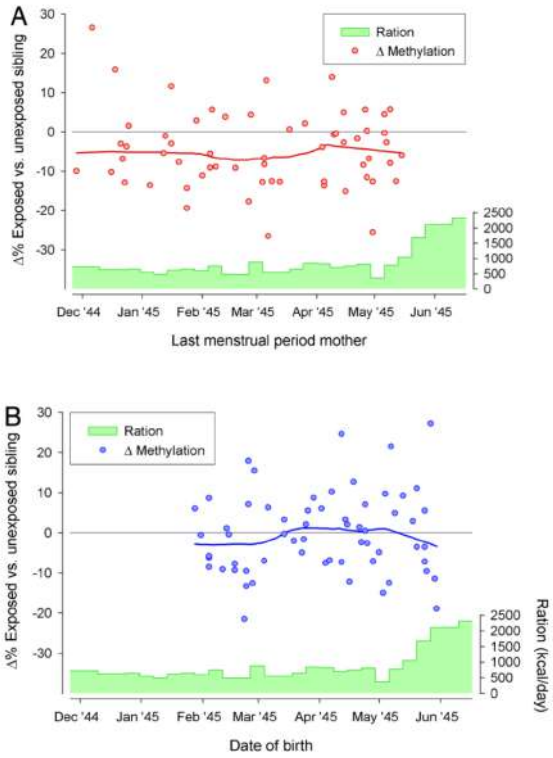
Los nacidos durante, o inmediatamente posterior a este periodo muestran elevado riesgo de diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares.

Además estos niños son más pequeños que los gestados por madres no expuestas. La descendencia de estos niños (hoy ancianos) fue de menor tamaño que el de las de cohortes no expuestas.

Heijmans et al. (2008). Proc.Nat.Acad.Sci USA. DOI pnas.0806560105

La gran hambruna holandesa (Invierno de 1944-1945)



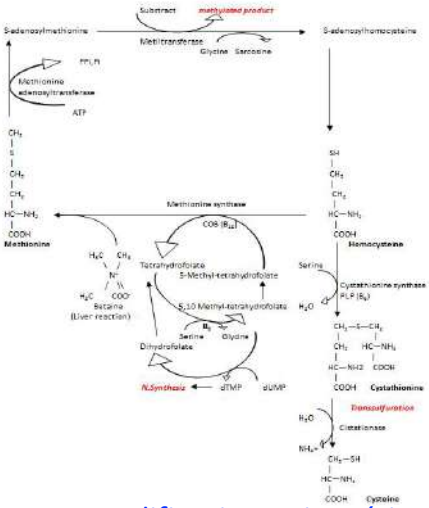


IGF2

Heijmans et al. (2008). Proc.Nat.Acad.Sci USA. DOI pnas.0806560105

La gran hambruna holandesa (Invierno de 1944-1945)

Los análisis epigenéticos en estos individuos **casi 60 años después** muestran **metilación diferencial** en varios genes involucrados en el **crecimiento y el control metabólico**, que dependen del sexo y el tiempo de exposición durante la gestación. La hipometilación en el promotor de IGF2, un gen con impronta materna implicado en el crecimiento y el desarrollo, también se ha observado en aquellos expuestos durante el período periconcepcional relativo a hermanos no expuestos.



•La vía del metabolismo de 1 carbono es necesaria para la síntesis de ADN y su metilación

➔ clave para la epigenetica

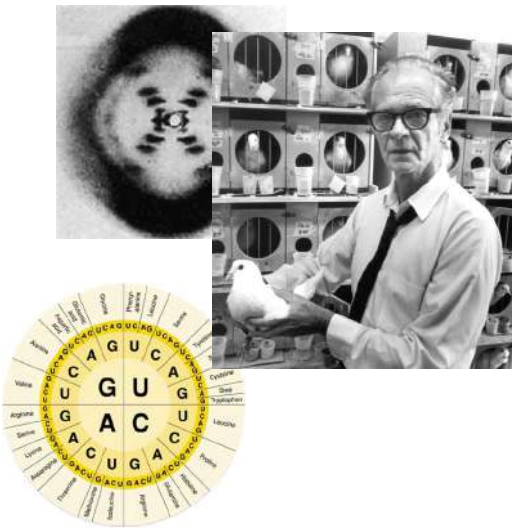
•Este metabolismo está muy relacionado con la dieta (ingesta de folato, metionina,…)

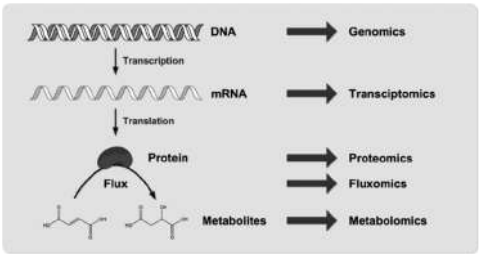
•Existe una relación causa-efecto entre el metabolismo de un carbono y la epigenética.

Esta modificacion epigenética es heredable, y tarda generaciones en revertir.

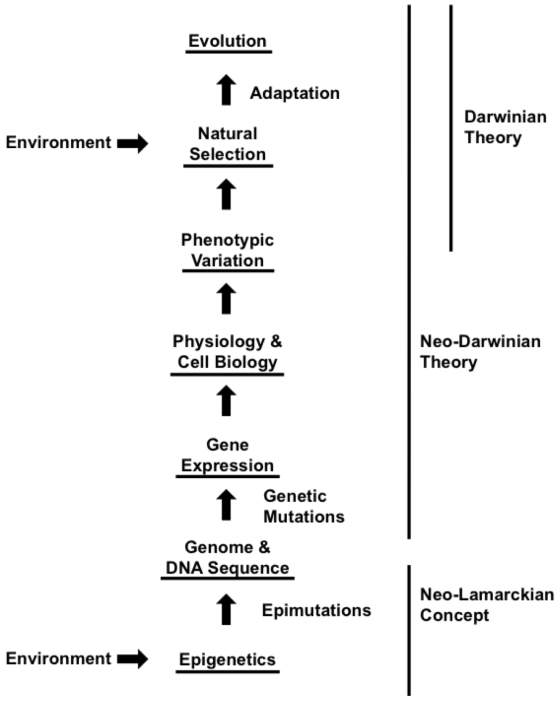
Heijmans et al. (2008). Proc.Nat.Acad.Sci USA. DOI pnas.0806560105

Teoría unificada de la Evolucion, BF Skinner





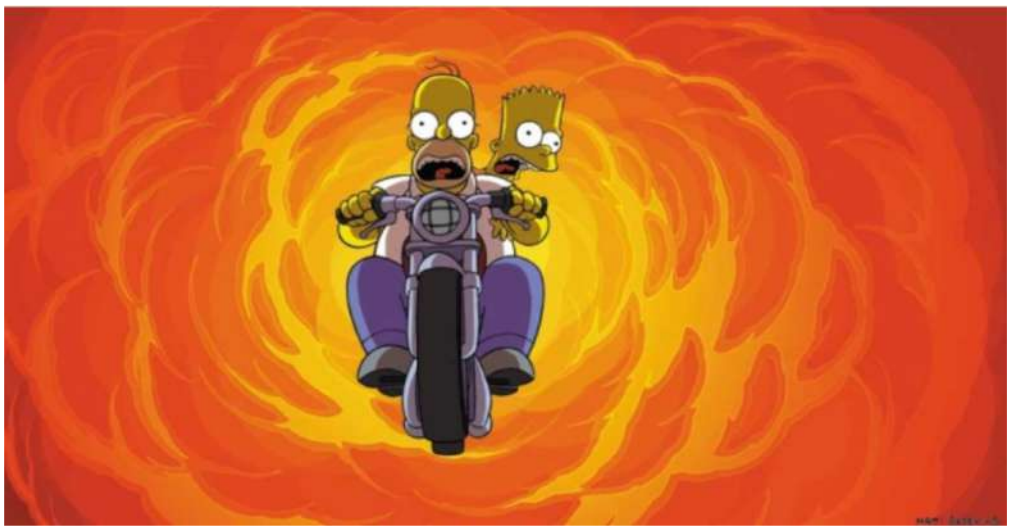
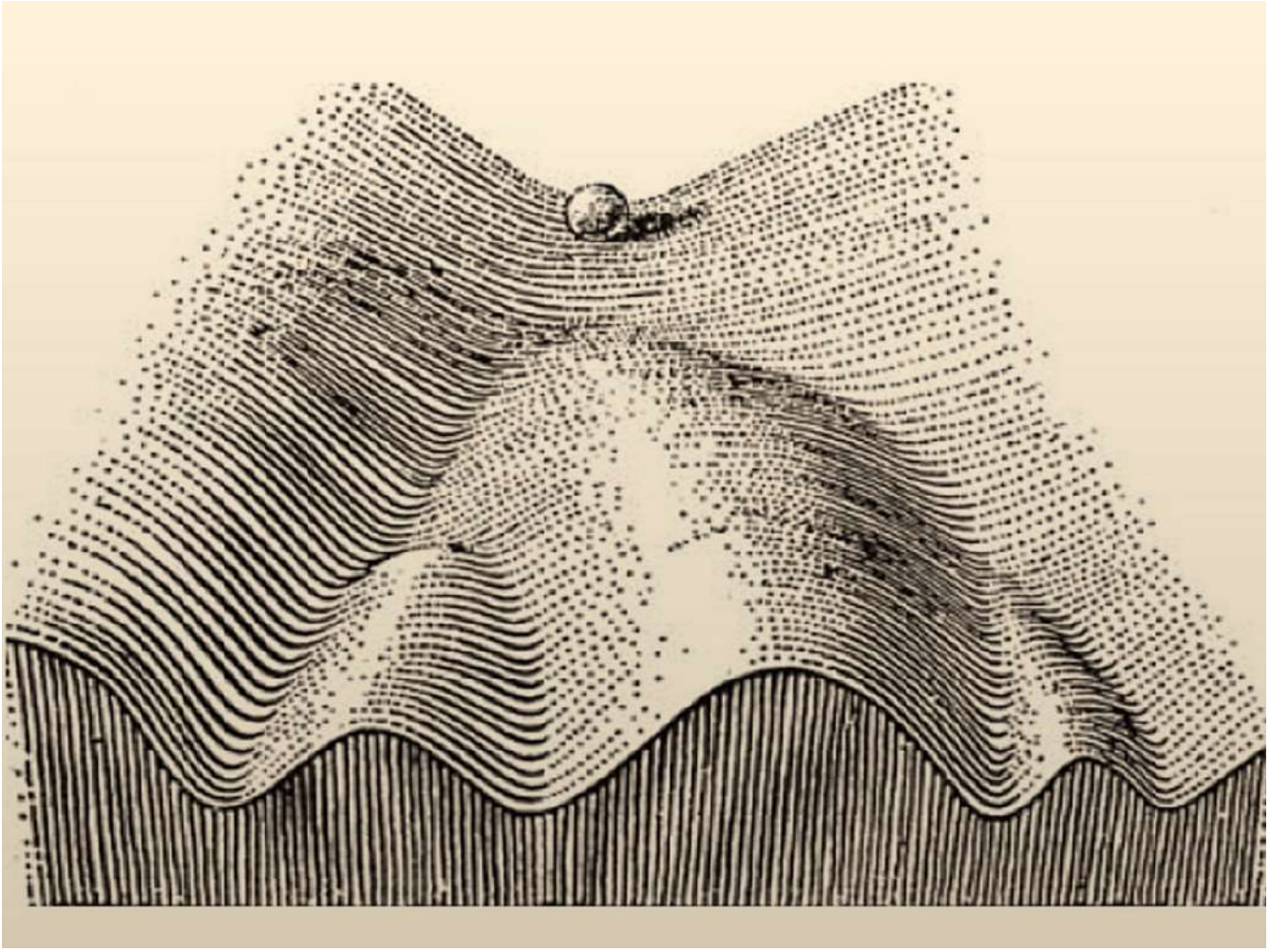
Teoría Unificada de la Evolución según Skinner



Para saber mas: Skinner 2015. Genome Biology and Evolution. DOI: 10.1093/gbe/evv073

Epigenética, la herencia más allá de los genes

¿Somos los pecados de nuestros padres?



¡Muchas gracias por vuestra atención!