

# Perfil de metilación diferencial de ADN en hipotálamo de lechones ibéricos expuestos a estrés térmico intrauterino y suplementación perinatal con antioxidantes

Pedro Vázquez Ortego<sup>1\*</sup>, Paula Aranguren Rivas<sup>1</sup>, Yolanda Núñez<sup>1</sup>, Ana García Cabrero<sup>1</sup>, Antonio Magro<sup>2,3</sup>, Fernando Sánchez Esquiliche<sup>4</sup>, Gerardo Gómez<sup>5</sup>, Nares Trakooljul<sup>6</sup>, Eduard Murani<sup>6</sup>, Cristina Óvilo<sup>1</sup>, Juan M. García Casco<sup>1,7</sup>, Ana Heras Molina<sup>3</sup>, María Muñoz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), Ctra. de La Coruña km 7.5, 28040, Madrid (España)

<sup>2</sup> Universidad Europea de Madrid (UEM), C. Tajo s/n, 28670, Villaviciosa de Odón (España)

<sup>3</sup> Universidad Complutense de Madrid (UCM), Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid (España)

<sup>4</sup> Sánchez Romero Carvajal (SRC), Ctra. de San Juan del Puerto s/n, 21290, Jabugo (España)

<sup>5</sup> Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla-La Mancha (IRIAF), Ctra. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso (España)

<sup>6</sup> Research Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18196, Dummerstorf (Alemania)

<sup>7</sup> Centro de I+D en Cerdo Ibérico (INIA-CSIC), Ctra. Zafra – Los Santos de Maimona EX101 km 4.7, 06300, Zafra (España)

\* Corresponding author: [pedro.vazquez@inia.csic.es](mailto:pedro.vazquez@inia.csic.es)

## Resumen

La metilación del ADN es uno de los principales mecanismos epigenéticos, con un papel fundamental en la reprogramación que tiene lugar durante el desarrollo prenatal, momento en el que el epigenoma es más susceptible a factores de estrés. En este estudio se analizó el metiloma hipotalámico de lechones ibéricos expuestos a altas temperaturas durante la gestación y cuyas madres recibieron suplementación con antioxidantes como estrategia aliviadora. Nuestro objetivo fue identificar marcas de metilación relacionadas con desarrollo temprano y respuesta al estrés por calor, evaluando el efecto de la suplementación antioxidante.

Se realizaron dos ensayos, uno con la gestación durante los meses de invierno (TN: termoneutralidad) y otro durante el verano (HS: estrés térmico). En cada ensayo, las cerdas ibéricas preñadas (n=48) se distribuyeron en dos grupos según la dieta que recibieron desde el día 50 de gestación hasta el destete: a) dieta control (C): 100 IU/kg de vitamina E y minerales en forma inorgánica (Mn, Zn, Cu, Se), siguiendo las recomendaciones FEDNA 2013, y b) dieta mineral (M): igual a la dieta control, pero aportando un porcentaje de los minerales (45 – 100%) en forma orgánica para favorecer su absorción. A los 21 días de edad, 32 lechones de cada ensayo fueron sacrificados, seleccionando pequeños (peso al nacimiento =  $0,98 \pm 0,12$  kg) y grandes (peso al nacimiento =  $1,51 \pm 0,11$  kg), y con distribución homogénea por dieta materna y sexo. Se tomaron muestras de hipotálamo de estos lechones, a las que se les extrajo ADN para su análisis por secuenciación de bisulfito de representación reducida (RRBS). Como resultado se obtuvo una media de 2,5 millones de sitios CpGs, estando un 20% localizados en posibles promotores, 11% en exones, 38% en intrones y 30% en regiones intergénicas. Las secuencias, previamente evaluadas y filtradas con FastQC-Trim Galore, se analizaron siguiendo el pipeline Bismark-DSS-genomation, y con el genoma porcino Sscrofa11.1 como referencia. Se consideraron como sitios CpG diferencialmente metilados (DMCs) aquellos con  $FDR < 0.05$ . Finalmente, se hicieron análisis de enriquecimiento funcional con el paquete de R gprofiler2 considerando los genes con DMCs a  $\pm 2$  kb del sitio de inicio de la transcripción (TSS) más cercano.

Los resultados mostraron que tanto la estación de gestación (HS vs TN: 2.568 DMCs) como la suplementación materna con antioxidantes (M vs C: 1.480 DMCs) tuvieron un efecto importante sobre el metiloma hipotalámico de los lechones. Además, se observó que el efecto de la dieta materna fue mayor en el ensayo HS (HS-M vs HS-C: 2.515 DMCs) comparado con el ensayo TN (TN-M vs TN-C: 1.539 DMCs). Los resultados del enriquecimiento funcional mostraron que los DMCs identificados estarían afectando a la expresión de genes, como *NRG2*, *PTK2* o *DNAJC5*, implicados en las vías de señalización de ERBB o PTK6, y la regulación de la comunicación y el transporte transmembrana.

En conclusión, nuestros resultados indican que la estación de gestación y la dieta materna influyen sobre el metiloma hipotalámico de los lechones, con un mayor efecto de la dieta en los lechones gestados durante el verano.

*Keywords: cerdo ibérico, metilación de ADN, desarrollo perinatal, estrés por calor.*

**Agradecimientos:** Ayudas PID2022-139367OB-C21 y PREP2022-000441 financiadas por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 (FEDER/UE, FSE+). Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y apoyo de El Dehesón del Encinar, IRIAF, Junta de Castilla-La Mancha. Además, nos gustaría agradecer al grupo Physiological Genomics del Departamento de Genética y Genómica del FBN por su ayuda y la oportunidad de realizar los análisis bioinformáticos en sus instalaciones durante una estancia de 3 meses.