

COMPARACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA MUSCULAR DE CERDOS IBÉRICOS PUROS Y CRUZADOS CON DUROC AL NACIMIENTO.

Ayuso¹, M., Fernández, A., González-Bulnes, A., Isabel, B., Fernández, A.I., Rey, A.I., Nuñez, Y., Benítez, R., Medrano, J.F., Cánovas, A., López-Bote, C.J. y Óvilo, C.

¹ Dpto. Producción Animal, UCM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid
mayher@live.com

INTRODUCCIÓN

El cerdo Ibérico es una raza autóctona destinada fundamentalmente a la obtención de productos cárnicos de alta calidad. Los rendimientos reproductivos y productivos son bajos; por ello, es habitual el uso de la raza Duroc como línea paterna terminal. Actualmente, la legislación española contempla el uso de esta raza y establece la denominación "Ibérico" para productos obtenidos de cruces de Ibérico x Duroc (IB x DU) al 50% (Real Decreto 4/2014). Sin embargo, animales ibéricos puros y cruzados presentan diferencias importantes en el crecimiento muscular y adipogénesis desde estadios muy tempranos del desarrollo, por lo que en cerdos cruzados, se observa un aumento del rendimiento pero un descenso en la calidad de la carne respecto a cerdos Ibéricos puros (Ventanas et al., 2006). Recientemente, se ha realizado un estudio comparativo del transcriptoma de músculo *longissimus dorsi* de lechones Ibéricos puros e IB x DU al destete mediante la técnica de *microarrays* (Óvilo et al., 2014); los resultados muestran que diversos genes y rutas metabólicas involucradas en el desarrollo muscular y el metabolismo lipídico se encontraban diferencialmente expresados entre ambos grupos.

El objetivo del presente trabajo es profundizar en el estudio del transcriptoma muscular de cerdos Ibéricos puros e IB x DU mediante la tecnología de RNA-Seq. Esta técnica permite medir la expresión génica de manera más precisa y exhaustiva que los *microarrays* (Marioni et al., 2008) con el fin de identificar genes o rutas metabólicas que puedan estar implicados en las diferencias de calidad observadas entre ambos genotipos. El estudio del transcriptoma se realizó en músculo del jamón (*Biceps femoris*), por su relevancia desde el punto de vista productivo, y en animales al nacimiento donde los procesos de mio y adipogénesis son especialmente activos. Además se realizó una búsqueda de potenciales factores de transcripción reguladores para las diferencias de expresión observadas entre tipos genéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y toma de muestras: El estudio se realizó sobre un total de 19 machos recién nacidos, 9 Ibéricos (IB) puros y 10 Ibéricos cruzados al 50% con Duroc (CR). En ellos, se registró el peso y longitud de la canal y el peso del jamón y se obtuvieron muestras de músculo *Biceps femoris* para el análisis de contenido en grasa intramuscular (GIM) y ácidos grasos (AG) y para el estudio de expresión génica.

Estudio de expresión génica: Se extrajo ARN total con el sistema Ribopure (Ambion) de muestras de 12 animales (6 IB y 6 CR). Se generaron bibliotecas que fueron secuenciadas utilizando la plataforma HiSeq2000 (Illumina, Inc.) Se utilizó el software CLC Genomic workbench (Qiagen, Aarhus, Denmark) para llevar a cabo el control de calidad, ensamblaje con el genoma de referencia porcino (Sscrofa10.2), normalización en RPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas), según fue descrito por Mortazavi et al. (2008) y análisis estadístico para la identificación de genes diferencialmente expresados (DE). Sólo los genes con *fold-change* (FC) superior a 1,5, expresión superior a 0,5 RPKM en al menos uno de los dos grupos y $P < 0,01$ se consideraron DE.

Estudio de biología de sistemas: Se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO asociados a genes DE mediante la herramienta online de anotación funcional del Max Planck Institute y se utilizó el software Ingenuity Pathway (IPA, Qiagen, Silicon Valley, CA) para la identificación de rutas metabólicas, funciones enriquecidas, así como en la construcción de redes con los genes DE. Por último, con el fin de identificar genes reguladores que podrían estar influyendo en la expresión de los genes DE y, por lo tanto en el fenotipo, se llevaron a cabo dos aproximaciones. En primer lugar se utilizó el software IPA para detectar posibles reguladores expresados

en nuestros animales. Por otro lado, determinamos los factores de transcripción potencialmente implicados en las diferencias de expresión mediante el estudio de *regulatory impact factors* (RIF) siguiendo la metodología descrita por Reverter et al. (2010) a partir de genes expresados en nuestros animales y considerados factores de transcripción (FT) en la base de datos AnimalTFDB (www.bioguo.org/AnimalTFDB/).

Análisis composición de AG: La extracción se realizó mediante el procedimiento *one-step* descrito por Sukhija y Palmquist (1988) a partir de muestras liofilizadas y su posterior análisis en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP-6890 (Avondale, PA, USA). Se empleó un patrón interno (C15:0) para determinar la cantidad total de GIM. La influencia del tipo genético sobre la composición de AG se analizó mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tipo genético afectó a los caracteres fenotípicos estudiados en los animales sacrificados al nacimiento. Los cerdos IB mostraron un menor peso y longitud de la canal, así como menor peso del jamón ($P < 0,001$). Por el contrario, dichos animales tendieron a presentar mayor cantidad de GIM ($P = 0,0716$) y menor cantidad de AG saturados ($P = 0,0861$), en concordancia con los resultados observados previamente en animales adultos (Lopez-Bote, 1998)

El estudio funcional de genes DE identificados mediante secuenciación del ARNm permitió identificar los mecanismos genéticos involucrados en las diferencias fenotípicas. Un total de 150 genes se encontraron DE entre grupos; de ellos, 95 genes se encontraban sobreexpresados en IB, con FC entre 1.9 y 12, y 55 genes en CR, con FC entre 2 y 63.5. Se observó un enriquecimiento de términos GO estrechamente relacionados con el desarrollo del tejido muscular, como la adhesión celular y el desarrollo muscular, coincidiendo con los puntos críticos que se intentan mejorar con la incorporación de genética Duroc a los cerdos Ibéricos (Lopez-Bote, 1998). Además, los genes sobreexpresados en IB están positivamente relacionados con el metabolismo lipídico y la homeostasis energética y negativamente con el desarrollo de tejido muscular; todo ello es consistente con las diferencias fenotípicas antes mencionadas entre las dos razas.

En el estudio de rutas metabólicas, se observó que tanto genes sobreexpresados en IB como en CR intervienen en la ruta "*RXR/LXR activation pathway*", relacionada con la síntesis de colesterol y la lipogénesis. Por otro lado, se encontraron rutas que únicamente fueron asociadas a uno de los dos grupos; así, en el grupo de genes sobreexpresados en IB se identificaron rutas relacionadas con el balance energético ("*IGF-1 Signaling*", "*Fatty Acid α -oxidation*"), mientras que en CR, predominaron rutas relacionadas con el funcionamiento y estructura celular, muy importante en el caso de las células musculares, como "*nNOS Signaling in Skeletal Muscle Cells*" y "*Actin Cytoskeleton Signaling*". Esto sugiere una mayor eficiencia en el músculo del cerdo ibérico para la acumulación de reservas energéticas, probablemente relacionado con el denominado "fenotipo ahorrador" asociado a esta raza. Además, los genes sobreexpresados en cada grupo fueron utilizados para construir redes de genes conectados entre sí que se relacionaron con funciones metabólicas interesantes, como las ya mencionadas.

El software IPA detectó un total de 42 potenciales reguladores para las diferencias de expresión observadas. Por otro lado, mediante el estudio de RIFs, identificamos 48 FT, los cuales fueron analizados conjuntamente con los genes DE mediante el software IPA, observándose que estos FT intervienen de forma significativa en rutas metabólicas de interés (Tabla 1), entre ellas la de adipogénesis. Cuatro genes fueron identificados siguiendo ambas aproximaciones. Estos genes son *TP53*, *IRF1*, *EGR2* y *FOXO1*. Entre ellos, cabe destacar el gen *EGR2* ya que disminuye la diferenciación de adipocitos desde células madre mientras aumenta la diferenciación de células musculares lisas (Wang et al., 2013). *FOXO1* es un regulador muy interesante porque se le ha asociado con diversos procesos que podrían tener un efecto importante sobre las diferencias fenotípicas observadas entre las dos razas, como son el crecimiento y diferenciación de mioblastos (Hakuno et al., 2011) o la regulación de la expresión de genes adipogénicos, como *PPARG* (Gupta et al, 2009).

Los resultados de expresión génica obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto numerosos genes involucrados en rutas metabólicas e interconectados entre sí que son potentes candidatos a explicar las diferencias fenotípicas relacionadas con parámetros productivos de interés, como el crecimiento, el contenido en magro o la deposición grasa, encontradas entre los dos genotipos porcinos estudiados, Ibérico puro e Ibérico x Duroc. En especial, los genes *PVALB*, sobreexpresado en CR (24X) y relacionado con la distrofia muscular, *APOM* y *SLC2A4*, sobreexpresado en IB e involucrados en el control del metabolismo lipídico, así como los FT *EGR2* y *FOXO1* merecen una especial atención y un estudio en profundidad en este material genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gupta, D., et al. 2013. J. Biol. Chem. 288:25440-25449.
- Hakuno, F., et al. 2011. PloS one 6: e25655.
- Lopez-Bote, C.J. 2008. Meat Sci. 49: S17-S27.
- Marioni, J., et al. 2008. Genome Res. 18: 1509 - 1517.
- Mortazavi, A et al. 2008. Nat. methods 5: 621-628.
- Ovilo, C., et al. 2014. BMC Genomics 15:413.
- Reverter, A., et al. 2010. Bioinformatics 26: 896-904.
- Sukhija, P.S. & Palmquist, D.L. 1988. J. Agric. Food Chem. 36: 1202–1206.
- Ventanas S., et al. 2006. Meat Sci. 73:651-659.
- Wang, S. S., et al. 2013. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45: 1825-1832..

Agradecimientos: AGL2010-21991-C03-00, e I. Martín de la Torre.

Tabla 1. Rutas metabólicas observadas considerando los factores de transcripción y los genes diferencialmente expresados entre Ibéricos puros e Ibérico x Duroc.

Ruta metabólica	p-valor	Genes involucrados
Adipogenesis pathway	0,001	<i>SLC2A4,DLK1,ZNF423,SIN3A,EGR2,SAP30L,STAT5B TP53,FOXO1</i>
LXR/RXR Activation	0,021	<i>TF,CLU,CCL2,FDFT1,MSR1,APOM</i>
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	0,028	<i>FOS,IRF1,CLU,MAP3K8,APOM,ZNF668</i>
Atherosclerosis Signaling	0,056	<i>CLU,CCL2,MSR1,ALOX12B,APOM</i>
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	0,060	<i>MYH3,CCL19,CLDN7,CXCL13,CCL2,MYH10</i>
PI3K Signaling in B Lymphocytes	0,060	<i>FOS,PLCD1,NFATC1,FOXO3,ATF3</i>
IL-17A Signaling in Fibroblasts	0,060	<i>FOS,CCL2,IL17RC</i>
Glucocorticoid Receptor Signaling	0,061	<i>FOS,SMAD2,CCL2,SMARCA2,STAT5B,NFATC1,FOXO3</i>

MUSCLE TRANSCRIPTOME COMPARISON OF PURE AND DUROC-CROSSBREED IBERIAN PIGS AT BIRTH.

ABSTRACT: Phenotypic differences in productive traits and meat quality have been reported between pure and Duroc-crossbreed Iberian pigs. The muscle transcriptome (*Biceps femoris*) of nine purebred Iberian and ten Duroc x Iberian crossbred pigs slaughtered at birth was studied to better understand causal molecular mechanisms. Several differentially expressed genes were identified (i.e. *APOM* and *SLC2A4*) as well as pathways involved in lipid metabolism and muscular development, such as adipogenesis pathway. Also, important regulatory factors such as *EGR2* and *FOXO1* were differentially expressed between pure and Duroc-crossbreed pigs. These results contribute to the better understanding of mechanisms underlying productive and meat quality differences between purebred and crossbred Iberian pigs.

Keywords: Iberian pig, RNA-Seq, transcription factor, meat quality.