

EFFECTO DEL GENOTIPO Y EL PESO FETAL SOBRE EL TRANSCRIPTOMA MUSCULAR DEL CERDO IBÉRICO

García-Contreras¹, C., Vazquez-Gómez², M., Astiz¹, S., Rey², A., Benítez¹, R., Núñez¹, Y., Isabel², B., González-Bulnes¹, A y Óvilo¹, C.

¹INIA, Madrid, España. ²Facultad de veterinaria, UCM, Madrid, España
garcia.consolacion@inia.es

INTRODUCCIÓN

El cerdo Ibérico, en comparación con razas comerciales mejoradas, tiene una elevada tendencia a la acumulación de grasa subcutánea e intramuscular, mayores índices de desaturación de grasa, mayores niveles de circulación de leptina en sangre, así como un mayor consumo de alimento debido a su genotipo ahorrador y resistencia a leptina (Muñoz et al., 2009; Óvilo et al., 2005). El crecimiento pre y postnatal, así como los aspectos críticos de la calidad de la carne, como el contenido de grasa intramuscular (GIM) y la composición de ácidos grasos (AG) están fuertemente determinados por la raza y el genotipo, incluso en fases de desarrollo temprano (Ayuso et al., 2016). En un estudio previo de nuestro grupo se mostró que el contenido lipídico muscular (en concreto en el músculo *longissimus dorsi* o *L. dorsi*) está determinado por el genotipo en estadios fetales (Cogollos et al., 2016). Por otra parte, otros estudios previos han mostrado que la raza de cerdo Ibérico es altamente susceptible a cambios en la cantidad y composición de la dieta, especialmente durante el desarrollo prenatal donde las deficiencias nutricionales pueden inducir a la aparición del crecimiento intrauterino restringido (IUGR; Gonzalez-Bulnes et al., 2012). Por ello, puede considerarse que tanto el genotipo como otros factores individuales, como la nutrición materna durante periodos críticos del desarrollo fetal podrían afectar al crecimiento y metabolismo y regular la expresión de genes relacionados con el desarrollo y la acumulación de grasa, actuando sobre la homeostasis fetal y permitiendo la adaptación a condiciones adversas. El objetivo de este estudio fue evaluar los patrones de expresión del genoma en músculo *L. dorsi* en individuos de distinto tipo genético (Ibérico puro e Ibérico cruzado con Large White) y en individuos con fenotipos extremos de crecimiento fetal, con el fin de identificar los genes y vías moleculares implicados en las diferencias fenotípicas entre dichos grupos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluyó 7 cerdas múltiparas Ibéricas puras, inseminadas con semen heterospérmico (mezcla de semen de verraco Ibérico puro y Large White, 1:1) con el fin de obtener fetos cruzados Ibérico x Large White (IBxLW) y fetos Ibéricos puros (IBxIB). Las cerdas fueron alimentadas con una dieta estándar hasta el día 35 de gestación, momento en el cual la cantidad de alimento se redujo a un 50% de sus necesidades de mantenimiento para la gestación. Este tipo de dieta afecta al correcto desarrollo fetal e induce la aparición de IUGRs (Gonzalez-Bulnes et al., 2012). A día 77 de gestación, se sacrificaron los animales obteniéndose un total de 51 fetos (27 fetos IBxIB, 15 machos y 12 hembras; y 24 fetos IBxLW, 14 machos y 10 hembras). La identificación del genotipo fetal se realizó mediante el análisis de polimorfismos en los genes *LEPR*, *IGF2* y *MC1R*, útiles como marcadores raciales, utilizándose ADN obtenido de muestras de hígado de todos los animales. Se pesaron y midieron todos los fetos y se tomaron muestras de músculo *longissimus dorsi* para el estudio del transcriptoma fetal. Para el análisis del transcriptoma se seleccionaron un total de 32 fetos con pesos extremos, 16 IBxIB y 16 IBxLW. La extracción del ARN total se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit RiboPure (Ambion) y su calidad se evaluó mediante análisis en Agilent 2100 Bioanalyzer. La preparación de la librería se efectuó mediante el *mRNA-Seq sample preparation kit* (Illumina) y se realizó la evaluación de la calidad de las lecturas secuenciadas mediante FASQC. A continuación, se usó Trim Galore (v.0.4.1) para la eliminación de los adaptadores de secuenciación y las colas de Poly A y Poly T. Las lecturas se mapearon frente al genoma de referencia (Sscrofa10.2) usando TopHat v.2.0.12 con Bowtie2 (v.2.2.3). Los transcritos se ensamblaron y se cuantificaron en FPKM mediante Cufflinks v.2.2.1, seguido de Cuffmerge, que fusiona los transcritos ensamblados de todas las muestras con los transcritos de referencia. Se utilizó Cuffquant para calcular los niveles de expresión génica para cada

muestra. El paquete CummeRbund Bioconductor R se utilizó para analizar las salidas de Cuffdiff y determinar el agrupamiento de las muestras de acuerdo con los datos de expresión, con el fin de evaluar la consistencia de los grupos comparados. La interpretación biológica de los datos de expresión diferencial obtenidos se llevó a cabo utilizándose la herramienta DAVID. Se calculó un valor de P corregido por pruebas múltiples utilizando el algoritmo de Bonferroni y se consideraron significativos los términos GO con un valor de $q < 0,05$. Además, se utilizó el *software* Ingenuity Pathway Analysis (IPA) para identificar y caracterizar las funciones biológicas, las redes de genes y las rutas canónicas afectadas por los genes diferencialmente expresados (DE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media del peso fetal fue de 328.13 ± 72.32 g observándose un efecto del genotipo, siendo los fetos cruzados más pesados que los Ibéricos ($363,13 \pm 68,91$ g vs. $293,13 \pm 57,88$ g respectivamente; $P < 0,005$). Con respecto al análisis de la expresión génica se encontraron 368 genes DE en función del tipo genético ($q < 0,05$), de los cuales 303 estuvieron sobrepresados en fetos IBxIB (con un FC entre 2,9 y 835; $q < 0,05$) y 65 en LWxIB (rango de FC entre 2 y 857; $q < 0,05$). Se observaron genes candidato como *NR4A3*, *PFKFB3*, *PPARG1- α* , *APOD* o *CCL2* ($q < 0,005$) sobrepresados en fetos LWxIB. Los genes *PPARG1- α* , *PFKFB3* y *APOD* son genes que están relacionados con procesos metabólicos como el metabolismo de la fructosamina, la glicolisis, el metabolismo lipídico o con el desarrollo cerebral. En el caso de fetos IBxIB, se observó una activación de genes relevantes como *CEBPA*, *PPARG*, *MARCO*, *GATA1*, *APOA2* o *APOE*. Este último, *APOE*, está relacionado con procesos biológicos como respuesta al exceso de dieta, procesos catabólicos del colesterol, transporte lipídico o respuesta a estrés oxidativo. *PPARG* está considerado como uno de los principales reguladores de la adipogénesis; de hecho, mutaciones en dicho gen han sido relacionadas con la reducción del tejido adiposo y el contenido en grasa en ratones (Olswang et al., 2002). Las principales funciones biológicas alteradas que se observaron fueron el metabolismo lipídico ($P < 0,000001$; Figura 1) y la interacción señalización célula-célula ($P < 0,000001$). Asimismo, la interpretación funcional de los genes DE permitió identificar reguladores potencialmente involucrados en las diferencias de expresión, como *CEBPA*, *CEBPB*, *HNF1A* o *HNF4A*, todos ellos activados en el músculo de animales puros. Los resultados de expresión génica diferencial en genes relacionados con el metabolismo lipídico concuerdan con las diferencias significativas observadas entre fetos IBxIB y LWxIB en cuanto a los niveles de colesterol total en sangre ($54,28 \pm 2,11$ mg/dl vs. $44,77 \pm 2,75$ mg/dl respectivamente; $P < 0,01$) y en los niveles de LDL ($36,36 \pm 2,05$ mg/dl vs. $30,51 \pm 1,58$ mg/dl respectivamente; $P < 0,05$), con mayores niveles en fetos IBxIB. Además, en un trabajo anterior donde se analizó el efecto del genotipo fetal sobre la composición lipídica muscular (Cogollos et al., 2016), se observó que los fetos ibéricos presentaban mayor deposición de ácidos grasos polinsaturados (PUFA), concretamente, mayores niveles de omega-6. Estas características están relacionadas con un estado metabólico protector, pudiendo sugerir una mejor adaptación por parte de la raza Ibérica. El muestreo realizado también permitió analizar el efecto del peso fetal sobre la expresión génica, comparando dentro de cada genotipo los fetos con valores extremos de peso. En fetos IBxIB, se encontraron 26 genes DE en función del peso, estando 22 sobrepresados en individuos de peso alto (FC entre 1,7 y 34,1; $q < 0,05$), entre los que podemos destacar el gen *MMP9* relacionado con la unión de colágeno y fibronectina, esencial en el desarrollo muscular. Por otro lado, en los individuos de bajo peso, sólo encontramos 4 genes sobrepresados (FC entre 1,8 y 168,5; $q < 0,05$). Sin embargo, cuando se analizó el efecto peso en fetos cruzados, se observó un total de 78 genes DE, siendo en este caso sólo 5 los genes sobrepresados en individuos de alto peso (FC entre 3,1 y 65,4; $q < 0,05$) y 73 los activados en los pequeños (FC entre 1,8 y 1337; $q < 0,05$). Entre éstos últimos (en los de bajo peso, cruzados) se detectaron genes como *APOD* relacionado con procesos metabólicos lipídicos, transporte de lípidos, metabolismo de la glucosa o la angiogénesis; o *PTGS2*, relacionado con el metabolismo y la biosíntesis de ácidos grasos, lo que podría estar relacionado con la mayor acumulación de grasa y la tendencia a la obesidad de estos individuos en la vida adulta. En concordancia, las funciones y redes enriquecidas en individuos de bajo peso estuvieron relacionadas con enfermedades neurológicas, anomalías del desarrollo o desórdenes tisulares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Ayuso, M., Fernandez, A., Nunez, Y., Benitez, R., Isabel, B., Fernandez, A. I., Rey, A. I., Gonzalez-Bulnes, A., Medrano, J. F., Canovas, A., Lopez-Bote, C. J. & Ovilo, C. 2016. PLoS One. 11(12): e0167858. • Cogollos, L., Garcia-Contreras, C., Vazquez-Gomez, M., Astiz, S., Sanchez-Sanchez, R., Gomez-Fidalgo, E., Ovilo, C., Isabel, B. & Gonzalez-Bulnes, A. 2016. Reprod. Fertil. Dev. • Gonzalez-Bulnes, A., Ovilo, C., Lopez-Bote, C.J., Astiz, S., Ayuso, M., Perez-Solana, M. L., Sanchez-Sanchez, R. & Torres-Rovira, L. 2012. Reproduction. 144(2):269-278. • Muñoz, G., Ovilo, C., Silio, L., Tomas, A., Noguera, J. L., & Rodriguez, M. C. 2009. J Anim Sci. 87(2): 459-468. • Olswang, Y., Cohen, H., Papo, O., Cassuto, H., Croniger, C. M., Hakimi, P., Tilghman, S. M., Hanson, R. W. & Reshef, L. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99(2):625-630. • Óvilo, C., Fernández, A., Noguera, J. L., Barragán, C., Letón, R., Rodríguez, C., Mercadé, A., Alves, E., Folch, J. M., Varona, L. & Toro, M. 2005. Genet. Res. 85(1), 57–67.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto nacional AGL2013-48121-C3-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO). C. García-Contreras y M. Vázquez-Gómez disfrutaron de un contrato FPI del MINECO (BES-2014-070464) y un contrato FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU014/01285).

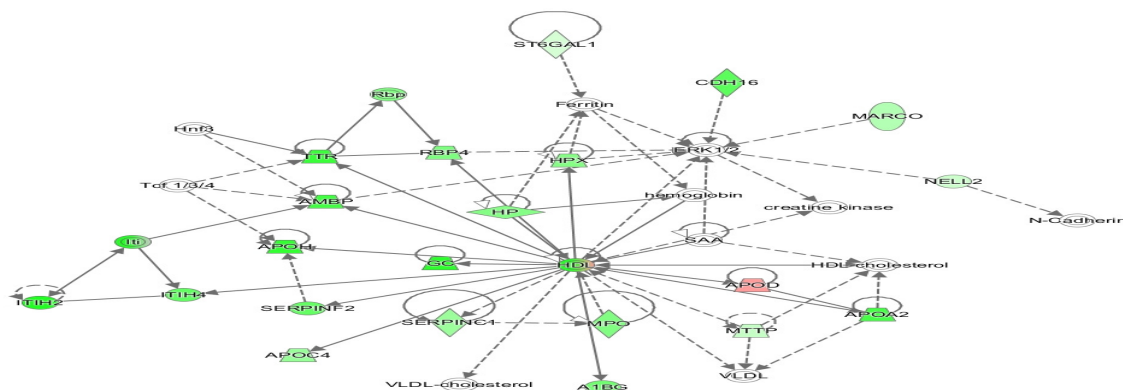


Figura 1. Red génica de genes DE relacionados con el metabolismo lipídico, el transporte molecular y la bioquímica de pequeñas moléculas.

EFFECT OF FETAL GENOTYPE AND WEIGHT ON MUSCLE TRANSCRIPTOME OF IBERIAN PIG

ABSTRACT: The Iberian pig breed is characterized by higher adipogenic potential and lower lean growth than commercial breeds. Also, Iberian pigs are highly susceptible to changes in maternal nutritional level and diet composition, with growth and tissue composition being highly dependent on genetic type and diet, even at early developmental stages. The aim of this study was to evaluate the expression profiles of the *longissimus dorsi* transcriptome of pure Iberian and Iberian x Large White crossbred fetuses, with extreme body weight values, in order to identify the genes and molecules involved in their phenotypic differences. We obtained a total of 51 purebred and crossbred fetuses at day 77 gestation. *L. dorsi* transcriptome was studied with RNAseq in 32 fetuses, 16 from each genotype, and selecting individuals with extreme body weight values in each genotype. The results showed that 368 genes were differentially expressed (DE) between genotypes and the enriched functions in Iberian fetuses were related to lipid metabolism and cell to cell signaling interaction. On the other hand, 26 genes were affected by weight in Iberian fetuses; while in crossbred animals 73 were DE conditional on weight. The identified genes indicate differential regulation of relevant functions and pathways mainly involved in lipid metabolism, muscle development and tissue disorders, which may explain the phenotypic differences among the compared groups.

Keywords: Iberian pig, prenatal development, genotype, transcriptome