

LA INGESTIÓN DE ALIMENTO AFECTA A LA EXPRESIÓN DE MÚLTIPLES FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO PORCINO

Cardoso T.F.¹, Quintanilla R², Tibau J.², Cánovas A.¹, González O², González-Prendes R.¹, Mármol E.¹ y Amills M.^{1*}

¹Departamento de Genética Animal, Centre de Recerca Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB), ²Programa de Genética y Mejora Animal, IRTA.

*marcel.amills@cragenomica.es

La grasa intramuscular (GIM) y su composición afectan de manera notable a la jugosidad, la terneza y, en definitiva, a la calidad y la aceptabilidad de la carne por parte del consumidor. Asimismo, es un parámetro fundamental en la elaboración de productos curados como por ejemplo el jamón. Desde un punto de vista genético, el depósito de GIM depende de un conjunto de genes que regulan la absorción, transporte, almacenamiento y catabolismo de nutrientes (especialmente lípidos y carbohidratos). La expresión de dichos genes está modulada, en buena medida, por la ingesta de alimento. Los análisis de asociación genómica (GWAS) de lípidos plasmáticos han revelado, principalmente en humano y en menor medida en porcino, la existencia de genes asociados a estos caracteres cuya relación con el metabolismo lipídico era, hasta la fecha, desconocida (Teslovich et al. 2010). De ello cabe inferir que la "fisiología genómica" de la absorción, transporte, almacenamiento y catabolismo de nutrientes (es decir, los genes que intervienen en dichos procesos y cómo interactúan entre sí) se conoce de manera bastante limitada en ambas especies. Dicha información biológica resulta fundamental para interpretar correctamente los datos generados a través de experimentos GWAS y de secuenciación del transcriptoma, así como para priorizar genes candidatos que puedan estar relacionados con la variación fenotípica observada (Lowe et al. 2016). El objetivo del presente trabajo consiste en identificar genes cuya expresión, en el músculo porcino, varía en respuesta a la ingesta de alimento.

En primer lugar, se midió las concentraciones de 4 metabolitos (glucosa, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres o NEFA) en 8 cerdos Duroc y en cuatro tiempos distintos (ayuno, y 2, 4 y 6 h post-ingesta). Se extrajo sangre mediante tubos Vacutainer y dichas muestras fueron remitidas al Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria de la UAB para su análisis. En la **Tabla 1** puede observarse que los picos máximos de glucosa y triglicéridos se producen a las 2 h y a las 4 h post-ingesta, respectivamente, y que a partir de entonces las concentraciones de ambos metabolitos tienden a disminuir.

Tabla 1. Concentraciones séricas post-prandiales de cuatro metabolitos en porcino

Tiempo	Colesterol (mg/dL)	Glucosa (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	NEFAs (mmol/L)
Ayuno	133,75	80,96	42,72	0,598
2 h post-ingesta	133,06	122,81	38,32	0,135
4 h post-ingesta	132,80	113,92	54,96	0,156
6 h post-ingesta	133,26	110,85	35,70	0,151

En consecuencia, en el experimento de análisis de la expresión génica se eligieron los siguientes puntos temporales a muestrear: T0 (ayuno), T1 (5 h post-ingesta) y T2 (7 h post-ingesta). Cada uno de estos puntos temporales estuvo representado por un total de 12 cerdas Duroc que entraron en la Granja Experimental de Porcino del IRTA (Monells) a

la edad de tres semanas, y fueron alimentadas con un pienso de transición durante 40 días. Durante la etapa de cebo, se les dispensó un pienso comercial hasta que alcanzaron un peso de 80 kg (aprox. edad de 120 días), momento en el que fueron sacrificadas en el matadero experimental de CAP-IRTA. De cada individuo, se obtuvo muestras del músculo *gluteus medius* que fueron almacenadas en RNAlater. El RNA total se extrajo con el kit RiboPure (Ambion, Austin, TX), se comprobó su calidad y cantidad, y fue secuenciado, mediante la aproximación RNA-seq, con un aparato HiSeq 2000 en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG). Las secuencias fueron mapeadas en el genoma porcino de referencia con el programa TopHat Alignment Tool version 2.0.9 y ensambladas con Cufflinks version 2.1.1 (Trapnell et al. 2012). Se utilizó Cuffmerge para realizar un ensamblado final y la expresión diferencial (ED) se analizó con el programa Cuffdiff (Trapnell et al. 2012). La significación de la ED se valoró con un estadístico t, y se corrigió para múltiples tests mediante una aproximación basada en el *false discovery rate*.

No se observó ED (T0 vs T1 o T0 vs T2) para muchos de los genes que tienen una función clave en el metabolismo de lípidos (lipogénesis: FASN, ACACA; β -oxidación de ácidos grasos; formación de triglicéridos: DGAT1; transporte de ácidos grasos: FABP3, FABP4) y carbohidratos (absorción: GLUT4; glicólisis, estimulación mediante insulina: IRS1, IRS2). Cabe la posibilidad de que la expresión de dichos genes varíe en algún punto temporal no contemplado en el presente trabajo. Las únicas excepciones a dicha observación fueron los genes LIPG, que codifica una lipasa endotelial, y SCD, implicado en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, que sí presentaron ED significativa tanto en T0 vs T1 como en T0 vs T2. Por otra parte, se observó ED significativa (T0/T1 y/o T0/T2) para genes que codifican factores de transcripción como HOXD1 (miogénesis), ARID5B (adipogénesis), KLF5 (β -oxidación de ácidos grasos), ESRRG (glicólisis y adipogénesis), FOXO1 (metabolismo de la glucosa y lipogénesis), CEBPD (lipogénesis), NR4A2 (β -oxidación de ácidos grasos), y PER1 (ritmo circadiano). También se observó la existencia de ED en genes relacionados con el estrés oxidativo, como p.e. THBS1, THBS2, TXNIP, ADAMTS1, ADAMTS4 y TBXAS1, así como en loci que participan en el proceso de la contracción muscular (ACTC1, TNNT2, MYH10).

Se llevó a cabo un segundo análisis (*Gene Ontology enrichment analysis*), basado en la aplicación *ReactomeFIViz* de *Cytoscape* (Wu et al., 2014), mediante el cual se determinó la existencia de rutas bioquímicas diferencialmente representadas en el conjunto de genes sometidos a ED (Tabla 2). De este modo, se observó que diversos genes que regulan los ritmos circadianos están infra- (PER1, BHLHE40, CRY2) y sobre-expresados (ARNTL, NPAS2) en el músculo *gluteus medius* como consecuencia de la ingestión de alimento. La periodicidad de los relojes moleculares circadianos central (núcleo supraquiasmático) y periféricos está influida no sólo por los niveles de luz, sino también por el estado energético corporal y la ingesta de nutrientes (Ribas-Latre & Eckel-Mahan 2016). A su vez, las oscilaciones en la expresión de los genes que constituyen dichos relojes tienen un efecto amplio y profundo sobre el metabolismo. En ratón, la pérdida de función del gen ARNTL implica un fenotipo de hiperfagia, hiperlipidemia, obesidad e incremento de la GIM, mientras que la inactivación de PER y CRY está asociada a intolerancia a la glucosa (Gooley et al. 2014). Asimismo, en el músculo la mayor parte de genes sometidos a regulación circadiana están relacionados con la homeostasis lipídica (Gnocchi et al. 2015). Es posible que la activación de múltiples factores de transcripción como resultado de la ingesta de alimento esté regulada por los genes que integran el reloj circadiano y que, a su vez, la variación genética de los mismos pueda tener efectos importantes sobre el depósito y la composición de la GIM.

Tabla 2. Rutas metabólicas que contienen genes diferencialmente expresados en el músculo esquelético porcino antes y después de la ingesta de alimento

Ruta metabólica	<i>p</i> -value	<i>q</i> -value	Genes implicados
T0 vs T1			
Calcineurin-regulated NFAT-dependent transcription in lymphocytes	1.51E-06	2.43E-04	<i>EGR1, EGR2, FOS, GATA3</i>
AP-1 transcription factor network	7.88E-06	6.30E-04	<i>EGR1, FOSL2, FOS, ATF3</i>
Circadian clock system	1.04E-04	5.51E-03	<i>ARNTL, PER1</i>
ATF-2 transcription factor network	1.66E-04	6.63E-03	<i>ACHE, FOS, ATF3</i>
Oxidative stress induced gene expression via NRF2	3.16E-04	8.25E-03	<i>MAFF, FOS</i>
Glucocorticoid receptor regulatory network	3.94E-04	8.25E-03	<i>EGR1, FOS, GATA3</i>
Bone remodeling	4.12E-04	8.25E-03	<i>FOSL2, FOS</i>
Circadian rhythm pathway	4.12E-04	8.25E-03	<i>ARNTL, PER1</i>
ECM-receptor interaction	5.41E-04	9.19E-03	<i>SDC4, THBS1, THBS2</i>
Trk receptor signaling mediated by MAPK	1.72E-03	1.89E-02	<i>EGR1, FOS</i>
T0 vs T2			
Circadian rhythm pathway	2.16E-09	3.89E-07	<i>NPAS2, CRY2, PER1, BHLHE40, ARNTL</i>
Circadian Clock	4.38E-08	3.42E-06	<i>NR3C1, NPAS2, CRY2, PER1, BHLHE40, ARNTL</i>
Circadian rhythm	5.70E-08	3.42E-06	<i>NPAS2, CRY2, PER1, BHLHE40, ARNTL</i>
Circadian clock system	2.58E-06	1.16E-04	<i>CRY2, PER1, ARNTL</i>
Regulation of nuclear SMAD2/3 signaling	4.85E-06	1.75E-04	<i>MYOD1, FOXO1, NR3C1, RUNX1, MYC</i>
FOXA2 and FOXA3 transcription factor networks	1.06E-05	3.19E-04	<i>NR3C1, CEBPA, CEBPD, PCK1</i>
Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation	1.22E-04	2.16E-03	<i>KLF5, CEBPA, CEBPD, PCK1</i>
C-MYB transcription factor network	1.35E-04	2.16E-03	<i>MYOD1, MYC, CEBPA, CEBPD</i>
ECM-receptor interaction	1.77E-04	2.65E-03	<i>SDC4, THBS1, THBS2, COL11A1</i>

Agradecimientos: Este estudio se ha financiado con los proyectos de investigación AGL2013-48742-C2-1-R y AGL2013-48742-C2-2-R, concedidos por el MINECO.

Referencias: Gnocchi et al. 2015. *Biology* 4: 104-132 • Gooley et al. 2014. *J. Genet. Genomics* 41: 231-250 • Lowe et al. 2016. *Genome Res.* 25: 1432-1441 • Ribas-Latre & Eckel-Mahan. 2016. *Mol. Met.* 5: 133-52. • Teslovich et al. 2010. *Nature* 466:707–713 • Trapnell et al. 2012. *Nat. Protoc.* 7: 562–578 • Wu et al. 2014. *F1000Res.* 3: 146.