

EFFECTO DEL GENOTIPO SOBRE EL TRANSCRIPTOMA HIPOTALÁMICO Y SU POSIBLE RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO Y LA VIABILIDAD EN LECHONES

Heras-Molina¹, A., García-Contreras¹, C., Vázquez-Gómez², M., Benítez¹, R., Núñez¹, Y., Ballesteros¹, J., Pesántez-Pacheco^{1,3}, J.L., Sanz-Fernández¹, V., Astiz¹, S., Isabel², B., González-Bulnes¹, A. y Óvilo¹, C.

¹SGIT-INIA.Madrid. ² UCM. Madrid. ³Universidad de Cuenca.
delasheras.ana@inia.es

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción porcina está basada en razas muy seleccionadas para la optimización de la productividad y la eficiencia reproductiva (Chang et al., 2003), así como en otras razas rústicas como el cerdo ibérico (Gonzalez-Añoover et al., 2010). Esta raza se caracteriza por un crecimiento más lento, una elevada tendencia al engrasamiento y una menor eficiencia productiva que las razas magras (Barea et al., 2007). En estudios recientes (Ayuso et al., 2016; Benítez et al., 2017), se han visto diferencias marcadas en los patrones de crecimiento entre estos genotipos, con un elevado potencial de crecimiento temprano de los individuos ibéricos puros, así como diferencias en el transcriptoma muscular durante estas etapas de desarrollo. El correcto crecimiento de los animales resulta fundamental para el mantenimiento de los niveles productivos y evitar posibles pérdidas económicas (Houška et al., 2010). Asimismo, se ha comprobado que el ambiente materno tiene una importancia fundamental en el desarrollo posterior de las crías (Óvilo et al., 2014). Por ello, es importante que, a la hora de estudiar la causa genética de las diferencias en el crecimiento de razas tan distintas como son las comerciales y las rústicas, se minimicen posibles efectos ambientales que actúan durante el desarrollo prenatal; lo que puede conseguirse eliminando los efectos maternos, utilizando para ello las mismas madres. El objetivo de este trabajo fue el estudio de los patrones de crecimiento y de expresión del transcriptoma a nivel hipotalámico en lechones ibéricos puros (IBxIB) y cruzados con Large White (IBxLW) para comprender los mecanismos moleculares responsables de sus diferencias fenotípicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 16 cerdas multíparas ibéricas puras fueron inseminadas con semen heterospérmico (mezcla de semen de verraco ibérico y Large White 1:1) en la granja Ibéricos de Arauzo S.L. (Zorita de la Frontera, Salamanca), seleccionándose 72 lechones (44 ibéricos y 28 cruzados, la mitad hembras y la mitad machos). Los lechones fueron pesados al nacimiento, destete y mensualmente hasta los 7 meses, y se midieron al nacimiento, destete y a los 2 y 7 meses. A los 2 meses se sacrificaron y se obtuvieron los hipotálamos de 20 individuos (5 hembras y 5 machos de cada genotipo), representativos de los grupos originales, para los análisis del transcriptoma. La extracción del ARN total se llevó a cabo mediante el kit Ribopure (Ambion). Se generaron librerías que fueron secuenciadas utilizando la plataforma HiSeq2000 (Illumina, Inc.). La calidad de las secuencias generadas fue analizada por la herramienta FastQC. A continuación, se usó la herramienta Trim Galore (v.0.4.1) para la eliminación de los adaptadores y las colas Poly A y Poly T. Posteriormente, estas lecturas se mapearon frente al genoma de referencia (Scrofa11.1) usando TopHat v.2.1.0 (Trapnell et al., 2009). Para el ensamblado, se usó la herramienta Cufflinks v.2.0.2, seguido de Cuffmerge, para unir los transcritos ensamblados de todas las muestras en un único archivo. Finalmente, se utilizó Cuffdiff para el análisis de las diferencias de expresión. El filtrado de los genes diferencialmente expresados (DE) se llevó a cabo teniendo en cuenta tres factores: una expresión media mayor de 0,5 FPKM en al menos uno de los grupos, un valor de Fold Change (FC) $\geq 1,25$ y un FDR $< 0,10$. La interpretación funcional de los datos obtenidos se realizó mediante el software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®), la cual permite detectar la

activación o inhibición de funciones biológicas, rutas metabólicas y potenciales reguladores en cada grupo experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso al nacimiento y a los dos meses fue mayor en los lechones IBxLW que en los IBxIB ($1,37 \pm 0,41$ kg vs. $1,24 \pm 0,31$ kg, $P < 0,05$ y $21,1 \pm 4,7$ kg vs $16,7 \pm 3,8$ kg, $P < 0,0001$). Sin embargo, a destete (24 días) estas diferencias no fueron significativas. Entre los 2 y 7 meses, las diferencias se mantuvieron constantes con una magnitud de una desviación típica sobre la media global. En el análisis del transcriptoma hipotalámico a dos meses de edad, se encontraron 313 transcritos diferencialmente expresados de los cuales 192 estuvieron sobre expresados (SE) en los animales IBxIB y 121 en los IBxLW, correspondiendo a 204 genes anotados. El rango de FC en los genes SE en los individuos ibéricos puros osciló entre 1,25x y 414,06x, mientras que en los genes SE en los cruzados este rango fue de 1,23x a 105,20x. Los genes con mayores niveles de FC fueron *PRL*, *FSHB*, *GH1* y *TSH*, todos ellos sobre expresados en IBxIB y relacionados con el sistema endocrino. En el caso de los animales cruzados, los genes más SE fueron *ZNF394*, *TNNT1* y *S100A4*. La interpretación funcional mostro diferentes funciones fisiológicas enriquecidas en el conjunto de genes DE, entre las que cabe destacar el desarrollo del organismo, la morfología tisular, la supervivencia del organismo y el desarrollo y funcionamiento del sistema endocrino. A nivel molecular y celular, destacan la afectación de la morfología y movimiento celular, la síntesis proteica, el transporte molecular y la bioquímica de pequeñas moléculas. En cuanto a las funciones relacionadas con el desarrollo corporal, se detectó un enriquecimiento en los individuos ibéricos puros en las referidas al desarrollo de la cabeza, del eje corporal, del tronco, del sistema reproductor, del aparato genital y gonadogénesis ($P < 0,0001$). Con relación a la morfología tisular, cabe destacar que la cantidad de monocitos ($P < 0,0001$), así como el desarrollo del sistema endocrino y la concentración hormonal ($P < 0,0001$), estaban aumentados en ibérico. Las funciones relacionadas con morbilidad y mortalidad estaban disminuidas en los animales ibéricos puros ($P < 0,0001$). Se realizó la predicción de potenciales reguladores para las diferencias de expresión detectadas, observándose algunas moléculas relevantes potencialmente activadas en el grupo ibérico como *RETNLB* ($P < 0,001$), *Jnk* ($P < 0,001$) y *PRL* ($P < 0,0001$). *RETNLB* lleva a cabo un papel regulador de la inmunidad innata del individuo (Propheter et al., 2017). Las *Jnks* se encargan de la respuesta a una gran cantidad de factores estresantes y de la regulación de funciones neuronales, inmunológicas y de desarrollo embrionario (Zeke et al., 2016). La *PRL* tiene una gran relevancia en la regulación de procesos a nivel celular (proliferación, diferenciación, supervivencia...), y en varios tejidos (reproductor, nervioso o conectivo) (Sackmann-Sala et al., 2015). La construcción de una red de regulación de las diferencias de expresión relacionadas con las funciones más importantes detectadas, permitió comprobar el papel de *RETNLB* y *Jnk* en las moléculas implicadas, tanto en la muerte/supervivencia del organismo como en el desarrollo de la cabeza (Figura 1). Todos estos datos indican una activación de rutas relacionadas con la viabilidad y crecimiento en los individuos ibéricos puros, aunque, a diferencia de resultados previos obtenidos en contrastes de genotipos Ibérico y Duroc (Ayuso et al., 2016; Benítez et al., 2017), los datos fenotípicos muestran un mayor tamaño de los cruzados durante todo el crecimiento, posiblemente debido a la mayor capacidad de desarrollo y potencial de crecimiento de la genética Large-White.

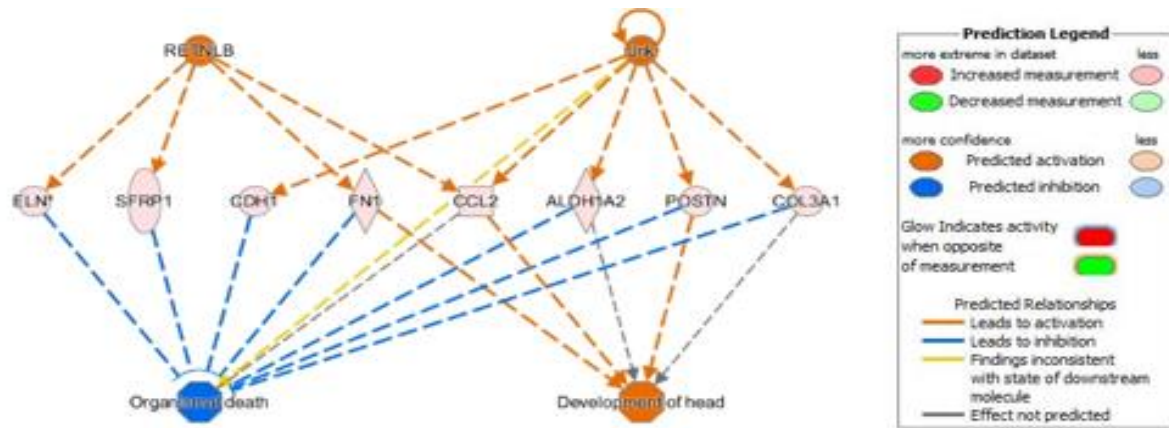


Figura 1. Red de regulación de la muerte del organismo y del desarrollo de la cabeza por RETNLB y Jnk, obtenida con el software IPA® a partir de los genes DE entre genotipos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayuso, M. et al. 2016. Plos One. 11
- Barea, R. et al. 2007. Animal. 1: 357-65.
- Benítez, R. et al. 2017. Int. J. Mol. Sci. 19:22
- Chang, K.C. et al. 2003. Meat Sci. 64: 93-103.
- Gonzalez-Añover, P. et al. 2010. Reprod. Domest. Anim. 45: 1003-7.
- Hennighausen, L. et al. 2005. Nat. Rev. Mol. Cell. Bio. 6: 715.
- Houška, L. et al. 2010. Czech. J. Anim. Sci. 55:139-48.
- Óvilo, C. et al. 2014. Brit. J. Nutr. 111: 735-46
- Propheter, D.C. et al. 2017. Proc. Natl. Acad. Sci. 114: 11027-33.
- Sackmann-Sala, L. et al. Mol. Endocrinol. 29: 667-81.
- Trapnell, C. et al. 2012. Nat. Protoc. 7: 562-78.
- Zeke, A. et al. 2016. Microbiol. Mol. Biol. R. 2016. 80:793-835.

Agradecimientos: Trabajo financiado con el proyecto AGL2016-79321-C2-1-R. A. de las Heras Molina y C. García Contreras disfrutaron de un contrato FPI del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (BES-2017-080541 y BES-2014-0700464, respectivamente).

EFFECT OF PIGLET GENOTYPE ON HYPOTHALAMIC TRANSCRIPTOME AND ITS RELATIONSHIP WITH GROWTH AND VIABILITY TRAITS

ABSTRACT: In swine production, both commercial and traditional breeds (such as Iberian pig), are used, with commercial pigs being more efficient in reproductive and productive traits. For understanding the molecular events behind early growth, the hypothalamic transcriptomes of 10 IBxIB and 10 IBxLW animals at 2 months of age were studied, with 313 DE transcripts being detected. Some relevant genes involved in endocrine system regulation showed large FC values, being upregulated in Iberian animals, such as *PRL*, *FSHB*, *GH1* and *TSH*. The functional analysis, showed differences in the activation of some metabolic routes and regulators (Jnk, RETLB, PRL). Results indicated that genes, biological functions and upstream regulators related to viability, growth and endocrine system development were enriched in IBxIB animals, although the IBxLW individuals were heavier, possibly due to a major growth potential from Large White genetics.

Keywords: transcriptome, viability, early growth, hypothalamus.