TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL ENTRE MACHOS Y HEMBRAS DE GENES PORCINOS RELACIONADOS CON LA ELIMINACIÓN DE ESCATOL Y ANDROSTENONA EN HÍGADO

Fernández, A.I., Fernández, A., Pérez-Montarelo D., Fernández-Rodríguez A., Barragán C., Nieto M., Rodríguez M.C., Toro M.A., Silió L. y Óvilo C.
Dpto. Mejora Genética Animal. INIA. Ctra. Coruña Km7.5. 28040 Madrid. avila@inia.es

INTRODUCCIÓN

La producción y comercialización de cerdos enteros en los países de la UE está afectada por el riesgo de incidencia en las canales del denominado olor a verraco que origina el rechazo por los consumidores de carne y productos derivados. La principal causa de este desagradable olor a orina es la deposición en tejido adiposo de androstenona y escatol, además de otros compuestos. La castración es una práctica habitual en algunos países, que no solo reduce el riesgo del olor sexual, sino que además reduce el comportamiento agresivo y facilita el manejo de los animales. Sin embargo, la castración afecta el bienestar animal y elimina la fuente natural de andrógenos que estimulan el crecimiento magro y reducen los costes de producción y la contaminación ambiental (Bonneau et al., 2000). La búsqueda de un sistema alternativo que haga posible la producción basada en machos enteros sin riesgo de olor a verraco se está investigando con diversas aproximaciones (Rius, 1999). La androstenona es una hormona esteroide cuya síntesis se produce en las gónadas, principalmente en testículos, y en glándulas suprarrenales. Posteriormente, es trasportada vía sangre a las glándulas salivares donde juega su función como feromona y finalmente es metabolizada en el hígado. Por otro lado, el escatol es un indol producto del metabolismo bacteriano del triptófano que se genera en el colon y cuya degradación también se produce en el hígado. Una eliminación deficiente de estos compuestos lleva a su acumulación en tejido adiposo, que a altos niveles genera el "olor a verraco". La razón por la que se registran altos niveles de estos compuestos en algunos machos enteros y no en otros, ni se observen en machos castrados ni en hembras no está bien establecida. Desde una perspectiva genética, se han llevado a cabo varios estudios de detección de QTL demostrando la naturaleza multifactorial de este carácter (Robic et al., 2007). A pesar de que la base bioquímica de síntesis y degradación de androstenona y escatol es ampliamente conocida, la búsqueda de mutaciones causales en genes que codifican para las enzimas implicadas en estos procesos no ha sido satisfactoria (Robic et al., 2007). Con la aplicación de la tecnología de los microarrays de expresión se pretende potenciar la identificación de genes asociados con la síntesis y/o acumulación de la androstenona y escatol, aunque hasta la fecha muy pocos estudios han llevado a cabo esta aproximación (Moe et al., 2007, 2008).
El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de los patrones de expresión de genes relacionados con la eliminación de la androstenona y escatol en cerdo, a través de la comparación de muestras de tejido hepático de machos enteros y hembras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de hígado analizadas en este trabajo corresponden a cerdos Ibéricos sacrificados con 7 meses de edad y 57 kg de peso medio, y pertenecientes a cinco familias de cuatro hermanos completos de la misma camada. Cada una de las familias estaba compuesta por dos individuos de cada sexo. Las muestras de ARN de hígado fueron extraídas con el kit RiboPure que proporciona una cantidad (NanoDrop) y calidad óptimas (Agilent 2100).
Microarrays: Muestras de ARN de hígado de ocho individuos, dos familias, fueron hibridadas con el chip porcino de Affymetrix (Affymetrix Porcine Genechip TM). La síntesis de ADN copia, marcajes, hibridaciones y escaneado se realizó en el hospital Vall d`Hebrón (Barcelona). La verificación de la calidad de las hibridaciones y la normalización de los datos se llevaron a cabo utilizando el paquete affyPLM y la función RMA de Bioconductor. El análisis estadístico de los datos normalizados se realizó utilizando el software Bioconductor, siguiendo el modelo: y= media + gen+ sexo + error, estableciendo un umbral de falso descubrimiento de 0.05. La anotación de las sondas y su interpretación biológica se realizó

utilizando diversos recursos públicos (Affymetrix, NetAffy, EasyGo y David database) y el software Ingenuity Pathway Analysis.
Validación de resultados: La validación de resultados se realizó para genes relevantes en este proceso y que presentaron unas diferencias de expresión no concluyentes o no aparecieron representados en el array de expresión (*3β-HSD, SULT1A1, TCF1, TCF2 y CYB5)*. La RT-PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo en todas las muestras disponibles utilizando el Sybr Green en un equipo MX3000 Stratagene y utilizando *GADPH* y *BM2* como controles endógenos. Los cálculos de la cantidades relativas de expresión se efectuaron utilizando el programa geNorm (http://medgen.ugent.be/genorm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis comparativo de la expresión utilizando microarrays entre machos enteros frente a hembras mostraron 391 sondas diferencialmente expresadas. Once de estas sondas corresponden a diez genes relacionados con el metabolismo del la androstenona y el escatol.
La acumulación de androstenona en grasa puede ocurrir por dos vías no independientes: una elevada tasa de síntesis del esteroide en los testículos o una reducida eficiencia en su eliminación en el hígado. La base bioquímica de la eliminación de androstenona ha sido bien estudiada. Se conoce que para que el organismo elimine este esteroide se requiere de una fase de reducción por el enzima deshidrogenasa 3β-HSD, seguida de una sulfoconjugación donde participan los enzimas SULT2A1 y SULT2B1. De éstos, sólo el gen que codifica para 3β-HSD fue detectado como diferencialmente expresado utilizando microarrays en nuestro ensayo (Tabla 1). Este resultado fue confirmado en un mayor número de muestras por qPCR, mostrando que los machos presentan una reducción de la expresión del gen *3β-HSD* de 0.17X, respecto a su expresión en hembras (Tabla 1). El gen *SULT1A1* no mostró diferencias de expresión significativas mediante la tecnología de microarrays de expresión. Sin embargo la validación de este resultado por qPCR en un mayor número de muestras nos permitió detectar que los machos, al igual que ocurría con el gen *3β-HSD,* presentan una reducción en el nivel de expresión de 0.53X respecto a las hembras (Tabla 1). El gen que codifica para SULT2B1, no apareció representado en el microarray de expresión y no pudo ser validado por qPCR ya que no existe secuencia porcina disponible.
La base bioquímica de la eliminación por parte del organismo del escatol también es conocida. Existen una primera fase de oxigenación donde participan los enzimas CYP2E1 y CYP2A6, y una segunda fase de sulfoconjugación por parte de SULT1A1. En nuestro ensayo, los genes que codifican para estas tres enzimas fueron identificadas como diferencialmente expresados en los arrays en un mismo sentido: los machos presentaron niveles de expresión menores que las hembras (Tabla 1). Además de estos, los factores de transcripción que regulan la expresión del gen *CYP2E1* también son conocidos (*TCF1 y TCF2)* y aunque no aparecían representados en el microarray, fueron analizados por qPCR (Tabla 1). Sin embargo no detectamos diferencias de expresión, por lo que esa menor expresión de *CYP2E1* en tejido hepático de machos no parece deberse a diferencias de expresión en estos factores de transcripción.
El producto del gen *CYB5* es indispensable en el proceso de síntesis de la androstenona a partir de pregnenolona en los testículos, sin embargo, se ha sugerido que este enzima también participa en el proceso de eliminación del esteroide en el hígado, además parece ser el enzima conector entre el metabolismo de androstenona y el del escatol (Moe et al., 2008). En nuestro estudio, no detectamos diferencias de expresión hepática con los datos obtenidos del análisis con microarrays, sin embargo, al validar por qPCR y aumentar el número de muestras, detectamos, al igual que en los casos anteriores, una reducción en la expresión del gen *CYB5* de 0.53X en machos (Tabla 1).
Independientemente de las posibles diferencias en la síntesis de androstenona y escatol, los resultados de expresión obtenidos en el presente trabajo, parecen indicar que en machos existe una regulación negativa de la expresión hepática de genes que codifican para los enzimas responsables de la eliminación de los principales compuestos desencadenantes del "olor a verraco". Además de estos, en este ensayo han sido identificados como diferencialmente expresados en ambos sentidos otros seis transcritos potencialmente relacionados con este proceso (Moe et al., 2008): *IGF1, CYP2C18, RORA, AKR1C1, FMO5 y HSD17B2* (Tabla 1).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bonneau, M., Carrié-Lemoine, J. & Mesure-Morat, M. 2000. Anim. Reprod. Sci. 15:259-263. • Moe, M., Meuwissen, T., Lien, S., Bendixen, C. Wang, X., Conley, L. N., Berget, I., Tajet, H. & Grindflek, E. 2007. BMC Genomics. 8:405. • Moe, M., Lien, S., Bendixen, C., Hedegaard, J., Hornshoj, H., Meuwissen, T. & Grindflek, E. 2008. BMC Vet. Res. 4:29. . • Rius M.A. 1999. Tesis Doctoral, Univ. De Girona. • Robic, A., Ñarzul, C. & Bonneau, M. 2007. Genet. Sel. Evol. 40:129-143.

Tabla 1. *Resultados del análisis de expresión de genes relacionados con la deposición de androstenona y escatol en tejido hepático porcino. M = machos y H = hembras.*

GEN	MICROARRAY (FDR<0.05)	Ratio M / H	qPCR (*P*<0.05)	Ratio M / H
	Relacionados con la degradación de androstenona en hígado			
3β-HSD	M < H	0.56 X	M < H	0.17 X
SULT1A1	M < H	NS	M < H	0.53 X
SULT2A1	No presente	--	No validado	--
	Relacionados con la degradación de escatol en hígado			
CYP2A6	M < H	0.06 X	No validado	--
CYP2E1	M < H	0.24 X	No validado	--
SULT1A1	M < H	0.13 X	No validado	--
TCF1	No presente	--	M = H	--
TCF2	No presente	--	M = H	--
	Potencialmente relacionados con la deposición de androstenona y escatol			
CYB5	M < H	NS	M < H	0.53 X
IGF1	M > F	1.96 X	No validado	--
CYP2C18	M > F	27.8 X	No validado	--
RORA	M > F	1.7 X	No validado	--
AKR1C1	M < F	0.42 X	No validado	--
FMO5	M < F	0.14 X	No validado	--
HSD17B2	M < H	0.1- 0.03 X	No validado	--

Agradecimientos: Este trabajo ha sido llevado a cabo en el marco del proyecto GEN03-20658-C05 04. Agradecemos la amable colaboración recibida de COPESE SL.

DIFFERENTIAL TRANSCRIPTION BETWEN MALES AND FEMALES OF PORCINE GENES RELATED WITH ANDROSTENONE AND SKATOLE REMOVAL IN LIVER

ABSTRACT: Boar taint is the unpleasant odour and flavour to urine-like of the cooked pig meat that is primarily caused by androstenone and skatole deposition in adipose tissue. Although the biochemical processes are well known, their genetic bases are still not clear. We have carried out a differential gene expression analysis between uncastrated pigs of both sexes using Affymetrix microarray and quantitative RT-PCR in order to investigate the expression pattern of genes related with androstenone and skatole removal in hepatic tissue. In total we have found 391 differentially expressed probes between both sexes, 11 related with androstenone and skatole metabolism, four encoding the main androstenone and skatole degradation enzymes. Androstenone degradation is performed in liver by three main enzymes, 3β-HSD, SULT2A1 and SULT2B1. In our study we have found a lower expression level of *3β-HSD* (0.17X) and *SULT2A1* (0.53X) genes in males than in females. In the same way, genes codifying enzymes that participate in the skatole degradation appeared downregulated in males (0.24X for *CYP2E1*, 0.06X for *CYP2A6* and 0.13X for*SULT1A1*). Moreover, in previous studies it has been suggested that CYB5 enzyme participates in the androstenone synthesis in testicles but it could also participate in steroid removal in liver and it has been proposed as the enzyme connecting androstenone and skatole metabolisms. In the present study we have also found a lower expression level of *CYB5* (0.53X) in males that in females. These results may indicate that males have a negative regulation of the expression levels of genes related with the degradation of the main causal components of the boar taint.

Keywords: *boar taint, androstenone, skatole, gene expression*