PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADOS A PH MUSCULAR 24H POST-MORTEM EN PORCINO

Pena[1,2], R.N., Ibáñez[1], N., Fernández[3], A.I., Folch[4,5], J.M., Casellas[1], J. y Noguera[1], J.L.

[1]IRTA, Genètica i Millora Animal, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida; [2]Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida; [3]Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Crta. Coruña km 7.5, 28040 Madrid; [4]Centre de Recerca en Agrigenòmica (Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus UAB, 08193 Bellaterra; [5]Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. romi.pena@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El músculo de los animales sufre después del sacrificio una serie de cambios bioquímicos que confieren a la carne sus propiedades de color, sabor, aroma y jugosidad. Estos cambios se conocen globalmente como maduración de la carne. Tras el sacrificio se incrementa progresivamente la cantidad de ácido láctico muscular al consumir las propias reservas de glucógeno, lo que provoca un descenso progresivo del pH muscular. El valor óptimo de pH 24 horas post-mortem (pH-24) para la correcta maduración de la carne se encuentra alrededor de 5,5. Valores superiores o inferiores se asocian a alteraciones en las propiedades organolépticas de la misma. El pH-24 depende de factores ambientales como el estrés del animal pero tiene también una fuerte componente genética. Se conocen algunos genes mayores con efectos importantes sobre estos parámetros (p.ej.: *RYR1*, la mutación del cual provoca el síndrome del estrés porcino). Sin embargo, tenemos un gran desconocimiento sobre las redes de interacción génica que intervienen en la caída del pH-24 muscular. Este trabajo tiene como objetivo dar un primer paso hacia este conocimiento a partir perfiles de transcriptómicos de músculo porcino *longissimus thoracis* (*Lt*).

.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y datos fenotípicos: En este estudio se utilizaron 110 animales procedentes de un retrocruce experimental (RC2) Ibérico (25%) x Landrace (75%) mantenidos en condiciones estándar de manejo y alimentación y sacrificados a una edad media de 179.9 ± 2.6 días. Teniendo en cuenta la gran influencia de la gestión ante-mortem en la calidad de la carne se observaron estrictamente las pautas de manejo durante el viaje y espera en el matadero. El pH-24 fue medido directamente en el músculo *Lt* refrigerado a 4ºC. En el matadero se tomaron muestras del músculo *Lt* que fueron congeladas en nitrógeno líquido y se guardaron a -80ºC hasta su análisis.

Aislamiento de ARN e hibridación en *microarrays*: Se aisló ARN total del músculo *Lt* utilizando el kit RiboPure (*Ambion*). Tras un análisis de calidad del mismo, el ARN total de 108 muestras de *Lt* se hibridó individualmente en GeneChip Porcine Genome *microarrays* (*Affymetrix*) siguiendo los protocolos desarrollados por esta casa comercial.

Análisis entre el pH-24 y los datos de expresión génica: Tras un análisis de calidad aplicando los paquetes de AFFY y SIMPLEAFFY del Bioconductor (Gentleman et al., 2004), los datos de 103 *microarrays* fueron normalizados con el algoritmo gcRMA y un total de 5.637 sondas fueron escogidas para los análisis estadísticos. El modelo utilizado para identificar genes con patrones de expresión relacionada con el pH-24 fue un modelo mixto con covariable continua. Se asumió una varianza del error homogénea y se consideraron los factores: media de cada sonda (103 individuos), lote de sacrificio (3 niveles) y sexo (2 niveles). El modelo fue resuelto mediante el programa GEAMM v4 (Casellas et al., 2008). Como criterio para seleccionar los genes que muestran cambios en su patrón de expresión en relación al pH-24, se aplicó la corrección por contraste múltiple mediante el *False Discovery Rate* (*q*-value <0.1) propuesto por Benjamini y Hochberg (1995).

Anotación funcional de los genes correlacionados con el pH-24: Con el fin de resumir la funcionalidad de los genes de expresión correlacionada con el pH-24 se realizó, mediante la base de datos *Reactome* (http://www.reactome.org), un análisis funcional *in silico* de términos ontológicos asociados y su distribución en vías metabólicas (base de datos KEGG).

Validación de los resultados por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR): Para este experimento se tomó un subgrupo de 36 animales representativos de los datos globales de pH-24 de la población (**Figura 1**). Se seleccionaron inicialmente seis genes según su función, representando a varias rutas metabólicas y de regulación génica muscular (**Figura 2**). El ARN muscular (1 µg) fue retrotranscrito con hexámeros aleatorios y retrotranscriptasa Revert-Aid (*Fermentas*) 1h a 42ºC. La reacción de amplificación se realizó por triplicado y contenía 1x SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*), 200 nM de *primers* y 3 µl de ADNc diluido 1:30, con el siguiente ciclo de temperaturas: 10 min a 95ºC, 40 ciclos de 15 s a 95ºC y 1 min a 60ºC. La cuantificación y normalización de los datos se realizó por el método ΔΔCt utilizando dos genes de referencia (*HPRT* y *RPL32*). Los valores de expresión de cada gen obtenidos en este ensayo fueron validados ajustando el mismo modelo mixto utilizado en los análisis de los datos de expresión procedentes del *microarray*.

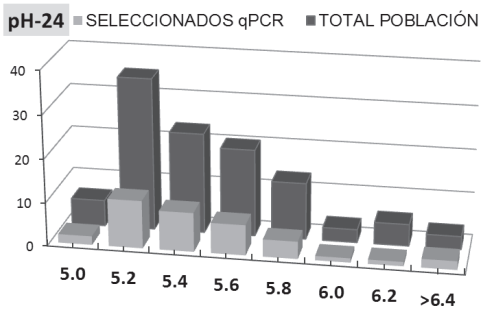


Figura 1. *Distribución de los animales en la población RC2 y en el subgrupo de animales seleccionados para el experimento de validación por qPCR, en relación a sus valores de pH muscular 24h post-mortem*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rutas metabólicas y de regulación génica relacionadas con el pH-24:

A partir de los perfiles transcriptómicos globales del músculo *Lt* de 103 cerdos retrocruzados hemos identificado un total de 827 sondas correlacionadas con el pH-24 (FDR<0.1) que corresponden, tras su anotación, a 722 genes únicos. La clasificación funcional de estos genes muestra varias rutas involucradas en la adaptación del músculo a situaciones de hipoxia (**Figura 2**). Por una parte, la falta de oxígeno imposibilita la obtención de energía a través de la glucolisis aeróbica (respiración oxidativa mitocondrial). Como mecanismo compensatorio se activa la glucólisis anaeróbica donde el piruvato se transforma en lactato, ATP y H^+, alterando el pH celular. Este paso se retroalimenta por la activación de canales iónicos por las altas concentraciones de lactato, lo que incrementa la demanda energética al promover la contracción muscular. Otras fuentes de H^+ activadas por la hipoxia son las ATPasas y kinasas. Por otra parte, otro grupo de mecanismos activado en estas condiciones son las respuestas al estrés celular, incluyendo el control de la apoptosis (regulación del proteosoma, reparación del ADN) y la regulación de la expresión de genes. Esta regulación se da tanto a nivel transcripcional, activando genes relacionados con la supervivencia celular, como post-transcripcional, modificando la traducción de los ARNm para adaptar la producción de proteínas a la demanda metabólica. Es notable que en la lista de 722 genes cuya expresión se correlaciona con el pH-24 se vean representadas todas estas rutas (**Figura 2**). Este hecho indica que los cambios transcripcionales (sobre la actividad de los genes) y post-transcripcionales (sobre los ARNm) se ejercen sobre genes con funciones tanto metabólicas como de regulación. Dos hechos son destacables: por un lado, la gran presencia de factores de transcripción (unos 120 genes) y, por otro, la casi ausencia de proteínas estructurales, indicando su escasa relación con la supervivencia del músculo a la hipoxia celular. Actualmente estamos validando algunos de estos resultados en genes representativos de las rutas más relevantes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (**Tabla 1**). Los primeros resultados muestran que, aunque se valida la correlación entre la expresión de algunos de estos genes y el pH-24, existe una baja correlación entre los datos de expresión medidos por qPCR y por hibridación en microarrays (**Tabla 1**).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. J R Stat Soc Series B Methodol 57: 289–300 • Casellas J, et al. 2008. Anim Genet 39: 89-90 • Gentleman RC, et al. 2004. Genome Biol 5: R80 •

Agradecimientos: Financiado por el proyecto MICINN *AGL2008-04818-C03/GAN.*

Tabla 1. *Coeficiente de regresión (b) entre la expresión génica y el pH muscular 24h post-mortem en datos de expresión obtenidos por microarray (mA) y PCR cuantitativa (qPCR) y coeficiente de correlación de Spearman (r) entre ambos grupos de datos.*

Acrónimo	Gen	*microarray*		qPCR		r(mA, qPCR)	
		b	*p*-value	b	*p*-value	r	p-value
IRS2	Insulin receptor substrate 2	0.458	0.00004	72.25	0.042	0.295	0.075
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	0.478	0.00006	317.04	0.002	0.866	<0.0001
PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	0.489	0.00008	54.35	0.012	0.711	<0.0001
SLC2A12	Solute carrier family 2 (glucosetransporter), member 12	-0.336	0.0013	41.69	0.150	0.045	0.789
ATP6V0B	ATPase, H+ transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit b	0.267	0.0023	65.06	0.038	0.192	0.255
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase 3	0.334	0.0034	185.34	0.003	0.811	<0.0001

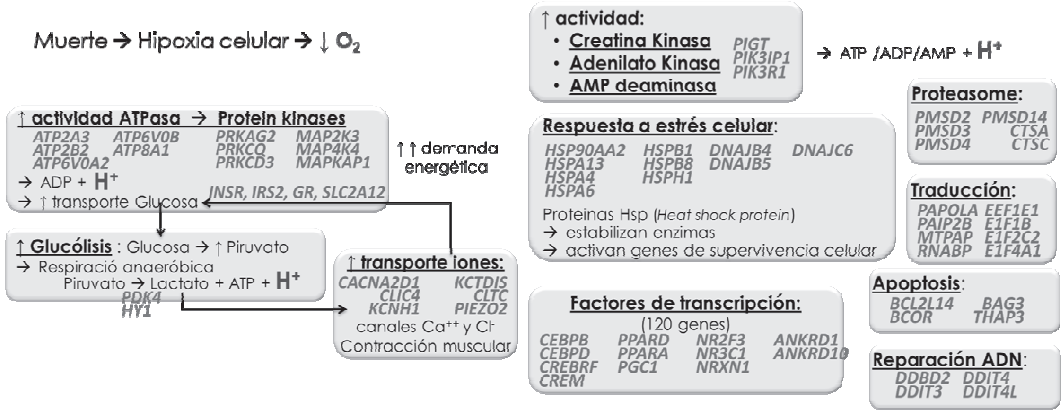


Figura 2: *Esquema de las rutas metabólicas y de regulación génica relacionadas con el pH muscular 24h post-mortem. Los acrónimos corresponden a los genes más relevantes identificados en cada función.*

GENE EXPRESSION PROFILES ASSOCIATED WITH MUSCULAR PH AT 24H POST-MORTEM IN SWINE

ABSTRACT: At slaughter the muscle of livestock animals undergoes biochemical changes that give the meat its colour, flavour, aroma and juiciness. These include a gradual accumulation of lactic acid by consuming muscle glycogen, leading to a drop in muscle pH. The optimal pH 24 h *post-mortem* (pH-24) for proper maturation of meat is about 5.5. Higher or lower values are associated with alterations in the organoleptic properties. The pH-24 depends on environmental factors but also has a strong genetic component, although there is little knowledge about gene interaction networks involved in the drop of muscular pH. Using global transcriptomic data of *longissimus thoracis* muscle of 103 backcrossed pigs we identified 827 probes correlated with pH-24 (FDR <0.1) corresponding to 722 unique genes. Functional classification of these genes shows a net of pathways involved in muscle adaptation to hypoxia, which includes the activation of anaerobic glycolysis, regulation of apoptosis (proteasome regulation, DNA repair) and of gene expression at transcriptional and post-transcriptional level by activating genes related to cell survival and adapting protein production to the metabolic needs. Two facts are remarkable: first, the large presence of transcription factors (120 genes) and, second, the near absence of structural protein, indicating a poor relationship with the response to hypoxia.

Keywords*:* ultimate pH, muscle, transcriptomics, pig