

Identificación ARN-Seq de genes del metabolismo lipídico asociados a grasa intramuscular mediante análisis de transcriptoma del *Longissimus dorsi* e hígado en cerdos alimentados con suplemento de harina de aguacate

RNA-Seq identification of lipid metabolism genes associated with intramuscular fat by transcriptome analyses of *Longissimus dorsi* and liver in pigs feed with avocado meal supplement

Clemente Lemus-Flores^{1*} , Gilberto Lemus-Ávalos¹ , Job Oswaldo Bugarín-Prado¹ , Fernando Grageola-Núñez¹ ,
Karina Mejía-Martínez¹  y Roberto Valdivia-Bernal¹ 

¹Universidad Autónoma de Nayarit, Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Laboratorio de Fisiología Nutricional y Genética Animal. Tepic, Nayarit, México.

*Correo electrónico: clemus@uan.edu.mx

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue identificar los genes involucrados en el metabolismo de lípidos y grasa intramuscular (GIM), por medio del análisis de transcriptoma en *Longissimus dorsi* e hígado, en cerdos de engorde con dieta suplementada con harina de aguacate (HA), así como su efecto sobre el peso final, pH₄₅ y GIM. Se alimentaron ocho cerdos castrados en cada dieta, una con HA al 0 % (HA0) y otra con 10 % (HA10). El análisis de transcriptoma fue realizado con secuenciación masiva (ARN-Seq), con el método DESeq2 se identificaron genes a partir de 12 muestras, tres por dieta y tejido, para obtener diferencialmente la expresión génica (DEG) de los Log₂ Fold Change (Log₂FC) de HA0 vs HA10, considerando valores de P<0,10 a P<0,01-E10. Suplementar con HA10 no afectó el peso final (107,6 kg), pero sí aumentó el pH₄₅ (6,0) y disminuyó la GIM (5,3 %). Comparando las dietas HA0 vs HA10, se identificaron en *L. dorsi* más genes con alta DEG Log₂FC (UP) en HA0, que se han relacionado con mayor influencia en el aumento de GIM. Con valores más altos de Log₂FC y P<0,001 se identificaron a genes UP en HA10 más asociados al metabolismo de los ácidos grasos; once genes para *L. dorsi* (*ABCG1, ADORA1, BMPR1B, FABP3, FRZB, ITGB6, MYLIP, RGN, RORC, RXRG, SPOCK3*) y trece genes para hígado (*CA3, CDKN1A, FADS1, FADS2, GABRB2, PCK2, PLIN4, RETSAT, ROBO2, RORC, SLC27A6, SOCS2, SPOCK3*). Las correlaciones entre los valores Log₂ de expresión de los genes con GIM, identifican en *L. dorsi* a 19 genes con correlación positiva (0,80-0,97) y 13 con correlación negativa (0,80-0,98), y en hígado a seis genes con correlación positiva (0,80-0,92) y nueve con correlación negativa (0,80-0,94). La HA afecta la GIM y ocasiona cambios en la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos.

Palabras clave: ARN-Seq; harina de aguacate; grasa intramuscular; transcriptoma

ABSTRACT

The objective of this research was to identify the genes involved in the metabolism of lipids and intramuscular fat (IMF), through transcriptome analysis in *Longissimus dorsi* and liver, in fattening pigs with a diet supplemented with avocado meal (AM), as well as their effect on the final weight, pH₄₅ and GIM. Eight castrated pigs were fed on each diet, one with 0 % AM (HA0) and another with 10 % (HA10). The transcriptome analysis was performed with massive sequencing (RNA-Seq), with the DESeq2 method, genes were identified from 12 samples, three per diet and tissue, to differentially obtain the gene expression (DEG) of the Log₂ Fold Change (Log₂FC) of HA0 vs HA10, considering values from P<0.10 to P<0.01-E10. Supplementing with HA10 did not affect final weight (107.6 kg), but it did increase pH₄₅ (6.20) and decreased IMF (5.83 %). Comparing the HA0 vs HA10 diets, more genes with high DEG Log₂FC (UP) in HA0 were identified in *L. dorsi*, which have been related to a greater influence on the increase in IMF. With higher Log₂FC values and P<0.001, UP genes were identified in HA10 more associated with fatty acid metabolism; eleven genes for *L. dorsi* (*ABCG1, ADORA1, BMPR1B, FABP3, FRZB, ITGB6, MYLIP, RGN, RORC, RXRG, SPOCK3*) and thirteen genes for liver (*CA3, CDKN1A, FADS1, FADS2, GABRB2, PCK2, PLIN4, RETSAT, ROBO2, RORC, SLC27A6, SOCS2, SPOCK3*). The correlations between the Log₂ expression values of the genes with IMF identify 19 genes with a positive correlation (0.80-0.97) and 13 with a negative correlation (0.80-0.98) in *L. dorsi*, and six genes with a positive correlation in liver (0.80-0.92) and nine with negative correlation (0.80-0.94). AM affects IMF and causes changes in the expression of genes associated with lipid metabolism.

Key words: RNA-Seq; avocado meal; intramuscular fat; transcriptome

INTRODUCCIÓN

La grasa intramuscular (GIM) es importante como un indicador de calidad de la carne, ya que se asocia a sabor y jugosidad de ésta, actualmente los diversos estudios indican que se puede modular y hacerla más saludable [26, 42]. El uso de diferentes fuentes alimenticias y nutrientes en la dieta de los cerdos (*Sus scrofa*) impacta en la cantidad y calidad del tejido adiposo y GIM, modificando el perfil de lípidos [5, 6, 11, 26, 41]. La expresión de genes es diferente de acuerdo con la fuente nutricional, en músculo e hígado y también difiere de acuerdo con la raza de cerdo [34, 39, 43].

Con técnicas actuales como ácido ribonucleico (ARN)-Seq se han identificado genes relacionados con la GIM y el metabolismo de los lípidos, lo que han permitido comprender, qué mecanismos biológicos se afectan y el impacto que tiene la fuente nutricional que se emplea [7, 29, 32, 36, 41]. De acuerdo con resultados publicados con el uso del aguacate (*Persea americana* Mill.) en la dieta de cerdos, se conoce que es una fuente de lípidos y antioxidantes que mejoran el perfil de los ácidos grasos (AG) del músculo, aumenta antioxidantes, y el consumo de esta carne producida tiene efectos benéficos en humanos [16, 17, 24]. El objetivo de esta investigación fue identificar los genes involucrados en el metabolismo de lípidos y GIM, por medio del análisis de transcriptoma en *Longissimus dorsi* e hígado, por efecto de suplementación con harina de aguacate (HA) en la dieta de cerdos en engorde (CdE), así como su efecto sobre el peso final (PF), pH₄₅ y GIM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y dietas

Dieciséis cerdos castrados de la raza Yorkshire-Landrace, con un peso inicial aproximado de 55 kilogramos (kg), alimentados con las dietas experimentadas y fueron distribuidos de forma aleatoria, con igual número a dos tratamientos (Tr). Se alojaron en corrales individuales con libre acceso a alimento y agua, siguiendo las recomendaciones de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 [31] para su cuidado y atención. El experimento tuvo una duración de 56 días (d) más cinco d previos de adaptación a instalaciones y alimento. Al final del experimento, los cerdos fueron sacrificados por el método aprobado en la normativa nacional contenida en la NOM-033-SAG/ZOO-2014 [30]. Las dos dietas fueron isoproteicas con diferente energía metabolizable de acuerdo con la inclusión de HA, considerando como base maíz (*Zea mays*) y harina de soya (*Glycine max*) (TABLA I). Se elaboraron dos dietas con suplemento de HA, una con 0 % (HA0) y otra con 10 % (HA10) en sustitución de maíz. La HA fue obtenida de acuerdo con lo descrito por Lemus y col. [23] y Lemus-Flores y col. [25].

PF, pH y GIM del *Longissimus dorsi*

Al inicio y final del periodo experimental, los cerdos fueron pesados en una báscula marca Torrey-México modelo 200 con capacidad de 200 kg. Inmediatamente después del sacrificio se recolectaron muestras de músculo *L. dorsi* de 100 gramos (g) a cada cerdo a la altura de la décima costilla. En el músculo *L. dorsi* restante, a la altura de la treceava costilla se midió pH a los 45 minutos (min) postsacrificio (pH₄₅), con potenciómetro marca Hanna-México modelo HI-8424. Las muestras de músculo *L. dorsi* se conservaron en congelador marca Torrey-México modelo CH15 a -20 °C hasta su uso en laboratorio. Posteriormente en laboratorio se determinó la porción lipídica GIM de acuerdo con el método 920.39 de la Association of Official Analysis Chemistry (AOAC) [3].

TABLA I
Ingredientes y composición química de las dietas (base seca)

Ingredientes, %/Dietas	HA0	HA10
Maíz	81,205	70,490
Harina de aguacate	0	10
Harina de soya	15,3	15,95
L-Lisina	0,125	0,11
Carbonata de calcio	0,82	0,82
Fosfato de calcio	0,65	0,73
NaCl	0,10	0,10
Premezcla de vitaminas y minerales	0,30	0,30
Zeolita	1,50	1,50
Total	100,00	100,00
Composición química calculada		
Mcal·kg ⁻¹ EM	3,85	4,08
Proteína cruda %	14,00	14,00
Lisina %	0,75	0,75
Metionina %	0,24	0,23
Treonina %	0,50	0,50
Ca %	0,50	0,51
Fosforo total %	0,45	0,44
Na %	0,06	0,06
Cl %	0,11	0,10

HA: harina de aguacate con niveles de inclusión de 0 y 10 %; EM: energía metabolizable

Análisis de transcriptoma en *Longissimus dorsi* e hígado

Se consideraron 12 muestras totales, tres muestras por cerdo y dieta experimental para cada tejido. Recolectando inmediatamente del sacrificio, 75 miligramos (mg) de músculo *L. dorsi* e hígado por cerdo para la extracción del ARN. Para la extracción del ARN se empleó el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, EUA), la concentración y pureza del ARN se realizó por espectrometría con NanoDrop Thermo Fisher modelo 2000 [24]. Para la secuenciación masiva se empleó equipo Nextseq 500 Illumina-EUA (www.illumina.com/company/legal.html), de 76 pares de bases (pb), a partir de las 12 muestras totales. Las secuencias obtenidas fueron mapeadas contra el genoma de referencia del cerdo *Sscrofa11.1* utilizando el programa Smalt 0.7.6 (<https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@smalt@0.7.6>). Los recuentos por gen se llevaron a cabo utilizando el programa Bamtools (<https://bio.tools/bamtools>), para filtrar exclusivamente genes codificantes para proteínas con lectura final de 15.760 registros. Con estos registros se realizó un análisis de expresión diferencial del músculo *L. dorsi* e hígado, de HA0 vs HA10 para 727 genes asociados al metabolismo de lípidos y reportados en diversas bibliografías. El Software IDEAmex (<http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>) [20] se utilizó para aplicar el método DESeq2 y obtener diferencialmente la expresión génica (DEG) de los Log₂ Fold Change (Log₂ FC) del control HA0 vs HA10 considerando valores de P<0,10 a P<0,01-E10.

Análisis estadístico

El efecto de la dieta sobre el pH₄₅ y la GIM se determinó mediante el análisis de la varianza, bajo un diseño completamente al azar con covariable utilizando el PF y las comparaciones de medias ajustadas mediante la prueba de Bonferroni, empleando el programa estadístico SPSSv20 [38]. Para identificar la función biológica de los genes con DEG de los Log₂ Fold Change (diferencia HA0-HA10) considerando valores de P<0,10 a P<0,01-E10, se utilizó la base de datos NCBI y las bases de datos del genoma de cerdo Ensembl (http://uswest.ensembl.org/sus_scrofa/info/index), ShinyGO v0.61: Gene Ontology Enrichment Analysis (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) y Phanter Go (<http://geneontology.org/>). Con los valores Log₂ de expresión de los genes del metabolismo lipídico en *L. dorsi* e hígado se calcularon las correlaciones con la GIM, empleando el programa estadístico SPSS v20 [38].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PF, pH y GIM del *Longissimus dorsi*

De acuerdo con los resultados presentados en la TABLA II, suplementar la alimentación de los cerdos con HA al 10 % no afectó el PF, pero sí hubo diferencias en los valores de pH₄₅ y GIM. Suplementar con HA aumentó el pH₄₅ y disminuyó la GIM.

El pH₄₅ alrededor de 6,3 a 6,7 es un indicador tecnológico de calidad de la carne deseado por los consumidores, cuando es mayor a 6 se asocia a menos pérdida por goteo en la carne [19, 22]. El pH₄₅ cuando disminuye de 5,5 se asocia a carnes pálidas suaves y exudativas (PSE), como fue en los cerdos que se alimentaron sin HA, causa un incremento en la desnaturalización de la proteína de la carne, propiciando una alta pérdida por goteo y baja retención de agua [22, 40]. Incluir HA disminuyó la GIM a valor cercano al 6 %, que es un valor mínimo deseado en cerdos ibéricos reconocidos por su alta calidad de la carne [15]. Los reportes en cerdos comerciales blancos indican GIM menor a la obtenida con HA, con valores desde 1,3 % [8], 1,6-1,8 % [19], 2 % [9] y 3,5 % [21]. La disminución de la GIM fue una situación similar a la reportada cuando se empleó aguacate en forma de pasta, disminuyendo al 4,08 %. Pero como se ha reportado, aumentando la cantidad de antioxidantes significativamente como son los compuestos fenólicos y tocoferol, así como AG poliinsaturados (PUFA). Mejorando la calidad de la carne y la estabilidad oxidativa de grasas y proteína [17, 18]. Soni y col. [37] y Fan y col. [14] también obtuvieron similares resultados, atribuyen la reducción de los niveles de GIM a los altos niveles de PUFA omega 6 en la dieta de los cerdos. Esto sucede con la inclusión de HA como se ha publicado anteriormente, ya que es una fuente de lípidos poliinsaturados y

antioxidantes que mejoran la calidad de los AG del músculo; con aumentos de antioxidantes que propician una calidad de la carne saludable para los consumidores [16,17,24]. Otras fuentes nutricionales no convencionales como *Moringa oleifera* también disminuyen GIM y grasa dorsal [12]. La *Moringa oleifera* reduce niveles de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol, sugiriendo una reducción del metabolismo de lípidos y lipogénesis, lo que ocasiona disminución de la grasa corporal [1]. Igual que en HA, los componentes fenólicos presentes en *Moringa oleifera* and *Brosimum. Alicastrum* contribuyen a la reducción de grasa ya que juegan un papel importante en la regulación de lípidos [13, 28].

Análisis de transcriptoma en *L. dorsi* e hígado

La expresión de los genes lipogénicos es diferente en cada tejido y por efecto de la composición de la dieta, afectando la cantidad y composición de los lípidos, así como su metabolismo [4, 10, 15, 41]. Esto se puede observar en *L. dorsi* e hígado, que de acuerdo con los análisis del método DESeq2 y DEG con Log₂FC, comparando la dieta control HA0 vs HA10, de 727 genes asociados al metabolismo de lípidos buscados, se identificaron 103 en *L. dorsi* y 71 en hígado, con 21 genes similares en ambos tejidos (TABLAS III, IV y V). En *L. dorsi* proporcionalmente hay más genes con alto DEG Log₂FC (UP) que con bajo DEG Log₂FC (DOWN) en HA0 vs HA10.

Todos estos genes identificados ya tienen reportes de asociación con el metabolismo de lípidos (<http://www.animalgenome.org/OTLdb>) [2, 39, 41]. Dentro de estas funciones biológicas se identifican a once genes DOWN en HA0 y UP en HA10 para *L. dorsi* y para hígado trece genes, que tuvieron más alto Log₂FC y P<0,001.

Con UP en HA0 para *L. dorsi* e hígado se identifican genes con reportes en cerdos, que se han relacionado con mayor influencia en el aumento de GIM, como sucedió en HA0. Wang y col. [41] reportan en cerdos indígenas Laiwu de China, que se caracterizan por altos niveles de GIM (9~12 %), expresión alta de los genes *ADIPOQ*, *EGR1*, *SDC4*, *SERPINE1*, *LDLR*, *ACACA*, *IGF2*, *MYOD1*, *MYOG*, *SOCS2*, *ACLY*, *CD44* y *ATF3* a los 240 d de edad cuando tienen más GIM. Tao y col. [39] también reportan expresión alta de los genes *ACACA*, *C4BPA*, *LDLR* y *SDC4* en cerdos de raza China vs Yorkshire. El gen *MYC* tiene reportes de asociación con miogénesis, hiperplasia muscular y adipogénesis [33]. De acuerdo con Mo y col. [27], el gen *BTG2* se asocia significativamente con el grosor de la grasa de los glúteos, el porcentaje de grasa, el porcentaje de músculo magro, la relación entre magro con grasa y la longitud de la canal.

La identificación de genes con DOWN en HA0 y UP en HA10 para *L. dorsi* e hígado se asocian más a las funciones biológicas de las rutas del metabolismo de lípidos, receptores activados por proliferadores

TABLA II
Comparación de promedios ajustados por la covariable PF entre las dietas de HA

	HA0	HA10	EEM	R ²	P
Peso inicial, kg	54,62 ^a	56,41 ^a	1,33	0,15	0,21
Peso final, kg	100,11 ^a	107,60 ^a	4,50	0,22	0,13
pH ₄₅	5,12 ^b	6,20 ^a	0,16	0,94	0,007
Grasa intramuscular, %	8,08 ^a	5,83 ^b	0,62	0,72	0,02

HA: harina de aguacate al 0 y 10 %; EEM: error estándar de la media; R²: coeficiente de determinación del modelo estadístico; P: valor de probabilidad; ab: literales diferentes superindicadas, indican diferencias entre dietas con P< valor

TABLA III
Identificación de genes con DEG Log₂ Fold Change de HA0 vs HA10 en *Longissimus dorsi*

P	Log ₂ FC	Genes UP HA0 / DOWN HA10	Log ₂ FC	Genes DOWN HA0 / UP HA10
0,001	1,97	ADIPOQ, ARID5B, ATF3, ATP1A2, BTG2, C4BPA, CTGF, DNMT3A, EGR1, FOS, GPAT3, HK2, HK3, HSP70.2, JUNB, KIAA0753, MYC, MYH1, MYH2, NFKBIA, PCK2, PHGDH, PLBD1, PRKAR2A, RGMB, RYR1, SDC4, SERPINE1, SNAI2, SP1	-1,29	ABCG1, ADORA1, BMPR1B, FABP3, FRZB, ITGB6, MYLIP, RGN, RORC, RXRG, SPOCK3
0,01	0,76	GAB2, JPH1, LDLR, MOCS1	----	No identificados
0,05	0,68	ABHD5, ACACA, ADAM22, FAT1, HERC2, IGF2, IGF2R, ITGA5, KCTD15, KLF2, MYOD1, MYOG, NR3C1, OBSCN, PRKAG3, PTPN11, RNF115, SAMD4A, SOCS2	-0,65	AAMDC, ABCA5, ADSL, AP2B1, CTSD, EBP, FGF1, PLA2G6PRDX2, SMPD1, SREBF1
0,1	0,59	ACLY, ATG2B, CD44, CEBPB, CIDEC, DST, GPD2, GSK3B, KDM2A, KDM7A, MAOA, MDFIC, NDEL1, PPP2R3A, PRKCI, SCARB1, SOX6	-0,53	ACADVL, APAF1, HHADH, GPAM, DHD, OXTR, PNPLA2, SLC27A1, ST8SIA5

DEG: diferencialmente la expresión génica; Log₂FC: Log₂ Fold Change. HA: harina de aguacate al 0 y10 %; P: valor de probabilidad. UP: alto; DOWN: bajo

TABLA IV
Identificación de genes con DEG Log₂ Fold Change del control HA0 vs HA10 en hígado

P	Log ₂ FC	Genes UP HA0 / DOWN HA10	Log ₂ FC	Genes DOWN HA0 / UP HA10
0,001	1,09	ANO3, BTG2, CAST, CD44, DENND2D, FOS, GALR3, HK3, HSP70.2, IFITM1, LIPG, PARD, PPP2R3A, SERPINE1	-1,59	CA3, CDKN1A, FADS1, FADS2, GABRB2, PCK2, PLIN4, RETSAT, ROBO2, RORC, SLC27A6, SOCS2, SPOCK3
0,01	1,08	C4BPA, DNAJA1	-1,16	ACAA1, ACADVL, EPHX2
0,05	1,22	ALOX15, APOM, ATF3, CEBPB, CENPA, CTGF, CTSS, FCER1G, JUNB, KLF2, MX2, NFKBIA, NPC1L1, PKHD1	-1,03	FAT4, GNRHR, GPAM, HADHA, LRFN2, SMPD3, SOX6, SPHK2, SREBF1
0,1	0,92	AKR1B1, PARP12, PHKG1, PIK3R5, SMAD6	-0,75	FADS6, GNMT, IDH3B, MDFIC, ME1, MTHFR, MYLIP, PYGL, SLC24A4

DEG: diferencialmente la expresión génica; Log₂FC: Log₂ Fold Change. HA: harina de aguacate al 0 y10 %; P: valor de probabilidad. UP: alto; DOWN: bajo

TABLA V
Identificación de genes con DEG Log₂ Fold Change del control HA0 vs HA10 en *Longissimu dorsi* e hígado

Genes UP HA0 / DOWN HA10	Genes DOWN HA0 / UP HA10
ATF3, BTG2, C4BPA, CD44, CEBPB, CTGF, FOS, HK3, HSP70.2, JUNB, KLF2, LDLR, NFKBIA, PPP2R3A, SERPINE1	ACADVL, GPAM, MYLIP, RORC, SPOCK3, SREBF1

DEG: diferencialmente la expresión génica; Log₂FC: Log₂ Fold Change. HA: harina de aguacate al 0 y10 %; P: valor de probabilidad. UP: alto; DOWN: bajo

peroxisómicos (PPAR) y metabolismo de los AG (FIGS.1 y 2). Similares resultados sucedieron con la dieta HA10 a lo que Benites y col. [4], en dieta con aceite de girasol (*Helianthus annuus*), los cuales al igual que este trabajo, se encontró un aumento en la expresión de los genes *RXRG* y *FABP*. Albuquerque y col. [2] en cerdos Alentejanos, reconocidos por su calidad de la grasa y carne, encontraron resultados similares que con la dieta HA10, una baja expresión de genes *IGF2* asociado a *PPARD*, *ADIPOQ*, *EGR1*, *FOS* y una alta expresión del gen *ME1* apoyando la idea de un aumento de la síntesis de lípidos más que al aumento de la GIM. La dieta con HA10 disminuyó el contenido de ácido palmítico (16:0), aumentaron los contenidos de AG araquídico (20:0) y linoleico (18:2 n6), con incremento de PUFA y las proporciones PUFA/SFA y PUFA/MUFA, con una disminución de la expresión de *ACACA* en ambos tejidos [24]. Otros genes que tuvieron alta expresión en la dieta HA10 son *MYLIP*

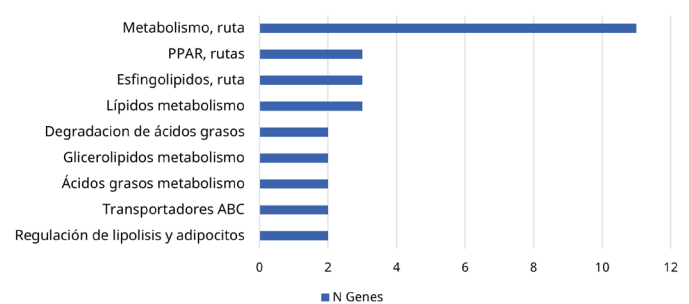


FIGURA 1. Identificación de las funciones biológicas de genes con Log₂FC DOWN en HA0 y UP en HA10 para *Longissimus dorsi*

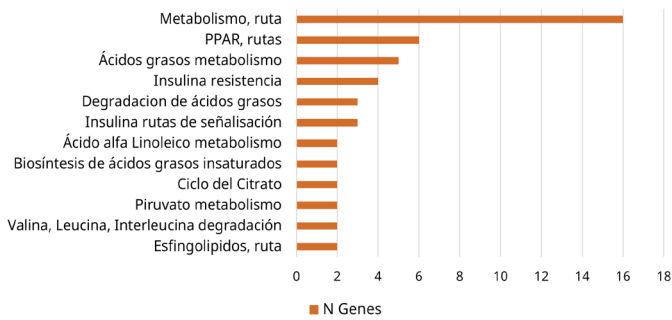


FIGURA 2. Identificación de las funciones biológicas de genes con Log₂FC DOWN en HA0 y UP en HA10 para hígado

regulador de miosina y *PLIN4* asociado con la composición de los AG en cerdos ibéricos [35].

Considerando las correlaciones de los valores Log₂ de expresión de los genes para *L. dorsi* e hígado (TABLAS VI y VII), se aprecia que, cuando el Log₂FC UP en HA0 y DOWN en HA10 la correlación es positiva, lo contrario cuando el Log₂FC DOWN en HA0 y UP en HA10. Para *L. dorsi* hay 19 genes con correlación positiva > +0,80 y 13 con correlación negativa < -0,80. Para hígado hay 6 genes con correlación positiva > +0,80 y 9 con correlación negativa < -0,80. Al igual que el aceite de girasol, *M. oleifera* y *B. alicastrum* [4, 12], la dieta con inclusión de HA cambia la expresión de los genes, su efecto se ve asociado al aumento o a la disminución de la GIM.

TABLA VI
Correlaciones significativas entre los genes y la GIM para *Longissimus dorsi*

Gen	r	P	grado	Gen	r	P	grado
<i>PRKAR2A</i>	0,97	0,001	1	<i>ST8SIA5</i>	-0,98	0,0004	2
<i>PPP2R3A</i>	0,97	0,002	1	<i>ACADVL</i>	-0,96	0,002	2
<i>SAMD4A</i>	0,96	0,002	1	<i>EBP</i>	-0,95	0,004	2
<i>HERC2</i>	0,95	0,003	1	<i>PNPLA2</i>	-0,94	0,005	2
<i>PRKCI</i>	0,95	0,004	1	<i>FABP3</i>	-0,94	0,01	2
<i>KDM2A</i>	0,95	0,005	1	<i>PRDX2</i>	-0,93	0,01	2
<i>SP1</i>	0,94	0,005	1	<i>SMPD1</i>	-0,92	0,01	2
<i>KDM7A</i>	0,93	0,01	1	<i>AAMDC</i>	-0,90	0,01	2
<i>DST</i>	0,92	0,01	1	<i>RORC</i>	-0,86	0,03	2
<i>NR3C1</i>	0,92	0,01	1	<i>ADSL</i>	-0,85	0,03	2
<i>SOX6</i>	0,88	0,02	1	<i>FGF1</i>	-0,85	0,03	2
<i>PTPN11</i>	0,87	0,03	1	<i>FRZB</i>	-0,84	0,03	2
<i>NDEL1</i>	0,86	0,03	1	<i>LDHD</i>	-0,83	0,04	2
<i>RGMB</i>	0,83	0,04	1	<i>SPOCK3</i>	-0,78	0,07	2
<i>ADAM22</i>	0,82	0,04	1	<i>ADORA1</i>	-0,78	0,07	2
<i>SNAI2</i>	0,82	0,04	1	<i>SLC27A1</i>	-0,76	0,08	2

TABLA VI (cont...)
Correlaciones significativas entre los genes y la GIM para *Longissimus dorsi*

Gen	r	P	grado	Gen	r	P	grado
<i>C4BPA</i>	0,81	0,05	1	<i>CTSD</i>	-0,73	0,10	2
<i>IGF2R</i>	0,80	0,06	1				
<i>ADIPOQ</i>	0,80	0,06	1				
<i>KIAA0753</i>	0,79	0,06	1				
<i>FAT1</i>	0,79	0,06	1				
<i>GSK3B</i>	0,77	0,07	1				
<i>PLBD1</i>	0,77	0,07	1				
<i>HK2</i>	0,77	0,07	1				
<i>OBSCN</i>	0,76	0,08	1				
<i>RYR1</i>	0,75	0,09	1				
<i>MYH1</i>	0,74	0,09	1				
<i>ATG2B</i>	0,72	0,10	1				
<i>JPH1</i>	0,72	0,10	1				

GIM: grasa intramuscular; r: coeficiente de correlación; P: valor de probabilidad; grado 1: Log₂FCUP en HA0 y DOWN en HA10; grado 2: Log₂FCDOWN en HA0 y UP en HA10

TABLA VII
Correlaciones significativas entre los genes y la GIM para hígado

Gen	r	P	grado	Gen	r	P	grado
<i>LIPG</i>	0,92	0,01	1	<i>PLIN4</i>	-0,94	0,005	2
<i>CENPA</i>	0,91	0,01	1	<i>SMPD3</i>	-0,92	0,01	2
<i>BTG2</i>	0,87	0,03	1	<i>IDH3B</i>	-0,90	0,02	2
<i>ALOX15</i>	0,84	0,04	1	<i>FADS6</i>	-0,88	0,02	2
<i>SERPINE1</i>	0,81	0,05	1	<i>SREBF1</i>	-0,86	0,03	2
<i>DENND2D</i>	0,80	0,06	1	<i>FAT4</i>	-0,82	0,05	2
<i>PPARD</i>	0,76	0,08	1	<i>GNMT</i>	-0,81	0,05	2
<i>ANO3</i>	0,75	0,08	1	<i>ROBO2</i>	-0,80	0,05	2
<i>NPC1L1</i>	0,74	0,10	1	<i>ME1</i>	-0,80	0,06	2
				<i>SLC24A4</i>	-0,79	0,06	2
				<i>MTHFR</i>	-0,78	0,07	2
				<i>MYLIP</i>	-0,78	0,07	2
				<i>PCK2</i>	-0,74	0,09	2
				<i>GPAM</i>	-0,72	0,10	2
				<i>GABRB2</i>	-0,72	0,10	2

GIM: grasa intramuscular; r: coeficiente de correlación; P: valor de probabilidad; grado 1: Log₂FCUP en HA0 y DOWN en HA10; grado 2: Log₂FCDOWN en HA0 y UP en HA10

CONCLUSIONES

Suplementar la alimentación de los cerdos con HA al 10 % no afectó el PF, aumentó el pH₄₅ y disminuyó la GIM. Al análisis de transcriptomas en *L. dorsi* e hígado, comparando las dietas HA0 vs HA10 se identifican más genes con alta DEG Log₂FC (UP), relacionados con mayor influencia en el aumento de GIM. Con valores más altos de Log₂FC y P<0,001 se identificaron a genes UP en HA10 más asociados al metabolismo de los AG. Las correlaciones entre los valores Log₂ de expresión de los genes con GIM, identifican en *L. dorsi* a más genes con correlación positiva y negativa que en hígado. La HA afecta la GIM y ocasiona cambios en la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos.

AGRADECIMIENTO

Al CONACYT por financiar del fondo I0002, convocatoria PDCPN 2014-1, el proyecto: Uso del aguacate de desecho en la manipulación de la calidad y composición de la carne de cerdos y ovinos para producir alimentos funcionales con estabilidad oxidativa.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADEGBENRO, M.; AGBEDE, J.O.; ONIBI, G.E.; ALETOR, V.A. Composite leaf meal: effects on haematology and biochemical indices of growing pigs. **Arch. Zoot.** 19: 65-76. 2016.
- [2] ALBUQUERQUE, A.C.; ÓVILO, Y.; NÚÑEZ, R.; BENÍTEZ, A.; LÓPEZ-GARCÍA, F.; GARCÍA, M.R.; FELIX, M.; LARANJO, R.; CHARMECA-MARTINS, J.M. Comparative transcriptomic analysis of subcutaneous adipose tissue from local pig breeds. **Genes.** 11(4): 422. 2020.
- [3] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYSIS CHEMISTRY (AOAC.). Official Methods of Analysis. 15 th. Ed. Gaithersburg, Maryland. USA. Pp 684. 1997.
- [4] BENÍTEZ, R.; NÚÑEZ, Y.A.; FERNÁNDEZ, B.; RODRÍGUEZ, C.; DAZA, A. Adipose tissue transcriptional response of lipid metabolism genes in growing Iberian pigs fed oleic acid v. carbohydrate enriched diets. **Anim.** 10: 939-46. 2016.
- [5] BENÍTEZ, R.A.; FERNÁNDEZ, B.; ISABEL, Y.; NÚÑEZ, E.; DE MERCADO, E.; GÓMEZ-IZQUIERDO, J.; GARCÍA-CASCO, C.; LÓPEZ-BOTE, C.; OVILLO, C. Modulatory effects of breed, feeding status, and diet on adipogenic, lipogenic, and lipolytic gene expression in growing Iberian and Duroc pigs. **Int. J. Mol. Sci.** 19(22): 1-20. 2018.
- [6] BENÍTEZ, R.N.; TRAKOOLJUL, Y.; NÚÑEZ, B.; ISABEL, E.; MURANI, E.; DE MERCADO, E.; GÓMEZ-IZQUIERDO, J.; GARCÍA-CASCO, C.; LÓPEZ-BOTE, C.; WIMMERS, K.; ÓVILO, C. Breed, diet, and interaction effects on adipose tissue transcriptome in Iberian and Duroc pigs fed different energy sources. **Genes.** 10(8): 589. 2019.
- [7] BENÍTEZ, R.; NÚÑEZ, Y.; AYUSO, M.; ISABEL, B.; FERNÁNDEZ-BARROSO, M.A.; DE MERCADO, E.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; GARCÍA-CASCO, J.M.; LÓPEZ-BOTE, C.; ÓVILO, C. Changes in Biceps femoris Transcriptome along Growth in Iberian Pigs Fed Different Energy Sources and Comparative Analysis with Duroc Breed. **Anim.** 11: 3505. 2021.
- [8] D'SOUZA, D.N.; PETHICK, D.W.; DUNSHEA, F.R.; PLUSKE, J.R.; MULLAN, B.P. Nutritional manipulation increases intramuscular fat levels in the *Longissimus* muscle of female finisher pigs. **Aust. J. Agric. Res.** 54: 745-749. 2003.
- [9] DURAN-MONTGÉ, P.; REALINI, C.E.; BARROETA, A.C.; LIZARDO, R.; ESTEVE, GARCÍA, E. Tissue fatty acid composition of pigs fed different fat sources. **Anim.** 2: 1753-1762. 2008.
- [10] DURAN-MONTGÉ, P.; THEIL, P.K.; LAURIDSEN, C.; ESTEVE, GARCÍA, E. Fat metabolism is regulated by altered gene expression of lipogenic enzymes and regulatory factors in liver and adipose tissue but not in semimembranosus muscle of pigs during the fattening period. **Anim.** 3: 1580-1590. 2009.
- [11] DZIB-CAUICH, D.; LEMUS-FLORES, C.; BUGARÍN-PRADO, J.O.; AYALA-VALDOVINOS, M.A.; MOO-HUCHIN, V.M. Perfil de ácidos grasos en músculo *Longissimus dorsi* y expresión de genes asociados con metabolismo lipídico en cerdos pelón mexicanos y cerdos Landrace-Yorkshire. **Livest. Res. Rural Dev.** 32(115): 1-8. 2020.
- [12] DZIB, C.D.; SIERRA, V.A.; LEMUS-FLORES, C.; BUGARÍN, J.O.; GRAGEOLA, N.F.; SEGURA, C.J.; MOO, H.V. Effects of *Moringa oleifera* and *Brosimum alicastrum* partial feed substitution in intramuscular fat and adipose tissues and on the expression of lipogenic genes of Mexican hairless pigs. **Austral J. Vet. Sci.** 53: 153-160. 2021.
- [13] EZZAT, S.M.; BISHBISHY, E.L.; ABOREHAB, M.H.; SALAMA, N.M.; HASHEESH, A. Up regulation of MC4R and PPAR- α expression mediates the anti-obesity activity of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet-induced obesity in rats. **J. Ethnopharmacol.** 251: 112541. 2020.
- [14] FAN, L.; PENG, Y.; WU, D.; HU, J.; SHI, X.; YANG, G.; LI, X. Dietary supplementation of *Morus nigra* L. leaves decrease fat mass partially through elevating leptin-stimulated lipolysis in pig model. **J. Ethnopharmacol.** 249: 112416. 2020.
- [15] FERNÁNDEZ, A.I.; ÓVILO, C.; BARRAGÁN, C.; RODRÍGUEZ, M.C.; SILIÓ, L. Validating porcine SCD haplotype effects on fatty acid desaturation and fat deposition in different genetic backgrounds. **Livest. Sci.** 205: 98-105. 2017.
- [16] GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, C.; LEMUS-FLORES, C.; BECERRA-VERDÍN, E.; BUGARÍN-PRADO, J.; MEJÍA-MARTÍNEZ, K. Antropométrico and serum lipid profiles in overweight men who consumed pork fed with avocado flour. **Abanico Vet.** 11: 1-16. 2021.
- [17] HERNÁNDEZ-LÓPEZ, S.H.; RODRÍGUEZ-CARPENA, J.G.; LEMUS-FLORES, C.; GALINDO-GARCÍA, J.; ESTÉVEZ, M. Antioxidant protection of proteins and lipids in processed pork loin chops through feed supplementation with avocado. **J. Food Sci. Technol.** 53(6): 2788-2796. 2016^a.
- [18] HERNÁNDEZ-LÓPEZ, S.H.; RODRÍGUEZ-CARPENA, J.G.; LEMUS-FLORES, C.; GRAGEOLA - NÚÑEZ, F.; ESTÉVEZ, M. Avocado waste for finishing pigs: Impact on muscle composition and oxidative stability during chilled storage. **Meat Sci.** 116(6): 186-192. 2016^b.

- [19] JANKOWIAK, H.; CEBULSKA, A.; BOCIAN, M. The relationship between acidification (pH) and meat quality traits of polish white breed pigs. **Eur. Food Res. Technol.** 247: 2813-2820. 2021.
- [20] JIMÉNEZ-JACINTO, V.; SANCHEZ-FLORES, A.; VEGA-ALVARADO, L. Integrative differential expression analysis for multiple experiments (IDEAMEX): A web server tool for integrated RNA-Seq data analysis. **Front. Genet.** 11: 279.2019.
- [21] KATSUMATA, M. Promotion of intramuscular fat accumulation in porcine muscle by nutritional regulation. **Anim. Sci. J.** 82: 17-25. 2011.
- [22] KIM, T.W.; KIM, C.W.; YANG, M.R.; NO, G.R.; KIM, S.W.; KIM, I.S. Pork Quality Traits According to *Postmortem* pH and Temperature in Berkshire. **Korean J. Food Sci. Anim. Resour.** 36(1): 29-36. 2016. <https://doi.org/h5bs>.
- [23] LEMUS, C.; BUGARÍN, J.; GRAGEOLA, F.; RODRÍGUEZ, J.G.; MEJÍA, K.; VALDIVIA, R. Características químicas de la pasta de aguacate hass fruto completo (*Persea americana* Mill) mexicano de Nayarit destinado a la alimentación animal. **Rev. Comp. Prod. Porc.** 24(2): 112-118. 2017.
- [24] LEMUS-AVALOS, G.; LEMUS-FLORES, C.; BUGARÍN-PRADO, J.O.; GRAGEOLA-NÚÑEZ, F.; AYALA-VALDOVINOS, M.A.; DUIFHUIS-RIVERA, T.; MOO-HUCHIN, V.M.; DZIB-CAUICH, D. Effect of diets with avocado meal on lipids in muscle, antioxidants and gene expression in finished pigs. **Rev. Bio. Cien.** 7: e968. 2020.
- [25] LEMUS-FLORES, C.; BUGARIN, P.J.; GRAGEOLA, N.F.; VALDIVIA, B.R.; RUIZ, D.I.; BONILLA, C.J.; SEGURA, C.J. The effect of avocado flour, sunflower oil and different forage: concentrate ratios in the final diet on feed intake, digestibility and productive performance of male sheep. **Veterinarski Arhiv.** 90(4): 353-364. 2020.
- [26] MALGWI, I.H.; HALAS, V.; GRÜNVALD, P.; SCHIAVON, S.; JÓCSÁK, I. Genes Related to Fat Metabolism in Pigs and Intramuscular Fat Content of Pork: A Focus on Nutrigenetics and Nutrigenomics. **Anim.** 12: 150. 2022.
- [27] MO, X.Y.; LAN, J.; JIAO, Q.Z.; XIONG, Y.Z.; ZUO, B.; LI, F.E.; XU, D.Q.; LEI, M.G. Molecular characterization, expression pattern and association analysis of the porcine *BTG2* gene. **Mol. Biol. Rep.** 38: 4389-4396. 2011.
- [28] MOO-HUCHIN, V.M.; CANTO-PINTO, J.C.; CUEVAS-GLORY, L.F.; SAURI-DUCH, E.; PÉREZ-PACHECO, E. Effect of extraction solvent on the phenolic compounds content and antioxidant activity of Ramon nut (*Brosimum alicastrum*). **Chem. Pap.** 73: 1647-1657. 2019.
- [29] MUÑOZ, M.; GARCÍA-CASCO, J.M.; CARABALLO, C.; FERNÁNDEZ-BARROSO, M.Á.; SÁNCHEZ-ESQUILICHE, F.; GÓMEZ, F.; RODRÍGUEZ, M.C.; SILIÓ, L. Identification of Candidate Genes and Regulatory Factors Underlying Intramuscular Fat Content Through *Longissimus dorsi* Transcriptome Analyses in Heavy Iberian Pigs. **Front. Genet.** 9: 608. 2018.
- [30] NORMA OFICIAL MEXICANA 033. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. 2014. Diario Oficial de la Federación. México. En línea: <https://bit.ly/3PunydY>. 20/02/2022.
- [31] NORMA OFICIAL MEXICANA 062. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2001. Diario Oficial de la Federación. México. En línea: <https://bit.ly/3AVXSXi>. 20/02/2022.
- [32] NÚÑEZ, Y.; RADOVIĆ, C.; SAVIC, R.; GARCÍA-CASCO, J.M.; ANDEK-POTOKAR, C.M.; BENÍTEZ, R.; RADOJKOVIC, D.; LUKIĆ, M.; GOGIĆ, M.; MUÑOZ, M. Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways related to oxidative phosphorylation, antioxidant defense, fatness and growth in mangalitsa and moravka pigs. **Anim.** 11: 844. 2021.
- [33] OH, J.; KIM, E.; LEE, H.; SONG, K. Effect of a c-MYC Gene Polymorphism (g.3350 G>C) on Meat Quality Traits in Berkshire. **Anim. Biosci.** 28(11): 1545-1550. 2015.
- [34] ÓVILO, C.; BENÍTEZ, R.; FERNÁNDEZ, A.; ISABEL, B.; NÚÑEZ, Y.; FERNÁNDEZ, A.I.; RODRÍGUEZ, C.; DAZA, A.; SILIÓ, L.; LÓPEZ-BOTE, C. Dietary Energy Source Largely Affects Tissue Fatty Acid Composition but Has Minor Influence on Gene Transcription in Iberian Pigs. **J. Anim. Sci.** 92: 939-954. 2014.
- [35] PENA, R.N.; NOGUERA, J.L.; GARCÍA-SANTANA, M.J.; GONZALEZ, E.; TEJEDA, J.F.; ROS-FREISEDES, R.; IBAÑEZ-ESCRICHE, N. Five genomic regions have a major impact on fat composition in Iberian pigs. **Sci. Rep.** 9: 2031. 2019.
- [36] SHANG-QIAO, S.; WEI-WEI, M.; SU-XIAN, Z.; CHAO-LONG, Z.; JIN, Y.; CUI-CUI, Z.; ZONG-QIANG, L. Transcriptome analysis of differential gene expression in the *longissimus dorsi* muscle from Debao and Landrace pigs based on RNA-sequencing. **Biosci. Rep.** 39(12): 1-23. 2019.
- [37] SONI-GUILLERMO, E.; FIGUEROA-VELASCO, J.L.; SÁNCHEZ-TORRES, M.T.; MARTÍNEZ-AISPURO, J.A.; CORDERO-MORA, J.L.; HERNÁNDEZ-CÁZARES, A.S.; COPADO-BUENO, J.M.F. Semilla de linaza (*Linum usitatissimum*) en dietas de cerdos para modificar la composición lipídica de la carne. **Agrociencia.** 51: 709-724. 2017.
- [38] SPSS. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. 2011.
- [39] TAO, X.; LIANG, Y.; YANG, X.; PANG, J.; ZHONG, Z.; CHEN, X.; LV, X. Transcriptomic profiling in muscle and adipose tissue identifies genes related to growth and lipid deposition. **PLoS ONE.** 12(9): 1-25. 2017.
- [40] VERMEULEN, L.; VAN DE PERRE, V.; PERMENTIER, L.; DE BIE, S.; VERBEKE, G.; GEERS, R. Preslaughter handling and pork quality. **Meat Sci.** 100(2015): 118-123. 2014. <https://doi.org/f6w6hc>.
- [41] WANG, H.; JIN, W.; DAN-DAN, Y.; ZONG, LI, L.; YONG-QING, Z.; WEI, C. Expression of lipid metabolism genes provides new insights into intramuscular fat deposition in Laiwu pigs. **Asian-Australasian J. Anim. Sci.** 33(3): 390-397. 2020.
- [42] WOOD, J.D.; ENSER, M. New aspects of meat quality. **Manipulating the Fatty Acid Composition of Meat to Improve Nutritional Value and Meat Quality.** University of Bristol, Bristol, United Kingdom. Pp 501-535. 2017. <https://doi.org/h5bt>.
- [43] ZHANG, J.; CUI, L.; MA, J.; CHEN, C.; YANG, B.; HUANG, L. Transcriptome analyses reveal genes and pathways associated with fatty acid composition traits in pigs. **Anim. Genetic.** 48(6): 645-652. 2017.