

EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN ALIMENTARIA SOBRE EL TRANSCRIPTOMA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN PORCINO

Ballester¹, M., González-Rodríguez¹, O., Amills², M., Cardoso², T.F., Pascual¹, M., Mármol-Sánchez², E., Tibau³, J. y Quintanilla¹, R

¹Genética y Mejora Animal, IRTA-Torre Marimon, Caldes de Montbui, 08140 Barcelona,

²CRAG, Consorcio CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, 08193 Barcelona,

³Genética y Mejora Animal, IRTA-Monells, Finca Camps i Armet, 17121 Girona.

maria.ballester@irta.cat

INTRODUCCIÓN

La restricción alimentaria en porcino conlleva una reducción del crecimiento que en algunos casos es parcialmente contrarrestada por un crecimiento compensatorio posterior (e.g. Heyer y Lebret, 2007; Daza et al., 2007), existiendo cierta controversia respecto a los posibles beneficios de dicha restricción en el rendimiento final. Algunos estudios apuntan a una mejora de la eficiencia alimentaria en animales bajo restricción (e.g. Daza et al., 2007), y en algunos casos la reducción del tocino dorsal podría ser considerada deseable. En cualquier caso, el efecto sobre el depósito de grasa en el músculo y el perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular deben ser parámetros a tener en cuenta, principalmente en sistemas dirigidos a obtener un producto de calidad diferencial. En un experimento llevado a cabo con una línea comercial Duroc (resultados no publicados) se pudo comprobar que la restricción alimentaria no provocó cambios significativos en el depósito de grasa intramuscular, tal como observaron Heyer y Lebret (2007), aunque sí se produjeron variaciones importantes en el perfil de ácidos grasos. En este sentido se observó un importante incremento del porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, resultado que concuerda parcialmente con los obtenidos por Daza et al. (2007) en cerdos Ibéricos. Bajo la hipótesis de que estos cambios están asociados a una modificación en el perfil de expresión génica a nivel muscular, el objetivo del presente trabajo consiste en analizar los cambios en el transcriptoma del músculo esquelético asociados a la restricción alimentaria durante el periodo de engorde en una población comercial Duroc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: Se utilizaron 24 hembras procedentes de 12 camadas de una línea comercial Duroc. Durante la primera fase de engorde (60-120 días de vida) se aplicaron dos regímenes alimentarios distintos: doce hembras fueron alimentadas *ad libitum* (grupo AL), mientras que las doce restantes recibieron una alimentación restringida (grupo RE). Posteriormente, durante la segunda fase de engorde (hasta ~150 días de vida) todos los animales fueron alimentados a voluntad. Al sacrificio, se recogieron muestras del músculo *gluteus medius* (GM) de todos los animales con *RNA-later* (Ambion) y posteriormente se guardaron a -80°.

Extracción de ARN y secuenciación (RNA-Seq): Se aisló el ARN total a partir de todas las muestras del músculo GM utilizando el kit RiboPure (Ambion). El ARN total se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop products) y su calidad fue verificada mediante un equipo Bioanalyzer-2100 (Agilent Technologies). La secuenciación se realizó en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG). Se generó una genoteca para cada animal utilizando el kit *TruSeq RNA Sample Preparation Kit* (Illumina). Las genotecas fueron secuenciadas con un equipo Illumina Hi-Seq 2000 mediante lecturas de 2x75 pb.

Mapeo y anotación de las lecturas: Se utilizó el programa *FASTQC* para el control de calidad de las lecturas generadas. Las lecturas fueron indexadas con *BOWTIE2 v2.2.3* (Langmead et al., 2012), y mapeadas en el genoma de referencia porcino (*Sscrofa10.2*) utilizando el programa *TopHat v2.0.9* (Trapnell et al., 2009). Los archivos *bam* resultantes se fusionaron mediante el programa *Samtools v0.1.18* (Li et al., 2009). El control de calidad del mapeo de lecturas y sus estadísticos se realizó mediante *Qualimap v2.2* (Okonechnikov et al., 2015).

Análisis de genes diferencialmente expresados: El número de lecturas que mapean en cada gen se determinó con el programa *Htseq-count* (Anders et al., 2015). Para identificar los genes diferencialmente expresados entre ambos grupos se utilizaron los paquetes de R *DESeq2* (Love et al., 2014) y *EdgeR* (Robinson et al., 2010), seleccionando aquellos genes con una tasa de cambio (FC) tal que $|\log_{2}FC| > 1$, y que mostrasen diferencias significativas

después del ajuste para múltiples contrastes (p_{adj} o FDR <0,05). Finalmente, los genes diferencialmente expresados fueron analizados mediante la herramienta *ClueGO* del programa *Cytoscape* (Bindea et al., 2009) y *David v6.8* (Huang et al., 2009) para identificar las rutas y funciones biológicas sobrerrepresentadas ($p_{adj}<0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la secuenciación de las 24 muestras del músculo GM se obtuvieron un total de 2108 M de lecturas pareadas de 75 pb. El 84,1% (81,8%-86,9%) de los transcritos fueron asignados al genoma de referencia porcino, de los cuales aproximadamente el 23,9% mapearon en más de una localización. Del total de lecturas mapeadas, el 72,4% correspondió a genes anotados, el 80,5% se localizó en regiones exónicas, y sólo el 7,8% en regiones intrónicas. El 11,5% de las lecturas mapearon en regiones intergénicas.

Se identificaron un total de 168 (*EdgeR*) y 90 (*DESeq2*) genes diferencialmente expresados entre los animales bajo restricción y los que no. De éstos, 69 genes fueron identificados en ambos análisis, detectándose 58 y 11 genes cuya expresión era mayor en los grupos AL y RE respectivamente. En la Tabla 1 se muestran los 5 genes más sobre-expresados y sub-expresados al comparar el grupo RE vs AL. Cabe destacar el gen *CD36*, que presentó mayores niveles de expresión en el grupo AL. Este gen codifica una proteína de membrana predominante implicada en el transporte de ácidos grasos en adipocitos, enterocitos y miocitos cardiacos y esqueléticos (Glatz y Luiken, 2016). Por otra parte, el gen *PCK1* presentó un relevante incremento de expresión en el grupo RE. Este gen es clave en la regulación de la gluconeogénesis, ya que la proteína PCK1 interviene en el paso limitante de la vía metabólica que produce glucosa a partir de lactato y otros precursores derivados del ciclo de Krebs (Gómez-Valadés et al., 2008).

La Tabla 2 muestra las rutas y funciones biológicas sobrerrepresentadas en la lista de genes diferencialmente expresados. Entre las rutas metabólicas identificadas cabe destacar la ruta de señalización FoxO, la de AMPK y la de la insulina (*KEGG*, Tabla 2). Dichas rutas están interrelacionadas y juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis energética. Entre los procesos biológicos más representados en el conjunto de genes identificados en este estudio cabe destacar el metabolismo del piruvato, la modificación de lípidos y el transporte de glucosa. Por lo que respecta a las funciones moleculares significativamente representadas conviene resaltar la actividad lipasa, cuyos genes se encuentran sobre-expresados en el grupo AL (Tabla 2).

En conclusión, la restricción alimentaria provoca cambios en la expresión génica que continúan incluso después de que ésta haya cesado; modificándose una serie de rutas metabólicas y genes candidatos entre animales con alimentación restringida vs los alimentados *ad libitum* que pudieran estar determinando a nivel molecular las diferencias entre los perfiles de ácidos grasos de los animales de ambos grupos. Un estudio multivariante de los datos del transcriptoma con los datos fenotípicos relativos al depósito y composición de la grasa en músculo permitirá ir más allá en el conocimiento de los efectos de la alimentación restringida sobre la composición de la grasa en porcino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S. 2015. *Genome Biol.* 11: R106.
- Bindea, G. 2009. *Bioinformatics* 25: 1091-3.
- Daza, A. 2007. *Animal Feed Science and Technology* 138: 61–74.
- Glatz, J.F. 2016. *Biochimie in press.*
- Gómez-Valadés, A.G. 2008. *Diabetes* 57: 2199-210.
- Heyer & Lebret. 2007. *J. Anim. Sci.* 85:769-78
- Huang, D.W. 2009. *Nature Protoc.* 4: 44-57.
- Langmead, B. 2012. *Nature Methods* 9: 357-359.
- Li, H. 2009. *Bioinformatics* 25: 2078-9.
- Love, M. 2014. *Genome Biol.* 15: 550.
- Okonechnikov, K. 2015. *Bioinformatics* 32: 292-4.
- Robinson, M.D. 2010. *Bioinformatics* 26:139-40.
- Trapnell, C. 2009. *Bioinformatics* 25: 1105-11.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2013-48742-C2-1-R y AGL2013-48742-C2-2-R. M. Ballester está financiada con un contrato Ramón y Cajal (RYC-2013-12573) del MINECO. Los autores agradecen a Selección Batallé S.A., y muy especialmente a J. Reixach, haber proporcionado el material animal, y a los técnicos de la granja experimental de porcino y del matadero experimental de IRTA-Monells su colaboración en la fase experimental y la obtención de las muestras biológicas.

Tabla 1. Lista de los 5 genes más sobre-expresados y los 5 genes más sub-expresados entre los grupos AL y RE identificados simultáneamente con los programas DESeq2 y EdgeR.

Ensembl Gene ID	Gen	Log ₂ FC**	EdgeR		DESeq2		
			P-Valor	FDR	Log ₂ FC**	P-Valor	padj
ENSSSCG00000024306	UBE2D2	-2,65	6,63E-05	8,79E-03	-1,18	2,65E-04	1,65E-02
ENSSSCG00000026110	SRPK2	-2,38	1,45E-08	2,30E-05	-1,64	3,73E-08	4,68E-05
ENSSSCG00000026196	FAM13A*	-1,97	3,24E-08	3,61E-05	-1,48	8,65E-08	8,57E-05
ENSSSCG00000030638	CD36*	-1,93	6,57E-04	3,31E-02	-1,06	9,72E-04	2,99E-02
ENSSSCG00000013119	STX3	-1,92	5,21E-06	1,61E-03	-1,37	3,11E-06	1,11E-03
ENSSSCG00000030425	SPHK2*	1,46	4,83E-04	2,84E-02	1,01	8,42E-04	2,73E-02
ENSSSCG00000015541		1,51	4,46E-06	1,55E-03	1,19	9,48E-06	2,04E-03
ENSSSCG00000003148	DBP*	1,58	4,52E-05	7,10E-03	1,17	4,39E-05	5,10E-03
ENSSSCG00000007507	PCK1	1,66	1,26E-03	4,44E-02	1,01	1,43E-03	3,72E-02
ENSSSCG00000011133	PFKFB3	2,08	2,25E-07	1,93E-04	1,47	5,89E-07	3,45E-04

*gen ortólogo humano; **Log₂FC: RE respecto a AL

Tabla 2. Rutas metabólicas, procesos biológicos y funciones moleculares sobre-representadas para los genes diferencialmente expresados en cerdas que han recibido una alimentación restringida vs cerdas alimentadas ad libitum.

GOID	Término GO	Nº Genes	P-valor
KEGG:04152	Ruta de señalización de AMPK	5	5,25E-03
KEGG:04068	Ruta de señalización de FoxO	3	1,85E-02
KEGG:04910	Ruta de señalización de la insulina	3	2,21E-02
GO:0006090	Proceso metabólico del piruvato	5	4,34E-03
GO:0030258	Modificación lipídica	5	1,25E-02
GO:0015758	Transporte de glucosa	3	2,27E-02
GO:0016298	Actividad lipasa	3	1,43E-02

EFFECTS OF FEED RESTRICTION ON SKELETAL MUSCLE TRANSCRIPTOME IN PIGS

ABSTRACT: This study aims to determine changes in the pig skeletal muscle transcriptome profile derived from feed restriction. A total of 24 females belonging to a Duroc commercial line were fattened under two feeding conditions: *ad libitum* (AL) and restricted (RE). At ~150 days of age animals were slaughtered, and transcriptome from *gluteus medius* muscle samples was analysed by RNA-Seq. The comparison of the AL and RE expression profiles by using both *EdgeR* and *DESeq2* programs made possible to identify 168 and 90 differentially expressed (DE) genes, respectively. A total of 69 genes were identified as DE in both analyses, 58 overexpressed in AL and 11 overexpressed in RE. Among the most DE genes it is worth highlighting the *CD36* gene which was overexpressed in AL group and encodes a membrane protein involved in fatty acids transport, or *PCK1*, a key gene in the regulation of gluconeogenesis that was overexpressed in RE animals. The biological processes over-represented in the list of DE genes include metabolism of pyruvate, lipid modification and glucose transport, whereas the main over-represented metabolic pathways were the FoxO, AMPK and insulin signaling pathways, which play a key role in the maintenance of energy homeostasis. Further studies will allow us to associate these transcriptomic changes with the modifications observed in the fatty acid profile observed in animals under feed restriction.

Keywords: Feed restriction, muscle fat deposition, transcriptome, pigs.