

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON ÁCIDO OLEICO SOBRE EL METABOLISMO MUSCULAR EN *BICEPS FEMORIS* DE CERDOS IBÉRICOS EN CRECIMIENTO

Benítez¹, R., Isabel², B., Fernández¹, A., Núñez¹, Y., De Mercado³, E., Gómez Izquierdo³, E., García-Casco¹, J., López-Bote², C. y Óvilo¹, C.

¹ Dpto. de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra. Coruña, km 7,5, Madrid.

² Dpto. Producción Animal, UCM. Ciudad Universitaria, s/n, Madrid

³ Centro de pruebas de porcino ITACYL (Hontalbilla), Segovia.

rmbenitez@inia.es

INTRODUCCIÓN

La composición de los tejidos animales es determinante en la calidad de sus productos y está influenciada por varios factores como son: la dieta, la raza, la edad y el sexo. La raza Ibérica se caracteriza por su alto potencial lipogénico, gran capacidad de desaturación y un característico perfil de ácidos grasos condicionado por su sistema tradicional de producción en Montanera, que conduce a un cambio en el perfil lipídico en el músculo y la grasa con un incremento de ácidos grasos monoinsaturados, principalmente oleico (Ventanas et al., 2008; Barea et al., 2013). En cerdo ibérico el empleo de piensos enriquecidos en ácido oleico puede favorecer la monoinsaturación de los tejidos y emplearse como alternativa al engorde tradicional en Montanera (López-Bote, 1998). Esta modificación de los tejidos puede deberse a acumulación directa de los componentes de la dieta pero también a la modulación de la síntesis endógena mediante cambios en la expresión génica y en la actividad enzimática. En este trabajo se han evaluado los efectos de una dieta suplementada con 6% de girasol alto oleico (HO) y otra basada en carbohidratos como fuente de energía (CH) sobre la composición tisular y parámetros productivos de cerdos Ibéricos en crecimiento temprano. También se ha realizado un estudio comparativo del transcriptoma del músculo *Biceps femoris* mediante secuenciación masiva (RNAseq) entre los animales sometidos a los dos tipos de dieta.

MATERIAL Y METODOS

Animales y registros fenotípicos: Se utilizaron 29 machos castrados Ibéricos Torbiscal, que comenzaron el ensayo con 19,9 kg (SD=3,8 kg) de peso medio y que se mantuvieron en condiciones idénticas de manejo, excepto el tratamiento nutricional con dietas isoenergéticas e isoproteicas incorporando aceite de girasol de alto oleico (HO, n=14) o carbohidratos (CH, n=15) como fuente de energía. Los animales se sacrificaron después de siete días de tratamiento con 24,1 kg (SD=4,5 kg) de peso medio. Para el estudio transcriptómico se utilizaron 6 animales de cada dieta, elegidos de forma equilibrada en pesos, edades y camadas. Se registró el consumo de pienso, la ganancia media de peso y el índice de conversión. Se muestrearon los músculos: *Longissimus dorsi* y *Biceps femoris* y la grasa subcutánea de lomo y bíceps.

Análisis fenotípico: Se determinó el contenido en grasa intramuscular y la composición de ácidos grasos del músculo *B.femoris*, siguiendo el procedimiento descrito por Segura y López-Bote (2014). La influencia de la dieta sobre la composición de ácidos grasos se analizó con un modelo que incluyó dieta como efecto fijo, y box y camada como aleatorios mediante el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (SAS, 2002).

Análisis transcriptómico: Se extrajo ARN total de bíceps de 12 animales (6 HO y 6 CH) con el sistema Ribopure (Ambion). Se generaron librerías que fueron secuenciadas utilizando la plataforma HiSeq2000 (Illumina, Inc.). La calidad de las secuencias fue analizada con la herramienta FastQC, verificando la calidad media de bases por posición, la longitud de las lecturas, porcentaje de cobertura, ambigüedad de bases, contenido en GC y contenido en secuencias sobre representadas.

El mapeo de las lecturas frente al genoma de referencia (Sscrofa10.2) se realizó con la herramienta libre TopHat v.2.1.0 (Trapnell et al., 2012), tras la eliminación de las secuencias de los adaptadores de Illumina utilizando la herramienta Trim_Galore. También se eliminaron aquellas bases que presentaron una calidad inferior a 20 (*Phred score*) y a en su caso, las lecturas que habían quedado reducidas a un tamaño

menor de 40 bases. Para el ensamblado se utilizó Cufflinks v.2.0.2 que emplea el archivo de anotaciones GTF, teniendo en cuenta las posibles alternativas de *splicing* de cada gen, y aporta información sobre la expresión de éste en FPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas). Para confirmar que el mapeo había sido correcto se utilizaron dos herramientas: Samstats y Qualimap. El análisis de expresión diferencial se realizó con la herramienta libre Cuffdiff, después de unir los transcritos ensamblados de todas las muestras en un solo archivo con Cuffmerge, aumentando así la profundidad de secuenciación. Se llevó a cabo un filtrado de los genes diferencialmente expresados (DE) obtenidos de acuerdo con tres criterios (Ayuso et al., 2012), una expresión media mayor de 0.5 FPKM en al menos uno de los grupos, un valor de Fold Change (FC) $\geq 1,5$ y un FDR $<0,1$. El paquete de R CummeRbund fue utilizado para analizar el *output* de Cuffdiff. Se realizó un *clustering* de las muestras para identificar cada uno de los grupos y se comparó la expresión entre las dos dietas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fenotípico: Los parámetros productivos de los animales tras una semana de tratamiento únicamente indicaron efecto de la dieta en el caso del músculo *B. femoris* que presentó un mayor porcentaje de grasa intramuscular en aquellos animales que recibieron la dieta HO (2,39 vs 2,07, $P<0,04$). La composición de los ácidos grasos en el músculo *B. femoris* y en la grasa del bíceps reflejó la composición de la dieta, con mayor cantidad de oleico y MUFA, y menor SFA y PUFA en la dieta HO.

Análisis del transcriptoma: Para cada muestra secuenciada se obtuvo una media entre 60-80 millones de lecturas. Todas las muestras pasaron el control de calidad (FastQC). TopHat/Cufflinks mapeó entre el 78 y el 83 % de lecturas, la mayoría de ellas de forma pareada. Para obtener el número de genes expresados se determinó el valor de FPKM. Se detectaron 14182 genes expresados (de los 29661 genes anotados). La mayoría de ellos (10888) presentó una expresión media o baja, entre 0,5 y 10 FPKM, siendo una pequeña minoría (545) los que expresaron con un valor superior a 1000 FPKM.

Se identificaron 25 genes DE, de los cuales 17 genes estaban sobre expresados en HO y ocho en CH. El rango de los FC en los 17 genes sobre expresados en HO osciló entre 2,3 y 23,5 y entre 1,9 y 11,2 en los sobre expresados en CH. Los genes con mayores diferencias de expresión fueron *ALB* y *APOC3* sobre expresados en HO y el *microRNA143* y *TBXAS1* en CH. Se realizó una interpretación funcional (rutas metabólicas y funciones GO más destacadas) de los 25 genes DE con los softwares IPA y DAVID. Se observó un enriquecimiento de las funciones relacionadas con metabolismo lipídico, bioquímica de pequeñas moléculas, transporte de moléculas, desarrollo celular y muerte, y supervivencia celular. Los cuatro genes citados previamente están relacionados con el metabolismo lipídico en concreto con la síntesis lipídica y el metabolismo y la acumulación de ácidos grasos. Se detectaron también posibles reguladores, como *ATF4*, *PPARGC1A* y *TNF* que podrían regular la expresión de varios genes DE relacionados con esas mismas funciones biológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barea et al. 2013. *Animal* 7: 688-6.
- López-Bote, C. J. 1998. *Meat Science* 26: 121-129.
- Segura, J. & Lopez-Bote, C.J. 2014. *Food Chem.* 15: 145: 821-5
- Trapnell et al. 2012. *Nat. Protoc.* 7(3): 562-78.
- Ventanas et al. 2008. *Animal* 2: 621-630.

Agradecimientos: Trabajo financiado con los proyectos S2013/ABI-2913 MEDGAN-CM y MINECO AGL2013-48121-C3. Agradecemos la colaboración de todo el personal del Centro de pruebas de porcino ITACYL (Hontalbilla) Segovia.

Tabla 1. Interpretación funcional de los 25 genes DE (IPA).

Categories	Functions Annotation	Genes	P-Value
Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry	synthesis of lipid	ALB,APOC3,CYP1A1,INSIG1,NR4A3,PKK4,TBXAS1,VEGFA	2,29E-06
Lipid Metabolism, Molecular Transport	accumulation of triacylglycerol	APOC3,INSIG1,mir-143,PKK4	2,99E-06
Lipid Metabolism, Molecular Transport	concentration of lipid	ALB,APOC3,CYP1A1,INSIG1,PKK2,PKK4,PHGDH,VEGFA	6,98E-06
Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry	fatty acid metabolism	ALB,APOC3,CYP1A1,INSIG1,PKK4,PHGDH,VEGFA	7,56E-06
Cellular Development and Tissue Development	differentiation of connective tissue cells	BMPR1B,INSIG1,mir-143,NR4A3,PKK4,TF,VEGFA	1,66E-05
Lipid Metabolism, Molecular Transport	accumulation of lipid	APOC3,INSIG1,mir-143,PKK4,PHGDH	3,17E-05
Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry	synthesis of fatty acid	ALB,APOC3,INSIG1,PKK4,VEGFA	3,37E-05
Connective Tissue Development and Function	adipogenesis	BMPR1B,mir-143,NR4A3,PKK4	3,58E-05
Nutritional Disease	obesity	APOC3,GPT2,mir-143,NR4A3,PKK4,VEGFA	4,00E-05
Inflammatory Response	inflammation of organ	ALB,CISH,CYP1A1,INSIG1,mir-143,PKK4,PHGDH,TF,VEGFA	4,11E-05
Gene Expression	binding of DNA	ALB,BMPR1B,CISH,CYP1A1,TF,VEGFA	4,30E-05
Cell Death and Survival	necrosis	ALB,APOC3,BMPR1B,CISH,mir-143,NR4A3,PKK2,PHGDH,SESN2,TF,TMEM107,VEGFA	7,80E-05
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	ALB,BMPR1B,CISH,CYP1A1,INSIG1,mir-143,NR4A3,PKK2,PKK4,PHGDH,SESN2,TBXAS1,TF,VEGFA	9,52E-05
Energy Production and Lipid Metabolism	oxidation of lipid	CYP1A1,NR4A3,PKK4,SESN2	1,01E-04

EFFECTS OF DIET SUPPLEMENTATION WITH OLEIC ACID ON MUSCLE METABOLISM IN BICEPS FEMORIS OF GROWING IBERIAN PIGS

ABSTRACT: Tissue composition largely determines the quality of meat and meat products and is influenced by factors as diet, genetic type, age or sex. Diet influences animal body and tissue composition due to direct deposition and to the nutrients effects on metabolism. In this study we evaluated the effects of a diet supplemented with 6% high oleic sunflower (HO) or carbohydrates as an energy source (CH) on the tissue composition and quality traits of growing Iberian pigs. A comparative study of the *Biceps femoris* transcriptome with RNAseq between animals fed with both types of diet was also carried out. Fatty acid composition of animal tissues reflected the diet composition and indicates higher lipogenesis in CH group, as expected. We detected 25 DE genes, some of them with relevant functions in lipid metabolism, small molecule biochemistry, molecular transport, cellular development, inflammatory response and cell death and survival (i.e. *ALB*, *INSIG1*, and *APOC3*). The bioinformatic analysis also allowed to predict potential regulators for the expression differences observed.

Keywords: Iberian pig, RNA-Seq, tissue composition, diet.