

INFLUENCIA DE LA RESTRICCIÓN PROTEICA EN EL TRANSCRIPTOMA DE MÚSCULO DE CERDOS CRUZADOS DURANTE LA FASE DE CRECIMIENTO

Muñoz^{1,2}, M., Fernández-Barroso^{1,2}, M. A., López-García², A., Carballo^{1,2}, C., Nuñez², Y., García-Casco^{1,2}, J.C. y González³, E.

¹INIA, Departamento de Mejora Genética Animal, 28040 Madrid. ²Centro de I+D en Cerdo Ibérico, Zafra (Badajoz). 06300; ³Instituto Universitario de Investigación de Recursos Agrícolas (INURA), Universidad de Extremadura
mariamm@inia.es

INTRODUCCIÓN

Los cerdos pertenecientes a la raza ibérica se caracterizan por tener unos índices bajos de crecimiento, un gran apetito y unos depósitos de grasa superiores a los de otras razas comerciales lo que se asocia con una carne y unos productos derivados curados de una excelente calidad sensorial (Lopez-Bote, 1998). La tendencia dominante de la producción de Ibérico se ha enfocado a la cría de cerdos cruzados Duroc x Ibérico para conseguir un equilibrio entre un mayor crecimiento y rendimiento de canal manteniendo la calidad de la carne y de la grasa.

La norma de calidad del cerdo ibérico (R.D. 4/2014) establece que los individuos deben ser sacrificados con una edad mínima de 10 meses y con un peso mínimo individual de canal de 115 kgs. La problemática radica en que los animales cruzados que se alimentan *ad libitum* pueden alcanzar este peso a los 8 meses de edad, y con ello se complica el poder cumplir la legislación. Una posible solución consistiría en aplicar una restricción proteica durante la fase de crecimiento para disminuir el crecimiento de los animales (Lebret, 2008).

La identificación de genes con una expresión modificada debido a alteraciones en la dieta puede proporcionar un mejor entendimiento de los procesos fisiológicos y bioquímicos que están implicados en el crecimiento y en la deposición de la grasa. El objetivo de este trabajo consiste en analizar el efecto de una dieta baja en proteína en el transcriptoma del músculo *longissimus dorsi* (LD) en cerdos cruzados Duroc x Ibérico a 45 y 90 kg de peso corporal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y dietas. Se seleccionaron 20 animales cruzados Duroc x Ibérico que fueron divididos al alcanzar 25 kg de peso en dos lotes con una dieta de recría diferencial: 1) dieta control (C) con pienso de trigo, cebada y soja formulada según las recomendaciones de FEDNA (2006) consistente en 3.180 kcal/kg de energía (EM), 16,5% de proteína total (PT) y 0,82% de Lys total; 2) dieta baja en proteína BP, de pienso isoenergético respecto al control, pero con un menor nivel de proteína total (11,5% PT). Los piensos se suministraron *ad libitum* durante la recría. Se realizaron dos series de sacrificio, uno a 45 (mitad del periodo de recría) y el segundo a 90 kg (final del periodo de recría). Los cerdos sacrificados a 45 kg de ambas dietas tenían una edad media de sacrificio de 103 ($\pm 0,01$) días y los que se sacrificaron a 90 kg tenían una media de edad de 165 ($\pm 0,08$) y 174 ($\pm 0,08$) días para las dietas C y BP, respectivamente. Por cada una de las categorías de peso se sacrificaron un total de 10 animales, cinco por cada dieta.

Extracción de ARN y secuenciación. Después del sacrificio se cogieron muestras de músculo LD, estas muestras se conservaron en N₂ líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C. Se extrajo el RNA total utilizando el kit de extracción Ribopure High Quality total RNA kit (Ambion, Austin, TX). Se evaluó la integridad del RNA mediante el dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se prepararon librerías de lecturas pareadas para ser secuenciadas en un secuenciador Illumina Hi-Seq 2000 (Fasteris, Plan-les-Quates, Switzerland) con 5 muestras por carril generando lecturas pareadas de un tamaño de 75 pb.

Se evaluó la calidad de las secuencias brutas usando el programa *FastQC* y se eliminaron los adaptadores utilizando *Trim Galore*. Las lecturas filtradas se mapearon contra la última versión disponible del genoma porcino de referencia (Sscrofa11.1) utilizando *TopHat v2.1.0* (Trapnell et al., 2009) mediante el alineamiento previo de las lecturas con la anotación del transcriptoma ENSEMBL (11.1). Después se ensamblaron los transcritos usando el software *Cufflinks v2.2.1* (Trapnell et al., 2012). Dentro de este software, se usó la herramienta *cuffcompare* para clasificar los transcritos.

Análisis de expresión diferencial, clasificación funcional de genes y análisis de redes.

La herramienta *Cuffdiff* se usó para calcular los valores de expresión y llevar a cabo los análisis de expresión diferencial entre las dos dietas a 45 y 90 kg de los genes anotados y las nuevas isoformas. Se filtraron las nuevas isoformas y los genes anotados con una media mínima de expresión de 0,5 FPKM y un \log_2 del *fold change* (FC) de expresión de 1,2. Además, se usó el paquete del entorno R, *q-value* (Storey y Tibshirani, 2003) para ajustar la significación del test múltiple. Finalmente, se consideraron como diferencialmente expresados (DE) aquellos genes con un *p-value* nominal menor de 0,05 y un *q-value* menor de 0,10.

Por último, se hicieron análisis funcionales de los genes diferencialmente expresados mediante análisis de enriquecimiento funcional GO con FatiGO usando la base de datos de *gene ontology* (GO). Además se usó STRING para generar redes y explorar las relaciones entre las proteínas codificadas por los genes DE.

Análisis por RT-qPCR. Se analizó la expresión mediante RT-qPCR de 13 y 12 genes expresados en LD a 45 y 90 kg, respectivamente. La expresión de estos genes se cuantificó mediante el kit SYBR Green Mix (Roche, Basel, Switzerland) en el dispositivo LightCycler480 (Roche, Basel, Switzerland). Se calculó la estabilidad de los genes endógenos *B2M* and *ACTB* mediante el software Genorm (Vandesompele et al., 2002) y se usaron los factores de normalización para llevar a cabo la normalización. Se calcularon las correlaciones de Pearson entre los valores de expresión de los datos de RNA-Seq (FPKM) y los datos normalizados de expresión de la RT-qPCR. Además se estimó el coeficiente de correlación de concordancia (CCC) (Miron et al., 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de eliminar los adaptadores, se obtuvieron un total de 911 y 863 millones de lecturas a 45 y 90 kg, respectivamente. Aproximadamente mapearon contra el genoma de referencia de porcino (Build 11.1) un total de 94,70% de las lecturas a 45 kg y 95,22% a 90 kg. El número total de transcritos ensamblados fue mayor a 45 (115.476) que a 90 kg (101.083). El porcentaje de tipos de transcritos clasificados por Cuffcompare fue similar a 45 y 90 kg, observándose que a 45 kg, el 43,3% de los transcritos eran nuevas isoformas y a 90 kg, un 40,0%. En cuanto al análisis de expresión diferencial a 45 kg se observaron un total de 139 genes e isoformas y 80 nuevas isoformas DE entre los dos tipos de dietas y a 90 kg, se observaron 43 genes e isoformas y 41 nuevas isoformas DE. Se observaron un total de 18 transcritos DE en común en los dos pesos, que representa un 8,22% de los transcritos DE a 45 kg y un 21,43% a 90 kg (Figura 1).

El análisis de enriquecimiento funcional de genes DE en términos GO reveló diferentes procesos biológicos en los dos pesos. Los principales procesos biológicos GO (GO_{BP}) se relacionan con el sistema inmune como defensa en la respuesta a virus (GO: 0051607) o respuesta a interferón de tipo I (GO: 0034340). Estos resultados ya fueron observados en hígado en un trabajo previo con los mismos animales y dietas (Muñoz et al., 2018). Por otro lado, muchos de los términos GO_{BP} observados a 90 kg estaban relacionados con el desarrollo y crecimiento del hueso como la regulación del remodelado del hueso (GO:0046850) o la reabsorción del hueso (GO:0045124) sugiriendo una alteración de rutas relacionadas con el crecimiento. Los resultados de interacción de proteínas realizados con STRING revelaron dos clusters principales de interacciones a 45 kg uno con las proteínas relacionadas con la respuesta inmune. Por otro lado, a 90 kg se detectaron menos interacciones entre las proteínas y los clusters formados tenían menos proteínas que los formados a 45 kg.

Un total de 12 de los 13 genes de los que se midió su expresión mediante RT-qPCR mostraron una correlación positiva significativa entre los datos de expresión del RNAseq y RT-qPCR a 45 kg. Mientras que a 90 kg, se observaron 9 genes con correlación positiva significativa entre los datos medidos con las dos técnicas. Además el CCC estimado fue de 0,949 y 0,847 a 45 y 90 kg, respectivamente. La no validación de alguno de los genes podría deberse a amplificación mediante RT-qPCR de isoformas que no se detectan mediante RNA-seq.

Estos resultados indican que la aplicación de la dieta con restricción en proteína durante el periodo de recría afecta de manera diferente a la expresión de los genes en músculo LD según se analice a mitad o final de la aplicación de la dieta. Mientras que a 45 kg se observa una alteración de genes que codifican para proteínas implicadas en el sistema inmune, a 90 kg, la alteración parece más relacionada con el crecimiento y desarrollo de los individuos.



Figura 1. Genes y nuevas isoformas diferencialmente expresadas en el músculo longissimus dorsi de cerdos cruzados Duroc x Ibérico sacrificados a 45 y 90 kg de peso corporal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lebret, B. 2008. *Animal* 2: 1548-1558.
- López-Bote, C. J. 1998. *Meat Sci.* 49 : 17–27.
- Miron, M. et al. 2006. *BMC Bioinformatics.* Jul 5;7:333
- Muñoz, M et al. 2018 *Proc. World Cong. on Genet. App. Lives. Product. Biology - Growth and Development:* 419
- Storey, J. D. & Tibshirani, R. 2003. *Natl. Acad. Sci.* 100 : 9440–9445.
- Trapnell, C. et al. 2009. *Bioinformatics* 25 : 1105–1111.
- Trapnell, C. et al. 2012. *Nat. Protoc.* 7: 562–578.
- Vandesompele, J. et al. 2002. *Genome Biol.* 3: 34–1.

Agradecimientos: Este trabajo está financiado por el proyecto RTA-2013- 00063-C01 del Instituto de Investigaciones Agrarias y Alimentarias (INIA).

INFLUENCE OF A LOW PROTEIN DIET IN LONGISSIMUS DORSI TRANSCRIPTOME DURING THE GROWING PERIOD OF IBERIAN CROSSBRED PIGS

ABSTRACT: Iberian crossbred pigs raise the minimum carcass weight before the age contemplated by the current Iberian Quality Standard (RD 4/2014) as a consequence of their higher growing rate. Protein restriction during growing period could diminish this growth rate reducing the feeding costs. The effect of protein restriction on the transcriptome of muscle longissimus dorsi was analyzed in order to identify gene networks and pathways modified by this restriction, in the middle (45 kg) and at the end (90kg) of growing period. A total of 219 and 84 differentially expressed genes and isoforms were identified in RNA samples of longissimus dorsi at 45 and 90 kg, respectively. The GO enrichment analyses revealed a total of 134 GO terms enriched with DE genes at 45 kg related mainly with immune system and 14 GO terms at 90 kg involved in growth and development of bone and muscles. These results indicate a differential effect of protein restriction on longissimus dorsi transcriptome depending of the growth stage.

Keywords: protein restriction; transcriptome, longissimus dorsi, Duroc x Iberian crossbred