

NIVEL ENERGÉTICO DE LA DIETA DE PRECEBO EN CERDOS IBÉRICOS: EFECTOS SOBRE EL TRANSCRIPTOMA MUSCULAR

A. López-García¹, Y. Núñez, L. Calvo, R. Benítez, J. Ballesteros, J. Segura, C. López-Bote,
C. Óvilo

¹INIA, Ctra. La Coruña km 7.5, 28040, Madrid, España; adrian.lopez@inia.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la selección genética aplicada en granjas porcinas ha experimentado un gran desarrollo, permitiendo mejoras sustanciales, principalmente en caracteres de crecimiento magro. Pero esta selección normalmente lleva correlacionada una respuesta negativa sobre otros caracteres como la deposición de grasa intramuscular (GIM). Este carácter ha recibido poca atención en la industria porcina mundial, centrada en la producción de carne fresca. Por otro lado, la GIM adquiere gran importancia en casos particulares en que se presta atención a la calidad de los productos, como en la producción de cerdo ibérico, que es una raza con alta tendencia al engrasamiento y con alto porcentaje de GIM. Sin embargo, actualmente la producción de cerdo ibérico se basa mayoritariamente en el cruzamiento con la raza duroc, lo que conduce a un menor y más heterogéneo contenido en GIM en los productos curados, como ocurre en otras razas comerciales.

Los avances en biotecnología y los nuevos conocimientos sobre expresión génica han abierto una nueva vía para conocer la base genética y potencialmente modular el contenido en GIM. En concreto, varios estudios han puesto de manifiesto que la expresión génica puede ser modificada a través de la composición de la dieta (Hamill *et al.*, 2013; Kolditz *et al.*, 2008). El diseño de diferentes estrategias nutricionales junto a la aplicación de técnicas selección genética sería de ayuda para conseguir este objetivo de selección. Por esta razón en el proyecto PIGOMIC se ha diseñado una serie de experimentos encaminados a mejorar la comprensión del transcriptoma del cerdo y los cambios metabólicos que se producen al modificar diferentes aspectos nutricionales de su dieta (nivel energético, perfil de ácidos grasos e índice glicémico (IG)) en las distintas fases de vida de los animales. En este trabajo se presentan los resultados de los análisis de expresión génica diferencial entre animales ibéricos cruzados alimentados con distinto nivel energético en el periodo de crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el diseño experimental participaron 300 animales, que fueron divididos aleatoriamente en tres grupos con programas de alimentación diferentes durante las fases de recría, precebo y cebo, basados en el uso de dos piensos isoproteicos pero con distinto nivel energético causado por un cambio en el contenido de grasa. El primer grupo fue alimentado con una dieta de bajo nivel energético (B) durante las tres fases de crecimiento (BBB); el segundo, con una dieta de alta energía (A) en cebo (BBA); y el tercero, con una dieta de alta energía en precebo y en cebo (BAA). Del total, se sacrificaron a final de precebo (60 kg de peso vivo) 10 animales (5 machos y 5 hembras) de dieta B (grasa = 4.29%, E.N. = 2300 cal/kg) y 10 de dieta A (grasa = 6.93%, E.N. = 2450 cal/kg) durante esta fase, para observar las diferencias de expresión antes del cebo. El fondo genético de los animales era el mismo y todos se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales a lo largo del experimento.

En el sacrificio se midieron parámetros de rendimiento de canal y calidad y composición de carne, así como medidas de porcentaje de GIM en diferentes regiones de los músculos *Longissimus dorsi* (craneal, medio y caudal) y *Biceps femoris* (craneal, caudal y dorsal). También se tomaron muestras de *Biceps femoris* de las 10 hembras, 5 de cada grupo, para el análisis transcriptómico.

Para la extracción de RNA se utilizó el sistema Ribopure (Ambion) a partir de 50-150 mg de muestra. Los RNA obtenidos se evaluaron mediante cuantificación con Nanodrop y análisis con bioanalizador Agilent. La secuenciación se llevó a cabo a través de servicio externo (CRG, Barcelona). El procesamiento y análisis de las secuencias se llevó a cabo con un protocolo Tuxedo estándar (Trapnell *et al.*, 2012). Para el mapeo de lecturas se usó el genoma de referencia porcino *Sscrofa 11.1*. Para el análisis de los genes diferencialmente expresados (DE) se utilizó el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Qiagen).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los análisis de rasgos fenotípicos no se encontraron diferencias entre tratamientos excepto en el rendimiento de canal, que resultó ser significativamente menor en el grupo de dieta B en precebo (grupo A: 77.49 ± 0.74 ; grupo B: 75.11 ± 0.74 ; p -value = 0.037).

El experimento de RNA-seq permitió generar una media de 40,4 millones de lecturas pareadas por muestra, con un promedio de 95.43 % de secuencias mapeadas sobre el genoma *Sscrofa 11.1*.

Respecto al análisis de expresión diferencial, se identificaron 61 genes diferencialmente expresados (q -value < 0.10, FC > 1.5), 41 sobreexpresados y 20 subexpresados en el grupo de dieta B. Algunos de estos genes están implicados en desarrollo muscular (*CDKN1A*, *SPP1*, *IGFBP5*) y otros están vinculados a funciones de metabolismo de carbohidratos o lípidos y producción de energía.

El panel de genes sobreexpresados en el grupo B incluye algunos interesantes como *SERPINE1*, responsable de la síntesis de la proteína PAI-1 (un aumento en su expresión se asocia a acumulación de triglicéridos y colesterol) (López-Legarrea *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2004), *PLIN1* (asociado a almacenamiento de lípidos en adipocitos, protegiéndolos de la beta-oxidación) (Saha *et al.*, 2004), *ADIPOQ* (cuya deficiencia resulta en carencia de adiponectina, implicada en regulación de niveles de glucosa y degradación de ácidos grasos) (Yamauchi *et al.*, 2002) o *PFKFB3* (implicado en metabolismo de fructosa-2,6-dP). Por otro lado, genes como *B3GALT1* (implicado en biosíntesis de glucolípidos y glucoproteínas a partir de oligosacáridos), o *PLIN5* (represor de la lipólisis) (Wang *et al.*, 2011), aparecen sobreexpresados en el grupo A.

La interpretación funcional del conjunto de genes realizada con la herramienta de análisis downstream del IPA reveló un enriquecimiento en el conjunto de genes problema de funciones relacionadas con desarrollo celular, crecimiento y proliferación celular, mantenimiento y funcionamiento celular, supervivencia y muerte celular y función y desarrollo del músculo esquelético ($8.9e-04 > p$ -value > $9.2e-11$). Además, se han podido predecir 14 redes causales (*Causal Networks*) significativamente inhibidas ($4.4e-04 > p$ -value > $2.6e-14$) y 16 significativamente activadas ($9.9e-07 > p$ -value > $1.3e-11$), algunas de ellas relacionadas con funciones de desarrollo y función del músculo esquelético (inhibidas: HSPB6, XDH; activadas: AEBP1, RAPGEF3).

Las condiciones en las que se ha llevado a cabo el estudio, es decir, en granja comercial y con piensos de composición similar aunque con ligeras diferencias en el aporte energético, pueden haber dificultado la detección de efectos más intensos a nivel fenotípico y de transcriptoma. Aun así, los resultados reflejan una clara influencia de la dieta en el transcriptoma, añadiendo que algunos de los genes DE observados participan en procesos biológicos acordes a este cambio en aporte lipídico y energético. Es posible que estas modificaciones en los niveles de expresión reflejen una respuesta adaptativa del músculo ante distintos niveles de suministro de energía en la dieta, lo que concordaría con la falta de efectos fenotípicos a nivel de deposición grasa.

Con este experimento se revela información sobre rutas metabólicas que podrían verse afectadas con cambios en la dieta. Nuevos diseños usando piensos con balances energéticos más diferenciados permitiría observar con mayor seguridad si estos patrones de expresión se mantienen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hamill, R.M., Aslan, O., Mullen, A.M., O'Doherty, J.V., McBryan, J., Morris, D.G., & Sweeney, T., 2013. BMC genomics, 14(1), 453. • Kolditz, C.I., Paboeuf, G., Borthaire, M., Esquerré, D., SanCristobal, M., Lefèvre, F., & Médale, F., 2008. BMC genomics, 9(1), 506. • López-Legarrea, P., Mansego, M.L., Zulet, M.A., & Martínez, J.A., 2013. J Clin Biochem Nutr., 53(3): 139-144. • Ma, L.J., Mao, S.L., Taylor, K.L., Kanjanabuch, T., Guan, Y., Zhang, Y., (...) & Vaughan, D.E., 2004. Diabetes, 53(2), 336-346. • Saha P.K., Kojima H., Martinez-Botas J., Sunehag A.L., Chan L., 2004. J Biol Chem., 20:279(34):35150-8. • Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., (...) & Pachter, L., 2012. Nature protocols, 7(3), 562. • Wang H., Bell, M., Sreenivasan, U.,

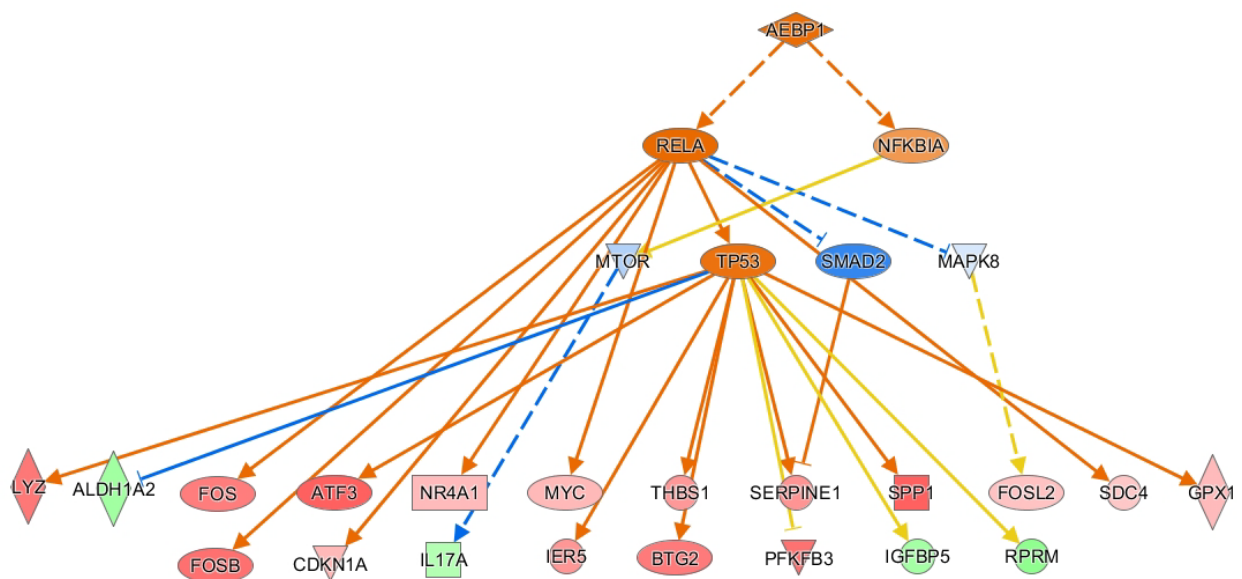
Hu, H., Liu, J., Dalen, K., (...) & Sztalryd, C., 2011. J Biol Chem., 286(18):15707-15. • Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y., Ito Y., Waki H., Uchida S., (...) & Kadowaki, T., 2002. Nat Med., 8(11):1288-95.

Agradecimientos: Proyecto financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, CDTI FEDER Interconnecta 2015.

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados relacionados con funciones de interés. Se representa el grupo de dieta donde aparecen sobreexpresados (Up), el valor de Fold Change (FC) y el p-value. Los genes con asterisco participan en ambos tipos de funciones.

Morfología de células musculares y masa muscular				Síntesis y absorción de lípidos			
Genes	Up	FC	p-value	Genes	Up	FC	p-value
ALDH1A2*	A	1.86	1.50e-04	ADIPOQ*	B	2.24	5.00e-05
CDKN1A	B	1.84	5.00e-05	ANGPTL4	A	1.94	5.00e-05
GPX1	B	1.81	4.00e-04	B3GALT1	A	4.53	7.50e-04
IGFBP5	A	1.83	5.00e-05	FOS	B	3.14	5.00e-05
IL17A*	A	1.66	5.50e-04	GDNF	B	6.03	5.00e-05
MYC	B	1.84	3.50e-04	MAP3K14	B	1.55	7.00e-04
SERPINE1*	B	2.57	5.00e-05	NR4A1	B	1.81	1.50e-04
SPP1	B	4.03	5.00e-05	PLIN5	A	1.90	1.50e-04
THBS1*	B	2.46	5.00e-05	ST8SIA2	B	1.83	5.00e-05

Figura 1. Causal Network del regulador AEBP1 generada por IPA (Qiagen).



© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

ENERGY CONTENT IN IBERIAN PIGS GROWING DIET: EFFECT ON MUSCLE TRANSCRIPTOME

ABSTRACT: Iberian pig production makes a particular case in swine genetic selection goals, since it focuses on meat quality, which makes intramuscular fat (IMF) a very important selection trait. But the tendency to crossbreeding with Duroc causes heterogeneity in IMF. New knowledge in transcriptomics has opened another way to modulate and understand the genetic basis of IMF content, as gene expression may be modified via diet composition. In this experiment we studied the influence of growing diet energy level on the muscle transcriptome of Iberian crossbred pigs. 20 animals (10 males and 10 females) were randomly arranged in 2 diet groups, with high (A) and low (B) energy supply. Animals were

slaughtered at the end of growing period, and carcass performance and meat quality and composition measures were taken. Samples from *Biceps femoris* were also taken from the 10 females for RNA-seq analysis. Only carcass yield was different between diets. Transcriptomic analysis showed 61 differentially expressed (DE) genes, some of them related with lipid metabolism (*ADIPOQ*, *SERPINE1*) and with skeletal muscle development (*CDKN1A*, *SPP1*). In spite of the slight difference in feed composition, this results point to an important effect of diet on transcriptome, and provides information regarding relevant genes and regulators functionally modulated by diet.

Keywords: iberian pig, intramuscular fat, transcriptome, rna-seq