

IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA EFICIENCIA ALIMENTARIA EN PORCINO MEDIANTE UN ENFOQUE INTEGRATIVO APLICADO AL TRANSCRIPTOMA DE HÍGADO Y DUODENO

Ramayo-Caldas¹, Y., Ballester¹, M., González-Rodríguez¹, O., Sánchez¹, J.P., Revilla², Soler³, M.J., Torrallardona⁴, D. y Quintanilla¹, R.

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

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

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

⁴Nutrición Animal, IRTA-Mas de Bover, Constantí, 43120 Tarragona.

yliaxis.ramayo@irta.cat

INTRODUCCIÓN

La eficiencia alimentaria actualmente es uno de los factores más importantes en la producción porcina, debido a su incidencia en la cuenta de resultados de las explotaciones y en el impacto ambiental. En este contexto se enmarcan los objetivos del proyecto europeo ECO-FCE—*A whole systems approach to optimising feed efficiency and reducing the ecological footprint of monogastrics*. El objetivo principal de este estudio, llevado a cabo dentro del proyecto ECO-FCE, es identificar genes candidatos asociados a caracteres relacionados con la eficiencia alimentaria en porcino mediante un enfoque holístico que combine información fenotípica y del transcriptoma de dos tejidos particularmente relevantes en los procesos de uso de nutrientes alimentarios, como son el hígado y el duodeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el marco del proyecto ECO-FCE se llevó a cabo un ensayo con cerdos blancos para contrastar la eficiencia alimentaria bajo diferentes estrategias de alimentación. El material animal consistió en 288 animales (144 machos enteros y 144 hembras) seleccionados de 25 camadas. Durante la fase de engorde en la granja experimental de porcino de IRTA-Monells se controló el peso y el espesor de grasa dorsal, y se registró la ingesta individual de alimento mediante comederos automáticos. Se analizó la eficiencia alimentaria de estos animales mediante distintos criterios, entre ellos la ingesta de alimento residual (RFI—*Residual Feed Intake*), y la ingesta y ganancia de peso residuales (RIG—*Residual intake and body weight gain*) de cada individuo.

El análisis del transcriptoma de hígado y duodeno mediante RNA-Seq se llevó a cabo en 80 animales seleccionados de modo divergente para RFI dentro de sexo*estrategia alimentaria, e incluyendo también algunos animales con fenotipos intermedios. El mRNA total de las 160 muestras se extrajo usando el kit RiboPure (Ambion, Austin, TX). Se verificó la pureza e integridad del mRNA en un dispositivo Bioanalyzer-2100 y se envió al Centro Nacional de Análisis Genómico para su secuenciación. La preparación de librerías para RNA-Seq se realizó con TruSeq (Illumina Inc), y la secuenciación se realizó en una plataforma HiSeq2000, obteniéndose ~50-60M de lecturas de 2x75 bp por muestra. Se utilizaron herramientas de mapeo STAR/2.5.2a (Dobin et al., 2013) para alinear las secuencias con el genoma de referencia porcino *Sscrofa10.2*. La cuantificación fue realizada por HTSeq (Ander et al., 2015), y la anotación con *Sscrofa.10.2.86*.

Posteriormente se analizaron los niveles de expresión del transcriptoma de hígado y duodeno conjuntamente con los datos fenotípicos mediante una combinación de análisis multivariantes y de análisis de redes de co-expresión génica tal como se detalla:

- 1— Para cada tejido (hígado y duodeno), se identificaron módulos de genes co-expresados mediante el procedimiento de redes ponderadas de co-expresión génica utilizando para ello la librería WGCNA (Langfelder y Horvath, 2008);
- 2— Se seleccionaron aquellos módulos de genes asociados a los fenotipos de eficiencia alimentaria (RFI y RIG) a partir de la correlación entre el primer componente principal (*module eigengene*) y los fenotipos;
- 3— Para resaltar los genes más relevantes dentro de cada módulo, se realizaron análisis multifactoriales dentro de los módulos seleccionados, así como análisis de correlación canónica regularizada (Cao et al., 2016);
- 4— Se realizó una comparación entre los genes identificados en hígado y duodeno, para identificar aquellos cuya expresión se asocia a la eficiencia en ambos tejidos.

Finalmente las listas de genes identificados se utilizaron para identificar procesos y vías metabólicas sobre-representadas mediante análisis de ontología de genes (GO) utilizando *ClueGO Cytoscape plug-in* (Bindea et al., 2009). El umbral para considerar significativa la sobre-representación de los términos GO se estableció mediante la corrección por contraste múltiple de Benjamini and Hochberg ($p_{adj} \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de redes de co-expresión mostraron parámetros topológicos similares entre las redes de hígado y duodeno, si bien las redes inferidas en el transcriptoma de duodeno se ajustaron mejor a la topología libre de escala a la que suelen ajustarse las redes biológicas. La clusterización de los genes en base a su conectividad permitió identificar en hígado y duodeno un total de 23 y 25 módulos (clústers) de genes con un patrón de expresión similar. El análisis de asociación de estos módulos con distintos fenotipos productivos evidenció que cuatro de estos módulos de co-expresión, uno de hígado y tres de duodeno, estaban significativamente asociados con los fenotipos de eficiencia alimentaria RFI y/o RIG (Tabla 1). Vale la pena destacar que en todos los módulos de ambos tejidos la correlación con estos fenotipos tuvo siempre patrones opuestos, de acuerdo con lo descrito para estos caracteres en vacuno por Pamela et al. (2015).

Los análisis multifactoriales y la comparativa de los módulos de co-expresión asociados a la eficiencia mostraron que 12 de los genes eran comunes en los dos tejidos (hígado y duodeno). Así mismo, un análisis más pormenorizado de los genes contenidos dentro de los módulos reveló que para algunos de estos genes ya se habían descrito asociaciones con la eficiencia alimentaria o caracteres relacionados en otras especies, en estudios tanto de genómica estructural como funcional. Los genes más relevantes se detallan en la Tabla 2. Por ejemplo, el gen *SGK1* se identificó como un gen candidato asociado al comportamiento alimentario en cerdos (Ngoc et al., 2013) y también se observó que mostraba una expresión diferencial en pollos con fenotipos extremos para eficiencia alimentaria (Bottje et al., 2012; Lee et al., 2015). Asimismo, para los genes candidatos identificados tanto en hígado como en duodeno *HSPH1*, *DNAJA1* y *STIP1* también se habían observado como diferencialmente expresados en el transcriptoma del bazo de vacunos con fenotipos extremos para la eficiencia alimentaria (Lindholm-Perry et al., 2016).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Anders et al. 2015. *Bioinformatics* 31:166. • Bindea et al. 2009. *Bioinformatics* 25:1091. • Botte et al. 2012. *Poult. Sci.* 91:2576. • Cao et al. 2016. *PLoS ONE* 11:e0160169. • Connor et al. 2010. *Funct. Integr. Genomics* 10:39. • Dobin et al. 2013. *Bioinformatics* 29:15. • Graczyk et al. 2016. *AFZ* 19:3. • Keogh et al. 2013. *PLoS ONE* 11: e0149373. • Kern et al. 2017. *Anim. Genet.* 48:90. • Langfelder & Horvath. 2008. *BMC bioinformatics* 9: 559. • Lee et al. 2012. *Anat. Cell Biol.* 45:160. • Lee et al. 2015. *Mol. Genet. Genomics* 290:1673. • Lindemans et al. 2013. *Nature* 528: 560. • Lindholm-Perry et al. 2016. *A. Front. Genet.* 7:127. • Mignon-Grasteau et al. 2016. *PLoS One* 10: e0135488. • Ngoc et al. 2013. *PLoS ONE* 8:e71509. • Pamela et al. 2015. *BMC Genomics* 6:1073. • Serão et al. 2013a. *BMC Genetics* 14:94. • Serão et al. 2013b. *PLoS ONE* 8:e78530. • Xu et al. 2016. *BMC Genomics* 17: 594. • Zhou. 2015. PhD Thesis.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto ECO-FCE (FP7-KBBE-2012-6). Los autores agradecen 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. Número de genes, valores de correlación (p-valores) de los módulos significativamente asociados con RFI o RIG en hígado o duodeno.

Módulos	# Genes	RFI	RIG
Higado_M1	444	0,38 (0,02)	-0,35 (0,03)
Duodeno_M1	41	0,34 (0,04)	-0,30 (0,07)
Duodeno_M2	126	0,32 (0,04)	-0,27 (0,10)
Duodeno_M3	37	-0,33 (0,05)	0,30 (0,07)

Tabla 2. Lista de los genes más relevantes contenidos en los módulos de co-expresión significativamente asociados con los fenotipos de eficiencia alimentaria, indicando el tejido al que pertenece el módulo y funciones o asociaciones descritas en otros estudios.

Gene ID	Tejido	Función o asociación previamente descrita: Fenotipo / Especie / Tipo de asociación	Referencia
<i>GADD45G</i>	Hígado	Eficiencia alimentaria / bovina / transcriptoma	<i>Alexandre et al. 2015</i>
<i>MAP3K8</i>	Hígado	Eficiencia alimentaria / bovina / GWAS	<i>Serão et al. 2013a</i>
<i>NFKBI</i>	Hígado	Eficiencia alimentaria / aviar / RNA-Seq	<i>Zhou 2015</i>
<i>SGK1</i>	Hígado	Comportamiento alimenticio / porcina / GWAS Eficiencia alimentaria / aviar / transcriptoma Eficiencia alimentaria / aviar / transcriptoma	<i>Ngoc Do et al. 2013</i> <i>Bottje et al. 2012</i> <i>Lee et al. 2015</i>
<i>IL22</i>	Duodeno	Regeneración epitelial de células intestinales	<i>Lindeman et al. 2015</i>
<i>SIN3A</i>	Duodeno	Consumo y crecimiento / bovina / GWAs	<i>Serão et al. 2013b</i>
<i>NQO1</i>	Duodeno	Eficiencia alimentaria / bovina / transcriptoma	<i>Kern et al. 2017</i>
<i>CSMD2</i>	Duodeno	Eficiencia alimentaria / bovina / GWAS	<i>Serão et al. 2013a</i>
<i>CDC37LI</i>	Duodeno	Eficiencia alimentaria / aviar / SNPs	<i>Graczyk et al. 2016</i>
<i>PSAT1</i>	Duodeno	Eficiencia alimentaria / bovina/ transcriptoma	<i>Connor et al. 2010</i>
<i>LECT2</i>	Duodeno	RFI / aviar / GWAs y transcriptoma	<i>Xu et al. 2016</i>
<i>HSPH1</i>	Hígado & Duodeno	Eficiencia alimentaria / bovina / transcriptoma Restricción alimentaria / bovina / transcriptoma	<i>Lindholm-Perry et al. 2016</i> <i>Keogh et al. 2016.</i>
<i>BAG3</i>	Hígado & Duodeno	Eficiencia digestiva & microbiota / aviar / QTL Motilidad intestinal / ratones / transcriptoma	<i>Mignon-Grasteau et al. 2015</i> <i>Lee et al. 2012</i>
<i>DNAJA1</i>	Hígado & Duodeno	Eficiencia alimentaria / bovina/ transcriptoma	<i>Lindholm-Perry et al. 2016</i>
<i>STIP1</i>	Hígado & Duodeno	Eficiencia alimentaria / bovina/ transcriptoma	<i>Lindholm-Perry et al. 2016</i>

INTEGRATIVE APPROACH APPLIED TO LIVER AND DUODENUM TRANSCRIPTOME HIGHLIGHTS CANDIDATE GENES ASSOCIATED WITH EFFICIENCY-RELATED TRAITS IN PIGS

ABSTRACT: The main goal of this study was to identify candidate genes associated with efficiency-related traits in pigs through an integrative approach. Liver and duodenum transcriptome of 80 individuals divergently selected for residual feed intake (RFI) was analysed by RNA-Seq. Expression data was explored through a combination of weighted gene co-expression network (WGCNA) and multivariable methods combining transcriptomic and phenotypic information. Genes were clustered according to their connectivity, and a total of 23 (liver) and 25 (duodenum) modules were identified. Four of these co-expressed gene modules (one in liver and three in duodenum) were significantly correlated with feed efficiency traits. Modules showed opposite correlation patterns with RFI and RIG in both tissues. The intra-module analysis revealed interesting tissue-specific candidate genes as well as 12 common genes associated with efficiency-related traits in pigs, previously reported in other species.

Keywords: feed efficiency, pigs, integrative approach, RNA-Seq, liver, duodenum