

EFFECTO DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO SOBRE LA EXPRESIÓN MUSCULAR DE miRNAs EN PORCINO

Mármol-Sánchez^{1,*}, E., Quintanilla², R., Cardoso^{1,3}, T.F., Tibau⁴, J., González-Rodríguez², O., González-Prendes¹, R., Ballester², M. y Amills¹, M.

¹Departament de Genètica Animal, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193. ²Genètica y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimon, Caldes de Montbui, 08140. ³Fundación CAPES, Ministerio de Educación de Brasil, Brasilia - DF 70040-020, Brasil. ⁴IRTA-Monells, Finca Camps i Armet s/n 17121 Monells.
emilio.marmol@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas (≈ 22 nucleótidos) de RNA no codificante capaces de unirse a la región 3'UTR de ciertos RNA mensajeros (mRNAs) y catalizar su degradación o bien inhibir su traducción. En humano, se han obtenido sólidas evidencias de que los miRNAs cumplen un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico (Flowers et al., 2013). Aunque en las diferentes especies domésticas se hayan establecido catálogos de numerosos miRNAs expresados en distintos tejidos, se sabe muy poco acerca de su función o de la identidad de los genes a los cuales regulan. Concretamente, en porcino se ha caracterizado el catálogo de miRNAs del músculo *longissimus dorsi*, hígado y tejido adiposo (Chen et al., 2011), de los adipocitos intramusculares (Guo et al., 2012) y se ha analizado la expresión diferencial de miRNAs en diversas razas porcinas (Li et al., 2012). De entre los resultados obtenidos, se ha demostrado que la expresión del miRNA-122 disminuye en cerdos alimentados con una dieta rica en colesterol (Cirera et al., 2010), y que miR-130b y miR-374b están implicados en la regulación del metabolismo lipídico del lechón (Pan et al., 2013). Resultados obtenidos en la especie humana (Heilbronn et al., 2005; Leonardson et al., 2010) y en ratón (Wolfrum et al. 2000) evidencian que la ingestión de alimento desencadena un cambio de la expresión génica en múltiples órganos y tejidos, y entre ellos, el tejido muscular esquelético. Así pues, en el presente trabajo se ha llevado a cabo un experimento consistente en analizar la expresión muscular de miRNAs en cerdos Duroc, sometidos a dos tipos de alimentación y sacrificados en diferentes puntos temporales pre y post-ingestión, con el objetivo de identificar los miRNAs que puedan tener una función reguladora del metabolismo muscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas y diseño experimental: Se analizó la expresión muscular de miRNAs en muestras de músculo *gluteus medius* de 48 cerdas Duroc de 120 días de edad distribuidas homogéneamente en 4 grupos y sacrificadas en diferentes puntos temporales:

- 1) Animales alimentados *ad libitum* (AL) y sacrificados en ayunas (T0),
- 2) Animales alimentados con una ración restringida en la primera fase del engorde (AR) y sacrificados en ayunas (T0),
- 3) Animales alimentados *ad libitum* (AL) y sacrificados a las 5 horas de haber comido (T1) y
- 4) Animales alimentados *ad libitum* (AL) y sacrificados a las 7 horas de haber comido (T2).

Utilizando el preparado comercial RiboPure RNA Purification kit (Ambion) se extrajo la fracción total de RNA a partir de muestras de músculo conservadas en RNA-later a -80°C. El kit comercial Agilent Small RNA Chip se empleó para determinar el porcentaje de la fracción de RNA pequeño no-codificante (sncRNA) respecto al total de RNA extraído. Para elaborar librerías a partir de la fracción de sncRNA de cada muestra, se precisó un porcentaje mínimo del 0,5% de miRNAs sobre el RNA total, y un valor RIN superior a 7. Se prepararon alícuotas con una cantidad mínima de 0,2-2 µg de RNA en un volumen de 50 µl de agua libre de RNAasas, con un cociente de absorbancias de A260/280 de 1,8-2 (Nanodrop ND-1000), y se conservaron a -80°C. Las muestras fueron secuenciadas por la empresa Sistemas Genómicos S.L. (<https://www.sistemasgenomicos.com>) mediante un aparato Hi Seq 2500 Sequencer (Illumina).

Análisis bioinformático: Los adaptadores fueron eliminados de las secuencias mediante el software *Cutadapt* (Martin, 2011), descartando las lecturas con un tamaño inferior a 15 o superior a 30 nucleótidos y obteniéndose un número de lecturas de \approx 10 millones para cada muestra secuenciada. Aproximadamente el 75% de las lecturas fueron mapeadas y anotadas de acuerdo al genoma de referencia porcino Sscrofa10.2, utilizando el software *Bowtie1* (Langmead et al., 2009) y teniendo en cuenta las especificaciones de lecturas cortas de miRNAs (Tam et al., 2015; Ziemann et al., 2016). El número de lecturas mapeadas en el genoma porcino se estimó mediante el software *FeatureCounts* (Liao et al., 2014). Con la finalidad de detectar miRNAs que presentaran expresión diferencial (ED), se compararon los grupos AL-T0 vs AL-T1, AL-T0 vs AL-T2, AL-T1 vs AL-T2 y AL-T0 vs AR-T0 utilizando los paquetes bioinformáticos *DESeq2* y *EdgeR* (Love et al., 2014; Robinson et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la comparación AL-T0 vs AL-T1, se encontró ED sólo con *EdgeR* y para un único miRNA (ssc-miR-215, Tabla 1). En cambio, para la comparación AL-T0 vs AL-T2 los programas *EdgeR* y *DESeq2* detectaron, de manera consistente, ED para siete miRNAs (Tabla 1, indicados en negrilla). Además, *DESeq2* determinó la existencia de ED para 2 miRNAs adicionales: ssc-miR-215 y ssc-miR-7857-3p. No se hallaron diferencias de expresión significativas para AL-T1 vs AL-T2 y AL-T0 vs AR-T0. El número de miRNAs que mostraron ED estadísticamente significativa fue sustancialmente menor en comparación con los datos de ED de mRNAs previamente analizados en la misma población mediante protocolos bioinformáticos semejantes (135 mRNAs con ED en AL-T0 vs AL-T2). Ello es consistente con el hecho de que el rango de expresión de un miRNA en general es bastante más limitado que el de un mRNA, puesto que un mismo miRNA puede regular a centenares de mRNAs diana. De este modo, cambios sutiles en la expresión de determinados miRNAs pueden tener un gran efecto sobre la expresión génica global.

Estudios recientes han demostrado que determinados miRNAs tienen una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis metabólica del organismo, regulando la respuesta fisiológica a variaciones en el aporte de nutrientes (Hartig et al., 2015). Por ejemplo, los miRNAs controlan la formación de islotes β de Langerhans y la secreción de insulina estimulada por la glucosa, el metabolismo del colesterol y otros lípidos en el hígado, y el almacenamiento de energía en el tejido adiposo (Singh et al., 2012). De hecho, algunos miRNAs incluidos en la Tabla 1 podrían tener una función biológica relacionada con la absorción de nutrientes y el metabolismo: por ejemplo, en humano el miRNA-339 está asociado con la respuesta al estrés oxidativo (Saddic et al., 2015). Ello concuerda con el análisis de ED de genes mRNA realizado en la misma población experimental Duroc (Figueiredo et al., 2016), donde se observó la existencia de ED para loci relacionados con dicho proceso biológico. Por otra parte, el mRNA de la proteína G6PC, que cataliza la formación de glucosa libre ante estados de hipoglucemia, ha sido identificado como diana de miR-339 (Chen et al., 2014), lo que podría explicar la disminución en su expresión en T2 ante la demanda de energía celular. Asimismo, el miRNA-7 afecta a la expresión del receptor *IGF-1R* (Wang et al., 2014), que tiene un papel fundamental en el proceso de absorción de la glucosa mediado por la insulina (Clemmons, 2004). En definitiva, nuestros resultados indican que el aporte de nutrientes al músculo esquelético determina un cambio en la expresión de distintos miRNAs, y un objetivo de futuro consistiría en determinar a qué genes regulan con la finalidad de comprender mejor su función biológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Flowers, E. et al. 2013. *Metabolism*. 62(1): 12-20.
- Chen, C. et al. 2011. *BMC Genomics*. 12: 448.
- Guo, Y. et al. 2012. *PLoS One*. 7(9): e45410.
- Li, H.Y. et al. 2012. *Anim Genet*. 43(6): 704-13.
- Cirera, S. et al. 2010. *Comp Med*. 60(2): 136-41.
- Pan, S. et al. 2013. *Br J Nutr*. 109(10): 1731-8.
- Heilbronn, N.K. et al. 2005. *Am J Clin Nutr*. 81(1): 69-73.
- Leonardson, A.S. et al. 2010. *Hum Mol Genet*. 19(1): 159-69.
- Wolfrum, C. et al. 2000. *Biochemistry*. 39(6): 1469-74.
- Martin M. 2011. *EMBnet.Journal*. 17(1), pp. 10-12.
- Langmead, B. et al. 2009. *Genome Biology*. 10:R25.
- Tam, S. et al. 2015. *Brief in Bioinf*. 16(6), 950–963.
- Ziemann, M. et al. 2016. *RNA*. 22:1-19.
- Liao, Y. et al. 2014. *Bioinformatics*. 30(7):923-30.
- Love, M.I. et al. 2014. *Genome Biology*. 15:550.
- Robinson, M.D. et al. 2010. *Bioinformatics*. 26, pp. -1.
- Hartig, S.M. et al. 2015. *Trends Endocrinol*

Metab. 26(12): 733-745. • Singh, P.K. et al. 2012. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 9(6): 334-344. • Saddic, L.A. et al. 2015. Physion Genom. 47: 455-462. • Cardoso, T.F. et al. 2016. XVIII Reunión Nacional de Mejora Genética Animal, Valencia, España. • Chen, Y. et al. 2014. Liver Int. 34(7): 976-990. • Wang, B. et al. 2014. Diagn Pathol. 9:211. • Clemmons, D.R. 2004. Horm Res. 62(1): 77-82.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con los proyectos AGL2013-48742-C2-1-R y AGL2013-48742-C2-2-R concedidos por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Los autores agradecen el apoyo del MINECO por la acreditación del Centre de Recerca en Agrigenòmica como *Centro de Excelencia Severo Ochoa 2016-2019* (SEV-2015-0533). Nuestro reconocimiento a la empresa Batallé por su apoyo en la generación del material animal.

Tabla 1. miRNAs diferencialmente expresados (*EdgeR* y *DESeq2*) en cerdos alimentados *ad libitum* y sacrificados en ayunas (AL-T0) vs cerdos alimentados *ad libitum* y sacrificados 5 horas (AL-T1) o 7 horas (AL-T2) después de haber comido.

EdgeR T0 vs T1					
miRNA	log ₂ FC	P-valor	FDR	Expr. media-T0 (counts per million)	Expr. media-T1 (counts per million)
ssc-miR-215	2,98	2,41E-05	0,0057	0,76	3,61

DESeq2 T0 vs T2					
miRNA	log ₂ FC	P-valor	FDR	Expr. media-T0 (counts per million)	Expr. media-T2 (counts per million)
ssc-miR-1285	-1,54	2,08E-06	0,0006	549,43	72,70
ssc-miR-339	-0,87	1,05E-04	0,015	7,23	3,21
ssc-miR-421-5p	1,02	1,75E-04	0,0166	5,19	10,71
ssc-miR-374a-3p	0,83	3,80E-04	0,0266	103,01	171,28
ssc-miR-129a-3p	-1,06	5,44E-04	0,0266	31,14	8,59
ssc-miR-296-3p	-0,80	5,61E-04	0,0266	29,39	13,29
ssc-miR-215	1,06	8,97E-04	0,0304	0,47	1,52
ssc-miR-7	0,80	9,64E-04	0,0304	180,40	304,72
ssc-miR-7857-3p	-0,90	1,91E-03	0,0492	4,67	1,63

EFFECT OF FOOD INTAKE ON THE MUSCULAR EXPRESSION OF miRNAs IN PIGS

Abstract: The aim of this study was to analyze microRNA muscular expression in pigs in response to food intake and different dietary conditions. We analyzed 48 Duroc pigs divided in 4 groups: pigs fed *ad libitum* and slaughtered under fasting conditions (AL-T0), pigs fed *ad libitum* and slaughtered 5 hours after last food intake (AL-T1), pigs fed *ad libitum* and slaughtered 7 hours after last food intake (AL-T2) and pigs fed with restricted feeding during the first fattening phase and slaughtered under fasting conditions (AR-T0). We used a comparative bioinformatics pipeline to determine differential expression over groups and discovered ssc-miR-215 to be differentially expressed between AL-T0 vs AL-T1, while seven miRNAs (ssc-miR-1285, ssc-miR-339, ssc-miR-421-5p, ssc-miR-374a-3p, ssc-miR-129a-3p, ssc-miR-296-5p and ssc-miR-7) showed differential expression between AL-T0 vs AL-T2 ((FDR < 0.05, |log₂FC| > 0.6). These results may indicate that food intake can decisively influence muscle microRNA expression as a regulatory mechanism that may contribute to fine-tune the physiological adaptation to nutrient supply.

Key words: RNA-sequencing, microRNA, food intake.