

Informe final publicable de proyecto

?Análisis de la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos en hígado de cerdos Pampa Rocha bajo tratamientos nutricionales con diferente contenido lipídico?

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172575

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2025

MONTENEGRO SILVA, María Del Carmen (Responsable Técnico - Científico)

BALEMIAN MEGHDESSIAN, Nariné (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA (Institución Proponente) \\

FACULTAD DE VETERINARIA. FUNDACIÓN MARCO PODESTÁ

Resumen del proyecto

El cerdo Pampa Rocha es uno de los recursos zoogenéticos de Uruguay y representa un modelo biológico de gran valor para estudiar la deposición de lípidos, debido a su tendencia al engrasamiento y su relevancia económica para los pequeños productores. Este proyecto tuvo como objetivo principal analizar la expresión génica en el hígado, principalmente relacionada al metabolismo lipídico en lechones de esta raza. Se comparó una dieta control (tratamiento T0) con una dieta con mayor contenido lipídico (tratamiento T15), aportada por la inclusión de afrechillo de arroz. Mediante secuenciación del ARN (RNAseq) en seis muestras de hígado (tres por tratamiento), se identificaron 290 genes con expresión diferencial (DEGs). El análisis funcional reveló modificaciones en diferentes vías biológicas. Respecto al metabolismo lipídico, se observó una modulación de la vía de señalización PPAR, donde los genes SCD y FABP3 resultaron subexpresados en T15, lo cual sugiere un impacto en el transporte y la utilización de ácidos grasos. El análisis de enriquecimiento también reveló vías centrales relacionadas al metabolismo de la insulina, identificándose como subexpresados en T15 a los genes PPP1R3B y PPP1R3C, implicados en la regulación del metabolismo del glucógeno y la resistencia a la insulina. Por otro lado, la sobreexpresión de genes que codifican metalotioneínas, tales como MT1A y MT2B, y términos relacionados con la detoxificación de iones en T15, junto con la vía de metabolismo del retinol, sugieren un aumento en el estrés celular o la toxicidad metabólica como consecuencia del tratamiento con mayor contenido lipídico. Estos resultados permiten profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares a nivel hepático que se ven alterados por la dieta en el cerdo Pampa Rocha, con implicaciones para la eficiencia productiva, la calidad de la carne y el estudio de enfermedades asociadas al metabolismo.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Genética

Palabras clave: expresión génica / metabolismo lipídico / nutrición /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El contenido y los perfiles de ácidos grasos (AG) en el tejido adiposo de las especies productivas inciden sobre las características nutricionales, sensoriales y tecnológicas de la carne (Wood et al., 2008). Los AG presentes en la carne y en el tejido adiposo del cerdo pueden provenir de la síntesis endógena, la cual puede resultar afectada por la composición de la dieta. Los AG provenientes de la alimentación son absorbidos directamente del intestino y almacenados en el músculo y en el tejido adiposo con pocas variaciones (Benítez et al., 2015). Por esto, los cambios en el contenido y la fuente de lípidos aportados por la dieta se consideran una de las formas más efectivas de modificar la composición del tejido adiposo de los cerdos y asegurar la producción de carne que cumpla con la calidad requerida desde el punto de vista nutricional, sensorial y tecnológico (Tikk et al., 2007; Benítez et al., 2015).

A pesar de la importancia de las características mencionadas en salud humana y producción animal, los mecanismos involucrados en la acumulación diferencial de lípidos en el tejido adiposo siguen siendo inciertos. Estudiar estos mecanismos en el cerdo es relevante debido a que su carne es una de las más producidas y consumidas a nivel mundial (USDA, 2021). Estos estudios también podrían aportar información sobre ciertas enfermedades humanas relacionadas con el metabolismo energético, como por ejemplo la obesidad y la diabetes, en las cuales esta especie es uno de los principales organismos modelo. Esto se debe a las similitudes genómicas, anatómicas, fisiológicas y metabólicas entre ambas especies (Koopmans y Schuurman, 2015; Dziegiej et al., 2018).

Las modificaciones en los lípidos de la dieta pueden incidir sobre la expresión de genes asociados al

metabolismo lipídico (Benítez et al., 2015). Analizar los cambios en la expresión de ARNm de estos genes en diferentes tejidos y en respuesta a cambios en la alimentación, constituye una aproximación para profundizar en el conocimiento de estos genes y sus funciones. Estas investigaciones también pueden conducir a una predicción más precisa de la respuesta del cerdo a la inclusión de lípidos en su alimentación (Kellner et al., 2017).

Las investigaciones sobre el metabolismo lipídico y su relación con la alimentación en cerdos incluyen la comparación entre dietas con diferente composición de AG y el uso de distintas fuentes de lípidos (Duran-Montge' et al., 2009; Benítez et al., 2015). Los resultados difieren de acuerdo a las razas utilizadas, sin embargo, en general se observa que el agregado de lípidos en la dieta de esta especie produce una supresión de la expresión de genes lipogénicos y aumenta la expresión los genes relacionados con la lipólisis (Tous et al., 2012; Kellner et al., 2017).

El hígado es uno de los tejidos de interés para evaluar la expresión de genes que intervienen en el metabolismo lipídico y su relación con la dieta. Se trata de un órgano crítico en el metabolismo de los carbohidratos, AG y aminoácidos, además de realizar la mayor parte de la síntesis, descomposición, transformación, excreción y otros procesos metabólicos (Huang et al., 2019). A pesar de que en los cerdos el tejido adiposo es el sitio principal de síntesis de lípidos, el hígado desempeña un rol crucial en el metabolismo lipídico mediante las funciones de transporte, oxidación de AG, síntesis de colesterol y fosfolípidos, y cetogénesis (Reiter et al., 2007; Duran-Montge' et al., 2009; Kellner et al., 2017). Por otro lado, el hígado en conjunto con el músculo y el tejido adiposo, son metabólicamente claves para la eficiencia alimentaria, parámetro productivo fundamental en la industria porcina. Las estrategias que buscan mejorar este parámetro tienen como objetivo reducir los costos de alimentación, factor que representa del 60 al 70% de los costos totales en la producción porcina. Estudios realizados mediante microarray y secuenciación del ARN (RNAseq) en estos tejidos han identificado vías metabólicas específicas para cada tejido, así como vías compartidas, que contribuyen a las diferencias en la eficiencia alimentaria (Gondret et al., 2017; Vigors et al., 2019). Una de las técnicas experimentales más utilizadas para evaluar los niveles de expresión de ARNm de genes específicos es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR). Esta técnica puede proporcionar la medición simultánea de la expresión de genes de interés, a través de la cuantificación relativa de los ARNm de dichos genes en relación a genes de referencia (housekeeping), utilizados para excluir variaciones generales en los niveles de transcripción (Nygard et al., 2007). La qPCR se ha empleado para estudiar el metabolismo lipídico en diferentes órganos y tejidos del cerdo (Reiter et al., 2007; Li et al., 2011), entre ellos el hígado. Dentro de los genes de interés analizados en el hígado de cerdos mediante ésta técnica pueden citarse a los siguientes: PPAR-?, SREBP-1, ACACA, FASN, SCD, LIPE, LPL, ACLY, ATGL, PRKAG-1 y G0S2, entre otros (Tous et al., 2012; Benítez et al., 2015; Heckmann et al., 2013; Kellner et al., 2017). Una alternativa es la técnica de RNA-seq, la cual ha emergido a partir del desarrollo de las tecnologías de la secuenciación, como una herramienta de alto rendimiento fundamental para la investigación biológica, que permite el análisis de transcriptomas completos (Wang et al., 2009). A diferencia de la técnica de qPCR, que requiere el conocimiento previo de los genes específicos a evaluar, RNA-seq permite la cuantificación simultánea de la expresión de todos los genes que se expresan en un determinado momento y bajo condiciones específicas (Kukurba y Montgomery, 2015). Un ejemplo de aplicación en modelos animales es el estudio de la modificación en la expresión génica en función de la dieta. El análisis del transcriptoma mediante RNA-seq en cerdos ha facilitado una comprensión profunda de cómo los nutrientes y compuestos bioactivos de los alimentos modulan la homeostasis metabólica, la respuesta inmune o la eficiencia productiva a nivel molecular (Fanalli et al., 2023; Lyu et al., 2022). Esta técnica permite además el descubrimiento de novo de transcritos, la identificación de nuevas isoformas de splicing y la caracterización de moléculas de ARN no codificantes (ncRNA), ofreciendo así una visión integral y completa de los mecanismos genéticos subyacentes a la regulación de la expresión en respuesta a diferentes situaciones biológicas (Kukurba y Montgomery, 2015).

En nuestro país, los estudios que evaluaron dietas con diferente composición lipídica en cerdos se han centrado principalmente en su efecto sobre el comportamiento productivo y la calidad de la carne (Capra et al., 2007a, 2007b, 2011). Asimismo se investigó el efecto de dietas con diferente contenido lipídico sobre el comportamiento productivo, calidad de la carne, carcasa y expresión génica en el músculo esquelético de lechones Pampa Rocha. En dicho trabajo el estudio de la expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica RNAseq, detectándose genes con expresión diferencial entre los tratamientos utilizados (dietas con diferente contenido lipídico) (Montenegro, 2019, Tesis de Doctorado). El análisis funcional de estos genes evidenció su participación en diferentes procesos y vías metabólicas, destacándose los relacionados con la calidad de la carne (metabolismo de lípidos y carbohidratos, desarrollo del músculo esquelético e interacción receptor-matriz extracelular). Se identificaron genes candidatos para calidad de carne, metabolismo energético y desarrollo muscular, tales como PDK4, TNC, KERA, GPER1, ABHD6, NR4A2, NR4A3, FOS, ATF3 y GOS2 (Montenegro et al., 2019).

Como se mencionó con anterioridad, la alimentación incide sobre los costos de producción, afectando en gran medida la rentabilidad de los productores (Bauza, 2000). En Uruguay el número de productores y explotaciones de cría porcina ha disminuido drásticamente en las últimas décadas, siendo los productores de menores recursos quienes mayormente abandonan la actividad debido a la escasa rentabilidad del sector. En este sentido, el estudio de la inclusión de diferentes alimentos para cerdos es relevante en función de la realidad de la industria porcina en Uruguay, ya que una de las estrategias desarrolladas por los pequeños y medianos productores porcinos para disminuir los costos de producción consiste en el uso de alimentos más económicos (Bell et al., 2014). Un alimento que puede considerarse por su bajo costo y sus adecuadas características nutricionales es el afrechillo de arroz, ya que posee una elevada concentración de energía y cantidades adecuadas de proteína. Posee además un alto contenido de AG insaturados, representados principalmente por el ácido linoleico (Bauza, 2000; Cozzolino, 2000).

Otro factor que puede repercutir sobre la deposición de tejido adiposo y el perfil de AG es la raza (Wood et al., 2008). En Uruguay, el cerdo Pampa Rocha es la única raza local de cerdos (Vadell, 2008). Esta raza puede resultar un modelo interesante para el estudio del efecto de diferentes dietas sobre el metabolismo lipídico, ya que presenta una tendencia al engrasamiento, la cual puede modificarse entre otros factores, a través del manejo de la alimentación (Barlocco, 2011). Las investigaciones realizadas en cerdos de razas locales sugieren que la alta deposición de lípidos que generalmente caracteriza a estos recursos los convierte en un modelo ideal para indagar en los mecanismos involucrados en la deposición de lípidos en esta especie (Wang et al., 2021), así como para comparar estos procesos con los que ocurren en las razas comerciales (Huang et al., 2019; Poklukar et al., 2021).

En función de los antecedentes, el proyecto plantea estudiar la expresión de genes específicos relacionados con el metabolismo de los lípidos en el hígado de lechones Pampa Rocha, alimentados en base a dietas con diferente contenido lipídico, aportado por la inclusión de afrechillo de arroz en uno de los tratamientos. El desarrollo de este trabajo permitirá profundizar en los mecanismos moleculares asociados al metabolismo de los lípidos que se ven afectados por la dieta en cerdos y mejorar la comprensión de rasgos complejos como la deposición de lípidos en esta especie.

Dada la utilización del cerdo Pampa Rocha como modelo en esta investigación, también se espera que los resultados obtenidos aporten a la caracterización de la única raza de cerdos criollos de nuestro país, utilizada principalmente por productores de escasos recursos. Finalmente, y considerando la importancia del cerdo como organismo modelo en enfermedades humanas, se espera que la información generada pueda relacionarse con estudios de metabolismo lipídico a nivel hepático realizados en humanos.

Objetivo general:

- Analizar la expresión hepática de los genes del metabolismo lipídico PPAR-?, SREBP-1, ACC, FASN, SCD, LIPE, LPL, ACLY, ATGL, PRKAG-1 y G0S2 en lechones Pampa Rocha bajo tratamientos nutricionales de diferente contenido lipídico.

Objetivos específicos:

- Extraer ARN total a partir de muestras de hígado de lechones Pampa Rocha.
- Diseñar primers específicos para cada ARNm de los genes a evaluar.
- Optimizar la técnica de PCR en tiempo real para la amplificación del ADN copia (ADNc) de los genes a evaluar.
- Realizar la cuantificación relativa mediante qPCR de la expresión de los genes de interés en el hígado de lechones Pampa Rocha alimentados con dietas con diferente contenido lipídico.
- *Analizar la expresión diferencial en muestras de hígado de cerdos Pampa Rocha, frente a dietas con diferentes contenido lipídico, mediante secuenciación del ARN.
- Identificar los mecanismos moleculares y las vías metabólicas que puedan resultar afectados por el nivel de expresión de los genes de interés, y su posible incidencia en producción animal.

Metodología/Diseño del estudio

Muestras: se trabajó con muestras de hígado de cerdos machos de raza Pampa Rocha obtenidas previamente (Montenegro, 2019, Tesis de Doctorado). El ensayo en el cual se obtuvieron las muestras se realizó en la Unidad de Producción de Cerdos del Centro Regional Sur (Estación Experimental, FAgro, Udelar), ubicada Progreso (Canelones, Uruguay), entre julio y noviembre de 2014. Se utilizaron 16 cerdos Pampa Rocha (12 machos enteros y cuatro hembras) desde el destete (42 días) y hasta los 77 días de edad. Los animales se alojaron en boxes con una superficie de 0,52 m²/animal, en un sistema de cama profunda de paja de trigo de 50 cm de profundidad, disponiendo de comederos grupales y bebederos tipo chupete con libre acceso al agua. Las muestras de hígado se obtuvieron de los 12 machos al momento de la faena (seis por tratamiento). Estas muestras se almacenaron en solución de RNALater® (Applied Biosystems) a -20°, en el banco de tejidos de la Unidad Académica de Genética de Facultad de Veterinaria (FVet, Udelar).

Extracción de ARN: la homogenización de las muestras se realizó en un equipo FastPrep-24TM (MP Biomedicals). La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando un kit de extracción comercial RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Alemania), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó por medición de la absorbancia a 260 nm y la pureza a partir de las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 nm en un equipo DeNovix DS-11. El ARN extraído se conservó a -80°C hasta su procesamiento.

Control de calidad del ARN: para evaluar la integridad del ARN extraído, se enviaron a Novogene Corporation Inc (California, Sacramento Sequencing Center, USA), alícuotas de cada muestra en tubos GenTegra® LLC, a temperatura ambiente. La medición se realizó determinando los valores de integridad del ARN (RIN, RNA integrity number), en un equipo Agilent 2100.

Síntesis de ADNc: para cada muestra se sintetizó ADN copia (ADNc) mediante transcripción inversa utilizando un kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), con primers oligo-dT (Thermo Fisher Scientific) y 1 µg añadido como molde. El ADNc se diluyó a una concentración final de 10 ng/ µL en agua libre de RNAsas y se almacenó a -20 °C.

Diseño de primers: en base a las posiciones genómicas de cada uno de los genes de interés a estudiar (PPAR-?, SREBP-1, ACACA, FASN, SCD, LIPE, LPL, ACLY, ATGL, PRKAG-1 y G0S2), se diseñarán juegos de

primers específicos para cada gen, utilizando la versión Sscrofa11.1 del genoma suino, disponible en https://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index

Para el diseño se utilizó la herramienta online Primer-BLAST, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Los primers se diseñaron abarcando uniones exón-exón para minimizar la potencial amplificación de ADN genómico. Como referencia se sintetizaron primers para los genes GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), RPL4 (ribosomal protein L4) y HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), utilizando las secuencias diseñadas por de Nygard et al., 2007. Los primers se sintetizaron en Macrogen (Corea del Sur), a través del servicio prestado por Tanirel (Montevideo, Uruguay).

Secuenciación del ARN y control primario de calidad: para la secuenciación del ARN, se utilizaron las seis muestras de mejor calidad y rendimiento de ARN (tres control y tres mayor contenido lipídico). La preparación de las librerías y la secuenciación fue realizada por Novogene Corporation Inc.. El ARN mensajero se purificó a partir del ARN total, mediante microesferas magnéticas poli-T unidas a oligonucleótidos. Tras la fragmentación, se sintetizó la primera cadena de ADNc mediante cebadores hexaméricos aleatorios, seguido de la síntesis de la segunda cadena de ADNc. La biblioteca se obtuvo tras la reparación de los extremos, el agregado de colas A, unión de adaptadores, la selección de tamaño, amplificación y purificación. La biblioteca se analizó con Qubit y PCR en tiempo real para su cuantificación, y con un bioanalizador para la detección de la distribución de tamaño. La secuenciación se llevó a cabo en una plataforma Illumina NovaSeq (paired-end 150 pb). Para garantizar la fiabilidad de los datos, se realizó un control de calidad en cada paso del procedimiento (análisis de muestras de ARN, construcción de la biblioteca y secuenciación).

El control de calidad primario de las secuencias (reads) se llevó a cabo posterior al filtrado de adaptadores y de secuencias de baja calidad ($N > 10\%$ y Q Score ≤ 5), e incluyó la determinación de los valores Phred (Quality Score o Q-score) Q20 y Q30 (recuento de bases del valor Phred > 20 o 30 /recuento total de bases), la eficacia (lecturas limpias/lecturas sin procesar)*100 %), la tasa de error y el contenido GC (recuento de bases G y C/total de bases).

Determinación de la expresión diferencial: para la eliminación posterior de adaptadores se utilizó el software Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Una vez depuradas, las secuencias se mapearon sobre el genoma de referencia porcino Sus scrofa 11.1, utilizando la función featureCounts del paquete Rsubread, v.2.18.0 (Liao et al., 2019), en el entorno R (v.4.4.2). Para el análisis de la expresión diferencial de genes se implementó un modelo lineal generalizado (GLM) utilizando el paquete DESeq2 v.1.44.0 (Love et al., 2014). Se consideraron con expresión diferencial aquellos genes que cumplieron con un cambio de expresión absoluto Fold Change (FC) mayor/igual a 2 ($|\log_{2}FC| \geq 1$) y un valor p menor a 0,01. Para seguir un criterio más estricto, también se consideraron los genes con (FC) mayor/igual 2 y un valor padj (FDR) menor 0,01.

Análisis funcional de la expresión diferencial: los genes de expresión diferencial (DEGs) se clasificaron en procesos biológicos (BP), funciones moleculares (MF) y componentes celulares (CC) utilizando la clasificación de Ontología Génica (GO, <https://geneontology.org/>). Asimismo se identificaron vías significativas según la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG, Kanehisa M y Goto S, 2000). Este análisis se realizó para todos los DEGs utilizando el software en línea DAVID v2021 (Sherman et al., 2022; Huang et al., 2009). Los DEGs se introdujeron utilizando la identificación oficial de la base Ensembl <https://www.ensembl.org/index.html>

Se consideraron los términos y las vías con valores de EASE Score Threshold $\geq 0,1$.

Resultados, análisis y discusión

Extracción de ARN y evaluación de integridad.

La medición de la concentración y pureza, a través de las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280, se realizaron en un espectrofotómetro DeNovix DS-11® (Laboratorio de la Unidad Académica de Genética - FVet). La integridad del ARN se evaluó mediante los valores de integridad del ARN (RIN, RNA integrity number), en un equipo Agilent 2100 (servicio Novogene Corporation Inc, California, Sacramento Sequencing Center, USA). Los resultados se incluyen en la Tabla 1 del Anexo 1.

Las figuras 1 y 2 (Anexo 1) muestran, a modo de ejemplo, los gráficos de la evaluación de la relación entre las bandas ribosomales 18 y 28S, para la determinación del RIN (RNA Integrity Number), obtenidas por el equipo Bioanalyzer 2100, para las muestras 889 (T0) y 891 (T15).

Retrotranscripción - obtención de ADNc

En la Tabla 2 (Anexo 1) se observan los datos de medición de ADN copia (ADNc), obtenidos después de la transcripción reversa de las muestras de ARN extraídas a partir de las 12 muestras de hígado de lechones Pampa Rocha. La medición se realizó en un espectrofotómetro DeNovix DS-11®.

Primers diseñados: se detallan en la Tabla 3 del Anexo 1.

Análisis de la expresión génica diferencial mediante secuenciación del ARN (RNAseq):

- Calidad de los datos primarios de secuenciación: con base a los valores de RIN (Tabla 1), se secuenciaron tres muestras por tratamiento: 871, 889 y 890 para T0, y 891, 924 y 994 para T15.

La preparación de las librerías y la secuenciación fue realizada por la empresa Novogene Corporation Inc (Sacramento Sequencing Center, USA). El ARN mensajero se purificó a partir del ARN total, mediante microesferas magnéticas poli-T unidas a oligonucleótidos. Tras la fragmentación, se sintetizó la primera cadena de ADNc mediante cebadores hexaméricos aleatorios, seguido de la síntesis de la segunda cadena de ADNc. La biblioteca se obtuvo tras la reparación de los extremos, el agregado de colas A, unión de adaptadores, la selección de tamaño, amplificación y purificación. La biblioteca se analizó con Qubit y PCR en tiempo real para su cuantificación, y con un bioanalizador para la detección de la distribución de tamaño. La secuenciación se llevó a cabo en una plataforma Illumina NovaSeq (paired-end 150 pb). Para garantizar la fiabilidad de los datos, se realizó un control de calidad en cada paso del procedimiento (análisis de muestras de ARN, construcción de la biblioteca y secuenciación).

El análisis de control de calidad de las secuencias (reads), posteriores al filtrado de adaptadores y secuencias de baja calidad (N > 10% y Q Score <= 5), mostró resultados consistentemente altos. El porcentaje de bases con valores Q-score superior a 30 (Q30) fue en todos los casos superior al 89%, validando la fidelidad de los datos obtenidos. Estos resultados se resumen en la Tabla 4 (Anexo 1), donde además del número de reads, figuran la eficacia, la tasa de error de base, los valores Q20, Q30 y el contenido GC de cada muestra analizada.

Las figuras 3 y 4 (Anexo 1) muestran a modo de ejemplo los gráficos de distribución de calidad de las secuencias para las muestras 889 (A4) del tratamiento control T0 y 891 (A6) del tratamiento T15 (dieta con mayor contenido lipídico). En las figuras 5 y 6 (Anexo 1) se observan las gráficas de contenido GC de dichas muestras; y en las figuras 7 y 8 (Anexo 1), se visualiza la composición de los datos crudos, en las mismas muestras.

Determinación de la expresión diferencial: se identificaron un total de 14873 transcritos sobre el genoma de referencia de *Sus scrofa*, (Sscrofa11.1, disponible en http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index).

Para la identificación de DEGs se aplicó como criterio valores de FC>2 ($|log2FC|>1$) y $p<0.01$. De esta manera se identificaron 290 secuencias con expresión diferencial, de las cuales 264 corresponden a genes

identificados y 27 secuencias cuyos identificadores no fueron asignados a genes. En la Tabla 5 (Anexo 2), se detalla la lista de genes que cumplen con este criterio.

De las 290 secuencias con expresión diferencial, 167 resultaron sobre expresados (up regulated) en T15 (sub expresados en T0), y 123 sub expresados (down regulated) en T15 (por lo tanto sobre expresados en T0).

Al considerar un criterio estadístico más estricto con valores de padj (FDR)<0.01, se identificaron 34 secuencias genes con expresión diferencial (Tabla 5, Anexo 2).

En diez de los 11 genes planteados inicialmente, no se encontró variación en la expresión (PPAR-?, SREBP-1, ACACA, FASN, LIPE, LPL, ACLY, ATGL, PRKAG-1 y GOS2). Si presentó expresión diferencial el gen SCD, que codifica la enzima esteroil-CoA-desaturasa (steroyl-CoA-desaturase, ENSSSCG00000010554), estando sub expresado en T15 ($\log_{2}FC = -1.413$, p -valor = 0.000 y padj $p = 0.002$).

Los genes planteados como referencia (housekeeping), GAPDH, RPL4 y HPRT1, no presentaron expresión diferencial, lo cual valida su utilización en el estudio.

- Análisis funcional de la expresión diferencial: para el análisis de enriquecimiento se empleó el programa de acceso libre DAVID (Sherman et al., 2022; Huang et al., 2009), utilizando las categorías GO y las vías KEGG. En una primera aproximación se incluyeron:

- a) 264 genes con identificación conocida y $p < 0.01$
- b) 33 genes con identificación conocida y $\text{padj} < 0.01$.

En ambos casos se excluyeron las secuencias cuyos identificadores no fueron asignados a genes.

a) Análisis funcional para 264 genes ($p < 0.01$): para procesos biológicos (GOTERM_BP) se identificaron 73 procesos (Tabla 6, Anexo 3). Los tres primeros términos, ordenados por el número de genes involucrados fueron: 1) cell differentiation (13 genes), 2) protein phosphorylation (12 genes) y 3) extracellular matrix organization (12 genes).

Respecto a vías relacionadas con el desarrollo y el metabolismo de los lípidos, figuran los términos: fat cell differentiation (4 genes), cholesterol biosynthetic process (4 genes), fatty acid transport (4 genes), long-chain fatty acid metabolic process (3 genes), acetyl-CoA metabolic process (3 genes) y regulation of lipid biosynthetic process (3 genes).

En el caso de componentes celulares (GOTERM_CC), se encontraron 18 términos (Tabla 7, Anexo 3). Los tres primeros fueron: cytoplasm (65 genes), extracellular region (54 genes) y cytosol (47 genes).

El enriquecimiento en estos términos se vincula con los mecanismos de síntesis, degradación y regulación de los lípidos a nivel hepático.

En cuanto a la categoría funciones moleculares (GOTERM_MF), se identificaron 39 términos (Tabla 8, Anexo 3). Los tres primeros fueron: metal ion binding (33 genes), ATP binding (25 genes) e identical protein binding (25 genes). Los términos vinculados al desarrollo y metabolismo de lípidos fueron: lipid binding (6 genes) y fatty acid binding (4 genes).

Respecto al análisis de vías KEGG estadísticamente enriquecidas en el listado, se identificaron 142 genes (53.8%) y 23 vías (Tabla 9, Anexo 3). Las tres primeras fueron: Metabolic pathways (37 genes), PI3K-Akt signaling pathway (15 genes) y Cytoskeleton in muscle cells (13 genes). Se destacan a continuación las vías directamente relacionadas con el metabolismo de los lípidos: PPAR signaling pathway (9), Steroid hormone biosynthesis (7), Retinol metabolism (7), Linoleic acid metabolism (5), Arachidonic acid metabolism (5) y Glycerolipid metabolism (4).

Esta categoría es una de las más informativas y muestra en este caso un enfoque en vías de señalización metabólica, vías asociadas al metabolismo de la insulina (Insulin signaling pathway e Insulin resistance) y el metabolismo de los lípidos.

b) Análisis funcional para 33 genes ($p<0.01$): el uso de este criterio más estricto permite visualizar las categorías más confiables del listado de genes.

Para la base de datos procesos biológicos (GOTERM_BP), se obtuvieron 14 términos (Tabla 10 - Anexo 3) asociados al metabolismo central. Los siguientes términos indican que los DEGs incluidos están involucrados en la regulación del metabolismo lipídico y del colesterol: Cholesterol homeostasis, Triglyceride homeostasis y cholesterol efflux. También figuran procesos metabólicos interconectados, y que podrían indicar una modificación en el metabolismo del glucógeno, tales como: glycogen metabolic process, regulation of glycogen biosynthetic process y glycogen biosynthetic process.

En la categoría componentes celulares (GOTERM_CC), se hallaron tres términos (Tabla 11 - Anexo 3): cytoplasm, transcription factor TFIID complex y protein phosphatase type 1 complex.

Para la categoría funciones moleculares (GOTERM_MF), los términos resultantes fueron (Tabla 12 - Anexo 3): iron ion binding, protein phosphatase 1 binding y glycogen binding.

En el caso de las vías KEGG_PATHWAY, se asociaron a cuatro términos (Tabla 13 - Anexo 3) centrados en el balance energético: Metabolic pathways, Insulin signaling pathway, AMPK signaling pathway e Insulin resistance. La aparición conjunta de estas vías sugiere que los 33 DEGs más confiables del experimento, están implicados en la regulación energética, y el metabolismo de glúcidos y lípidos.

Para profundizar en el estudio de los DEGs bajo el criterio $p_{adj} < 0.01$, se llevó a cabo el análisis funcional diferenciado los DEGs sub expresados (15 genes) de los sobre expresados (19 genes) en el tratamiento T15. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Para los genes sub expresados en T15 (log2 FC negativos), resultaron asociados tres términos para la categoría GOTERM_BP: regulation of glycogen biosynthetic process (con 2 genes: PPP1R3B y PPP1R3C), RNA polymerase II preinitiation complex assembly (2 genes: A0A8W4FA63 y A0A8W4FLZ6) y glycogen metabolic process (2 genes: PPP1R3B y PPP1R3C).

Respecto a la categoría GOTERM_MF, los conceptos asociados fueron: glycogen binding y protein phosphatase 1 binding. En ambos casos los genes que los integran son PPP1R3B y PPP1R3C.

Para este mismo subgrupo de DEGs, resultaron dos importantes vías KEGG: PPAR signaling pathway (2 genes: FABP3 y SCD) e Insulin resistance (2 genes: PPP1R3B y PPP1R3C)

En los genes sobre expresados en T15 (log2 FC positivos), se relacionaron diferentes términos GOTERM_BP, vinculados a la detoxificación de iones: detoxification of copper ion, cellular response to zinc ion, cellular response to cadmium ion, cellular response to copper ion, intracellular zinc ion homeostasis y negative regulation of growth. Son comunes a los mismos los genes Metallothionein (A0A287AI89_PIG), metallothionein 1A (MT1A) y metallothionein-2A (MT2B). Otros GOTERM_BP resultantes fueron: leukocyte cell-cell adhesion (genes NT5E y APOA4) y cholesterol homeostasis (genes APOA4 y SLC37A4).

Las vías KEGG encontradas para los genes sobre expresados en T15 fueron: Arginine and proline metabolism (genes GATM y P4HA1) y Mineral absorption (MT1A y MT2B).

Para GOTERM_MF se identificaron los términos zinc ion binding (genes NT5E, CPZ, MT1A y MT2B) y oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen (genes CYP2C49 y P4HA1).

A partir de este análisis surge un número de DEGs más reducido para profundizar la interpretación y centrar los siguientes estudios. Los genes sub expresados en T15, en comparación a T0, de interés son PPP1R3B, PPP1R3C, A0A8W4FA63, A0A8W4FLZ6, FABP3 y SCD. En cuanto a los genes de interés sobre expresados en T15, se encuentran CYP2C49, A0A287AI89_PIG, MT1A, MT2B, NT5E, CPZ, APOA4, SLC37A4, GATM y P4HA1.

A partir del estudio de la expresión diferencial se observó una respuesta transcripcional en el subgrupo de

muestras obtenidas para el tratamiento T15 (mayor contenido lipídico), identificando 290 DEGs ($p<0.01$). Si bien genes fundamentales como PPAR-? y SREBP-1 no presentaron variación, la sub expresión del gen SCD ($\log_{2}FC = -1.413$, $p_{adj} = 0.002$) en T15 fue significativa. Este resultado indica una probable disminución en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados. La detección de la vía de señalización PPAR (genes SCD y FABP3), subraya un impacto directo en el transporte y la utilización de ácidos grasos. Estudios similares en cerdos reportan que los lípidos aportados por la dieta afectan la expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y la regulación de esteatosis hepática (Szostak et al., 2016; Fanalli et al., 2022).

El análisis de enriquecimiento, particularmente bajo el criterio estricto ($p_{adj}<0.01$), reveló vías centrales relacionadas al metabolismo de la insulina. Este enfoque en el balance energético y la señalización de insulina es coherente con estudios que relacionan el perfil del transcriptoma hepático con la eficiencia alimenticia y la respuesta metabólica a la dieta en cerdos (Vigors et al., 2019). Los genes sub expresados PPP1R3B y PPP1R3C respaldan esta idea al estar implicados en la regulación del metabolismo del glucógeno y la resistencia a la insulina.

Por otro lado, la sobre expresión de metalotioneínas (A0A287AI89_PIG, MT1A, MT2B) y términos relacionados con la detoxificación de iones en T15, junto con la vía Retinol metabolism ($p<0.01$), sugiere un aumento del estrés celular o la toxicidad metabólica como consecuencia de la dieta con mayor contenido lipídico. Estudios en cerdos han remarcado el efecto de la dieta sobre el transcriptoma del hígado, incluyendo la modulación de vías como la del metabolismo de la Vitamina A, interconectadas con el estrés y la función hepática (Zhao et al., 2016). La activación de estos mecanismos de respuesta es un indicador de cambios en la homeostasis del hígado inducidos por el tratamiento T15.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados demuestran que la modificación del contenido lipídico de la dieta genera una respuesta transcripcional significativa en el hígado del cerdo Pampa Rocha. Esta respuesta se caracteriza por una alteración en la regulación del metabolismo lipídico y energético central.

Para el metabolismo de los lípidos, la vía de señalización PPAR, con la sub expresión de los genes SCD y FABP3 en el tratamiento T15, indica que la dieta alta en lípidos produce una alteración en la síntesis de ácidos grasos. Además, la desregulación de las vías centrales del metabolismo de la insulina sugiere que la dieta T15 compromete la sensibilidad a la insulina y la homeostasis energética. Este hallazgo es de relevancia si se considera la eficiencia alimenticia en cerdos y el uso de esta especie como modelo de enfermedades del metabolismo energético, como el hígado graso no alcohólico en humanos. Asimismo, la sobre expresión de genes que codifican metalotioneínas (MT1A, MT2B) y la modulación de la vía del metabolismo del retinol, indican que la dieta T15 generó un estrés metabólico a nivel hepático, activando mecanismos de defensa celular.

Cabe mencionar que la propuesta inicial de analizar 12 muestras mediante RT-qPCR se vio comprometida por dificultades experimentadas durante la etapa de extracción de ARN, que condujeron a una limitación en la cantidad de material de partida (muestras de hígado previamente obtenidas y almacenadas). Ante esta restricción, la decisión de aplicar la técnica de RNAseq en las seis muestras de mejor calidad, permitió la identificación de 290 DEGs, lo cual posibilitó una evaluación más completa del transcriptoma del hígado en

las muestras problema, superando los 11 genes planteados al inicio. Este cambio proporcionó un perfil molecular más detallado del efecto del tratamiento nutricional. Para lograrlo, se agradece la colaboración del Lic. MSc. Pablo Perazza (INIA Las Brujas), fundamental para el análisis bioinformático, y del preparador Bruno Beretta, por el apoyo en tareas de laboratorio.

En función de estos avances, el experimento continuará para validar los resultados. Para ello, en una primera instancia se buscará incrementar el número de muestras analizadas mediante RNAseq, dentro de los límites del material almacenado. Posteriormente, se verificará la expresión de genes con expresión diferencial identificados mediante RT-qPCR, lo cual es esencial para la validación y la publicación de los resultados.

Los hallazgos de esta investigación reafirman el valor del recurso zoogenético Pampa Rocha como modelo biológico relevante para estudios de enfermedades vinculadas al metabolismo energético, y sugieren que los genes identificados pueden utilizarse como marcadores moleculares para la evaluación de dietas y programas de selección. Para esto es fundamental incrementar el número de muestras a analizar en futuros estudios.

Finalmente, como perspectiva de continuidad del trabajo, se plantea la profundización en el análisis de los datos obtenidos a través de RNAseq, principalmente para indagar con más detalle en las vías y genes modificados, así como para identificar transcritos y ARN no codificantes que modulen genes identificados clave, abriendo otras oportunidades de investigación.

Referencias bibliográficas

Barlocco N. (2011). Experiencias en la caracterización productiva del cerdo Pampa Rocha en Uruguay. Producción de carne natural. En: Situación y conservación de recursos zoogenéticos porcinos. Montevideo, Uruguay. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. 31-39.

Bauza R. (2000). El afrechillo de arroz como alimento para cerdos y otros animales domésticos (pp76). Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía.

Bell W, Carballo C, Castro G, Barlocco N. (2014). Situación y perspectivas de la producción porcina en Uruguay. En: Jornadas Nacionales de Actualización Porcina y VI Encuentro del CIAP. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa. <https://www.upc.edu.uy/caracterizacion-socio-economica-del-sectorporcino?download=168:bell-y-col-2014>

Benítez R, Núñez Y, Fernández A, Isabel B, Fernández AI, Rodríguez C, Barragán C, Martín- Palomino P, López-Bote C, Silió L, Óvilo C. (2015). Effects of dietary fat saturation on fatty acid composition and gene transcription in different tissues of Iberian pigs. Meat Science 102: 59–68.

Bolger AM, Lohse M., Usadel B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics, btu170.

Capra G, Echenique A, Grompone MA, Bauza R, González A, Silva D. (2007a). Evaluación de la inclusión de grano de soja desactivada, afrechillo de arroz integral o suero de queso en la dieta de cerdos en engorde. 3. Efecto sobre el perfil lipídico de la grasa subcutánea. Agrociencia. IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos. (Vol. Esp.): 59-63.

Capra G, Echenique A, Grompone MA, Bauza R, González A, Silva D. (2007b). Evaluación de la inclusión de grano de soja desactivada, afrechillo de arroz integral o suero de queso en la dieta de cerdos en engorde. 2. Efecto en la calidad de la canal y la carne. Agrociencia. IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos. (Vol. Esp.): 53-58.

Capra G, Repiso L, Fradiletti F, Martínez R, Cozzano S, Márquez R. (2011). Efecto de la dieta de cerdos en crecimiento sobre el valor nutritivo y la aptitud tecnológica de la carne y grasa. INNOTECH. Rev. Lab. Tecnol. Uruguay. 6:11-20.

Cozzolino D. 2000. Características de los suplementos utilizados en el Uruguay para su empleo en alimentación animal (Serie Técnica Nº 110). Montevideo, Uruguay: Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA.

Dziegieł N, Szczerba P, Jura J, Pieszka M. (2018). The pig as an animal model in biomedical research: A review. Postępy Higieny I Medycyny Doswiadczonej, 72:1032-1042.

Duran-Montge' P, Theil PK, Lauridsen C, Esteve-Garcia E. (2009). Dietary fat source affects metabolism of fatty acids in pigs as evaluated by altered expression of lipogenic genes in liver and adipose tissues.

Animal, 3(4): 535–542.

Fanalli SL, da Silva BPM, Gomes JD, Durval MC, de Almeida VV, Moreira GCM, Silva-Vignato B, Afonso J, Freitas FAO, Reecy JM, Koltes JE, Koltes D, Garrick D, Correia de Almeida Regitano L, Balieiro JCC, Mourão GB, Coutinho LL, Fukumasu H, de Alencar SM, Luchiari Filho A, ... Cesar AS M. (2023). RNA-seq transcriptome profiling of pigs liver in response to diet with different sources of fatty acids. *Frontiers in genetics*, 14, 1053021.

Fanalli SL, da Silva BPM, Gomes JD, Ciconello FN, de Almeida VV, Freitas FAO, Moreira GCM, Silva-Vignato B, Afonso J, Reecy J, Koltes J, Koltes D, Regitano LCA, de Carvalho Baileiro JC, Freitas L, Coutinho LL, Fukumasu H, de Alencar SM, Luchiari Filho A, Cesar ASM. (2022). Effect of dietary soybean oil inclusion on liver-related transcription factors in a pig model for metabolic diseases. *Scientific reports*, 12(1), 10318.

Gondret F, Vincent A, Houée-Bigot M, Siegel A, Lagarrigue S, Causseur D, Gilbert H, Louveau I (2017). A transcriptome multi-tissue analysis identifies biological pathways and genes associated with variations in feed efficiency of growing pigs. *BMC Genomics* 18: 244.

Heckmann BL, Zhang X, Xie X, Liu J. (2013). The G0/G1 switch gene 2 (G0S2): regulating metabolism and beyond. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(2): 276–281.

Huang M, Chen L, Shen Y, Chen J, Guo X, & Xu N. (2019). Integrated mRNA and miRNA profile expression in livers of Jinhua and Landrace pigs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(10): 1483-1490.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 4(1):44-57.

Kanehisa M, Goto S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28(1):27-30.

Kellner TA, Gabler NK, Patience JF. (2017). The composition of dietary fat alters the transcriptional profile of pathways associated with lipid metabolism in the liver and adipose tissue in the pig. *Journal of Animal Science*, 95:3609–3619

Koopmans SJ, Schuurman T. (2015). Considerations on pig models for appetite, metabolic syndrome and obese type 2 diabetes: From food intake to metabolic disease. *European Journal of Pharmacology*, 759: 231–239

Kukurba KR, Montgomery SB. 2015. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015(11): 951-969.

Li Q, Domig KJ, Ettle T, Windisch W, Mair C, Schedle K. (2011). Evaluation of Potential Reference Genes for Relative Quantification by RT-qPCR in Different Porcine Tissues Derived from Feeding Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(3):1727-1734.

Liao Y, Smyth GK, Shi W (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads, *Nucleic Acids Research*, 47 (8): e47.

Love MI, Huber W, Anders S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data

with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550.

Lyu W, Xiang Y, Wang X, Li J, Yang C, Yang H, Xiao Y. (2022). Differentially Expressed Hepatic Genes Revealed by Transcriptomics in Pigs with Different Liver Lipid Contents. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2315575.

Montenegro M. (2019). Estudio del perfil de expresión génica en el músculo esquelético de cerdos Pampa Rocha sometidos a diferentes dietas. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 145pp.

Montenegro M, Peraza P, Balemian N, Carballo C, Barlocco N, González Barrios P, Mernies B, Saadoun A, Castro G, Guimarães SF, Llambí, S (2019). Gene expression analysis by RNA-sequencing of Longissimus dorsi muscle of pigs fed diets with differing lipid contents. *Genetics and Molecular Research*, v18 (4).

Nygard AB, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M. (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC molecular biology*, 8: 67.

Poklukar K, ?andek-Potokar M, Batorek Luka? N, Tomažin U, Škrlep M. (2020). Lipid Deposition and Metabolism in Local and Modern Pig Breeds: A Review. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(3): 424.

Reiter SS, Halsey CHC, Stronach BM, Bartosh JL, Owsley WF, Bergen WG (2007). Lipid metabolism related gene-expression profiling in liver, skeletal muscle and adipose tissue in crossbred Duroc and Pietrain Pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 2: 200–206.

Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, Imamichi T, Chang W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkac194.

Szostak A, Og?uszka M, Te Pas MF, Po?awska E, Urba?ski P, Juszczuk-Kubiak E, Blicharski T, Pareek CS, Dunkelberger JR, Horba?czuk JO, Pierzcha?a M. (2016). Effect of a diet enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids on the pig liver transcriptome. *Genes & nutrition*, 11, 9.

Tous N, Theil PK, Lauridsen C, Lizardo R, Vilà B, Esteve-Garcia E. (2012). Dietary conjugated linoleic acid modify gene expression in liver, muscles, and fat tissues of finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 90: 340–342.

Vadell A. (2008). Una reseña corta sobre la raza criolla de cerdos Pampa Rocha y su utilización en Uruguay. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 15(2): 105-112.

Vigors S, O'Doherty JV, Bryan K, Sweeney T. (2019). A comparative analysis of the transcriptome profiles of liver and muscle tissue in pigs divergent for feed efficiency. *BMC Genomics* 20, 461.

Wang L, Zhang Y, Zhang B, Zhong H, Lu Y & Zhang H. (2021). Candidate gene screening for lipid deposition using combined transcriptomic and proteomic data from Nanyang black pigs. *BMC genomics*, 22(1): 441.

Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI, Whittington FM. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78: 343–358.

USDA (United States Department of Agriculture) (2021). Livestock and Poultry: World Markets and Trade. https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf

Zhao Y, Hou Y, Liu F, Liu A, Jing L, Zhao C, Luan Y, Miao Y, Zhao S, Li X. (2016). Transcriptome Analysis Reveals that Vitamin A Metabolism in the Liver Affects Feed Efficiency in Pigs. *G3* (Bethesda, Md.), 6(11), 3615–3624.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)