LA SELECCIÓN POR GRASA INTRAMUSCULAR MODIFICA EL PERFIL METAGENÓMICO DEL CIEGO EN CONEJO

Martínez-Álvaro, M., Zubiri-Gaitán, A., Casto-Rebollo, C., Blasco, A. y Hernández, P.
[1]Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n 46020 Valencia.; mamaral9@upv.es

INTRODUCCIÓN

Aumentar el contenido de grasa intramuscular (GIM) en la carne tiene un gran interés económico ya que mejora su terneza, jugosidad y sabor. Hay estudios que relacionan la deposición lipídica con el perfil microbiano del tracto digestivo en humanos y ratón (Krajmalnik-Brown et al., 2012). Se han desarrollado dos líneas de conejo procedentes de un mismo origen genético y seleccionadas por alta (línea GA) y baja (línea GB) GIM durante diez generaciones. Estas líneas son un material excepcional para el estudio de la base genética de la deposición de GIM, modificada tras la selección (Martínez-Álvaro et al., 2016). En este estudio queremos investigar los cambios que se han producido en el metagenoma del contenido cecal e identificar las rutas metabólicas modificadas tras la selección.

MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento de selección para el desarrollo de las líneas GA y GB está descrito en Martínez-Álvaro et al. (2016). Se sacrificaron 16 y 17 conejos de las líneas GA y GB de la generación 10 a las 9 semanas de edad, tras un ayuno previo de 4 horas. Inmediatamente tras el sacrificio, se recogieron muestras de contenido cecal, se homogeneizaron y conservaron a -80ºC. Las muestras fueron secuenciadas con Illumina NextSeq**.** La longitud media de las lecturas pareadas fue de 2 x 150 pb. Las lecturas se alinearon a la base de datos KEGG (http://www.kegg.jp), y se lograron identificar 6230 genes microbianos. Tras eliminar aquellos genes con cero “counts” en más de 8 animales, nos quedamos con 4540 genes.

Los datos metagenómicos fueron pre-procesados usando la transformación del ratio del logaritmo centrado (clr) debido a su naturaleza composicional, tal y como sugiere Gloor et al. (2017). Los genes microbianos que difieren en ambas líneas se identificaron a través de un Análisis Discriminante basado en Proyecciones sobre Estructuras Latentes (DA-PLS, SIMCA, P+ 15.0.1, Umetrics (Umea, Suecia)) con un vector de clasificación GA/GB como variable dependiente y los 4540 genes microbianos como variables independientes. Se seleccionaron las variables basándose en el criterio de la importancia de cada variable en la proyección (VIP), considerando que los genes microbianos con un VIP < 1,0 contribuyen poco a la predicción, y se eliminaron hasta que el modelo DA-PLS perdió capacidad predictiva (Q^2). El modelo final se construyó con 3 componentes latentes e incluyó 105 genes. A continuación, se identificaron las rutas metabólicas correspondientes a estos 105 genes. El trabajo se centró en los genes implicados en el metabolismo energético (18 genes en total).

Se analizaron estos 18 genes con un modelo DA-PLS incluyéndolas como variables independientes y el vector de clasificación GA/GB como variable dependiente. Este modelo fue construido con un componente latente. Las abundancias relativas de los genes se estimaron por animal, referidas a la suma de los “counts” de los 105 genes modificados tras la selección. Posteriormente se estimaron las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre las líneas GA y GB para la abundancia relativa de los 18 genes usando el programa Rabbit (Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València). Sobre estas distribuciones marginales, se calcularon la mediana y la probabilidad de la diferencia de ser positiva cuando la mediana >0 o negativa cuando la mediana es <0 (P).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección por GIM tuvo una respuesta correlacionada en la abundancia relativa de 105 genes microbianos en el contenido cecal de conejo, identificados a través de DA-PLS. Estos 105 genes explicaron un 91,6% de la clasificación de los animales en GA o GB, tras la validación cruzada (Q^2). Estos 105 genes microbianos codifican proteínas involucradas en

diferentes rutas metabólicas, siendo las rutas más importantes las del metabolismo energético (18 genes), transducción de señal (10), metabolismo de nucleótidos (8) y aminoácidos (5), transporte de membrana (5), replicación y reparación de ácidos nucleicos (3), traducción (3) y metabolismo de cofactores y vitaminas (3). Este trabajo se centró en los genes microbianos involucrados en las rutas del metabolismo energético. La Tabla 1 muestra los genes microbianos involucrados en rutas energéticas con diferente abundancia relativa en las líneas GA y GB.

***Tabla 1**. Genes microbianos involucrados en el metabolismo energético con diferencias en su abundancia relativa en las líneas de alta (GA) y baja (GB) grasa intramuscular.*

KEGG	Descripción	GA-GB	P
K14067	malato-CoA ligasa, subunidad beta	1,192	0,98
K00863	dihidroxiacetona quinasa	0,912	0,82
K01813	L-ramnosa isomerasa	0,909	0,99
K15987	bomba de Na pirofosfato-energizante K(+)-estimulada	0,781	0,98
K18697	fosfatidilglicerofosfatasa C	0,762	0,98
K01183	quitinasa	0,647	0,95
K12339	cisteína sintasa B	0,582	0,92
K07248	lactaldehído deshidrogenasea /glicolaldehído deshidrogenasa	0,435	0,84
K01208	ciclomaltodextrinasa	-1,037	1,00
K03079	L-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa	-0,949	1,00
K16951	sulfito reductasa anaeróbica subunidad B	-0,921	1,00
K00362	NADH nitrito reductasa, subunidad grande	-0,916	1,00
K02847	O-antigen ligasa	-0,792	0,99
K13015	UDP-N-acetil-D-glucosamina deshidrogenasa	-0,776	1,00
K01040	glutaconato CoA-transferasa, subunidad B	-0,724	1,00
K03271	D-sedoheptulosa 7-fosfato isomerasa	-0,680	0,98
K00374	nitrato reductasa, subunidad gamma	-0,580	0,98

GA-GB = mediana de la diferencia entre líneas expresada en unidades de desviación típica; P = probabilidad de que GA-GB sea mayor que 0 cuando es positiva o menor que 0 cuando es negativa.

Dos genes involucrados en el metabolismo del metano (*malato-CoA ligasa subunidad beta* (K14067) y *dihidroxiacetona quinasa* (K00863)) fueron más abundantes en la línea GA, con diferencias entre líneas de 1,192 y 0,912 desviaciones típicas (P = 0,98 y 0,82, respectivamente). La metanogénesis es un proceso que consume H_2, que es un producto final de la fermentación de los carbohidratos, y además actúa como regulador de ésta. Un trabajo de revisión en humano y ratón sugiere que existe un enriquecimiento de metanógenos oxidantes de H_2 en individuos obesos, consumiendo H_2 de manera más eficiente y por tanto conduciendo a una mayor tasa de fermentación (Krajmalnik-Brown et al., 2012). Además, la línea GA mostró mayor abundancia de genes involucrados en rutas de carbohidratos específicos como la manosa y la fructosa (*L-ramnosa isomerasa* (K01813), P = 0,99 y *dihidroxiacetona quinasa* (K00863), P= 0,82). En la línea GB, otros genes *como D-sedoheptulosa 7-fosfato isomerasa* (K03271) y *O-antigen ligasa* (K02847), involucrados en la biosíntesis de lipopolisacáridos, fueron más abundantes (P=0,98 y P=0,99, respectivamente). Finalmente, cuando analizamos estos 18 genes microbianos en un modelo DA-PLS, la Q^2 obtenida tras la validación cruzada fue de 55,7%, mostrando un poder de clasificación alto.
Estos resultados preliminares subrayan la importancia del microbioma intestinal en la deposición lipídica en músculo en conejos, y muestran que la selección por GIM conduce a una respuesta correlacionada en el perfil metagenómico. En este estudio, centrado en las rutas del metabolismo energético, hemos observado un enriquecimiento de distintas rutas en GA y GB como consecuencia de la selección. Además, estos resultados implican una conexión entre los genes del individuo y los genes microbianos de su contenido cecal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V. & Egozcue. 2017. Front. Microbol. 8: 2224. • Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z.E., Kang, D.W. & DiBase, J.K. 2012. Nutr. Clin. Prac. 27: 201-214. • Martínez-Álvaro, M., Hernández, P. & Blasco, A. 2016. J. Anim. Sci. 94: 4993-5003.

Agradecimientos: Este experimento ha sido subvencionado por el proyecto AGL2017-86083-C2-1-P-AR del Plan Nacional de Investigación. Marina Martínez-Álvaro agradece su contrato APOSTD/2017/060 a la Generalitat Valenciana.

SELECTION FOR INTRAMUSCULAR FAT MODIFIES THE METAGENOMIC PROFILE IN RABBIT CECUM

ABSTRACT: In this study we investigate the correlated responses to selection for intramuscular fat (IMF) in the cecum microbes genome. Distinct microbial genes between the two lines were identified using Projection to Latent Structures Discriminant Analysis (DA-PLS). The final model including 105 microbial genes showed a Q^2 of 91.6%. From those, 18 genes were involved in the energy metabolism pathway. These genes showed different relative abundance in the high and low IMF lines. Two genes involved in methane metabolism, and two involved in the metabolism of mannose and fructose were more abundant in the high line, and two genes related to lipopolysaccharides biosynthesis were more abundant in the low line. Our study highlights the importance of the gut microbiome in the muscular lipid deposition in rabbits and shows that selection for IMF led to a correlated response in their metagenomics profile, particularly in the energy metabolic routes. These results highlights a relationship between the genes of the individual and the genes of its gut microbes.

Keywords*:* intramuscular fat, correlated responses, metagenome, rabbit