

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL  
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CERDOS PAMPA ROCHA  
SOMETIDOS A DIFERENTES DIETAS**

**por**

**Lic. Msc. María del Carmen MONTENEGRO SILVA**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Doctora en Ciencias  
Agrarias opción Ciencias  
Animales**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
Febrero 2019**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Ing. Agr. (Dra.) Ana Espasandín, el Ing. Agr. (PhD.) Gabriel Ciappesoni y la Ing. Agr. (PhD.) Elly Navajas, el 12 de febrero de 2019

Autora: Lic. Msc. María del Carmen Montenegro. Directora Dra. Silvia Llambí, Co-directora Dra. Simone Facioni Guimarães.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia Llambí, por su orientación académica, pero principalmente por su apoyo a lo largo de estos años.

A la Dra. Simone Facioni Guimarães, co-directora de Tesis, por su orientación y disposición, sin lo cual no hubiese sido posible finalizar este trabajo.

A la Ing. Agr. Cecilia Carballo y al Ing. Agr. Nelson Barlocco por su colaboración en la elaboración del proyecto, trabajo de campo, aportes y discusión de resultados.

A Gustavo Castro, Pablo Peraza, Pablo González Barrios, Ali Saadoun, Beatriz Mernies, Juan Franco, Eugenio Jara y Nariné Balemián por la colaboración y sus aportes en la realización de esta tesis.

Al personal de la Unidad de Producción de Cerdos del Centro Regional Sur (Facultad de Agronomía), por su colaboración durante la realización del trabajo de campo.

A la Ing. Agr. Valeria Maciel, Dra. Lucía Tárdiz, Bach. Andrea Romero y Dr. Pedro Sitjar por su colaboración en el trabajo de campo y recolección de muestras.

Al Dr. José Sotelo, Lic. Msc. Guillermo Eastman (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable), Dr. Alejandro Benech (Hospital de Facultad de Veterinaria), Dra. Graciela Pedrana (Histología-Facultad de Veterinaria) y a las integrantes del LEMA por la colaboración técnica y por permitirme el uso de los equipos de los diferentes Laboratorios.

A mis compañeros del Área Genética por el apoyo brindado en el transcurso de esta etapa.

A mis amigas y amigos por el apoyo constante, sin ustedes este proceso hubiese sido más difícil de transitar.

A mamá y papá, y a toda mi familia, por haberme dado la posibilidad de estudiar, por acompañarme y alentarme siempre.

La investigación que da origen a los resultados presentados en esta publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS\_NAC\_2013\_1\_11440 y de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
PÁGINA DE APROBACIÓN .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
RESUMEN .....	VIII
SUMMARY .....	IX
<u>1. INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN .....	1
1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	4
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	4
<u>1.3.1 Objetivos específicos</u> .....	4
<u>2. MARCO TEÓRICO</u> .....	6
2.1 CARNE DE CERDO: CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES, CONSUMO Y PRODUCCIÓN A NIVEL MUNDIAL .....	6
<u>2.1.1 Características nutricionales de la carne de cerdo</u> .....	6
<u>2.1.2 Consumo y producción mundial de carne de cerdo</u> .....	7
2.2 PRODUCCIÓN DE CERDOS EN URUGUAY.....	8
<u>2.2.1 Situación actual</u> .....	8
<u>2.2.2 Principales características de la producción de cerdos en Uruguay</u> .....	10
2.2.2.1 Distribución geográfica.....	10
2.2.2.2 Sistemas de producción.....	11
2.2.2.3 Rodeo porcino: número de animales, categorías y razas .....	12
2.3 RECURSOS ZOOGENÉTICOS .....	14
<u>2.3.1 Recursos zoogenéticos porcinos de Uruguay</u> .....	16
2.4 IMPORTANCIA DE LA ALIMENTACIÓN EN PRODUCCIÓN PORCINA .....	19
2.5 ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA A TRAVÉS DE LAS CIENCIAS ÓMICAS .....	22
<u>2.5.1 Ciencias ómicas</u> .....	22
<u>2.5.2 Nutrigenómica y transcriptómica</u> .....	22
2.5.2.1 ARN-Seq.....	24

<u>3. INCLUSIÓN DE AFRECHILLO DE ARROZ EN DIETAS PARA LECHONES EN POSDESTETE: EFECTO SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CARACTERÍSTICAS DE CARCASA</u> .....	29
3.1 RESUMEN .....	30
3.2 SUMMARY .....	30
3.3 INTRODUCCIÓN .....	31
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
3.6 CONCLUSIÓN .....	39
3.7 AGRADECIMIENTOS .....	39
3.8 BIBLIOGRAFÍA .....	40
<u>4. CALIDAD DE CARNE EN CERDOS PAMPA ROCHA DE URUGUAY ALIMENTADOS CON DIETAS CON Y SIN AFRECHILLO DE ARROZ EN SU COMPOSICIÓN</u> .....	42
4.1 RESUMEN .....	43
4.2 ABSTRACT .....	44
4.3 INTRODUCCIÓN .....	45
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
<u>4.4.1 Animales y diseño experimental</u> .....	46
<u>4.4.2 Tratamientos</u> .....	47
<u>4.4.3 Toma de muestras</u> .....	47
<u>4.4.4 Variables analizadas</u> .....	48
<u>4.4.5 Análisis estadístico</u> .....	49
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	50
<u>4.5.1 Variable pH</u> .....	50
<u>4.5.2 Variable color</u> .....	51
<u>4.5.3 Variable fuerza de corte</u> .....	52
<u>4.5.4 Contenido y composición de ácidos grasos de los lípidos intramusculares</u> .....	53
4.6 CONCLUSIONES .....	56
4.7 AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN .....	57

4.8 BIBLIOGRAFÍA .....	57
<u>5. GENE EXPRESSION ANALYSIS OF LONGISSIMUS DORSI MUSCLE OF PIGS FED DIETS WITH DIFFERENT LIPID CONTENT BY RNA-SEQUENCING</u> .....	61
5.1 ABSTRACT .....	62
5.2 INTRODUCTION .....	62
5.3 MATERIALS AND METHODS .....	64
<u>5.3.1 Animals, treatments, and phenotypic determinations</u> .....	64
<u>5.3.2 RNA isolation, library construction and RNA sequencing</u> .....	65
<u>5.3.3 Bioinformatics analysis and functional analysis of differential expression</u> .....	65
5.4 RESULTS .....	66
<u>5.4.1 Intramuscular fat content and composition of fatty acids</u> .....	66
<u>5.4.2 Analysis of data obtained by RNA-seq</u> .....	66
<u>5.4.3 Differential expression</u> .....	67
<u>5.4.4 Functional analysis</u> .....	67
5.5 DISCUSSION .....	72
<u>5.5.1 Lipid and carbohydrate metabolism</u> .....	72
<u>5.5.2 Muscle tissue development</u> .....	75
<u>5.5.3 ECM-receptor interaction and focal adhesion</u> .....	76
5.6 CONCLUSION .....	78
5.7 ACKNOWLEDGEMENT .....	78
5.8 REFERENCES .....	79
5.9 SUPPLEMENTARY MATERIAL* .....	83
<u>6. DISCUSIÓN</u> .....	85
6.1 DISCUSIÓN GENERAL .....	85
6.2 CONCLUSIONES .....	94
6.3 PERSPECTIVAS .....	95
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u> .....	97
<u>8. ANEXOS</u> .....	109

## RESUMEN

En la presente tesis se estudió el efecto de dietas con diferente contenido lipídico sobre el comportamiento productivo, la calidad de la carne, carcasa y expresión génica en el músculo esquelético de lechones Pampa Rocha. Se utilizaron 16 cerdos de esta raza los cuales fueron asignados al azar entre los tratamientos: T0 (dieta control con 0 % de afrechillo de arroz) y T15 (dieta con mayor contenido lipídico, con 15 % de afrechillo de arroz). Para estudiar el comportamiento productivo se determinaron la ganancia diaria en peso, la eficiencia en conversión y el consumo de ración en la totalidad de los individuos (N=16), no registrándose diferencias en el promedio del período experimental. El estudio de la calidad de la carne y la carcasa se realizó en los machos (N=12), analizándose las siguientes variables: pH; luminosidad, índice de rojo y de amarillo; fuerza de corte; contenido de grasa intramuscular y perfil de ácidos grasos; peso de la carcasa y espesor de grasa dorsal. Se registraron diferencias en los valores de pH 90 minutos y 24 horas (inferiores en T15), luminosidad, contenido de ácido linoleico y de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y en la relación AGPI/AGS (mayores en T15). El análisis de la expresión génica se realizó a través de la secuenciación del ARN extraído de las muestras de músculo esquelético mediante ARNseq y evidenció 359 genes conocidos con expresión diferencial. El análisis funcional de estos genes reveló 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 concluye que la inclusión de afrechillo de arroz en la dieta de lechones Pampa Rocha podría considerarse como una alternativa en la elaboración de raciones para esta categoría, debiendo tenerse en cuenta otros factores que podrían haber incidido sobre las variables afectadas. Por otro lado, los genes y procesos metabólicos identificados pueden orientar futuras investigaciones sobre la calidad de la carne en cerdos así como en el estudio de enfermedades humanas relacionadas con el metabolismo energético y el desarrollo muscular.

**Palabras clave:** recursos zoogenéticos, comportamiento productivo, calidad de carne, nutrigenómica, transcriptómica.

## **GENE EXPRESSION STUDY OF SKELETAL MUSCLE OF PAMPA ROCHA PIGS FED WITH DIFFERENT DIETS**

### **SUMMARY**

In this thesis, the effect of different diets when varying the lipid content on growth performance, meat quality, carcass and gene expression in the skeletal muscle of Pampa Rocha piglets was evaluated. Sixteen pigs were randomly assigned among the treatments: T0 (control diet, 0% of bran rice) and T15 (diet with greater lipid content, 15% of bran rice). In order to study growth performance; daily gain weight, conversion efficiency and feed intake were determined in the totality of the individuals (N = 16), without finding differences in the average during the experimental period. For the analysis of meat quality, the meat and carcass of the males were used (N = 12) to measure some variables: pH, luminosity, index of red and yellow, shear force, content of intramuscular fat and fatty acid profile, body weight and back fat thickness. Differences were found for pH values at 90 minutes and 24 hours (lower in T15), luminosity, content of linoleic acid and of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and in the PUFA/SFA (higher in T15). The gene expression analysis was carried out through the sequencing of the RNA extracted from the samples by RNAseq and showed 359 differentially expressed genes. The functional analysis of these genes revealed their participation in different processes and metabolic pathways, highlighting those related with the meat quality (lipid and carbohydrate metabolism, skeletal muscle development and receptor-extracellular matrix interaction). In conclusion, the inclusion of bran rice in the diet of Pampa Rocha piglets could be considered as an alternative for their food intake, however, other factors that could have affected the variables should be considered. The genes and metabolic processes identified can guide future research about the meat quality in pigs as well as in the study of human diseases related to energy metabolism and muscle development.

**Keywords:** zoogenetic resources, productive behavior, meat quality, nutrigenomic, transcriptomic.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 JUSTIFICACIÓN

La producción porcina en Uruguay ocupa un lugar de escasa relevancia desde el punto de vista económico. Sin embargo, esta actividad ha desempeñado tradicionalmente un rol de importancia social como sustento de pequeños y medianos productores rurales (Castro, 2007).

La escasa relevancia, la inexistencia de políticas que impulsen el sector y las políticas de libre mercado, entre otros aspectos, han conducido a una disminución en el número de pequeños y medianos productores de cerdos en las últimas décadas. Conjuntamente se observa una concentración de los animales en un número menor de explotaciones, las cuales utilizan mayoritariamente líneas híbridas comerciales que requieren condiciones de producción particulares y costosas, siendo inaccesibles para los productores con menores recursos.

Esta situación se observa a nivel de la producción porcina mundial, donde el desarrollo tecnológico ha establecido sistemas de producción modernos, con alto grado de insumos y rendimientos, en los cuales para aprovechar el potencial genético de las razas utilizadas los criadores deben proporcionar a los animales un ambiente estandarizado. Estos sistemas de producción, además de ser inaccesibles para los productores con menores recursos, también han conducido a una disminución en la variabilidad racial y a la sustitución de las razas locales. En contraposición, los sistemas tradicionales de subsistencia de pequeña escala utilizan animales adaptados localmente o sus cruzamientos, buscan el suministro a determinados segmentos de mercado y contribuyen a la seguridad alimentaria (FAO, 2016, FAO, 2010).

Las razas y poblaciones locales constituyen recursos genéticos animales, entendiéndose a estos como las especies animales que se utilizan o pueden utilizarse para la producción de alimentos y la agricultura (FAO, 2010). La conservación de estos recursos se considera de suma importancia a nivel mundial, con el objetivo de mantener la mayor diversidad posible en las especies de animales domésticos. Se estima que la variabilidad genética de los recursos locales les permitiría adaptarse a

eventualidades que puedan surgir en el futuro. Asimismo, esta variabilidad puede ser aprovechada en planes de mejora y obtención de productos en mayor cantidad y calidad (FAO, 2010, Martínez, 2001).

En el caso de Uruguay, la producción pecuaria en general no se basa en la utilización de recursos locales, debido principalmente a la falta de información acerca de los mismos (Castro *et al.*, 2004).

Nuestro país cuenta con un recurso genético porcino que es el cerdo Pampa Rocha, el cual fue reconocido en 1997 por la Asociación Rural del Uruguay (ARU) como la primera raza de cerdos criolla de Uruguay. Desde el año 1994 esta raza es investigada por la Facultad de Agronomía (Universidad de la República) con el objetivo central de conservarlos, multiplicarlos e incluirlos en la cadena productiva. Posteriormente, y también con el objetivo de estudiar al cerdo Pampa Rocha, se incorporaron otros grupos de trabajo provenientes de las Facultades de Veterinaria y Ciencias. A partir de la unificación de estos esfuerzos se ha logrado una importante caracterización de esta raza desde el punto de vista productivo, morfométrico y genético (Vadell y Carballo 2013, Castro *et al.*, 2012). Las diferentes investigaciones sobre la canal, carne y grasa de este recurso permiten afirmar que los cerdos Pampa Rocha pueden ser incorporados en la cadena productiva (Barlocco, 2011, Barlocco y Vadell, 2005).

En los últimos años han surgido nuevas oportunidades de mercado para la carne del cerdo Pampa Rocha, como el incremento en el consumo de carne porcina que se viene registrando en Uruguay. Barlocco (2011) afirma que otras oportunidades para la producción del cerdo Pampa Rocha son la industria del turismo en ascenso, el mayor poder adquisitivo en estratos sociales de altos ingresos y el aumento del precio de la carne vacuna. Se genera así un escenario favorable para la producción de cerdos como el Pampa Rocha, pudiendo considerarlos como un recurso de importancia económica, principalmente con un enfoque hacia un producto diferencial.

La utilización productiva de razas locales es importante para la conservación de las mismas. Un ejemplo reconocido a nivel mundial de aprovechamiento exitoso de un recurso local es el caso del cerdo ibérico, del cual se han logrado recuperar y

conservar las diferentes variedades a partir de la implementación de planes de conservación y uso sostenible del mismo.

Además de la importancia para la conservación de la variabilidad genética, el empleo de una raza local como la Pampa Rocha también resultaría beneficioso para los pequeños productores rurales, debido a que la rusticidad característica de esta raza les permite producir con mínimos requerimientos y poco manejo, lo cual podría contribuir a contrarrestar la problemática de abandono de la actividad.

En cuanto a los factores de producción, uno de los más importantes en la cría porcina es la alimentación, incidiendo sobre los costos de producción, el comportamiento productivo y la calidad de la carne (Echenique, 2007, Bauza, 2000).

En función de lo expuesto, en la investigación que dio lugar a esta tesis se planteó analizar la incidencia de la alimentación sobre el comportamiento productivo, calidad de la carne y expresión génica a nivel del músculo esquelético en cerdos de la raza local Pampa Rocha. Para esto se utilizaron dietas con diferente contenido lipídico, aportado por un alimento económico como lo es el afrechillo de arroz.

Para estudiar el efecto de la nutrición sobre la expresión génica en el músculo esquelético se aplicó un enfoque transcriptómico. La transcriptómica se encarga del estudio de los transcriptomas (conjunto de moléculas de ARN que se expresan en una célula, tejido u organismo). Esta disciplina se enmarca dentro de la genómica funcional, la cual engloba a las diferentes disciplinas “ómicas”, que son las que se dedican al estudio de los diferentes productos de expresión de los genes en un momento determinado o bajo distintas condiciones (transcriptómica, proteómica, metabolómica entre otras) (Llambí y Arruga, 2018).

En los últimos años, las técnicas utilizadas por las ciencias “ómicas” han alcanzado gran desarrollo y han conducido a una utilización cada vez mayor de estos enfoques en animales de producción. El abordaje seguido por la transcriptómica permite, en el caso de este estudio, profundizar en el conocimiento del metabolismo a nivel de músculo esquelético y su relación con la calidad de la carne, en respuesta a la alimentación.

De esta forma, la presente investigación pretende generar información en aspectos de interés económico en la raza criolla Pampa Rocha, buscando asimismo contribuir en la caracterización y conservación de este recurso zoogenético local.

## 1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Las dietas utilizadas, con diferente contenido lipídico, afectan el comportamiento productivo, las variables de calidad de carne y de carcasa estudiadas?

¿La expresión génica en músculo esquelético de cerdos Pampa Rocha se ve afectada por la alimentación utilizada?

¿Constituye la transcriptómica un enfoque adecuado para analizar los procesos metabólicos que se ven afectados al modificar la dieta de los animales?

¿La transcriptómica es una herramienta útil para caracterizar a los recursos zoogenéticos locales?

## 1.3 OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de dos dietas con diferente contenido lipídico sobre el comportamiento productivo, calidad de carne y expresión génica en músculo esquelético en lechones Pampa Rocha.

### 1.3.1 Objetivos específicos

- Determinar si existen diferencias en el comportamiento productivo frente a los tratamientos propuestos.
- Determinar si existen diferencias en características de calidad de carne y carcasa frente a los tratamientos propuestos.

- Secuenciar el transcriptoma del músculo esquelético en lechones de la raza Pampa Rocha mediante ARN-seq, en función de los tratamientos.
- Determinar si existen diferencias en el perfil de expresión génica frente a los tratamientos propuestos.
- Identificar los genes que se expresan diferencialmente frente a los dos tratamientos y en qué vías metabólicas y/o procesos biológicos intervienen.
- Identificar posibles genes candidatos asociados a calidad de carne.
- Contribuir en la caracterización de la raza local Pampa Rocha.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 CARNE DE CERDO: CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES, CONSUMO Y PRODUCCIÓN A NIVEL MUNDIAL

#### 2.1.1 Características nutricionales de la carne de cerdo

La carne de cerdo es la más consumida en el mundo, contabilizando el 38 % de la producción y aproximadamente el 36 % del consumo mundial de carne. Es un componente fundamental de muchas de las dietas tradicionales, y constituye una importante fuente de energía y de nutrientes para la alimentación humana (Dugan *et al.*, 2015, FAO, 2014).

El consumo de carne de cerdo aporta aminoácidos esenciales, que son aquellos que los seres humanos no pueden sintetizar y que deben obtenerse a partir de fuentes externas. Esta carne también proporciona minerales (fósforo, selenio, sodio, zinc, potasio, cobre, hierro y magnesio), y vitaminas (B6, B12, tiamina, niacina, riboflavina y ácido pantoténico), que son beneficiosos para el crecimiento y desarrollo adecuado de niños y adultos (FAO, 2014).

Asimismo la carne de cerdo aporta ácidos grasos, siendo los monoinsaturados (AGM) la clase más abundante, seguidos de los saturados (AGS) y los poliinsaturados (AGPI). Por tratarse de una especie monogástrica, la composición de ácidos grasos en la carne de cerdo dependerá en gran medida de la alimentación que reciban, lo cual determina que las modificaciones en la dieta de estos animales puedan ser utilizadas para mejorar los perfiles de ácidos grasos de su carne (Dugan *et al.*, 2015).

La carne de cerdo, por ser la más consumida en el mundo, por el aporte de aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas, así como por la posibilidad de obtener perfiles lipídicos adecuados a través del control de su alimentación, constituye un recurso alimenticio saludable y beneficioso si se incorpora adecuadamente en las dietas humanas.

### 2.1.2 Consumo y producción mundial de carne de cerdo

La carne de cerdo es la carne roja de mayor consumo a nivel mundial, junto con la aviar y la bovina, registrándose durante el año 2017 un consumo de 110.588 millones de toneladas, según datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2017). Su demanda ha registrado un fuerte incremento en las últimas décadas, principalmente debido a los cambios en los patrones de consumo relacionados con el aumento de ingresos en los países en desarrollo con economías en crecimiento (FAO, 2016).

En el año 2017 la producción mundial de carne de cerdo fue de 111.034 millones de toneladas, significando un aumento del 1 % con respecto al año anterior. Esta carne se produce en todo el mundo, exceptuando algunas regiones que mantienen reservas culturales y religiosas en relación al consumo de la misma. El principal productor de cerdo es China, país que durante el año 2017 abarcó el 48 % de la producción (53.5 millones de toneladas). China es, además, el principal consumidor de carne de cerdo, seguido por la Unión Europea, Rusia y Brasil (MGAP-OPYPA, 2017, FAO, 2016).

Con respecto a las exportaciones de carne de cerdo, se ha observado un descenso durante el 2017, pero se estima un incremento del 3 % para el 2018. El principal exportador es la Unión Europea, con 2.800 miles de toneladas de carne exportadas durante el 2017, seguida por Estados Unidos, Canadá y Brasil. Las importaciones también registraron un leve descenso, aunque se predice que las mismas crecerán un 2 % en 2018 por la mayor demanda de México, Filipinas y países de América del Sur (MGAP-OPYPA, 2017, USDA, 2017).

## 2.2 PRODUCCIÓN DE CERDOS EN URUGUAY

### 2.2.1 Situación actual

La actividad agropecuaria es primordial para la economía uruguaya, ya que representa en promedio el 10,4 % del producto interno bruto (PIB) (promedio para el período 2009-2016, incluyendo la actividad agropecuaria y las industrias asociadas al agro). Dentro del sector agropecuario, la actividad pecuaria genera aproximadamente el 46,3 % de la producción (período 2009-2016), correspondiendo mayoritariamente a la producción de carne bovina, lechería, ovinos y lanas (MGAP-DIEA, 2017).

En este contexto el sector porcino presenta una menor relevancia. Sin embargo, las condiciones de nuestro país son favorables para la cría de cerdos en sistemas sustentables, debido al clima y a la producción de pasturas de calidad (Castro, 2007), a la vez que se observa un incremento del consumo de carne de cerdo en los últimos años. En el 2009, el consumo de esta carne en Uruguay se ubicó en los 9,7 Kg por habitante (Errea, 2012), valor que ascendió a los 15,3 kilogramos por habitante en el año 2016.

A pesar de esta situación, la cría de cerdos presenta importancia social al proporcionar parte del sustento de las familias de pequeños y medianos productores rurales (Castro, 2007), además de constituir una de las actividades que más fomentan el asentamiento de estas familias. Esto es consecuencia de la demanda diaria de atención y los hábitos alimenticios de la especie, que permiten la utilización de productos de escaso valor disponibles localmente como alimento (Bell *et al.*, 2014).

Aunque la producción de cerdos revista tal importancia social, y aun cuando su consumo haya aumentado, el número de productores y explotaciones ha disminuido drásticamente en las últimas décadas. Tanto en este sector como en otros rubros agropecuarios, los productores que abandonan el campo son principalmente los de menores recursos. El abandono de la cría de cerdos tiene sus causas principalmente en la escasa rentabilidad de la actividad, debida a aspectos económicos y comerciales tales como el alto costo de insumos, el bajo precio del producto final y las dificultades en la colocación de la producción. Esta problemática es agravada por el

ingreso cada vez mayor de materias primas y productos elaborados que compiten con la producción nacional (Bell *et al.*, 2014).

En la actualidad la mayor parte de la carne de cerdo consumida en Uruguay procede de la importación. Durante el 2017 se importaron 30.714 toneladas (datos a noviembre de ese año), un 9% más que en el mismo período del año 2016. El 88% de la carne de cerdo importada por Uruguay proviene de Brasil. Esto ha repercutido en la faena, la cual ha experimentado un descenso continuo (Cuadro 1) (MGAP-OPYPA, 2017).

Asimismo, la ausencia de mecanismos de fijación del precio del cerdo dificulta aún más la situación de los productores, siendo los industriales quienes lo determinan generalmente en función del costo de las importaciones (Bell *et al.*, 2014).

Los productores de cerdos han seguido diferentes estrategias para contrarrestar la baja rentabilidad del sector. Las mejoras en los índices productivos a través de la intensificación y concentración de la producción han sido la estrategia desarrollada por las grandes empresas, con una alta inversión de capital en insumos, genética e instalaciones. En cambio, los pequeños y medianos productores han optado por disminuir los costos de producción mediante la utilización de sistemas de baja inversión y uso de alimentos de menor costo. La incorporación de más tecnología para mejorar la productividad y la competitividad del sector implica mayores dificultades para los productores de menor escala, obstaculizando aún más su participación en el mercado (FAO, 2016, Bell *et al.*, 2014).

Cuadro 1: existencias, faena, importación, exportación y consumo de carne de cerdos para el período 2009-2016.

Año	Exist. <sup>1</sup> (miles de animales)	Faena <sup>2</sup>		Imp. <sup>3</sup> (toneladas)	Exp. <sup>4</sup> (toneladas)	Consumo Interno	
		(miles de cabezas)	(toneladas de carne)			Global (toneladas)	Por habitante (en kilos)
2009	199	230	17.290	15.156	27	32.419	9,6
2010	207	241	16.624	17.678	25	34.277	9,9
2011	225	243	16.492	21.391	14	37.869	11,1
2012	207	250	17.223	26.376	16	43.583	12,8
2013	200	252	17.650	30.720	118	48.252	14,1
2014	208	241	16.916	31.992	38	50.703	14,7
2015	216	227	15.850	35.203	39	51.014	14,7
2016	187	215	14.983	38.272	44	53.211	15,3

<sup>1</sup>Exist.: Existencias. Datos a junio de cada año.

<sup>2</sup>Incluye autoconsumo en los predios.

<sup>3</sup>Imp.: Importaciones.

<sup>4</sup>Exp.: Exportaciones.

Fuente: modificado del Anuario Estadístico Agropecuario 2017 (MGAP-DIEA, 2017).

## 2.2.2 Principales características de la producción de cerdos en Uruguay

### 2.2.2.1 Distribución geográfica

En Uruguay, los establecimientos con cerdos se localizan mayoritariamente en las zonas centro-sur, litoral oeste y litoral este del país, donde se concentra la demanda y existe disponibilidad de alimentos económicos. Los establecimientos en las zonas centro-sur y litoral oeste del país están asociados a los rubros agrícolas, hortícola y lechero, mientras que en el litoral este se asocian a la ganadería extensiva y a la industria arrocera (Bell *et al.*, 2014). En cuanto a la distribución por departamentos, el 23,1 % de las explotaciones con venta de cerdos se ubicaba en el

departamento de Canelones, seguido por Colonia (10,8 %), San José (8,4 %), Rocha (6,9 %) y Soriano (6,7 %) (MGAP-DIEA, 2013).

#### 2.2.2.2 Sistemas de producción

Los sistemas de producción pueden definirse en función de los objetivos de producción, del tipo de alojamiento y del tipo de alimentación.

De acuerdo a los objetivos de producción, en nuestro país el 77 % de los productores comerciales de cerdos de Uruguay se dedican a la cría y recría (criadores), el 19 % al ciclo completo; y el 4 % a terminación. Para los establecimientos criadores el rubro porcino no es el principal generador de ingresos y se caracterizan por una escasa inversión en instalaciones. En cambio, para la mayoría de las explotaciones de ciclo completo, el rubro porcino sí representa la principal fuente de ingresos y la inversión en instalaciones es mayor (González y Bauza, 2009).

En función de los sistemas de alojamiento, un 36 % de las explotaciones con cerdos en Uruguay emplea el confinamiento total o parcial de los animales; un 44 % utiliza la cría a campo y un 20 % una combinación de ambos sistemas. La correlación entre el objetivo de producción y el tipo de alojamiento es alta, ya que la mayoría de los criadores, quienes manejan un número menor de animales, utilizan el sistema a campo con menor inversión, mientras que las explotaciones de ciclo completo emplean el confinamiento o la combinación de sistemas (González y Bauza, 2009).

Al considerar la alimentación que reciben los animales, puede observarse que el 94 % de las explotaciones utiliza una complementación entre ración balanceada y alimentos alternativos. Estos últimos pueden ser subproductos lácteos, granos, subproductos de molinería y residuos de industria alimentaria. La ración balanceada es el principal alimento en el 61 % de las explotaciones (que concentran más del 71 % de las existencias, aunque solamente el 27 % de los animales son alimentados únicamente en base a ración), mientras que las pasturas son empleadas como parte de la alimentación de los animales en el 71 % de las explotaciones (42 % del stock).

Los sistemas de alimentación también se correlacionan con la escala productiva y el nivel de inversión. En las explotaciones de menor tamaño predomina una alimentación basada en la combinación de concentrado y pasturas, en tanto que los productores con más de 500 animales utilizan preferentemente el concentrado (González y Bauza, 2009).

#### 2.2.2.3 Rodeo porcino: número de animales, categorías y razas

Para el año 2016 (datos a junio de ese año, Cuadro 1), las existencias se ubicaron alrededor de los 187.000 animales. A pesar de la disminución en el número de productores, el número de animales se ha mantenido relativamente constante debido a la concentración de la producción en explotaciones de mayor escala. De acuerdo a los datos recabados en el último Censo General Agropecuario del año 2011 (Cuadro 2), para ese entonces las existencias porcinas del país eran de 194.639 animales. Para ese mismo año, el 29 % de las explotaciones concentraban el 84 % de los animales, mientras que las explotaciones de menor escala constituían el 71 % de las explotaciones totales y poseían solamente el 16 % de los animales (MGAP-DIEA, 2013).

Cuadro 2: número de explotaciones y existencias registradas durante el Censo General Agropecuario 2011 (MGAP-DIEA, 2013).

Tamaño de la piara (N° de animales)	Explotaciones con cerdos					
	Total		Con producción comercial			
			Existencias de cerdos			Promedio (cabezas por explotación)
	N° de explotaciones	Existencias	N° de explotaciones	Total		
				Cabezas	%	
Total	8080	194.639	2.367	163.577	100	69
Menos de 10	5451	17.290	631	3.117	1,9	5
De 10 a 20	1260	17.564	620	8.964	5,5	14
De 21 a 50	854	27.136	619	20.271	12,4	33
De 50 a 151	389	31.926	372	30.662	18,7	82
De 151 a 300	67	13.967	66	13.807	8,4	209
Más de 300	59	86.756	59	86.756	53	1470

Fuente: Censo General Agropecuario 2011 (MGAP-DIEA, 2013).

Con respecto a las razas de cerdos criados en Uruguay, en la actualidad predominan los híbridos comerciales, de alta producción y adaptados a sistemas de producción intensivos. Los reproductores de este tipo comenzaron a importarse a partir de la década del 90, llegando a reemplazar en gran medida a las razas utilizadas tradicionalmente, como ser Duroc, Landrace y Large White (Barlocco, 2011, González y Bauza, 2009). Barlocco (2011) señala que la recuperación de estas razas clásicas podría ser trascendental para el desarrollo del sector, principalmente para los productores que no cuentan con los recursos para cumplir con los requerimientos de las líneas híbridas. Para estos productores, otra posibilidad radicaría en la utilización de recursos porcinos locales y sus cruzamientos con otras razas, ya que estos se encuentran localmente adaptados y se caracterizan por su rusticidad, lo cual les permite producir con menores requerimientos.

La utilización de animales adaptados localmente o sus cruzamientos se observa a nivel mundial en los sistemas tradicionales de subsistencia de pequeña escala. Estos sistemas son fundamentales para garantizar la seguridad alimentaria y forman parte

de los medios de subsistencia del 70 % de la población pobre del medio rural (FAO, 2016, Hoffmann, 2010).

A pesar de que nuestro país cuenta con recursos zoogenéticos locales, estos no son utilizados con fines productivos debido fundamentalmente al desconocimiento de sus características y a la buena adaptación de las razas extranjeras (Castro *et al.*, 2004).

### 2.3 RECURSOS ZOOGENÉTICOS

Los recursos zoogenéticos son las especies animales, y sus diferentes poblaciones, que se utilizan o pueden utilizarse para la producción de alimentos y la agricultura. Las poblaciones diferenciadas dentro de una misma especie constituyen las razas (FAO, 2010). Si bien existen diferentes definiciones para el término raza, según la FAO (1999), citado por FAO (2010), una raza consiste en un grupo subespecífico de ganado doméstico con características externas definibles e identificables que permiten separarlo por inspección visual de otros grupos de la misma especie, o bien en un grupo cuya separación geográfica y/o cultural de grupos fenotípicamente similares ha llevado a aceptar su identidad separada.

Los recursos zoogenéticos locales se caracterizan por su adaptación a las condiciones en las cuales se originaron, lo cual puede observarse a través del desarrollo de resistencia a enfermedades y parásitos específicos, adaptación a las condiciones climáticas, disponibilidad de agua y alimentos, y capacidad de producir sobre la base de los recursos forrajeros locales. Estas características les permiten producir en ambientes y sistemas en los cuales otras razas, como las comerciales mejor adaptadas a sistemas de producción controlados, no logran producir (FAO, 2015).

Los rasgos productivos y funcionales de las razas y la habilidad de estas para adaptarse a las condiciones locales, son definidos por su diversidad genética (Hoffmann, 2010). La diversidad de los recursos zoogenéticos es fundamental para todos los sistemas de producción, proporcionando la materia prima para la mejora genética y la adaptación a las circunstancias cambiantes. El mantenimiento de esta

diversidad incrementa las alternativas para enfrentar los retos que puedan presentarse en el futuro, ya sean relacionados con el cambio climático, la amenaza de nuevas enfermedades, el descubrimiento de nuevos requisitos nutricionales para las personas, las fluctuaciones del mercado o los cambios en las necesidades de la sociedad (FAO, 2010).

En la actualidad, la diversidad del ganado a nivel mundial está reduciéndose y se están perdiendo rápidamente recursos zoogenéticos únicos y generalmente no caracterizados. De las 7161 razas registradas en la base de datos DAD-IS de FAO, el 26 % se encuentra en riesgo, mientras que en el 66 % de estos recursos se desconoce el estado de riesgo (FAO-DAD-IS, 2018a).

La extinción de estos recursos y de su diversidad genética implica la pérdida de sus caracteres adaptativos únicos y reduce las oportunidades para disminuir la pobreza, lograr la seguridad alimentaria y una agricultura sostenible (Hoffmann, 2010).

Por otro lado, los recursos zoogenéticos locales constituyen un medio de vida para muchas familias rurales de menores recursos alrededor del mundo. Estos animales proporcionan insumos para la producción agrícola y pueden ser vendidos en casos de necesidad, equivaliendo a los servicios de ahorro y seguro. El ganado y sus productos también satisfacen diferentes funciones sociales y culturales, y contribuyen al apoyo de actividades deportivas y de esparcimiento. El ganado también cumple funciones importantes en los ecosistemas agrícolas, como ser el reciclaje de nutrientes, dispersión de semillas y mantenimiento del hábitat. Las funciones del ganado en sociedades con mayor poder adquisitivo son menos variadas, pero se mantienen algunas funciones culturales importantes relacionadas con el deporte y el esparcimiento, así como con el suministro de productos alimenticios de importancia cultural. Asimismo han surgido otros roles, generalmente en el caso de razas tradicionales, vinculados con el turismo y la gestión de paisajes (FAO, 2010).

La conservación de los recursos zoogenéticos locales y de la diversidad genética que portan se ha convertido en una prioridad a nivel mundial. El reto relacionado con la gestión de los recursos zoogenéticos consiste en promover

estrategias que permitan el desarrollo económico mientras se mantiene y utiliza la diversidad genética (FAO, 2010, Hoffmann, 2010).

Para lograr conservar a los recursos zoogenéticos es necesario caracterizarlos, lo que conlleva el estudio de diferentes características (productivas, morfométricas, genéticas, etc). En la próxima sección se mencionarán los recursos zoogenéticos porcinos de Uruguay, puntualizando en la raza Pampa Rocha y en los diferentes esfuerzos que se han llevado a cabo en el país para su caracterización.

### 2.3.1 Recursos zoogenéticos porcinos de Uruguay

En nuestro país se han descrito tres recursos porcinos locales: los cerdos Mamellados, Casco de Mula y Pampa Rocha (Castro, 2007, Vadell *et al.*, 1995). Los Mamellados se caracterizan por la presencia de mamellas (apéndices pendulosos en la base del cuello), característica asociada a cerdos descendientes de ibéricos. En el año 1997 fueron identificados en un frigorífico en nuestro País. Con anterioridad a esa fecha existían referencias de estos animales, pero no se observaban con facilidad por encontrarse fuera del circuito comercial (Castro, 2007).

Los cerdos Casco de Mula presentan fusión de dedos (sindactilia), característica que los haría más resistentes a la fiebre aftosa en comparación con otros recursos. Uno de los posibles orígenes propuestos para estos cerdos es Brasil, desde donde probablemente hayan llegado a Uruguay, ya que las evidencias de estos animales corresponden a departamentos fronterizos o cercanos al vecino país (Castro, 2007).

En la actualidad no existe información respecto al número de cerdos Mamellados y Casco de Mula en Uruguay, desconociéndose la situación de riesgo de ambos recursos (FAO-DAD-IS, 2018b).

Los cerdos Pampa Rocha se originaron naturalmente en la zona este de Uruguay, principalmente en el departamento de Rocha, en un ecosistema de bañados, con buena capacidad de producción de pasturas y utilizando como alimento el fruto de la palmera *Butia capitata* que predomina en el lugar (Vadell, 2008, Castro, 2007).

En el año 1997 fue considerada como la primera raza criolla de cerdos por la Asociación Rural del Uruguay (Barlocco, 2011).



Foto 1: cerda Pampa Rocha y su lechigada. Foto tomada en el Centro Regional Sur, Facultad de Agronomía, Departamento de Canelones.

El plantel de reproductores de esta raza se estableció en el año 1996 cuando fue creada la Unidad de Producción de Cerdos (UPC) en el Centro Regional Sur (Facultad de Agronomía). En la actualidad los animales de esta raza se mantienen principalmente en la mencionada unidad, en un sistema de cría a cielo abierto y alimentados fundamentalmente con pasturas (Castro *et al.*, 2012).

Los cerdos Pampa Rocha se caracterizan por ser de tamaño medio y presentar pelaje negro con hasta seis regiones de pelaje blanco (frente, punta de la cola y las cuatro extremidades), con predominancia de un perfil cóncavo y orejas de tipo célticas (Vadell y Carballo 2013, Castro *et al.*, 2012). Las cualidades más destacables de la raza se relacionan con características de las hembras, tales como la prolificidad, la habilidad de consumo de pasturas, la producción de leche y la longevidad productiva (Vadell *et al.*, 2010). A causa de su rusticidad y adaptación, esta raza es utilizada por pequeños productores quienes emplean sistemas de producción de mínima inversión.

Estos cerdos son el recurso porcino local más estudiado, lográndose hasta la actualidad una importante caracterización productiva, morfométrica y genética.

Los estudios de caracterización morfométrica han evidenciado dimorfismo sexual, así como una proporción esquelética mayor en comparación con la de otros porcinos latinoamericanos (Castro *et al.*, 2012).

Diferentes estudios acerca del comportamiento productivo de esta raza destacan la superioridad de los cruzamientos de la misma con cerdos Duroc y Large White en la fase de crecimiento y engorde (Barlocco y Vadell, 2005). Con relación a la carne del cerdo Pampa Rocha, las investigaciones han evidenciado condiciones de estabilidad oxidativa y calidad de carne aceptables para su industrialización (Carballo, 2013, Mernies *et al.* 2012).

Los diferentes estudios realizados hasta el momento han permitido concluir que los cerdos Pampa Rocha presentan niveles de productividad aceptables y que es posible su inclusión en la cadena productiva (Barlocco 2011, Barlocco y Vadell, 2005).

La caracterización genética de la raza Pampa Rocha ha incluido la aplicación de un panel de microsatélites recomendados por FAO-ISAG a partir de lo cual se determinó que esta raza presenta una elevada variabilidad genética y constituye un grupo genético bien definido (Montenegro *et al.*, 2015). Otros estudios de caracterización genética del cerdo Pampa Rocha han implicado el análisis de polimorfismos en genes mayores asociados a características de interés productivo (Llambí *et al.*, 2015, Montenegro, 2012).

En la actualidad se desconoce el número exacto de cerdos Pampa Rocha, encontrándose en estado de riesgo según la base de datos DAD-IS de FAO (FAO-DAD-IS, 2018b).

Si bien esta raza cuenta con una importante caracterización en aspectos productivos, morfométricos y genéticos, los estudios enfocados en integrar características productivas con aspectos moleculares son escasos, pudiéndose citar únicamente el trabajo de Llambí *et al.*, 2015.

En los cerdos uno de los aspectos productivos de mayor importancia es la alimentación, debido a su efecto sobre la rentabilidad del sector y la calidad del

producto final. En este sentido es fundamental evaluar cómo se ven afectados el comportamiento productivo y la calidad de la carne. Asimismo es interesante comprender los cambios que ocurren a nivel molecular como respuesta a la alimentación que reciben los animales. En la actualidad existen diferentes disciplinas que permiten este abordaje, tales como la nutrigenómica y la transcriptómica. Ambas se enmarcan dentro de las ciencias “ómicas”, áreas de investigación que han experimentado un gran desarrollo en los últimos años.

En las siguientes secciones se abordarán la importancia de la alimentación y su incidencia sobre características de interés económico en cerdos, y las oportunidades que ofrecen la nutrigenómica y la transcriptómica para profundizar en aspectos moleculares que pueden verse modificados por la alimentación.

#### 2.4 IMPORTANCIA DE LA ALIMENTACIÓN EN PRODUCCIÓN PORCINA

Los costos en alimentación representan cerca del 70 % de los costos totales en la producción porcina. En el caso de Uruguay, donde esta actividad es llevada a cabo mayoritariamente por pequeños y medianos productores, los cambios en los valores de los alimentos repercutirán directamente en la rentabilidad. Esto determina la búsqueda de una economía en la dieta ofrecida, pero sin afectar los parámetros productivos de los animales (Echenique y Capra, 2011, Bauza, 2000).

La alimentación también influye en la composición y calidad de la carne y en los productos elaborados a partir de esta. En la producción porcina es considerada uno de los aspectos más importantes cuando se busca la obtención de un producto de calidad (Echenique, 2007).

El metabolismo de los lípidos a nivel muscular es uno de los factores que afecta en gran medida a la calidad de la carne. El cerdo por ser un animal monogástrico almacena los ácidos grasos del alimento con pocas variaciones, existiendo una relación cercana entre el tipo de grasa ingerida y la depositada. Los ácidos grasos presentes en la carne y en el tejido adiposo del cerdo pueden provenir de la síntesis por parte del animal o de la deposición directa a partir de la dieta. Esto determina que sea posible cambiar, dentro de ciertos límites, el perfil lipídico en los

tejidos muscular y adiposo de los cerdos, así como el contenido de grasa intramuscular a través de la alimentación (Echenique, 2007, Rosenvold y Andersen, 2003).

En la industria porcina, enfocarse en la naturaleza de la fuente de grasa de la dieta es esencial para asegurar la producción de carne de calidad (Tikk *et al.*, 2007).

Las características del tejido adiposo de cerdo serán diferentes en función de si su destino final será la industrialización o el consumo fresco. Desde el punto de vista industrial, la composición del tejido adiposo va a afectar propiedades tecnológicas de la materia prima, como ser la consistencia, color, vida útil, aroma y sabor. Estas propiedades dependerán principalmente de la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados que conforman los fosfolípidos y triglicéridos del tejido adiposo. Si la proporción de ácidos grasos poliinsaturados es elevada, se producirán consistencias blandas, viéndose también afectados el color, la vida útil de la carne y los productos elaborados, como consecuencia de una mayor susceptibilidad a la oxidación. Si la proporción de ácidos grasos saturados es elevada, el tejido adiposo presentará consistencia firme, color blanco y baja susceptibilidad al deterioro por oxidación, siendo estas características buscadas desde el punto de vista industrial (Echenique, 2007).

Los requerimientos para la carne destinada para consumo fresco son opuestos a los industriales. Desde el punto de vista nutricional es fundamental reducir el contenido de AGS en la carne para consumo humano ya que su presencia, conjuntamente con la del colesterol, eleva la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el suero, lo cual se asocia con la presentación de enfermedades coronarias. Dentro de los AGS, no todos son equivalentes ya que los que poseen cadenas de 18 carbonos o más de longitud no contribuyen al incremento del colesterol sérico en los seres humanos. Se considera hipercolesterolémicos a los ácidos grasos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), siendo este último el que se encuentra en mayor proporción en la grasa porcina (Braun y Pattacini, 2013).

Por otro lado, se promueve el incremento del consumo de los AGMI y AGPI por los beneficios que presentan para la salud humana. Los AGPI son esenciales y

por lo tanto deben ser proporcionados por la dieta (Simopoulos, 2016). Sin embargo deben mantenerse relaciones adecuadas entre los AGPI de tipo omega 6 (n6) y los omega 3 (n3), así como también se desaconseja el consumo de ácidos grasos trans y se incentiva el aporte de antioxidantes naturales (Dugan *et al.*, 2015). El ácido linoleico es el principal AGPI esencial de la serie n6 por ser el precursor en el organismo de todos los ácidos grasos de la serie n6 por desaturación y elongación enzimática. En la serie n3 encontramos al ácido linolénico, a partir del cual se originan los AGPI de la serie n3 (Braun y Pattacini, 2013).

Los cerdos tampoco poseen sistemas enzimáticos capaces de sintetizar los ácidos linoleico y linolénico, por lo cual la presencia de estos en la carne porcina depende exclusivamente del aporte a través de la alimentación. El consumo de carne de cerdos producidos en base a una alimentación en la cual se haya considerado la inclusión de estos ácidos grasos esenciales constituye una forma de incorporarlos en las dietas humanas.

Debido a la incidencia de la alimentación en la rentabilidad, el comportamiento productivo y la calidad de la carne, es de interés el estudio de la inclusión de diferentes alimentos en la dieta. Un alimento que puede ser tenido en cuenta por ser económico y por sus características nutricionales es el afrechillo de arroz.

El afrechillo de arroz es un subproducto de la industria molinera que posee una elevada concentración de energía y cantidades adecuadas de proteína que se ubican en el orden del 10 al 15 %. Se caracteriza por presentar un alto contenido de ácidos grasos insaturados, lo cual puede producir enranciamiento oxidativo de los lípidos, pudiendo afectar el valor nutritivo y palatabilidad (Cozzolino, 2000). Esto también puede incidir negativamente sobre la calidad de la grasa con fines de industrialización, pero resultando interesante si se destina a cortes para consumo fresco (Bauza *et al.*, 2007).

## 2.5 ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA A TRAVÉS DE LAS CIENCIAS ÓMICAS

### 2.5.1 Ciencias ómicas

La genómica es la ciencia dedicada al estudio de los genomas. Dentro de los objetivos de la genómica se encuentra la comprensión del contenido y organización de los genomas, y de la función de sus diferentes componentes. Dentro de la genómica existen distintos enfoques, como ser la genómica estructural, la comparativa o la funcional. La genómica estructural, tal como lo indica su nombre, se encarga de estudiar la estructura de los genomas. La genómica comparativa estudia la función, el contenido y la organización de genomas de diferentes especies u organismos y los compara con otros previamente secuenciados y con genomas ancestrales (Llambí y Arruga, 2018).

La genómica funcional surgió a partir de la necesidad de seguir avanzando en el conocimiento de la función de los genomas y engloba a las llamadas ciencias “ómicas”. Estas disciplinas estudian los diferentes productos de la expresión de los genes en un momento determinado o bajo distintas condiciones (transcriptómica, proteómica, metabolómica entre otras) (Llambí y Arruga, 2018).

### 2.5.2 Nutrigenómica y transcriptómica

Dentro de las ciencias ómicas se encuentra la nutrigenómica, que estudia el rol de los nutrientes y componentes bioactivos de los alimentos sobre la expresión génica, incluyendo el efecto de la dieta sobre la estabilidad del genoma, alteraciones epigenómicas; y en la expresión de ARN, proteínas y metabolitos (Fenech *et al.*, 2011). Los nutrientes y componentes de la dieta pueden afectar a los individuos influyendo sobre los diferentes niveles que son objeto de estudio de las ciencias ómicas (Kato y Kimura, 2003).

La transcriptómica es otra de las ciencias que se enmarca dentro de la genómica funcional. Esta disciplina estudia los transcriptomas bajo diferentes

condiciones. El transcriptoma se define como el conjunto de moléculas de ARN que se expresan en una célula, tejido u organismo (Blencowe *et al.*, 2009).

La transcriptómica incluye la clasificación de los diferentes transcritos, la determinación de la estructura transcripcional de los genes y la cuantificación de los cambios en la expresión génica bajo determinadas condiciones o en distintas etapas del desarrollo (Wang *et al.*, 2009).

El transcriptoma representa solo uno de los múltiples aspectos biológicos que se modifican en respuesta a los nutrientes. Sin embargo, Kato y Kimura (2003) sostienen que el análisis del mismo puede emplearse como marcador global de la respuesta de las células, órganos y estado corporal de los individuos resultante de cambios en el proteoma y metaboloma (Figura 1).

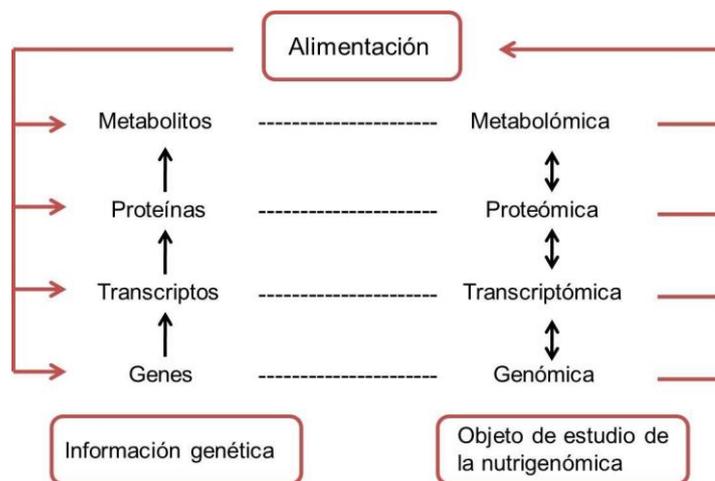


Figura 1: Incidencia de los nutrientes sobre los diferentes niveles de la expresión génica. Figura adaptada de Kato y Kimura (2003).

El conocimiento del transcriptoma del cerdo bajo determinadas condiciones es importante para interpretar elementos funcionales del genoma y mejorar la comprensión de características complejas como la deposición de grasa, el metabolismo y el crecimiento. La generación de esta información en el cerdo es significativa ya que el mismo es uno de los modelos animales más utilizados en la investigación de enfermedades humanas, como la obesidad y la diabetes, debido a su similitud fisiológica (Chen *et al.*, 2011).

La importancia del cerdo como modelo en biomedicina también radica en la gran homología existente entre su genoma y el de los seres humanos, a pesar de que ambas especies pertenecen a grupos evolutivos diferentes (Llambí y Arruga, 2018).

En los últimos años se ha buscado que las diferentes ciencias ómicas sean incorporadas en el campo de la conservación de los recursos zoogenéticos. Bruford *et al.*, 2015, sostiene que es fundamental incorporar los avances tecnológicos de las ciencias ómicas para garantizar la conservación de la biodiversidad de los animales de granja. Para que los estudios que buscan el recuento de las bases biológicas para la adaptación y la identificación de objetivos de selección y conservación en ambientes diversos sean exitosos, se requerirá la integración de datos genómicos, epigenómicos, transcriptómicos y ambientales. Las herramientas genómicas en conjunto con los estudios fenotípicos deben aplicarse de manera más consistente para describir, utilizar y conservar la diversidad genómica y de razas del mundo para las próximas generaciones (Bruford *et al.*, 2015).

#### 2.5.2.1 ARN-Seq

El desarrollo de la técnica de secuenciación del ARN (ARN-Seq), basada en las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, ha posibilitado el mapeo y la cuantificación de los transcriptomas (Mortazavi *et al.*, 2008). La misma proporciona una visión más detallada de la expresión génica, permitiendo identificar las diferentes moléculas de ARN, los eventos de splicing alternativo y la expresión específica de alelos. De esta forma ha revolucionado la comprensión de la complejidad y el dinamismo de los transcriptomas (Kukurba y Montgomery, 2015).

Un experimento típico de RNA-Seq comprende el aislamiento de ARN a partir de una muestra biológica, su conversión en ADN complementario (ADNc), la construcción de una librería y la posterior secuenciación en una plataforma NGS (next-generation sequencing).

Para asegurar el éxito de la aplicación de la técnica de RNA-Seq, el ARN extraído debe ser de suficiente calidad para la generación de la librería. La calidad del ARN suele medirse a través del número de integridad del ARN (RIN). Los

valores de RIN se ubican entre 1 y 10, siendo las muestras con valor de RIN 10 las que presentan menor degradación y mayor calidad. El RIN estima la integridad de la muestra usando electroforesis en gel y el análisis de las relaciones de las bandas ribosómicas 28S a 18S (Kukurba y Montgomery, 2015).

La creación de la librería de ARN-Seq puede variar mediante la selección de diferentes ARN y entre plataformas NGS. Este paso implica el aislamiento de las moléculas de ARN deseadas, su transcripción inversa a ADNc, la fragmentación o amplificación de las moléculas de ADNc de forma aleatoria y la unión de adaptadores de secuenciación. La precisión en la detección de los tipos específicos de ARN depende en gran medida de la construcción de la librería. El protocolo para la construcción de la librería debe seleccionarse en función del tipo de moléculas de ARN que se desea estudiar. El conjunto de ARN total incluye ARN ribosómico (ARNr), ARN mensajero precursor (pre-ARNm), ARNm y diversas clases de ARN no codificante (ARNnc). En la mayoría de los tipos celulares las moléculas de ARNr representan más del 95% del ARN celular total. Si las moléculas de ARNr no se eliminan antes de la construcción de la librería, disminuirá la detección de otros ARN menos abundantes. Muchos protocolos se centran en el enriquecimiento de las moléculas de ARNm antes de la construcción de la librería mediante la selección de ARN poliadenilados (poli-A). Alternativamente, se puede reducir selectivamente el ARNr utilizando kits comercialmente (Kukurba y Montgomery, 2015).

El análisis de los datos resultantes de un experimento de ARN-Seq presenta desafíos computacionales únicos que no se encuentran en otros análisis basados en secuencias y requiere una consideración específica de los sesgos inherentes a los datos de expresión (Kukurba y Montgomery, 2015).

Una vez obtenidos los reads (lecturas) en una plataforma NGS, se procede al control de calidad y filtrado de esas secuencias. Si el genoma de referencia de la especie estudiada está disponible, el análisis de ARN-seq normalmente implica el mapeo de los reads sobre el genoma de referencia o transcriptoma para inferir qué transcritos son expresados. Cuando un genoma de referencia no está disponible o está incompleto, las lecturas de ARN-seq pueden ensamblarse *de novo* (Conesa *et al.*, 2016).

El paso posterior generalmente consiste en la estimación y cuantificación de la expresión génica, que se determina principalmente en base al número de reads asignados a cada secuencia de transcripción (Conesa *et al.*, 2016).

La técnica de ARN-seq tiene diversas aplicaciones. La más común es la detección de los genes que se expresan diferencialmente entre grupos experimentales (muestras de diferentes tejidos, grupos de tratamiento o muestras de diferentes poblaciones). El análisis de la expresión génica diferencial puede complementarse con estudios de asociación cuando se usan para proporcionar información de expresión diferencial de genes ubicados en regiones genómicas de interés identificadas por GWAS. Otras aplicaciones de la técnica de ARN-seq son la identificación de diferencias en la expresión de isoformas y de la expresión específica de alelos. Simultáneamente con el análisis de la expresión génica, los datos de ARN-seq pueden usarse para identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o repeticiones de secuencias simples para uso posterior en estudios de marcadores. Asimismo esta técnica se usa para mejorar las anotaciones genómicas mediante la identificación de nuevos transcritos (Hekman *et al.*, 2015).

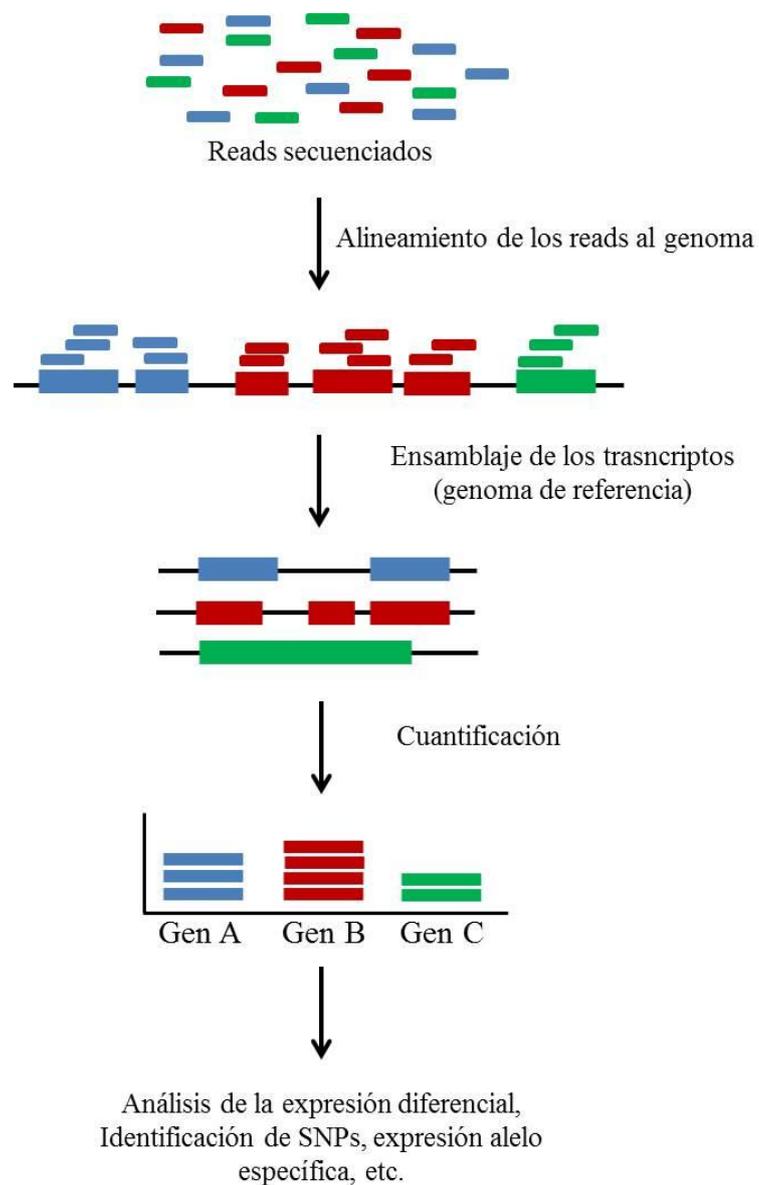


Figura 2: esquema general del análisis de datos obtenidos mediante ARN-Seq.

Fuente: Modificado de Kukurba y Montgomery (2015).

Numerosos trabajos analizan el transcriptoma de diversos órganos y tejidos en cerdos mediante ARN-Seq (Liu *et al.*, 2018, Palombo *et al.*, 2018, Xu *et al.*, 2018). Dentro de los estudios nutricionales pueden citarse trabajos que evalúan el efecto la contaminación de la dieta con micotoxinas sobre el transcriptoma del hígado e intestino (Régner *et al.*, 2017), o la incidencia de la alimentación sobre el

transcriptoma del músculo esquelético e hígado (Ogłuszka *et al.*, 2017, Szostak *et al.*, 2016). Esta técnica también se ha utilizado para identificar marcadores para características de interés productivo (Piórkowska *et al.*, 2018, Ropka-Molik *et al.*, 2018). En nuestro país y para el caso de animales de granja existen estudios transcriptómicos en ovinos (Peraza *et al.*, 2016, Grasso 2013), no habiendo antecedentes en cerdos.

### 3. INCLUSIÓN DE AFRECHILLO DE ARROZ EN DIETAS PARA LECHONES EN POSDESTETE: EFECTO SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CARACTERÍSTICAS DE CARCASA

Título abreviado: Utilización de afrechillo de arroz en dietas para lechones en posdestete.

<sup>1</sup>Montenegro, M.; <sup>2</sup>Carballo, C.; <sup>3</sup>González Barrios, P.; <sup>4</sup>Castro, G.; <sup>2</sup>Barlocco, N. y <sup>1</sup>Llambí, S.

<sup>1</sup>Departamento de Genética y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria. Udelar. Montevideo. Uruguay. [mariadc.montenegro@gmail.com](mailto:mariadc.montenegro@gmail.com), [silvia.llambi@gmail.com](mailto:silvia.llambi@gmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Producción Animal y Pasturas. Facultad de Agronomía. Udelar. Montevideo. Uruguay. [ceciscs@gmail.com](mailto:ceciscs@gmail.com), [nelsonbarlocco@gmail.com](mailto:nelsonbarlocco@gmail.com)

<sup>3</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Cómputo. Facultad de Agronomía. Udelar. [pgonza2211@gmail.com](mailto:pgonza2211@gmail.com)

<sup>4</sup>Departamento Animales de Granja. Facultad de Veterinaria. Udelar. Montevideo. Uruguay. [gustavocastorrosa@gmail.com](mailto:gustavocastorrosa@gmail.com)

Aceptado en Agrocienza Uruguay (ISSN 2301-1548). Revista editada por la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay.

### 3.1 RESUMEN

Se evaluó el efecto de la inclusión de afrechillo de arroz en la dieta sobre el comportamiento productivo y características de carcasa en lechones de la raza Pampa Rocha. Se utilizaron 16 animales desde el destete a los 42 días y hasta los 77 días de edad, los cuales se alojaron en boxes en un sistema de cama profunda de paja de trigo. Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con dos tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos consistieron en dietas con diferente contenido lipídico (T0 = 0 % de afrechillo de arroz; T15 = 15 % de afrechillo de arroz). Para evaluar el comportamiento productivo se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias para las variables consumo diario de ración (CD), ganancia de peso diaria (GD) y eficiencia de conversión (EC). Las características de carcasa evaluadas fueron peso y espesor de grasa dorsal, y se analizaron a través de una comparación de medias por tratamiento. Para GD y EC, se observaron diferencias durante la semana 5, no presentándose diferencias en el promedio del período experimental. Para el CD no se registraron diferencias a través de las semanas y en el promedio del período experimental. Las características de carcasa no difirieron estadísticamente entre tratamientos. En función de los resultados se concluye que el afrechillo de arroz podría considerarse como alternativa en la elaboración de raciones para lechones.

**Palabras clave:** nutrición, Pampa Rocha.

**Inclusion of rice bran in diets for post-weaning piglets: effect on the productive behavior and carcass traits**

### 3.2 SUMMARY

This study assessed the effect of bran rice inclusion in the diet on the productive behavior and carcass characteristics of Pampa Rocha piglets. Sixteen animals were used from weaning up to 42 days and up to 77 days of age, which were housed in boxes in a deep bed system of wheat straw. An experimental design of

complete blocks at random with two treatments and four replications was used. The treatments consisted of diets with different lipid content (T0 = 0 % rice bran; T15 = 15 % rice bran). To evaluate the productive behavior, analysis of variance and comparison of means were used for food daily consumption (CD), daily weight gain (GD) and conversion efficiency (EC). The carcass traits evaluated were weight and thickness of back fat, and were analyzed through a comparison of means by treatment. For GD and EC, differences were observed during week 5, with no differences in the average of the experimental period. For CD, no differences were recorded through the weeks or the average of the experimental period. Carcass traits did not differ statistically between treatments. Based on the results, it is concluded that rice bran could be considered as an alternative for piglets food preparation.

**Keywords:** nutrition, Pampa Rocha.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

La producción porcina en Uruguay se caracteriza por la presencia de pequeños y medianos productores, que deben competir en un mercado interno reducido abastecido en un porcentaje importante por productos importados y el agronegocio mediado por grandes empresas de producción intensiva. Como estrategia de supervivencia en el rubro existe una búsqueda permanente de alternativas que tiendan a reducir los costos de producción, representado mayoritariamente por la alimentación de los animales (Echenique y Capra, 2011). Es así que cualquier cambio en los valores de los alimentos repercutirá directamente en la rentabilidad, determinando la búsqueda de una economía en la dieta ofrecida, pero sin afectar los parámetros productivos (Bauza, 2000a).

Un alimento alternativo que puede considerarse debido a su bajo costo y características nutricionales es el afrechillo de arroz. El mismo puede reemplazar parte de los granos y de los subproductos proteicos, estos últimos generalmente de alto valor unitario, y se caracteriza por presentar una elevada concentración de energía, cantidades adecuadas de proteína y un alto contenido de ácidos grasos insaturados (Cozzolino, 2000). Las características de los lípidos del afrechillo de

arroz pueden repercutir sobre la palatabilidad y valor nutritivo de la carne, y afectar negativamente la calidad de la grasa con fines de industrialización. Sin embargo, su inclusión en la dieta puede resultar interesante cuando se destina a cortes para consumo fresco (Bauza *et al.*, 2007).

Además de las características de los alimentos, la raza de los animales es otro factor que debe considerarse por su incidencia sobre el comportamiento productivo, características de carcasa y calidad de carne. En nuestro país la única raza local es la raza Pampa Rocha. Los estudios relacionados con la caracterización productiva, de la canal, carne y grasa de este recurso han permitido concluir que presenta niveles de productividad similares a los observados en las razas tradicionales. Si bien presenta una tendencia al engrasamiento, esto puede modificarse manejando la instalación, los cruzamientos o la oferta de concentrado (Barlocco, 2011, Barlocco *et al.*, 2003). En la actualidad su bajo número poblacional es preocupante, principalmente por la introducción de líneas híbridas que han desplazado las razas existentes en el país. Por ser un recurso local caracterizado por su rusticidad, es utilizado principalmente por pequeños productores, tanto en pureza racial como en cruzamientos, ya que estos animales se adaptan a las condiciones fundamentalmente de infraestructura con que cuentan estos productores, a diferencia de las líneas híbridas comerciales cuyos requerimientos son mayores.

En función de estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del agregado de afrechillo de arroz en la dieta sobre el comportamiento productivo y características de carcasa en lechones de la raza Pampa Rocha.

### 3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en la Unidad de Producción de Cerdos del Centro Regional Sur (Estación Experimental de Facultad de Agronomía-Universidad de la República), ubicada en la localidad de Progreso (Canelones, Uruguay), entre los meses de julio y noviembre de 2014. Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo No. Exp. 111130-000834-13, aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Udelar).

Se utilizaron 16 cerdos Pampa Rocha (machos enteros y hembras) desde el destete (42 días) y hasta los 77 días de edad. El peso promedio al inicio del experimento fue de  $14,85 \pm 1,93$  Kg. Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con dos tratamientos y cuatro repeticiones. Los animales de cada repetición pertenecían a una misma camada y los tratamientos fueron asignados aleatoriamente dentro de cada bloque.

Como tratamientos se utilizaron dietas isoproteicas e isoenergéticas con diferente contenido lipídico: el tratamiento T0 consistió en una dieta con 0 % de afrechillo de arroz (control) y el tratamiento T15 una dieta con 15 % de afrechillo de arroz (mayor contenido lipídico). El porcentaje de afrechillo utilizado en el tratamiento T15 corresponde al máximo tolerado por la categoría (Bauza, 2000b). En el cuadro 1 se detalla la composición porcentual de las dietas y en el cuadro 2 la composición química del afrechillo de arroz utilizado. El contenido energético de ambas dietas fue de 3.300 Kcal de Energía Digestible por Kg y 18 % de proteína cruda (Tablas de Requerimientos del National Research Council, 1998).

La alimentación se realizó una vez al día (8:00 AM), basándose la oferta diaria de alimentos en el peso vivo de los animales y considerando una restricción de 75 % respecto al consumo máximo teórico durante los cuatro primeros días.

Cuadro 1. Composición porcentual de ingredientes y niveles nutricionales de las dietas empleadas (kg).

Ingredientes	T0	T15
Maíz	68	55
Harina de Soja	28,5	26,5
Afrechillo de Arroz	0	15
Fosfato	1,72	1,72
Carbonato	0,8	0,8
Núcleo vitamínico	0,5	0,5
Sal	0,5	0,5
Total	100	100
<u>Niveles nutricionales (en base fresca)</u>		
Proteína Cruda (%)	0,2	0,19
Energía metabolizable (Kcal/kg)	3,25	3,27
Extracto etéreo (%)	0,034	0,048

Cuadro 2. Composición química del afrechillo de arroz utilizado (datos en base fresca)

Materia seca (%)	88,9
Proteína cruda (%)	13,1
Cenizas (%)	10,8
Fibra cruda (%)	8,3
Extracto etéreo (%)	14,8
Energía digestible (Kcal/kg)*	3200

Datos proporcionados por la empresa privada que suministro el afrechillo de arroz. \* calculado.

El experimento se llevó a cabo en un sistema de cama profunda de paja de trigo de 50 cm de profundidad, alojándose cada repetición en boxes con una superficie de 0,52 m<sup>2</sup>/animal, disponiendo de comederos grupales y bebederos tipo chupete para permitir el libre acceso al agua de bebida.

Para evaluar el comportamiento productivo se determinó el consumo diario de ración (kg/día), la ganancia de peso diaria (kg/día) y la eficiencia de conversión, de forma semanal y en el promedio del período experimental.

Respecto a las características de carcasa, las mismas fueron efectuadas sobre los machos (seis animales por tratamiento), los cuales fueron sacrificados al finalizar la experiencia, evaluándose el peso de la carcasa y el espesor de la grasa dorsal. Para la medición de espesor de grasa dorsal se empleó una regla milimetrada y se promedió los valores obtenidos a la altura de la primera costilla, última costilla y última vértebra.

Para el análisis estadístico del consumo diario de ración, ganancia de peso diaria y eficiencia de conversión, se realizó un análisis de varianza utilizando un modelo mixto con medidas repetidas en el tiempo. Las medidas repetidas fueron evaluadas a nivel de cada lechón y/o unidad experimental utilizando una estructura autoregresiva heterogénea a través del tiempo. La comparación de medias se realizó mediante el test de Diferencia Mínima Significativa (DMS) con un nivel de confianza del 95 %.

Para el análisis estadístico del peso de carcasa y espesor de grasa dorsal se realizó un ajuste de medias por tratamiento y su comparación a través de prueba t de student, con un nivel de significancia del 95%. Todos los análisis estadísticos fueron implementados mediante el software estadístico Infostat.

### 3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para las variables de comportamiento productivo, se observaron diferencias entre tratamientos durante la semana 5 (interacción tratamiento-fecha) tanto para la ganancia de peso como para eficiencia de conversión, siendo mayor la ganancia y mejor la eficiencia de conversión para el tratamiento T0. Para ambas variables no se observaron diferencias en el promedio del período experimental. En el caso de la variable consumo, no se registraron diferencias significativas a través de las semanas y durante el valor promedio del período experimental. Estos resultados se detallan en el Cuadro 3.

Existen antecedentes en nuestro país respecto al estudio de la inclusión de afrechillo de arroz integral en dietas de híbridos comerciales durante el período de terminación (60-110 Kg de peso vivo) y su efecto en el comportamiento productivo, características de canal, carne y grasa (Bauza *et al.*, 2007; Capra *et al.*, 2007). Al incluir este alimento en un nivel de 25 %, Bauza *et al.* (2007) encontraron una disminución en la velocidad de crecimiento, no observando diferencias en la eficiencia de conversión, respecto a dietas con diferente composición. Sin embargo, no existen trabajos que evalúen la inclusión de afrechillo de arroz integral en lechones en posdestete y en la raza Pampa Rocha.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo no difieren de los parámetros de crecimiento esperados reportados por las tablas de requerimientos disponibles (INRA, 1989). Los resultados de ganancia diaria en peso son superiores a los registrados por Barlocco *et al.* (2005) y Carballo (2007) en lechones Pampa Rocha y sus cruzamientos con razas comerciales, en etapa de posdestete y en condiciones de cría a campo, lo cual puede explicar las diferencias debido a los mayores requerimientos energéticos de los animales en esas condiciones. En comparación con ambos trabajos, nuestros datos de consumo y eficiencia de conversión fueron similares. Por su parte, Maciel *et al.* (2014) analizando el comportamiento productivo en lechones en posdestete en sistemas de producción al aire libre y en cama profunda, reportaron valores similares de ganancia diaria en los lechones criados a campo (0,550 kg/día), y superiores en los lechones criados en cama profunda (0,645 kg/día). Los datos de eficiencia de conversión registrados en nuestro trabajo son similares a los de estos autores.

Respecto a las características de carcasa, no se registraron diferencias entre tratamientos para las variables evaluadas (Cuadro 4).

Capra *et al.* (2007) al evaluar dietas con diferentes contenido lipídico, una de las cuales incluía un 25 % de afrechillo de arroz, en híbridos comerciales en etapa de terminación (60-110 kg), tampoco encontraron diferencias en características de carcasa.

Por ser los Pampa Rocha una raza caracterizada por su rusticidad, lo cual determina una deposición temprana de tejido adiposo (Barlocco *et al.*, 2003), y considerando el mayor contenido lipídico de la dieta que contenía afrechillo de arroz, se podrían haber esperado un efecto sobre el espesor de grasa dorsal. La ausencia de diferencias para esta variable podría deberse a que la duración del ensayo no haya sido suficiente para que se observarán diferencias.

Cuadro 3. Medias ajustadas y desvío estándar para ganancia de peso (kg/día), consumo de ración (kg/día) y conversión para los tratamientos T0 y T15, semanalmente y como promedio del periodo experimental.

Variable	Tratamiento	Semana					Promedio
		2	3	4	5	5	
Ganancia	T0	0,522 (0,03) a	0,535 (0,05) a	0,495 (0,05) a	0,748 (0,02) a	0,577 (0,01) a	
	T15	0,585 (0,03) a	0,439 (0,05) a	0,514 (0,05) a	0,673 (0,02) b	0,553 (0,01) a	
Consumo	T0	1,020 (0,08) a	1,037 (0,12) a	1,257 (0,15) a	1,420 (0,02) a	1,183 (0,08) a	
	T15	1,062 (0,08) a	1,105 (0,12) a	1,360 (0,15) a	1,547 (0,02) a	1,268 (0,08) a	
Conversión	T0	1,952 (0,24) a	1,9687 (0,32) a	2,680 (0,47) a	1,894 (0,08) b	2,124 (0,14) a	
	T15	1,896 (0,24) a	2,561 (0,32) a	2,682 (0,47) a	2,306 (0,08) a	2,360 (0,14) a	

Letras diferentes indican diferencias significativas, con un 95% de confianza. Los valores entre paréntesis corresponden al desvío estándar.

Cuadro 4. Medias ajustadas y desvío estándar de las características de carcasa evaluadas para los tratamientos T0 y T15.

	T0	T15
Peso Carcasa (Kg)	23,4 (2,3) a	24,2 (2,3) a
Espesor de grasa dorsal (mm)	1,47 (0,3) a	1,44 (0,3) a

Letras diferentes indican diferencias significativas, con un 95% de confianza.

Los valores entre paréntesis corresponden al desvío estándar.

### 3.6 CONCLUSIÓN

Debido a que la inclusión de afrechillo de arroz en la dieta no influyó en el comportamiento productivo y en las características de carcasa estudiadas de los lechones Pampa Rocha, se concluye que este alimento podría considerarse como una alternativa en la elaboración de raciones para esta categoría, principalmente al considerar la reducción en los costos de producción y por lo tanto en el resultado económico.

### 3.7 AGRADECIMIENTOS

La investigación que da origen a los resultados presentados en esta publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS\_NAC\_2013\_1\_11440 y de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC). Se agradece al Personal de la Unidad de Producción de Cerdos (Facultad de Agronomía-Udelar).

### 3.8 BIBLIOGRAFÍA

- 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* (pp31-39). Montevideo, Uruguay: Oficina de Publicaciones de la Facultad de Veterinaria.
- Barlocco, N., Galietta, G., Vadell, A., Mondelli, M. y Ballesteros, F.** (2003). *Evaluación de sistemas de producción de cerdos a campo basados en la utilización de pasturas. 2. Efecto sobre las canales.* En III Encuentro Latinoamericano de Especialistas en Sistemas de Producción Porcina a Campo. Marcos Juárez, Argentina. Recuperado de <https://www.upc.edu.uy/calidad-de-carcasa-carne-y-grasa?download=52:barlocco-y-col-2003-2>
- Barlocco, N., Gómez, A., Vadell, A. y Franco, J.** (2005). Crecimiento de lechones en sistemas de producción a campo. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 23, 67-72. Recuperado de <http://revistas.unellez.edu.ve/revista/index.php/ruct/article/view/34/31>
- Bauza, R.** (2000a). *El afrechillo de arroz como alimento para cerdos y otros animales domésticos* (pp76). Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía.
- Bauza, R.** (2000b). *Recopilación de los alimentos más comunes para cerdos.* Recuperado de <http://www.upc.edu.uy/apoyo-productor/alimentacion>
- Bauza, R., González, A., Silva, D., Capra, G., Echenique, A. y Grompone, M.A.** (2007). Evaluación de la inclusión de grano de soja desactivado, afrechillo de arroz integral o suero de queso en la dieta de cerdos engorde. 1. Efecto sobre el comportamiento. *Agrociencia Uruguay*, Volumen Especial, IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos, 47-52. Recuperado de <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/218/155>
- Capra, G., Echenique, A., Grompone, M. A., Bauza, R., González, A. y Silva, D.** (2007). Evaluación de la inclusión de grano de soja desactivado, 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 Uruguay*, Volumen Especial, IX

- Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos, 53-58.  
Recuperado de  
<http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/219/156>
- Carballo, C.** (2007). Efecto del genotipo y sexo en el comportamiento productivo de cerdos en la etapa de posdestete-recría en un sistema de producción a campo. *Agrociencia Uruguay*, Volumen Especial, IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos, 75-80. Recuperado de  
<http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/223/160>
- Cozzolino, D.** (2000). *Características de los suplementos utilizados en el Uruguay para su empleo en alimentación animal* (Serie Técnica N° 110). Montevideo, Uruguay: Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA.
- Echenique, A. y Capra, G.** (2011). *Desarrollo de tecnologías para mejora de la calidad de producto en sistemas familiares de producción porcina* (Serie FPTA N° 34). Montevideo, Uruguay: Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA.
- Institut National de la Recherche Agronomique.** (1989). *L'Alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles*. Paris, France: INRA Editions.
- Maciel, V., González Barrios, P., Carballo, C. y Barlocco, N.** (2014). *Evaluación del sistema de cama profunda en lechones en posdestete*. En V Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal, Montevideo, Uruguay.  
Recuperado de  
[http://www.alpa.org.ve/ojs/index.php/ojs\\_files/article/viewFile/2521/908](http://www.alpa.org.ve/ojs/index.php/ojs_files/article/viewFile/2521/908)
- National Research Council.** (1998). *Nutrient requirements of swine*. Washington, D.C., United States of America: The National Academy Press.

#### 4. CALIDAD DE CARNE EN CERDOS PAMPA ROCHA DE URUGUAY ALIMENTADOS CON DIETAS CON Y SIN AFRECHILLO DE ARROZ EN SU COMPOSICIÓN

María Montenegro<sup>1</sup>, Cecilia Carballo<sup>2</sup>, Beatriz Mernies<sup>1</sup>, Juan Franco<sup>3</sup>, Ali Saadoun<sup>4</sup>, Pablo González Barrios<sup>2</sup>, Nelson Barlocco<sup>2</sup>, Gustavo Castro<sup>1</sup>, Silvia Llambi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplaces 1620, CP 11600. Montevideo Uruguay.

<sup>2</sup>Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, CP 12900. Montevideo Uruguay.

<sup>3</sup>Estación Experimental Mario Cassinoni, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Ruta 3 Km 363, CP 60000. Paysandú, Uruguay.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400. Montevideo Uruguay.

<sup>1</sup> Autor para la correspondencia: María Montenegro *[mariadc.montenegro@gmail.com](mailto:mariadc.montenegro@gmail.com)*

Aceptado para su publicación en la revista ALPA (Archivos Latinoamericanos de Producción Animal). Publicada por la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. ISSN: 2075-8359 (online), 1022-1301 (paper).

#### 4.1 RESUMEN

Se evaluó el efecto de dietas con diferente contenido lipídico sobre variables de calidad de carne en cerdos de la raza local Pampa Rocha (Uruguay). Se emplearon 16 lechones, con un peso promedio inicial de  $14,85 \pm 1,93$  Kg, desde el destete, a los 42 días, y hasta los 77 días de edad, teniendo el ensayo una duración de 35 días. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con dos tratamientos. El experimento se llevó a cabo en boxes, en un sistema de cama profunda de paja de trigo. Los tratamientos consistieron en dietas con diferente contenido lipídico: el tratamiento T0 consistió en una dieta con 0 % de afrechillo de arroz (control) y el tratamiento T15 una dieta con 15 % de afrechillo de arroz (mayor contenido lipídico). Se midió el pH, color, fuerza de corte, contenido y perfil de ácidos grasos del tejido adiposo intramuscular. Los datos fueron analizados a través de un ANAVA con los efectos de bloque y tratamiento, realizándose posteriormente una comparación mediante el test LSD y un análisis de correlación de Pearson entre las variables de interés, con 95% de confianza. Se obtuvieron diferencias en el pH a los 90 minutos (T0 =  $5,77 \pm 0,13$ ; T15 =  $5,11 \pm 0,13$ ) y 24 horas *post mortem* (T0 =  $5,46 \pm 0,14$ ; T15 =  $4,92 \pm 0,14$ ), luminosidad (T0 =  $39,79 \pm 0,62$ ; T15 =  $42,34 \pm 0,62$ ), contenido de ácido linoleico (T0 =  $11,05 \pm 0,66$ ; T15 =  $13,79 \pm 0,66$ ), contenido de ácidos grasos poliinsaturados (T0 =  $13,26 \pm 0,78$ ; T15 =  $16,26 \pm 0,78$ ) y en la relación entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados (T0 =  $0,33 \pm 0,02$ ; T15 =  $0,39 \pm 0,02$ ). El tratamiento T15 pudo afectar desfavorablemente al pH y la luminosidad, resultando favorable desde el punto de vista nutricional el mayor contenido de AGPI observado en dicho tratamiento. Sin embargo, la relación n-6/n-3 fue elevada en ambos tratamientos, por lo cual debe considerarse la inclusión de alimentos con mayor contenido en AGPI de la serie n-3 para reducir esta relación. De acuerdo a estos resultados, se concluye que la utilización de afrechillo de arroz en un nivel del 15 % podría considerarse como alternativa de alimentación, debiendo tenerse en cuenta otros factores que podrían haber incidido sobre las variables evaluadas.

**Palabras clave:** pH, Color, Fuerza de corte, Ácidos grasos

## **Meat quality in pigs Pampa Rocha of Uruguay fed diets with and without rice bran in its composition**

### **4.2 ABSTRACT**

The effect of diets with different lipid content was evaluated on variables of meat quality in pigs of local breed Pampa Rocha (Uruguay). Sixteen piglets with an initial body weight of  $14.85 \pm 1.93$  Kg were used, from weaning (42 days) and up to 77 days of age, having the trial 35 days. The experimental design was completely randomized blocks with two treatments. The experiment was conducted in boxes, in a system of deep bed of wheat straw. The treatments consisted of different lipid content diets: T0 treatment consisted of a diet with 0% rice bran (control) and T15 treatment a diet with 15 % of rice bran (higher lipid content). The pH, color, shear force, intramuscular fat and fatty acid profile were measured. Data were analyzed through an ANAVA with block and treatment effects, subsequently performing a comparison using the LSD test and Pearson correlation between the variables of interest, with 95 % confidence. There were differences in pH at the 90 minutes (T0 =  $5.77 \pm 0.13$ ; T15 =  $5.11 \pm 0.13$ ) and 24 hours (T0 =  $5.46 \pm 0.14$ ; T15 =  $4.92 \pm 0.14$ ), luminosity (T0 =  $39.79 \pm 0.62$ ; T15 =  $42.34 \pm 0.62$ ), linoleic acid content (T0 =  $11.05 \pm 0.66$ ; T15 =  $13.79 \pm 0.66$ ), polyunsaturated fatty acid (PUFA) content (T0 =  $13.26 \pm 0.78$ ; T15 =  $16.26 \pm 0.78$ ), and on the relationship between polyunsaturated and saturated fatty acid (T0 =  $0.33 \pm 0.02$ ; T15 =  $0.39 \pm 0.02$ ). T15 treatment could adversely affect the pH and luminosity, but the higher content of PUFA observed in such treatment can be favorable nutritionally. The ratio of n-6/n-3 was elevated in both treatments, so it should be deemed the inclusion of food with highest content in the series n-3 PUFA to reduce this ratio. Based on these findings, it is concluded that the use of rice bran at a level of 15 % could be considered as an alternative food. However, other factors that might have influenced on the evaluated variables should be taken into account.

**Key words:** pH, Colour, Shear force, Fatty acids

### 4.3 INTRODUCCIÓN

Diversos factores inciden sobre la calidad de la carne en cerdos. Uno de estos es la alimentación, representando un importante porcentaje en los costos de producción. En Uruguay la producción porcina se caracteriza por la presencia de pequeños y medianos productores, para los cuales cualquier cambio en los valores de los alimentos repercutirá directamente en la rentabilidad, determinando así una búsqueda de dietas más económicas que no afecten los parámetros productivos (Echenique y Capra, 2011, Bauza, 2000). Un alimento alternativo que puede considerarse en función de su bajo costo y sus características nutricionales es el afrechillo de arroz, ya que posee una elevada concentración de energía, cantidades adecuadas de proteína y un alto contenido de ácidos grasos insaturados (Cozzolino, 2000). Los ácidos grasos presentes en la carne y tejido adiposo del cerdo pueden provenir de la síntesis por parte del animal o de la deposición directa a partir de la dieta, siendo así la alimentación una vía factible para modificar el perfil lipídico en los tejidos muscular y adiposo de los cerdos (Echenique, 2007, Rosenvold y Andersen, 2003).

La carne debe reunir determinadas características para cumplir con los requerimientos de comerciantes y consumidores. Dentro de las características que son consideradas para evaluar la calidad de la carne pueden citarse la capacidad de retención de agua, color, pH, contenido y composición del tejido adiposo, estabilidad oxidativa, sabor, aroma y textura (Simitzis *et al.*, 2010, Rosenvold y Andersen, 2003). En el caso de la industria porcina, enfocarse en la naturaleza de la fuente de grasa de la dieta es esencial para asegurar la producción de carne que cumpla con la calidad requerida (Tikk *et al.*, 2007). Desde el punto de vista industrial es deseable que el tejido adiposo presente consistencia firme, color blanco y baja susceptibilidad al deterioro por oxidación, características que se obtienen a través una mayor proporción de ácidos grasos saturados. Si la carne se destina para consumo fresco, los requerimientos son opuestos a los industriales, ya que se fomenta el consumo de ácidos grasos poliinsaturados. Si bien es fundamental mantener relaciones adecuadas entre los ácidos grasos de la serie omega 6 y omega 3, los ácidos grasos

poliinsaturados son esenciales y representan beneficios para la salud de los consumidores (Simopoulos, 2016, Echenique, 2007).

La calidad de la carne también es afectada por la interacción de otros factores como la edad de los animales, el manejo previo y posterior al sacrificio y el sistema de producción (Ngapo y Gariépy, 2008, Olsson y Pickova, 2005). El tipo genético también repercute en la calidad de la carne a través de su incidencia sobre la deposición de tejido adiposo y el perfil de ácidos grasos (Wood *et al.*, 2008). En Uruguay la única raza local de cerdos es la raza Pampa Rocha. Diferentes estudios de caracterización productiva, de la canal y carne de este recurso han permitido concluir que esta raza presenta niveles de productividad aceptables (Barlocco, 2011). En la actualidad, el bajo número poblacional de animales de esta raza es alarmante, principalmente debido a la introducción de líneas híbridas que han desplazado a las razas existentes en el país. Para la FAO (2010), la conservación de los recursos zoogenéticos locales es esencial para garantizar la seguridad alimentaria mundial y el desarrollo sostenible. En este sentido, avanzar en la caracterización productiva del cerdo Pampa Rocha es fundamental para la conservación de dicho recurso.

En función de estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dietas con diferente contenido lipídico, aportado por el afrechillo de arroz, sobre variables de calidad de carne en cerdos de la raza Pampa Rocha.

## 4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.4.1 Animales y diseño experimental

Los procedimientos se realizaron de acuerdo al protocolo N° Exp. 111130-000834-13 aprobado por Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Udelar, Uruguay). Se utilizaron 16 cerdos Pampa Rocha (12 machos enteros y 4 hembras) desde el destete (42 días) y hasta los 77 días de edad, con una duración del ensayo de 35 días. El peso promedio al inicio y al final del ensayo fue de  $14,85 \pm 1,93$  kg y  $32,3 \pm 3,66$  kg, respectivamente. Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con dos tratamientos y cuatro repeticiones. Los animales

de cada repetición pertenecían a una misma camada y los tratamientos fueron asignados aleatoriamente dentro de cada bloque. El experimento se llevó a cabo en un sistema de cama profunda de paja de trigo de 50 cm de profundidad, alojándose en boxes con una superficie de 0,52 m<sup>2</sup>/animal, disponiendo de comederos grupales y bebederos tipo chupete para permitir el libre acceso al agua de bebida. Las temperaturas promedio, mínima y máxima, dentro de los boxes fueron de 10,24 y 21,37°C respectivamente. El ensayo se realizó en la Unidad de Producción de Cerdos del Centro Regional Sur (Estación Experimental de Facultad de Agronomía, Universidad de la República) ubicada en la localidad de Progreso, departamento de Canelones, Uruguay.

#### 4.4.2 Tratamientos

Los tratamientos consistieron en dietas isoproteicas e isoenergéticas con diferente contenido lipídico: el tratamiento T0 consistió en una dieta con 0 % de afrechillo de arroz (control) y el tratamiento T15 una dieta con 15 % de afrechillo de arroz (mayor contenido lipídico). El contenido energético de ambas dietas fue de 3.300 Kcal de energía digestible por Kg y 18% de proteína cruda. En la Tabla 1 se detalla la composición de los tratamientos (ver Cuadro 1 del Capítulo 3). La alimentación se realizó una vez al día (8:00 am) y se basó en la oferta de ración balanceada según una escala de peso. El cálculo de oferta de ración se realizó mediante la fórmula de Consumo Máximo Voluntario ( $CMV = PV^{0.75} \times 110 \times 4 / 3200$ ).

#### 4.4.3 Toma de muestras

Una vez finalizado el ensayo se procedió al sacrificio de los machos (N=12), los cuales tenían un peso promedio de 32,53 ± 3,65 kg. A los 40 minutos post sacrificio se procedió a la remoción del músculo *Longissimus dorsi* (LD) a la altura de la 10<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> costilla y a su traslado al laboratorio en condiciones adecuadas para la toma de medidas y almacenamiento de muestras a -4°C. Las hembras utilizadas en este ensayo contribuyeron a analizar el efecto de los tratamientos sobre variables

productivas (Montenegro *et al.*, 2015) pero no fueron utilizadas para los fines de este estudio.

#### 4.4.4 Variables analizadas

Se analizaron las variables pH, color, fuerza de corte, contenido y composición de ácidos grasos de los lípidos intramusculares.

La medición de pH se realizó a los 45, 60, 90 minutos y 24 horas *post mortem* (pH45, pH60, pH90 y pH24 respectivamente). Para esto se realizó una escisión en el músculo e introdujo un electrodo de penetración de un pHmetro Lutron.

Para la medición de color de la carne, la misma se dejó oxigenar durante una hora y se procedió a la lectura en la superficie del músculo de las variables luminosidad (L\*), índice de rojo (a\*) e índice de amarillo (b\*), empleándose un colorímetro Minolta CR-10. Estas mediciones se realizaron por triplicado, empleándose el promedio de los tres valores en el análisis estadístico posterior (sistema CIELAB).

Para la medición de la fuerza de corte, se almacenó al vacío una muestra de 2,5 cm de espesor y 5 cm de longitud, y se maduró durante 72 horas a 4°C para posteriormente congelarse a -20°C hasta el análisis. Las muestras fueron cocinadas a baño maría hasta una temperatura interna de 72°C. Se obtuvieron de 6 a 8 submuestras de 1,25 cm de diámetro en dirección de las fibras musculares. La evaluación se llevó a cabo a través de la resistencia al corte empleando una cuchilla de Warner Bratzler (texturómetro Instrom 3342, acoplado a un software), a través de la medición de fuerza máxima de corte, expresándose los valores en kg.

La determinación del contenido del tejido adiposo intramuscular (GIM) se realizó sobre muestras de 2,5 cm de espesor y 8 cm de longitud, las cuales se envasaron al vacío y se conservaron a -20°C hasta el momento del análisis. La extracción de los lípidos se realizó por homogeneización con un Virtis 45 (velocidad de rotación de 20 000-25 000 rpm) en una mezcla de cloroformo-metanol (2-1, V-V) según la técnica de Folch *et al.*, (1957). La composición de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases (Eder, 1995) y se realizó a partir de los

lípidos extraídos previamente. Para la preparación de la metilación de los ácidos grasos se disolvieron los lípidos con cloroformo, para la uniformización de las muestras a un peso de 40 mg. Para la metilación se siguió el método en frío descrito por Ichihara *et al.* (1996). Para realizar la separación de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500 (Perkin Elmer Instruments, USA) acoplado a un inyector automático. La separación de los distintos ácidos grasos se realizó con una columna capilar CPSIL-88. La detección y cuantificación de los distintos ácidos grasos se realizó con un detector de llama (FID) Perkin Elmer 500. La integración de las áreas para la cuantificación de los diferentes ácidos grasos se realizó mediante el software de Perkin Elmer Totalchrom-Clarus FID. Los ácidos grasos individuales fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de ácidos grasos estándares de la mezcla Sulpeco 37 (Sigma Chemical, USA). Los ácidos grasos se expresaron como porcentaje del total de ácidos grasos detectados. Los ácidos grasos menores y los no identificados fueron agrupados como otros lípidos.

A partir de éstos datos, se realizó la sumatoria de los ácidos mirístico, palmítico y esteárico para obtener el total de ácidos grasos saturados (AGS), la sumatoria de los ácidos palmitoleico y oleico para obtener el total de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), y la sumatoria de los ácidos linoleico,  $\alpha$ -linolénico y araquidónico para obtener el total de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). La relación AGPI/AGS se obtuvo como el cociente entre la sumatoria de AGPI y AGS, calculados previamente. Para determinar la relación n-6/n-3 se realizó el cociente entre los valores de los ácidos n-6 detectados (ácidos linoleico y araquidónico) y n-3 ( $\alpha$ -linolénico).

#### 4.4.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través de un ANAVA con los efectos de bloque y tratamiento, y posteriormente se realizó una comparación mediante el test LSD. Para analizar las asociaciones entre variables se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre éstas variables con un nivel de significancia del 95%.

Todos los análisis estadísticos fueron implementados mediante el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

#### 4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los valores medios obtenidos para cada tratamiento y la comparación de medias para las variables pH, color y terneza se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Medias ajustadas, error estándar y comparación de medias para las variables pH, color y fuerza de corte

Variable	Media T0	EE T0	Media T15	EE T15	p-valor
pH45	5,87	0,22	6,03	0,22	0,640
pH60	5,67	0,15	5,37	0,15	0,196
pH90	5,77	0,13	5,11	0,13	0,008
pH24	5,46	0,14	4,92	0,14	0,033
L*	39,79	0,62	42,34	0,62	0,022
a*	10,51	1,09	11,78	1,09	0,432
b*	-6,80	0,35	-6,62	0,22	0,738
Fuerza de corte (Kg)	3,71	0,35	3,03	0,35	0,214

EE: error estándar

p-valores  $\leq 0.05$  indican diferencias significativas

##### 4.5.1 Variable pH

Se encontraron diferencias en los valores de pH90 y pH24, siendo ambas mediciones inferiores en las muestras de los animales alimentados con afrechillo de arroz.

La tasa de disminución del pH depende de las reservas de glucógeno musculares y de la tasa metabólica del animal previa al sacrificio, aspectos que son afectados por el estrés experimentado por el animal previamente y durante el

sacrificio, la temperatura y humedad, y el genotipo de los animales para los genes receptor de rianodina (RYR1 o Hal) y Rendimiento Napole (RN) (Salas y Mingala, 2016, Adzitey y Nurul, 2011).

El manejo de los animales y las condiciones ambientales determinan el pH final incidiendo sobre la tasa metabólica del animal. En este ensayo, el manejo previo y durante el sacrificio, así como las condiciones ambientales, fueron las mismas para ambos grupos, por lo cual no explicarían las diferencias observadas en pH.

La predisposición genética de los animales empleados en nuestro ensayo no fue analizada, sin embargo un estudio previo en el cual se genotiparon cerdos Pampa Rocha para el gen RYR1 no detectaron la presencia de la mutación que afecta la calidad de carne (Cedrez, 2013), no existiendo estudios sobre el gen RN en esta raza.

Respecto a la alimentación, la composición de la dieta generalmente no afecta al contenido de glucógeno muscular al utilizar fuentes energéticas convencionales (Coma *et al.*, 1999), sin embargo las dietas que combinan una proporción baja de carbohidratos digeribles y alta en grasas pueden reducir las reservas de glucógeno y mitigar los valores bajos de pH (Rosenvold y Andersen, 2003). En el presente estudio, si bien la dieta T15 presentaba un mayor contenido en grasa, los valores de pH finales (24 horas *post mortem*) pueden considerarse bajos en ambos tratamientos, lo cual indicaría que las dietas empleadas no generaron una acumulación diferencial de glucógeno muscular al momento del sacrificio.

#### 4.5.2 Variable color

El tratamiento afectó la variable L\*, siendo mayor para el tratamiento T15, lo cual indica carnes más claras en los animales cuya dieta incluyó afrechillo de arroz. Las variables a\* y b\* no se vieron afectadas. Se encontró una correlación negativa entre L\* y el pH90 ( $r = -0,72$ ;  $p = 0,01$ ), así como entre b\* y pH24 ( $r = -0,61$ ,  $p = 0,03$ ). Las diferencias observadas en L\* podrían deberse a las diferencias observadas en pH, ya que son variables relacionadas entre sí. Valores bajos de pH provocan la pérdida de agua de la carne, haciendo su estructura más densa y provocando que la

luz se refleje desde las capas superiores, resultando así en carnes más pálidas (Tartrakoon *et al.*, 2016).

Respecto a la alimentación, la misma puede incidir sobre la estabilidad del color de la carne a través del aporte de antioxidantes los cuales contrarrestan el deterioro oxidativo, aumentando la vida útil de la carne y contribuyendo en el mantenimiento de un color deseable. Unos de los antioxidantes más efectivos es la vitamina E (Carballo, 2013, Rosenvold y Andersen, 2003). En el presente estudio no se analizó el contenido de dicha vitamina, pero se esperaría que el aporte fuera similar en ambos tratamientos ya que la inclusión a través del núcleo vitamínico fue el mismo (Tabla 1). El aporte de AGPI a través de la alimentación también puede incidir sobre el color, ya que estos ácidos grasos son sustratos de oxidación lipídica e incrementan la susceptibilidad a la oxidación (Braun y Pattacini, 2013). De esta forma, sería esperable un incremento del deterioro oxidativo en los animales sometidos al tratamiento T15 como consecuencia del mayor contenido de AGPI del afrechillo de arroz, lo cual podría explicar en parte las diferencias observadas en luminosidad.

#### 4.5.3 Variable fuerza de corte

Para esta medición, la cual puede ser tomada como un indicador de terneza, no se observaron diferencias entre tratamientos. El pH de la carne afecta la terneza, incidiendo sobre la capacidad de retención de agua y generando mayor actividad de proteasas a pH cercanos a la neutralidad (Coma *et al.*, 1999). Sin embargo, las diferencias registradas en pH no incidieron sobre la variable fuerza de corte.

Las posibles asociaciones entre la terneza y la composición de la carne porcina, principalmente con el contenido de tejido adiposo, se han estudiado en los últimos años encontrándose resultados contradictorios (Wood *et al.*, 1999). En el presente estudio el análisis de correlaciones no reveló una asociación entre la terneza y el contenido de GIM, sí obteniéndose correlaciones negativas con el contenido de los ácidos mirístico ( $r = -0,60$ ,  $p = 0,04$ ) y palmítico ( $r = -0,70$ ,  $p = 0,01$ ), y una correlación positiva con el contenido de ácido oleico ( $r = 0,68$ ,  $p = 0,02$ ).

#### 4.5.4 Contenido y composición de ácidos grasos de los lípidos intramusculares

Los valores medios obtenidos para cada tratamiento y la comparación de medias para estas variables se presentan en la Tabla 3. La matriz de coeficientes de correlación de Pearson para todas las variables evaluadas se presenta en la Tabla 4.

Tabla 3. Tabla 3: Medias ajustadas, estándar error y comparación de medias para las variables GIM y perfil de ácidos grasos

Variables	Media T0	EE T0	Media T15	EE T15	p-valor
GIM*	2,04	0,30	2,20	0,30	0,716
Ác. Mirístico (%)	1,73	0,14	1,67	0,14	0,784
Ác. Palmítico (%)	28,33	0,96	28,56	0,96	0,270
Ác. Palmitoleico (%)	4,43	0,39	4,34	0,39	0,884
Ác. Esteárico (%)	11,55	0,35	11,33	0,35	0,813
Ác. Oleico (%)	36,32	0,86	33,55	0,86	0,157
Ác. Linoleico (%)	11,05	0,66	13,79	0,66	0,021
Ác. $\alpha$ -linolénico (%)	0,77	0,06	0,90	0,06	0,177
Ác. Araquidónico (%)	1,57	0,19	1,57	0,19	0,980
Otros Lípidos	4,34	0,39	4,43	0,39	0,880
$\Sigma$ AGS	41,55	0,90	41,61	0,90	0,961
$\Sigma$ AGMI	40,72	0,82	37,70	0,82	0,112
$\Sigma$ AGPI	13,26	0,78	16,26	0,78	0,035
AGPI/AGS	0,33	0,02	0,39	0,02	0,048
n-6/n-3	18,33	2,19	18,49	2,19	0,959

\*g/100 g de muestra

EE: error estándar

p-valores  $\leq 0,05$  indican diferencias significativas.

GIM: contenido de lípidos intramusculares.

Otros lípidos: ácidos grasos menores y no identificados.

$\Sigma$  AGS: ác. mirístico + ác. palmítico + ác. esteárico

$\Sigma$  AGMI: ác. palmitoleico + ác. oleico

$\Sigma$  AGPI: ác. linoleico +  $\alpha$ -linolénico + araquidónico

n-6: ác. linoleico y ác. araquidónico; n-3: ácido  $\alpha$ -linolénico

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson estimados para las variables analizadas.

L*	a*	b*	pH45	pH60	pH90	pH24	Fuerza	Ác. miris- tico	Ác. Palmi- tico	Ác. palmito- léico	Ác. esteárico	Ác. oleico	Ác. lino- léico	Ác. α- linoléico	Ác. araqui- dónico	Otros lip.	GIM	
L*	1,00	0,09	0,97	0,33	0,27	0,01	0,09	0,62	0,86	0,74	0,34	0,64	0,83	0,65	0,04	0,22	0,34	0,77
a*	-0,50	1,00	0,92	0,93	0,62	0,34	0,39	0,74	0,43	0,33	0,21	0,19	0,08	0,52	0,12	0,29	<0,001	0,75
b*	-0,01	0,03	1,00	0,27	0,09	0,11	0,03	0,22	0,14	0,15	<0,001	0,03	0,99	0,07	0,47	0,49	0,82	0,08
pH45	0,33	0,03	-0,37	1,00	0,13	1,00	0,39	0,73	0,93	0,71	0,39	0,44	0,59	0,45	0,55	0,58	0,26	0,55
pH60	-0,34	0,16	-0,51	0,49	1,00	<0,001	0,51	0,84	0,79	0,35	0,50	0,28	0,07	0,28	0,81	0,19	0,97	
pH90	-0,72	0,30	-0,48	0,00	0,81	1,00	<0,001	0,94	0,48	0,61	0,54	0,66	0,54	0,05	0,01	0,60	0,40	0,97
pH24	-0,52	0,27	-0,61	0,29	0,82	0,85	1,00	0,83	0,36	0,39	0,13	0,23	0,69	0,02	0,16	0,79	0,28	0,46
Fuerza	0,16	-0,11	0,38	0,12	0,21	-0,02	-0,07	1,00	0,04	0,01	0,39	0,34	0,02	0,66	0,86	0,94	0,63	0,50
Ác. miris- tico	-0,06	0,25	-0,45	-0,03	0,07	0,23	0,29	-0,60	1,00	<0,001	0,14	0,03	0,05	0,47	0,44	0,08	0,78	0,72
Ác. palmítico	-0,11	0,31	-0,45	-0,13	-0,09	0,16	0,28	-0,70	0,92	1,00	0,11	0,02	0,02	0,48	0,41	0,29	0,73	0,58
Ác. palmitoléico	0,30	-0,39	-0,82	0,29	0,29	0,19	0,47	-0,27	0,46	0,48	1,00	0,06	0,81	0,03	0,84	0,15	0,55	0,06
Ác. esteárico	-0,15	-0,41	0,63	-0,26	-0,22	-0,14	-0,38	0,30	-0,64	-0,67	-0,56	1,00	0,06	0,76	0,92	0,65	0,07	0,19
Ác. oleico	0,07	-0,53	0,00	0,19	0,34	0,2	0,13	0,68	-0,58	-0,67	0,08	0,56	1,00	0,07	0,64	0,68	0,25	0,89
Ác. linoléico	0,15	0,21	0,55	-0,26	-0,54	-0,57	-0,65	-0,14	-0,23	-0,22	-0,64	0,1	-0,55	1,00	0,09	0,18	0,71	0,49
Ác. α-linolénico	0,59	-0,47	0,23	0,2	-0,34	-0,7	-0,43	-0,06	-0,25	-0,26	0,06	0,03	-0,15	0,51	1,00	0,95	0,51	0,71
Ác. araquidónico	-0,38	0,33	0,22	-0,19	0,08	0,17	0,09	0,02	-0,52	-0,33	-0,44	0,15	-0,13	0,41	-0,02	1,00	0,35	0,39
Otros Lip.	-0,3	0,82	-0,07	0,37	0,41	0,27	0,34	0,16	0,09	0,11	-0,19	-0,54	-0,36	0,12	-0,21	0,29	1,00	0,78
GIM	-0,1	0,11	0,53	-0,2	-0,01	0,01	-0,24	0,22	0,12	-0,18	-0,56	0,4	0,05	0,22	-0,12	-0,28	-0,09	1,00

Los coeficientes estimados se ubican debajo de la diagonal principal y los p-valores por encima para cada combinación de pares de variables. p-valores  $\leq 0,05$  indican correlaciones significativas.

Otros Lip.: ácidos grasos menores y los no identificados.

GIM: Contenido de lípidos intramusculares.

Los tratamientos no afectaron el contenido de GIM. Capra *et al.*, (2011) estudiando el efecto de diferentes dietas, una de ellas con el mismo nivel de inclusión de afrechillo de arroz utilizado en nuestro ensayo, tampoco hallaron diferencias y reportaron un contenido similar de GIM.

Respecto al perfil lipídico, se verificaron diferencias en el contenido de AGPI y en el porcentaje de ácido linoleico, siendo en ambos casos superiores para T15. El mayor contenido de AGPI en T15 se explicaría por el mayor contenido de ácido linoleico, lo cual concuerda con la composición del afrechillo de arroz donde más del 30 % de los lípidos totales corresponden a este ácido graso (Bauza, 2000). El contenido de ácido linoleico hallado en ambos tratamientos se encuentra dentro del rango esperado en el tejido adiposo de cerdos donde puede variar desde 3 a 28 % (Grompone, 2010). Desde el punto de vista tecnológico, niveles mayores al 14 % de este ácido generan dificultades en la elaboración de productos fermentados puros debido a una menor consistencia de la grasa y al enranciamiento (Capra *et al.*, 2007). Los animales del tratamiento T15 presentaron un contenido de ácido linoleico (13,79 %) que se ubica en el límite de este requerimiento.

La distribución de ácidos grasos en ambos tratamientos corresponde a la esperada para el caso de los AGS y AGMI. Esta distribución varía en el caso de lo AGPI, donde es esperable un mayor contenido de linoleico, linolénico y araquidónico (Braun y Pattacini, 2013), observándose en el presente estudio un mayor contenido de linoleico, seguidos de araquidónico y linolénico.

En comparación con trabajos previos en Pampa Rocha, Mernies *et al.*, (2012), encontraron porcentajes de AGS similares, superiores de AGMI e inferiores de AGPI. Nuestros resultados no coinciden con lo hallado por estos autores, lo cual podría atribuirse a las diferencias en alimentación y edad de los animales. Capra *et al.*, (2007) encontraron una menor proporción de AGS, similares de AGMI y superiores de AGPI en híbridos comerciales alimentados con una dieta compuesta por un 25 % de afrechillo de arroz. Estos investigadores también hallaron un mayor contenido de ácido linoleico, si bien dicho estudio se centró en la grasa subcutánea e implicó una inclusión mayor de afrechillo de arroz.

Desde el punto de vista nutricional, un mayor contenido en AGPI se considera beneficioso para la salud humana, destacándose en este sentido a los ácidos linoleico y linolénico debido a su esencialidad. Para evaluar el impacto a nivel de la salud deben considerarse las relaciones AGPI/AGS y n-6/n-3. La relación AGPI/AGS en la carne de los animales alimentados con afrechillo de arroz fue superior y se acerca más al mínimo recomendado de 0,4 (Teye *et al.*, 2006), resultando así más beneficiosa en comparación a la carne obtenida en la dieta control. Las diferencias observadas en dicha relación son consecuencia de los niveles superiores de ácido linoleico y del total de AGPI. La relación n-6/n-3 resultó similar en ambos tratamientos y se encuentran por encima de las recomendaciones nutricionales que sugieren valores inferiores a 10 (Simopoulos, 2016). El consumo de dietas concentradas en granos como el maíz, trigo y arroz, por ser ricas en carbohidratos y ácidos grasos n-6, y bajas en ácidos grasos n-3 y antioxidantes, producen un incremento en la relación n-6/n-3 (Olsson y Pickova, 2005), de forma que la similitud registrada en el presente trabajo podría deberse a la inclusión de afrechillo de arroz en T15 y a la mayor proporción de maíz en T0 (68 % en T0 y el 55 % en T15).

#### 4.6 CONCLUSIONES

La inclusión de un 15 % de afrechillo de arroz en la dieta de lechones Pampa Rocha incidió sobre la tasa de descenso de pH y generó valores más elevados de luminosidad. En la composición de AG de la carne se obtuvo un mayor porcentaje de ácido linoleico, AGPI y una mayor relación AGPI/AGS. El incremento de AGPI es beneficioso desde el punto de vista nutricional. La relación n-6/n-3 no se encuentra dentro de los rangos adecuados en ambos tratamientos, debiendo considerarse la importancia de reducir esta relación a través de la inclusión de alimentos con mayor contenido en AGPI de la serie n-3. Debido a que las restantes variables no se vieron afectadas, la utilización de afrechillo de arroz en un nivel del 15 % podría considerarse como alternativa de alimentación, principalmente en función de su bajo

costo y sus características nutricionales, debiendo considerarse otros factores que podrían haber incidido sobre las variables evaluadas.

#### 4.7 AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

La investigación que da origen a los resultados presentados en esta publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS\_NAC\_2013\_1\_11440 y de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC). Se agradece al Laboratorio de Calidad de Alimentos y Calidad de Productos (FAgro-Udelar) por el préstamo de instrumentos de medición.

#### 4.8 BIBLIOGRAFÍA

- Adzitey F, Nurul H. 2011. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences - a mini review. *Int Food Res J.* 18:11-20.
- 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. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 31-39.
- Bauza R. 2000. El afrechillo de arroz como alimento para cerdos y otros animales domésticos. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- Braun R, Pattacini S. 2013. Evaluación de ácidos grasos en las carcasas de cerdos alimentados con sorgo termoprocesado durante el crecimiento y la terminación. *Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam.* 23(1): 25-35.
- Capra G, Echenique A, Grompone MA, Bauza R, González A, Silva D. 2007. 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 Uruguay, Volumen*

- Especial, IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos: 59-63.
- 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. INNOTEC, Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay. 6:11-20.
- Carballo C. 2013. Oxidación lipídica y proteica de carne de cerdos Pampa Rocha producidos sobre pasturas. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Cedrez V. 2013. Síndrome de Estrés Porcino: actualización del problema a nivel nacional y análisis de secuencias del gen RYR1 en cerdos de raza Pampa Rocha. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Coma J, Piquer J, Companys GV. 1999. Calidad de la carne en porcino efecto de la nutrición. En: XV Curso de Especialización, Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Barcelona, España.
- Cozzolino D. 2000. Características de los suplementos utilizados en el Uruguay para su empleo en alimentación animal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie Técnica, 110:16. Montevideo, Uruguay.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Echenique A. 2007. Efecto de la alimentación sobre la calidad de la carne y la grasa de cerdo. En: IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos. Montevideo, Uruguay. 55-63.
- Echenique A, Capra G. 2011. Desarrollo de tecnologías para mejora de la calidad de producto en sistemas familiares de producción porcina. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie FPTA. 34:56. Montevideo, Uruguay.
- Eder K. 1995. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 671(1):113-131.

- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma. Traducción de la versión original en inglés 2007, disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm> Consultado 10 de mayo de 2018.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Grompone MA. 2010. Composición química de los tejidos: lípidos. En: *Introducción a la Ciencia de la Carne*. Editorial Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 75-114.
- Ichihara K, Shibahara A, Yamamoto K, Nakayama T. 1996. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids*, 31(5): 535-539.
- Mernies B, Carballo C, Cabrera MC, Barlocco N, Saadoun A. 2012. Ácidos grasos del músculo Longissimus dorsi de cerdos Pampa Rocha y cruza con razas Duroc y Large White. *Veterinaria (Montevideo)* 48:123. (Resumen).
- Montenegro M, Llambí S, Carballo C, González Barrios P, Barlocco N. 2015. Efecto de la inclusión de afrechillo de arroz integral en dietas para cerdos Pampa Rocha en un sistema de cama profunda. *Novenas Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria (Resumen)*. Montevideo, Uruguay.
- Ngapo TM, Gariépy C. 2008. Factors Affecting the Eating Quality of Pork. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 48(7): 599-633.
- Olsson V, Pickova J. 2005. The influence of production systems on meat quality, with emphasis on pork. *Ambio*, 34(4/5): 338-343.
- Rosenvold K, Andersen HJ. 2003. Factors of significance for pork quality: a review. *Meat Science*, 64:219–2370.
- Salas RCD, Mingala CN. 2016. Genetic Factors Affecting Pork Quality: Halothane and Rendement Napole Genes. *Anim Biotechnol*, 28(2): 148-155.
- Simitzis PE, Symeon GK, Charismiadou MA, Bizelis JA, Deligeorgis SG. 2010. The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat Science*, 84(4): 670-676.

- Simopoulos AP. 2016. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3):128.
- Tartrakoon W, Tartrakoon T, Kitsupree N. 2016. Effects of the ratio of unsaturated fatty acid to saturated fatty acid on the growth performance, carcass and meat quality of finishing pigs. *Animal Nutrition*, 2:79-85.
- Teye G, Sheard PR, Whittington FM, Nute GR, Stewart A, Wood JD. 2006. Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality. *Meat Science*, 73:157–165.
- Tikk K, Tikk M, Aaslyng MD, Karlsson AH, Lindahl G, Andersen HJ. 2007. Significance of fat supplemented diets on pork quality – Connections between specific fatty acids and sensory attributes of pork. *Meat Science*, 77:275–286.
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Richardson RI, Sheard PR. 1999. Manipulating meat quality and composition. *Proc Nutr Soc*, 58(2):363–370.
- 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.

## 5. GENE EXPRESSION ANALYSIS OF *LONGISSIMUS DORSI* MUSCLE OF PIGS FED DIETS WITH DIFFERENT LIPID CONTENT BY RNA-SEQUENCING

M.C. Montenegro<sup>1</sup>, P. Peraza<sup>2</sup>, N. Balemian<sup>1</sup>, C. Carballo<sup>3</sup>, N. Barlocco<sup>3</sup>, P. González Barrios<sup>4</sup>, B. Mernies<sup>1</sup>, A. Saadoun<sup>5</sup>, G. Castro<sup>6</sup>, S. Facioni Guimarães<sup>7</sup> and Silvia Llambí<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Canelones Uruguay.

<sup>3</sup>Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>4</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Cómputo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>5</sup>Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>6</sup>Departamento Animales de Granja, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>7</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Corresponding autor: M.C. Montenegro

E-mail: mariadc.montenegro@gmail.com

Artículo en elaboración a ser enviado a la revista Genetics and Molecular Research (revista editada por la Fundación de Investigaciones Científicas de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, ISSN 16765680).

## 5.1 ABSTRACT

This study evaluates the effect of two diets (treatments) with different lipid content on the transcriptome of *Longissimus dorsi* muscle in Uruguayan Pampa Rocha piglets. Three animals were used per treatment, with 44 to 77 days of age at the beginning and end of the experiment respectively. The intramuscular fat content (IMF) and its fatty acid composition were analyzed to determine if diets produced a phenotypic effect. Gene expression analysis was performed with the RNA-seq methodology, with a functional analysis of genes with differential expression between treatments. As for the IMF and fatty acid composition, no differences between treatments were observed. In relation to gene expression analysis, we identified 359 genes with differential expression between treatments. Functional analysis allowed the identification of numerous biological processes and metabolic pathways that included carbohydrate metabolism, skeletal muscle growth and extracellular matrix-receptor interaction. In conclusion, the study of the transcriptome of skeletal muscle in pigs allows deepening in the genetic basis of important productive traits that may contribute to the study of human diseases.

**Keywords:** Nutrigenomics, Transcriptomic, Skeletal muscle, Candidate genes, Meat quality.

## 5.2 INTRODUCTION

Different production factors influence meat quality, with feeding being one of the most important factors in pork production. In recent years, there has been a growing interest in the modification of the fatty acid composition of adipose tissue from production animals through diet (Wood et al., 2008). Pigs store dietary fat almost unchanged; thus, there is a close relationship between the type of fat ingested and the fat deposited (Rosenvold and Andersen, 2003), and can thus modified different meat attributes associated with the content and composition of intramuscular fat. Nutrigenomics provides a possible approach to investigate the influence of dietary nutrients. This discipline studies the role of nutrients and

bioactive components of food on gene expression, including their effect on genome stability, RNA expression, proteins and metabolites (Fenech et al., 2011). Kato and Kimura (2003) argue that the study of transcriptomes, the complete set of RNA molecules expressed in an organism, cell type or tissue under certain conditions, constitutes one of the levels where modifications in response to nutrients, can be used as a global marker of the status and response of cells and organs to modifications at other molecular levels, such as the proteome and metabolome. The introduction of new generation RNA sequencing technology (RNA-seq) has revolutionized transcriptomic studies as a result of increased knowledge on quantitative and qualitative aspects of transcriptomes (Loor et al., 2015), leading in recent years to an increase in the number of studies that use this technology for the analysis of the transcriptome in different species. In the case of pigs, different works evaluate the incidence of feeding on the transcriptome, particularly of skeletal muscle, by RNA-seq (Szostak et al., 2016; Ogłuszka et al., 2017). The study of variations in gene expression under certain conditions in pigs is important for interpreting functional elements of the genome and improving the understanding of complex traits such as fat deposition, metabolism, and growth (Chen et al., 2011). Another factor affecting meat quality, including intramuscular fat content and composition, is the genotype. While commercial breeds are better suited for intensive production systems and have better growth rates compared to local breeds, the latter have not been subjected to severe selection pressures and in many cases are notable for production of high quality meat (Ayuso et al., 2016). The local Uruguayan Pampa Rocha breed has a high genetic variability (Montenegro et al., 2015), standing out for its prolificacy and the oxidative stability and acceptable quality for industrialization of its meat (Vadell et al., 2010; Carballo, 2013).

In this study, the effect of diets with different lipid content on skeletal muscle transcriptome was examined through RNAseq in piglets of the Pampa Rocha breed. Through this approach, we intended to characterize gene expression against these diets and determine its incidence on biological processes related to deposition of intramuscular fat and fatty acid profile.

## 5.3 MATERIALS AND METHODS

### 5.3.1 Animals, treatments, and phenotypic determinations

The procedures with animals were performed according to protocol No. Exp. 111130-000834-13, approved by the Honorary Commission of Animal Experimentation (CHEA, Udelar, Uruguay). Six male piglets of the Pampa Rocha breed, three per treatment, were weaned at 42 days with an average initial weight of  $15.64 \pm 2.06$  kg. These animals belonged to an initial sample of twelve animals and were selected according to the quality of the extracted RNA measured through RIN values.

The experiment lasted 35 days and was carried out in boxes, in a deep bedding system, with group feeders and drinking troughs to allow free access to water.

We used as treatments isoproteic and isoenergetic diets with a base formula of maize, soybean meal, phosphate, carbonate, vitamin nucleus and salt, and an energy content in both diets of approximately 3.300 kcal of digestible energy per kg and 18% of crude protein. These treatments differed in their lipid content: T0 consisted of a diet with 0% of rice bran (control) and T15 of a diet with 15% of rice bran (higher lipid content). Animals were feed once a day (8:00 AM) and feed was offered according to live weight. The animals were slaughtered at the end of the experiment, at 77 days of age and average weight of  $33.63 \pm 4.11$  kg. The *Longissimus dorsi* (LD) muscle was subsequently removed, and samples of 5 g were collected for RNA extraction. These samples were stored in RNA stabilization solution (RNAlater®) at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the time of extraction.

The differential effect of diets was assessed through calculation of fatty acid content and profile in intramuscular fat. This analysis was performed in a greater population using the techniques and procedures described in Montenegro et al., (2018, in press). Treatment mean comparison of these variables was performed with the Student t-test at a 0.05 confidence level. The analysis was performed with the statistical software Infostat (Di Rienzo et al., 2014).

### 5.3.2 RNA isolation, library construction and RNA sequencing

Sample homogenization was performed in a FastPrep®-24 equipment (MP Biomedicals) using MP Bio Lysing Matrix and Trizol® tubes. Total RNA was obtained using Trizol® (Thermo Fisher Scientific®) according to the manufacturer's instructions. Concentration of RNA samples was measured on a Nanodrop ND1000 spectrophotometer. The RNA quality control, library preparation and sequencing were performed by Macrogen. Briefly, control of total RNA integrity was performed with an Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer. Libraries were constructed from total RNA with the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2. Sequencing libraries were prepared by random fragmentation of the cDNA sample followed by ligation of 5' and 3' adapters. The adapter-ligated fragments were subsequently amplified by PCR and gel purified. To verify the size of the PCR-enriched fragments, the size distribution of the template was verified with an Agilent Technologies 2100 bioanalyzer. Library quantification was performed through qPCR according to the Illumina qPCR Quantification Protocol Guide. RNAseq was performed on an Illumina HiSeq 2000 platform to generate 100-bp paired-end (Macrogen).

### 5.3.3 Bioinformatics analysis and functional analysis of differential expression

For the quality control of the sequences and data analysis, the CLC Genomics Workbench 9.5.2 (CLC bio, Aarhus, Denmark) software was used. The reads were mapped onto the porcine reference genome *Sus scrofa* v.10.2 (GCA\_000003025.4) using the default parameters of the RNA-seq analysis of CLC software.

Differential expression analysis was performed using a generalized linear model (GLM), and genes with fold change values  $\geq 2$  and p-value  $\leq 0.05$  were considered significant. Differential expression genes (DEGs) were classified into biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC) using the Gene Ontology (GO) classification. The identification of significant pathways was performed according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). This analysis was performed for all DEGs using DAVID v 6.8

online software (Huang et al., 2009a; 2009b). The DEGs were introduced using the official gene symbol and human genome annotation through the BioMart tool. Terms and pathways with a p-value  $\leq 0.05$  for the Benjamini correction were considered significant.

Additionally, we analyzed the relationships between up-regulated and down-regulated genes in T15 compared to T0, using the ClueGo v 2.3.3 application, available at Cytoscape v. 3.4.0 (Bindea et al., 2009; Saito et al., 2012). In this way, *Homo sapiens* annotation and the BP of GO and KEGG databases were used. Probability was calculated through the hypergeometric test (two-sided) with the Benjamini correction. Three genes per node were used as parameters, with a minimum percentage of associated genes of 3% and a Kappa score of 0.4.

## 5.4 RESULTS

### 5.4.1 Intramuscular fat content and composition of fatty acids

There were no significant differences in these variables (p-value  $\geq 0.05$ ). These results are available in the Supplementary material (Table S1).

### 5.4.2 Analysis of data obtained by RNA-seq

An average number of paired reads of 95.349.811 was obtained, of which 63.49%, were mapped in pairs, 10.07% were mapped in broken pairs, and 26.43% were not mapped in any region of the genome. A total of 17154 genes were identified distributed across all chromosomes and mitochondrial DNA. The sequences are available in National Center for Biotechnology Information database under accession number SUB4301377.

### 5.4.3 Differential expression

A total of 404 genes presented differential expression between treatments ( $FC \geq 2$ ;  $p$ -value  $\leq 0.05$ ), of which 359 corresponded to known genes, with 170 up-regulated and 189 down-regulated genes at T15, as compared to T0. These genes were used for the functional analysis. The Supplementary material (Table S2) includes the detailed list of genes, FC, and  $p$ -value.

### 5.4.4 Functional analysis

Through the DAVID software, 26 significant BP were identified ( $p$ -value adjusted for the Benjamini correction  $\leq 0.05$ ) for all DEGs. The two processes with the highest number of genes were response to organic substance (84 genes,  $p$ -value 0.010), and cell surface receptor signaling pathway (77 genes,  $p$ -value 0.025). Other relevant processes were response to lipids (33 genes,  $p$ -value 0.039), and muscle tissue development (19 genes,  $p$ -value 0.041). For MF, three terms related to glycosaminoglycan binding (15 genes,  $p$ -value 0.0058) were recorded. As for the CC, six terms were obtained related to the extracellular region, such as extracellular matrix (32 genes,  $p$ -value 3.3 E-06) and extracellular region (115 genes,  $p$ -value 3.3 E-06). Figure 1 shows the DEGs count for the terms BP, MF, and CC. We further identified two significant KEGG pathways: focal adhesion (15 genes,  $p$ -value 0.021) and extracellular matrix (ECM)-receptor interaction (9 genes,  $p$ -value 0.045). Supplementary tables S3.1, S3.2, S3.3 and S3.4 details the complete listing of BP, MF, CC, and KEGG\_PATHWAY respectively obtained with DAVID software.

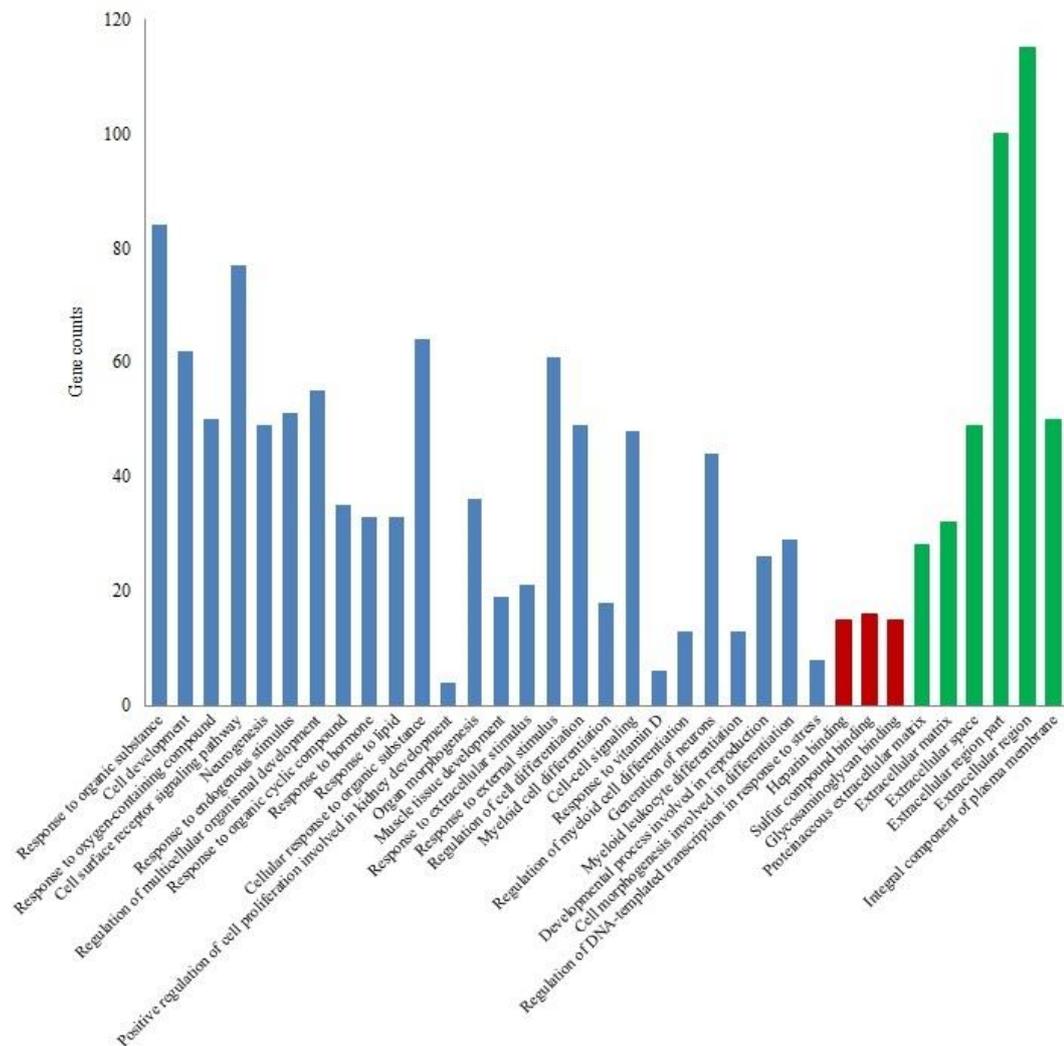


Figure 1: The significantly gene ontology terms of differentially expressed genes obtained with DAVID. The blue represent the biological processes, the red represent the molecular functions, and the green represent the cellular components. The bar plot represents the gene counts within each gene ontology category.

By comparing up-regulated and down-regulated genes with the ClueGo application, 26 significant groups were obtained (Supplementary material S4). Processes and pathways assigned to cluster of up-regulated genes include focal adhesion, transport of calcium and regulation of ionic homeostasis, and protein digestion and absorption; while those for the down-regulated gene cluster are response those of hexose and skeletal muscle cell differentiation. Figure 2 shows the

functional distribution of the up-regulated genes in the T15 treatment compared to T0.

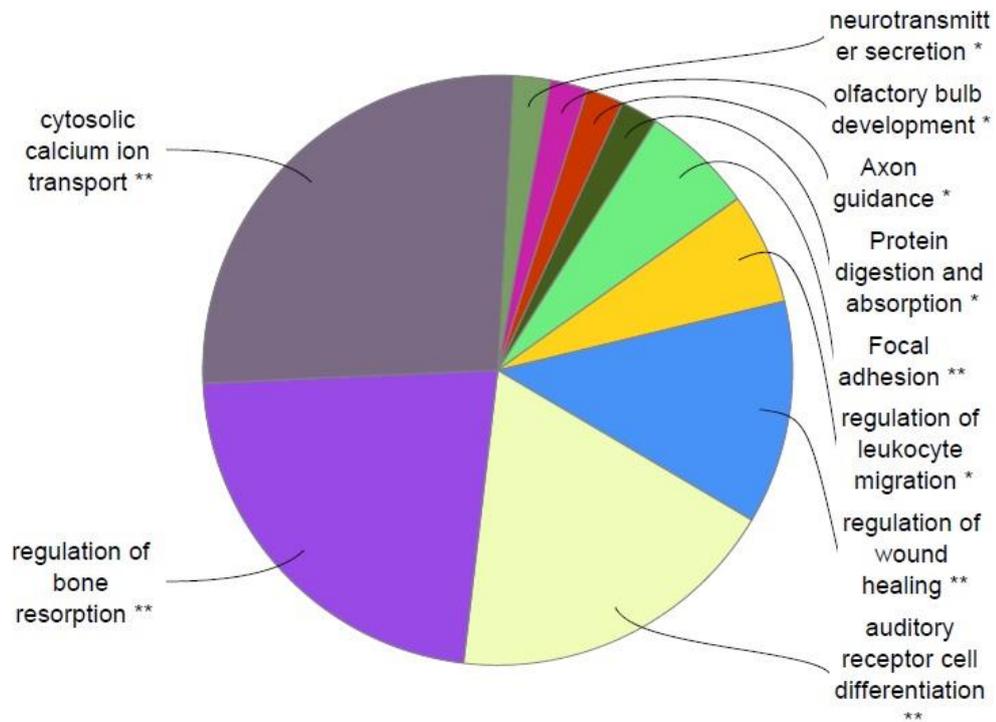


Figure 2: Overview chart of biological processes and pathways distribution specific for up-regulated genes in the T15 treatment compared to T0. The name of the group is given by the most significant term in the group. Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.

Some processes were not specific to any cluster, including regulation of lipid biosynthetic process. This latter process is part of a group of processes where the rest of the terms were specific to the cluster of down-regulated genes and related to carbohydrate and steroid metabolism (Group 25, Supplementary table S4.1).

Common processes resulting from functional analysis include: 1) lipid response and metabolism (Table 1); 2) muscle tissue development and cellular differentiation of skeletal muscle (Table 2), and 3) ECM-receptor interaction and focal adhesion (Table 3). Carbohydrate metabolism was a process obtained exclusively with ClueGo and that it is worth of deepening its study (Table 1).

Table 1 - Biological processes related to lipid and carbohydrate metabolism of the differentially expressed genes.

Biological process (Gene Ontology)	Genes	p-value <sup>c</sup>
Response to lipid <sup>a</sup>	<i>TNC, CXCL11, CXCL10, LOX, SRD5A2, SPP1, PRKCA, SELP, ABR, PDK4, GPER1, SLIT3, EPHA3, TNFRSF10C, NEDD4, MYOD1, NR6A1, FOS, TYR, NR1D1, MYC, DEFB1, ZFP36, STC2, NR4A2, PIM1, NR4A3, PCK2, JUNB, GH1, CATSPER4, DUSP1, JUN</i>	0.039
Regulation of lipid biosynthetic process <sup>b</sup>	Up <sup>c</sup> <i>ABHD6, DKK3, GPER1, PDK4</i>	0.006
	Down <sup>d</sup> <i>CYR61, EGR1, INSIG1, NR1D1, SIK1</i>	
Regulation of carbohydrate biosynthetic process <sup>b</sup>	Up <sup>c</sup> <i>GPER1</i>	0.041
	Down <sup>d</sup> <i>NR1D1, PPP1R3B, SESN2, SIK1</i>	
Response to hexose <sup>b</sup>	Up <sup>c</sup> <i>GPER1, PRKCA, RMI1</i>	0.003
	Down <sup>d</sup> <i>EGR1, FGF21, FOXA2, HNF1B, LIN28A, NR1D1, PCK2, SESN2, SLC26A6, VSNL1</i>	
Gluconeogenesis <sup>b</sup>	Up <sup>c</sup> -----	0.043
	Down <sup>d</sup> <i>ATF3, NR1D1, PCK2, SESN2, SIK1</i>	

<sup>a</sup>Biological processes obtained with DAVID software.

<sup>b</sup>Biological processes obtained with ClueGo-Cytoscape: <sup>c</sup>up-regulated genes in T15 compared to T0, <sup>d</sup>down-regulated genes in T15 compared to T0.

<sup>e</sup>p-value adjusted for the Benjamini correction.

Table 2 - Biological processes related to muscle tissue development and cellular differentiation of skeletal muscle of the differentially expressed genes.

Biological process (Gene Ontology)		Genes	p-value <sup>e</sup>
muscle tissue development <sup>a</sup>		<i>EGR1, MAFF, MYOD1, EOMES, C16ORF89, GJA5, PIN1, FOS, ATF3, EYA2, BTG2, ITGA8, DNER, VEGFA, HEY2, SIK1, IFRD1, COL11A1, MYLK</i>	0.041
skeletal muscle cell differentiation <sup>b</sup>	Up <sup>c</sup>	<i>EOMES</i>	0.005
	Down <sup>d</sup>	<i>ATF3, BTG2, EGR1, FOS, MAFF, MYOD1, MYH7B</i>	
skeletal muscle tissue development <sup>b</sup>	Up <sup>c</sup>	<i>DNER, EOMES</i>	0.006
	Down <sup>d</sup>	<i>ATF3, BTG2, EGR1, FOS, MAFF, MYOD1, MYH7B</i>	

<sup>a</sup>Biological processes obtained with DAVID software.

<sup>b</sup>Biological processes obtained with ClueGo-Cytoscape: <sup>c</sup>up-regulated genes in T15 compared to T0, <sup>d</sup>down-regulated genes in T15 compared to T0.

<sup>e</sup>p-value adjusted for the Benjamini correction.

Table 3 - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways of the differentially expressed genes.

KEGG pathway		Genes	p-value <sup>c</sup>
ECM-receptor interaction	Up <sup>a</sup>	<i>CHAD, COMP, ITGA8, LAMC3, SPP1, THBS4, TNC</i>	0.0053
	Down <sup>b</sup>	-----	
Focal adhesión	Up <sup>a</sup>	<i>CHAD, COMP, ITGA8, LAMC3, MYL5, MYLK, MYLK4, PRKCA, SPP1, THBS4, TNC</i>	0.003
	Down <sup>b</sup>	<i>JUN, VEGFA</i>	

These pathways were obtained with DAVID and ClueGo-Cytoscape.

<sup>a</sup>Up-regulated genes in T15 compared to T0

<sup>b</sup>Down-regulated genes in T15 compared to T0.

<sup>c</sup>The p-value adjusted for the Benjamini correction corresponds to that obtained in ClueGo-Cytoscape.

## 5.5 DISCUSSION

A total of 17154 transcripts distributed through the porcine genome were identified, of which 359 with known function presented differential expression between treatments and were associated with numerous biological processes and metabolic pathways. We will discuss the most relevant and enriched ones in the comparison between groups: lipid and carbohydrate metabolism, muscle tissue development, focal adhesion and ECM-receptor interaction.

### 5.5.1 Lipid and carbohydrate metabolism

In the functional analysis, the genes obtained in the process "response to lipid", obtained by DAVID, were associated with lipopolysaccharide response, signal transduction, regulation of transcription and gene expression, and inflammatory response. The process "regulation of lipid biosynthetic process", obtained through

the ClueGo application, was unspecific and formed a group where the remaining processes were related to carbohydrate metabolism, which were down-regulated. For this reason, lipid and carbohydrate metabolism will be discussed together.

Among the up-regulated genes in T15 related to these metabolic pathways, we find *PDK4* (pyruvate dehydrogenase kinase 4), which encodes a mitochondrial enzyme involved in the shift of energy source from glucose to fatty acids in response to physiological conditions (Araki and Motojima, 2006). Lan et al., (2009) identified a mutation in this gene associated with IMF and water content in pigs. Li et al. (2016) also found a higher expression in the Chinese Wannanhua breed, characterized by better meat quality and higher IMF when compared to Yorkshire. These authors suggest that differences in their expression pattern would contribute to phenotypic differences observed in the LD muscle between different breeds. Another up-regulated gene was *GPER1* (G protein-coupled estrogen receptor 1), which plays an essential role in metabolic regulation, including lipid and glucose homeostasis. Estrogen-dependent signaling through GPER helps counteract the development of obesity, being seen in knockout mice for this gene the development of obesity and increase of fat deposits (Barton and Prossnitz, 2015). We also identified the *ABHD6* gene ( $\alpha/\beta$  hydrolase domain containing 6), which encodes a lipase capable of degrading different lipid substrates, as an up-regulated one. Suppression of *ABHD6* in mice avoids obesity and hepatic steatosis induced by high-fat diets (Thomas et al., 2013, Zhao et al., 2016). For its role in energy homeostasis, it is considered a potential therapeutic target for diseases that alter lipid metabolism, such as obesity and type II diabetes. The up-regulation of *GPER1* and *ABHD6* may counteract the effect of the diet with higher lipid content (T15 treatment) and be related with the down-regulation of the metabolic pathways of carbohydrates that we observed.

Regarding the down-regulated genes associated with these pathways, most encode transcription factors (TF). Among these, we find *MYC* (myc proto-oncogene protein), which is involved in adipocyte proliferation, lipid metabolism and fatty acid transport. Ayuso et al. (2016) points out that it is a potential TF for regulation of fat gain in young pigs. Other down-regulated genes were *JUNB* (JunB proto-oncogene), *JUN* (jun proto-oncogene) and *FOS* (proto-oncogene c-Fos), which encode members

of the AP-1 family (activating protein 1), and take part in the regulation of several cellular processes including proliferation, differentiation, apoptosis, and oncogenesis (Chinenov and Kerppola, 2001). Puig-Oliveras et al., (2016) found six SNPs in *FOS* associated with IMF and fatty acid (FA) composition, being an important candidate gene for the study of these complex characteristics affecting meat quality. Other down-regulated genes were *NR4A2* and *NR4A3* (nuclear receptor subfamily 4 group A member 2 and member 3, respectively), which encode nuclear receptors expressed in tissues with high energy demand such as skeletal muscle. They respond directly to signaling molecules, including fatty acids, and their differential expression in human adipose tissue would affect metabolic processes such as lipolysis, lipogenesis, glucose transport, and energy expenditure (Veum et al., 2012).

The fact that pathways associated with lipid metabolism are nonspecific is in agreement with the lack of differences in IMF and FA profiles. This lack of differences could be due to the short time the animals were subjected to the treatments, or to the fact that the difference in lipid content between the diets was not large enough. It could also be due to the number of individuals analyzed, since Montenegro et al. (2018, in press), analyzing these same animals within a larger population, found differences in PUFA and linoleic acid values. However, it could be expected that in those animals fed with the diet with higher lipid content there has been an increase in the availability of lipids at muscle level. This would explain the identification of up-regulated genes that are negative regulators of lipid biosynthesis and have lipase activity; as well of down-regulated genes related to carbohydrate metabolism. Puig-Oliveras et al. (2014) reported similar results in LD muscle of pigs with different fatty acid composition, where a higher PUFA content could reduce consumption of fatty acids and glucose and result in an inhibition of lipogenesis. Pascual et al. (2007) state that under isocaloric diets, the addition of dietary lipids may induce a decrease in endogenous lipid synthesis in parallel with reduced carbohydrate utilization, which is the main substrate for lipogenesis. In our case, up-regulated genes indicating a decrease in lipid utilization, together with the decrease in pathways and genes linked to carbohydrate metabolism, would indicate that the higher lipid content of T15 affected to some extent these metabolic pathways. The

functions of genes related to these pathways, together with the evidence relating them to different diseases, make necessary to deepen into their knowledge, mainly if we consider that pig is a model species for the study of human diseases.

### 5.5.2 Muscle tissue development

The identified DEGs related to skeletal muscle development were down-regulated. Among them, we found important regulators such as *FOS*, *ATF3* (activating transcription factor 3) and *MAFF* (MAF bZIP transcription factor F). *FOS* is a member of the aforementioned AP-1 family and, in addition to influencing the accumulation of IMF, is an important regulator of muscle differentiation and metabolism (Ayuso et al., 2016; Hou et al., 2016). Hou et al. (2016) reported a lower level of expression in Landrace, compared to Chinese races, suggesting that this differential expression could influence the regulation of skeletal muscle growth. In the case of *ATF3* and *MAFF*, they are TFs that interact with members of the AP-1 family. *ATF3* is a cAMP dependent TF related to positive regulation of cell proliferation and differentiation of skeletal muscle cells. Wang et al. (2015) reported an increase in its expression same in the Chinese creole races Diannan Small-ear and Tibetan, suggesting that it could be a candidate gene for inhibition of muscular growth in these races. Keller et al. (2011) reported a down-regulation of *FOS* and *ATF3* in pigs fed with diet supplemented with L-carnitine, and suggest that this decrease would have an anti-apoptotic effect on skeletal muscle of pigs, mainly due to the inhibition of pro-apoptotic signaling pathways. The effect of apoptosis has been demonstrated on the loss of muscle mass observed during aging and in certain pathologies, such as muscular dystrophy and neuromuscular diseases (Siu and Alway, 2009), whereby down-regulation of these genes could have a favorable effect, although there is no information on this. *MAFF* is also related to skeletal muscle differentiation. Studying the skeletal muscle of Duroc pigs with different lipid profiles, Cardoso et al. (2017) also found a differential expression of this gene, which is sub expressed in the group with higher PUFA content. Although we did not found significant differences in the lipid profile, PUFA content was higher in those

animals subject to a treatment with higher lipid content; hence, our results regarding this gene could be in agreement with those reported by Cardoso et al. (2017).

According to the stage of growth of the animals analyzed (77 days at the end of the experiment), it would be expected the expression of pathways linked to muscle growth in both groups. However, the down-regulation observed in those animals fed with the diet with higher lipid content may suggest an effect of the treatment over these pathways. Down-regulated genes encoding TFs, due to their incidence on different pathways and processes, are important candidates that could mediate the response of the organism to the difference in lipid content of the treatments used in this study.

### 5.5.3 ECM-receptor interaction and focal adhesion

These pathways were up-regulated in T15. The ECM consists of a complex assembly of proteins and polysaccharides that play an important role in the morphogenesis of organs and tissues, and in the maintenance of cellular and tissue structures and functions. Specific interactions between cells and ECM regulate cellular activities such as adhesion, migration, differentiation, proliferation, and apoptosis. Focal adhesions are specialized adhesive structures between cells and ECM, mediated primarily by integrin family receptors, constituting important sites for signal transduction (van der Flier and Sonnenberg, 2001; Clause and Barker, 2013). ECM affects meat quality as it can affect IMF deposition, connective tissue content and muscle development. As for muscle development, the interactions between ECM and muscle cells play a central role in regulating differentiation and proliferation of these cells (Velleman, 2012). In the ECM, the mesenchymal stem cells (MSCs) are located, from which myogenic cells are derived, as well as the satellite cells that are indispensable for postnatal muscle growth. The extracellular environment regulates the proliferation and differentiation of MSCs and satellite cells. If MSC cells progress through the adipogenic differentiation process, the IMF content will be affected; if they progress through the fibrogenic differentiation process, this will lead to the synthesis of collagen and an increase in the content of

connective tissue; and if they progress through the myogenic process, it will lead to an increase in muscle mass (Du and Carlin, 2012; Óvilo et al., 2014).

Among the up-regulated genes that are part of these pathways, we found *ITGA8* (integrin subunit alpha 8), *COL11A1* and *COL11A2* (collagen type XI alpha 1 chain and alpha 2 chain, respectively). Integrins interact with a large number of proteins, and the signaling events that involve them lead to changes in cell morphology and mobility, as well as in gene expression (van der Flier and Sonnenberg, 2001; Wehrle-Haller, 2012). It has been proposed that they would intervene in angiogenesis regulation, which could in some way affect adipogenesis due to the close relationship between the two processes (Óvilo et al., 2014).

Collagen molecules are major components of ECM, and their intramuscular content contributes to meat hardness, affecting its texture and being related to the growth rate. In turn, collagen development is negatively related to the development of adipocytes in ECM (Óvilo et al., 2014).

Among the up-regulated genes in T15, we also found *TNC*, which encodes the tenascin C protein. This ECM protein is part of a protein family that modulates cell adhesion and response to growth factors (Chiovaro et al., 2015). The *TNC* gene has been reported as a potential candidate gene for meat quality traits in pigs (Kayan et al., 2011).

These pathways have been reported as enriched in the LD muscle of pigs, with different composition in intramuscular fat (Cánovas et al., 2010; Pena et al., 2013). Óvilo et al., 2014 found higher expression in Duroc x Iberian crossbred pigs and highlight the importance of ECM in the composition and organization of muscle tissue, as well as in the regulation of IMF deposition.

In our case, the higher expression of ECM pathways and focal adhesion in those animals fed with the diet with higher lipid content, suggests an effect of the treatment, which may affect characteristics associated with meat quality, as well as the transduction of signals and the signaling of events.

## 5.6 CONCLUSION

Through RNAseq we identified 359 genes with differential expression between groups, 170 up-regulated and 189 down-regulated for treatment with higher lipid content when compared to the control diet. Treatment effect can be observed through the intervention of these genes in important metabolic pathways, some of which affect meat quality. Among these pathways, those associated with lipid metabolism were not affected, in agreement with the similarity of IMF and fat content. We observed an effect on carbohydrate metabolism, with a lower expression of the genes involved in these pathways in the treatment with higher lipid content. Other important pathways affected were muscle tissue development and ECM-receptor interaction. As for muscle tissue development, we found a lower expression for the treatment with higher lipid content, while the opposite occurred for the ECM pathway. The results of the differential expression of the genes involved in these pathways, which was dependent on the lipid content of the diet, provides information that may be useful for future research related to meat quality, also providing information that may be valuable in the study of human diseases, mainly those related to energy metabolism and muscle development.

## 5.7 ACKNOWLEDGEMENT

This research has received funding from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay) under the code POS\_NAC\_2013\_1\_11440 and the Comisión Sectorial de Investigación Científica (Uruguay). We are grateful to personnel of Centro Regional Sur (FAgro) and Laboratorio de Técnicas Nucleares (FVet), INIA Las Brujas, Dra. Graciela Pedrana, Dr. José Sotelo, Lic. Guillermo Eastman and Departamento de Zootecnia (UFV, Brasil) for their invaluable help.

## 5.8 REFERENCES

- Araki M, Motojima K (2006). Identification of ERR $\alpha$  as a specific partner of PGC-1 $\alpha$  for the activation of PDK4 gene expression in muscle. *FEBS J* 273:1669-1680. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05183.x>
- Ayuso M, Fernández A, Núñez Y, Benítez R, et al. (2016). Comparative analysis of muscle transcriptome between pig genotypes identifies genes and regulatory mechanisms associated to growth, fatness and metabolism. *PLoS One* 10:e0145162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145162>
- Barton M, Prossnitz ER (2015). Emerging roles of GPER in diabetes and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab* 26:185-192. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.02.003>
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, et al. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25: 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Cánovas A, Quintanilla R, Amills M, Pena R (2010). Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. *BMC Genomics* 11:372. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-372>
- Carballo C. 2013. Oxidación lipídica y proteica de carne de cerdos Pampa Rocha producidos sobre pasturas. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. Available at [\[https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/123456789/8828\]](https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/123456789/8828)
- Cardoso TF, Cánovas A, Canela-Xandri O, González-Prendes R, et al. (2017). RNA-seq based detection of differentially expressed genes in the skeletal muscle of Duroc pigs with distinct lipid profiles. *Sci Rep.* 7:40005. <https://doi.org/10.1038/srep40005>
- Chen C, Ai H, Ren J, Li W, et al. (2011). A global view of porcine transcriptome in three tissues from a full-sib pair with extreme phenotypes in growth and fat deposition by paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics* 12:448. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-448>

- Chinenov Y, Kerppola TK (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20:2438-2452. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204385>
- Chiovaro F, Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2015). Transcriptional regulation of tenascin genes. *Cell Adh Migr* 9:34-47. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1008333>
- Clause KC, Barker TH (2013). Extracellular Matrix Signaling in Morphogenesis and Repair. *Curr Opin Biotechnology* 24:830–833. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, et al. (2014). InfoStat versión 2014. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available at <http://www.infostat.com.ar>
- Du M, Carlin KM (2012). Meat Science and Muscle Biology Symposium: Extracellular matrix in skeletal muscle development and meat quality. *J Anim Sci* 90:922–923. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4937>
- Fenech M, El-Sohehy A, Cahill L, Ferguson L, et al. (2011). Nutrigenetics and Nutrigenomics: Viewpoints on the Current Status and Applications in Nutrition Research and Practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4:69–89. <https://doi.org/10.1159/000327772>
- Hou X, Yang Y, Zhu S, Hua C, et al. (2016). Comparison of skeletal muscle miRNA and mRNA profiles among three pig breeds. *Mol Genet Genomics* 291:559-573. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1126-3>
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nat Protoc* 4:147-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene list. *Nucleic Acids Res* 37:1-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>
- Kato H, Kimura T (2003). Evaluation of the Effects of the Dietary Intake of Proteins and Amino Acids by DNA Microarray Technology. *J Nutr* 133:2073S-2077S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.6.2073S>

- Kayan A, Cinar MU, Uddin MJ, Phatsara C, et al. (2011). Polymorphism and expression of the porcine Tenascin C gene associated with meat and carcass quality. *Meat Science* 89:76-83. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.001>
- Keller J, Ringseis R, Priebe S, Guthke R, et al. (2011). Dietary L-carnitine alters gene expression in skeletal muscle of piglets. *Mol Nutr Food Res* 55:419–429. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000293>
- Lan J, Lei MG, Zhang YB, Wang JH, et al. (2009). Characterization of the porcine differentially expressed PDK4 gene and association with meat quality. *Mol Biology Rep* 36:2003. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9411-4>
- Li XJ, Zhou J, Liu LQ, Qian K, et al. (2016). Identification of genes in longissimus dorsi muscle differentially expressed between Wannanhua and Yorkshire pigs using RNA-sequencing. *Anim Genet* 47:324-333. <https://doi.org/10.1111/age.12421>
- Loor JJ, Vailati-Riboni M, McCann JC, Zhou Z, et al. (2015). TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: Nutrigenomics in livestock: Systems biology meets nutrition. *J Anim Sci* 93:5554–5574. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9225>
- Montenegro M, Llambí S, Castro G, Barlocco N, et al. (2015). Genetic characterization of Uruguayan Pampa Rocha pigs with microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 38:48-54. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738120140146>
- Ogłuszka M, Szostak A, te Pas M, Poławska E, et al. (2017). A porcine gluteus medius muscle genome wide transcriptome analysis: dietary effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on biological mechanisms. *Genes Nutr* 12:4. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0552-8>
- Óvilo C, Benítez R, Fernández A, Núñez Y, et al. (2014). Longissimus dorsi transcriptome analysis of purebred and crossbred Iberian pigs differing in muscle characteristics. *BMC Genomics* 15:413. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-413>
- Pascual JV, Rafecas M, Canela MA, Boatella J, et al. (2007). Effect of increasing amounts of a linoleic-rich dietary fat on the fat composition of four pig breeds. Part II: Fatty acid composition in muscle and fat tissues. *Food Chem* 100:1639–1648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.045>

- Pena RN, Noguera JL, Casellas J, Díaz I, et al. (2013). Transcriptional analysis of intramuscular fatty acid composition in the longissimus thoracis muscle of Iberian x Landrace back-crossed pigs. *Anim Genet* 44:648–660. <https://doi.org/10.1111/age.12066>
- Puig-Oliveras A, Ramayo-Caldas Y, Corominas J, Estellé J, et al. (2014). Differences in Muscle Transcriptome among Pigs Phenotypically Extreme for Fatty Acid Composition. *PLoS One* 9:e99720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099720>
- Puig-Oliveras A, Revilla M, Castelló A, Fernández AI, et al. (2016). Expression-based GWAS identifies variants, gene interactions and key regulators affecting intramuscular fatty acid content and composition in porcine meat. *Sci Rep* 6:31803. <https://doi.org/10.1038/srep31803>
- Rosenvold K, Andersen HJ (2003). Factors of significance for pork quality: a review. *Meat Sci* 64:219–237. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00186-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00186-9)
- Saito R, Smoot M, Ono K, Ruschinski J, et al. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat Methods* 9:1069–1076. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2212>
- Siu PM, Alway SE (2009). Response and adaptation of skeletal muscle to denervation stress: the role of apoptosis in muscle loss. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:432-452. <https://www.bioscience.org/2009/v14/af/3253/fulltext.htm>
- Szostak A, Ogłuszka M, te Pas M, Poławska E, et al. (2016). Effect of a diet enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids on the pig liver transcriptome. *Genes Nutr* 11:9. <https://doi.org/10.1186/s12263-016-0517-4>
- Thomas G, Betters JL, Lord CC, Brown AL, et al. (2013). The serine hydrolase ABHD6 is a critical regulator of the metabolic syndrome. *Cell Rep* 5:508-520. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.047>
- Vadell A, Barlocco N, Carballo C (2010). Prolificidad y longevidad productiva de cerdas Pampa Rocha en un sistema de producción al aire libre. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 17:149-153. [http://www.iip.co.cu/RCP/172/172\\_21artAVadell.pdf](http://www.iip.co.cu/RCP/172/172_21artAVadell.pdf)

- van der Flier A, Sonnenberg A (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305:285-298. <https://doi.org/10.1007/s004410100417>
- Velleman SG (2012). MEAT SCIENCE AND MUSCLE BIOLOGY SYMPOSIUM: Extracellular matrix regulation of skeletal muscle formation. *J Anim Sci* 90:936–941. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4497>
- Veum VL, Dankel SN, Gjerde J, Nielsen HJ, et al. (2012). The nuclear receptors NUR77, NURR1 and NOR1 in obesity and during fat loss. *Int J Obes (Lond)* 36:1195-1202. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.240>
- Wang Z, Li Q, Chamba Y, Zhang B, et al. (2015). Identification of Genes Related to Growth and Lipid Deposition from Transcriptome Profiles of Pig Muscle Tissue. *PLoS One* 10:e0141138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141138>
- Wehrle-Haller B (2012). Structure and function of focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 24:116-124. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.001>
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, et al. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci* 78:343-358. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>
- Zhao S, Mugabo Y, Ballentine G, Attane C, et al. (2016).  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Domain 6 Deletion Induces Adipose Browning and Prevents Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Rep* 14:2872-2888. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.076>

## 5.9 SUPPLEMENTARY MATERIAL\*

The following online material is available for this article:

Table S1 - Intramuscular fat and fatty acids contents.

Table S2 - Detailed list of DEGs identified by RNAseq.

Table S3.1 - Functional analysis using DAVID software (gene ontology-biological processes).

Table S3.2 - Functional analysis using DAVID software (gene ontology-molecular functions).

Table S3.3 - Functional analysis using DAVID software (gene ontology-cellular components).

Table S3.4 - Functional analysis using DAVID software (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways).

Table S4.1 - Functional analysis by comparing up-regulated and down-regulated genes using ClueGo-Cytoscape software.

Figure S4.2 - Processes specific to the cluster of genes up-regulated in treatment T15. The bars represent the percentage of genes per term and the number of genes associated with the terms is shown as bar label. Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.

Figure S4.3 - Processes specific to the cluster of genes down-regulated in T15 treatment compared to T0. The bars represent the percentage of genes per term and the number of genes associated with the terms is shown as bar label. Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.

Figure S4.4 - Overview chart of biological processes and pathways distribution specific for down-regulated genes in the T15 treatment compared to T0. The name of the group is given by the most representative term (most significant p-value). Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.

Figure S4.5 - Overview chart of processes not specific to any cluster. Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.

\*El material suplementario correspondiente a este capítulo constituye el anexo de la presente tesis (Capítulo 8).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 DISCUSIÓN GENERAL

En la presente tesis se estudió el efecto de dietas con diferente contenido lipídico sobre: el comportamiento productivo; características de carcasa y calidad de la carne; y expresión génica del músculo esquelético en lechones de la raza Pampa Rocha. A través de los diferentes enfoques planteados se busca aportar información que contribuya en la caracterización de este recurso local.

El estudio del comportamiento productivo no reveló diferencias en el promedio del período experimental entre los animales alimentados con T0 y T15. Si se observaron diferencias durante la última semana del ensayo en la ganancia en peso y en la eficiencia de conversión, siendo ambas variables mayores en T0. Esto evidencia una interacción tratamiento-fecha.

Si bien no existen reportes que evalúen la inclusión de afrechillo de arroz integral en lechones en posdestete y en la raza Pampa Rocha, Bauza *et al.*, (2007) al analizar dietas con diferente composición para cerdos identificaron una disminución en la velocidad de crecimiento al incluir este alimento. Sin embargo el estudio mencionado implicó un mayor nivel de inclusión de afrechillo (25 %) y se realizó en híbridos comerciales durante el período de terminación.

Las investigaciones de Barlocco *et al.* (2005) y Carballo (2007), realizadas en lechones Pampa Rocha y sus cruzas con razas comerciales en etapa de posdestete registraron ganancias en peso inferiores a los observados para T0 y T15, mientras que los datos de consumo y eficiencia de conversión fueron similares. Estos trabajos utilizaron otra alimentación (ración balanceada y acceso a pasturas) y cría a campo. Los requerimientos energéticos de los animales en esas condiciones son mayores, lo cual podría explicar las diferencias de estos trabajos con los resultados de esta tesis.

Con respecto a las características de carcasa evaluadas (peso y espesor de grasa dorsal), no se presentaron diferencias entre tratamientos. Según Barlocco *et al.*, (2003), los cerdos rústicos como los Pampa Rocha presentan una deposición temprana de tejido adiposo, por lo cual se esperaría un mayor espesor de grasa dorsal

en los animales que recibieron el tratamiento con mayor contenido lipídico (T15). Sin embargo, la duración del ensayo (5 semanas) puede ser una posible explicación para la ausencia de diferencias entre tratamientos.

Los valores de pH<sub>90</sub> y pH<sub>24</sub> fueron inferiores en las muestras de los animales alimentados con afrechillo de arroz. La disminución de pH *post mortem* del músculo es consecuencia de la acumulación de ácido láctico producido a partir de la degradación del glucógeno por glucogenólisis y glucólisis en condiciones anaerobias. El pH final (a las 24 horas *post mortem*) se alcanza cuando se agotan las reservas de glucógeno o cuando el valor de pH alcanza el límite para que las enzimas glucolíticas continúen funcionando (Salas y Mingala 2016, Coma *et al.*, 1999). La tasa de disminución del pH depende de las reservas de glucógeno musculares y de la tasa metabólica del animal previa al sacrificio. Estos aspectos son afectados por el estrés experimentado por el animal previamente y durante el sacrificio, la temperatura y la humedad, y el genotipo de los animales para los genes receptor de rianodina (RYR1) y Rendimiento Napole (RN) (Salas y Mingala, 2016, Adzitey y Nurul, 2011).

El manejo de los animales y las condiciones ambientales determinan el pH final incidiendo sobre la tasa metabólica del animal. Las condiciones de manejo y ambientales fueron las mismas para ambos grupos, por lo cual no explicarían las diferencias observadas en pH. La predisposición genética de los animales no fue analizada, si bien estudios previos no encontraron la mutación desfavorable en el gen RYR1 en cerdos Pampa Rocha (Cedrez, 2013).

De acuerdo con Coma *et al.*, 1999 si se utilizan fuentes energéticas convencionales, la composición de la dieta no suele afectar el contenido de glucógeno muscular. Sin embargo, según Rosenvold y Andersen, (2003) las dietas que presenten a la vez proporciones menores de carbohidratos digestibles y mayores de grasas, pueden reducir las reservas de glucógeno y contrarrestar los valores bajos de pH. Si bien la dieta T15 presentaba un mayor contenido en grasa, los valores de pH finales resultaron bajos en ambos tratamientos, indicando que los mismos no habrían generado una acumulación diferencial de glucógeno muscular al momento del sacrificio.

La dieta con afrechillo de arroz generó valores promedios de L\* mayores, resultando en carnes más claras; no observándose diferencias en las variables a\* y b\*.

Las variables pH y L\* suelen relacionarse por lo cual las diferencias en pH podrían explicar las diferencias en L\*, encontrándose una correlación negativa entre ambas. Cuando el pH es bajo se produce pérdida de agua en la carne. Esto determina que la estructura de la carne sea más densa y que la luz se refleje desde las capas superiores, resultando en carnes más pálidas (Tartrakoon *et al.*, 2016).

Otro factor que puede afectar al color de la carne es la oxidación lipídica. De esta forma, las diferencias en luminosidad también podrían deberse al mayor aporte de AGPI del tratamiento con afrechillo de arroz, ya que estos ácidos grasos son sustrato de oxidación lipídica e incrementan la susceptibilidad a la oxidación (Braun y Pattacini, 2013).

En la variable fuerza de corte, la cual puede tomarse como un indicador de ternura, no se registraron diferencias entre tratamientos, a pesar de que las diferencias en el pH de la carne podrían haber afectado a esta variable. Según Coma *et al.*, 1999, estas características se relacionan debido a la incidencia del pH sobre la capacidad de retención de agua de la carne, pudiendo así verse alterada la ternura.

El contenido de GIM no fue afectado por los tratamientos. Capra *et al.*, (2011) al estudiar el efecto de diferentes dietas, una de las cuales presentaba el mismo nivel de inclusión de afrechillo de arroz que el tratamiento T15, observaron contenidos similares de GIM.

Con respecto al perfil lipídico, se verificaron diferencias en el contenido de AGPI y de ácido linoleico, siendo en ambos casos superiores para T15. El mayor contenido de AGPI de los animales del tratamiento T15 se debe al mayor contenido de ácido linoleico en dicho tratamiento. Esto concuerda con la composición del afrechillo de arroz donde más del 30 % de los lípidos totales corresponden a este ácido graso (Bauza, 2000).

La distribución de ácidos grasos en ambos tratamientos corresponde a la esperada para los AGS y AGMI. En relación a los AGPI, se observó un mayor contenido de linoleico, seguido de araquidónico y linolénico, no concordando con lo

esperado. Según Braun y Pattacini (2013) la distribución normal se corresponde con un contenido superior de ácido linoleico, seguido de los ácidos linolénico y araquidónico. En comparación con trabajos previos en cerdos Pampa Rocha, Mernies *et al.*, (2012), encontraron porcentajes similares de AGS, superiores de AGMI e inferiores de AGPI. Sin embargo, la alimentación y la edad de los animales utilizados por estos autores fue diferente. Por su parte, Capra *et al.*, (2007) en su trabajo con híbridos comerciales e inclusión de afrechillo de arroz en un nivel del 25 %, encontraron una menor proporción de AGS, similares de AGMI y superiores de AGPI. Estos autores también encontraron un mayor contenido de ácido linoleico, si bien dicho estudio se realizó sobre la grasa subcutánea y con una inclusión de afrechillo de arroz superior.

El mayor contenido en AGPI y la relación AGPI/AGS observados en la carne de los animales alimentados con T15 pueden considerarse beneficiosos desde el punto de vista nutricional. Según Teye *et al.*, (2006) el mínimo recomendado entre AGPI/AGS es de 0,4, observándose en los animales T15 un valor promedio de 0,39.

La relación n-6/n-3 fue similar en ambos tratamientos y son superiores a las recomendadas, donde se sugieren relaciones inferiores a 10 (Simopoulos, 2016). Olsson y Pickova (2005) afirman que el consumo de dietas concentradas en granos como el maíz, trigo y arroz, producen incrementos en la relación n-6/n-3 debido a que son ricas en carbohidratos y ácidos grasos n-6, y bajas en ácidos grasos n-3 y antioxidantes. De acuerdo con estos autores, la mayor proporción de maíz en T0 (68 % en T0 y 55 % en T15), conjuntamente con la inclusión de afrechillo de arroz en T15, podrían explicar la similitud observada en la relación n-6/n-3.

Para analizar la expresión génica se utilizó la técnica ARN-Seq, siendo el primer caso de su aplicación para el estudio de un recurso zoogenético local en nuestro país. Se identificaron 404 genes con expresión diferencial entre tratamientos, de los cuales 359 presentaron función conocida.

El análisis funcional de estos genes se realizó mediante los programas DAVID (Huang *et al.*, 2009a, 2009b) y ClueGo (Bindea *et al.*, 2009). A través del software DAVID se llevó a cabo una clasificación de todos los genes con expresión diferencial, sin discriminar su nivel de expresión entre los tratamientos. La aplicación

ClueGo se utilizó para visualizar las relaciones entre los genes, en este caso diferenciándolos entre los sub expresados y los sobre expresados para ambos tratamientos.

El análisis funcional evidenció la asociación de los genes con expresión diferencial con numerosos procesos biológicos y vías metabólicas. Dentro de los relacionados con las características fenotípicas estudiadas se encuentran el metabolismo de lípidos y carbohidratos, el desarrollo y la diferenciación del músculo esquelético y las interacciones entre receptores con la matriz extracelular (ECM).

Los procesos y vías asociados al metabolismo de lípidos y carbohidratos conforman un mismo grupo en el análisis obtenido a través del software ClueGo. Las vías relacionadas al metabolismo lipídico no fueron identificadas como sub o sobre expresadas, sino que resultaron inespecíficas, mientras que las relacionadas con el metabolismo de carbohidratos presentaron menor expresión en T15 en comparación con T0. Los genes *PDK4*, *GPER1* y *ABHD6*, asociados a estas vías metabólicas, son genes sobre expresados en T15 y cumplen diferentes funciones en la homeostasis energética.

En el gen *PDK4* se ha identificado una mutación asociada con GIM y la capacidad de retención de agua en cerdos (Lan *et al.*, 2009). Se ha sugerido que las diferencias en la expresión de este gen contribuiría con las diferencias fenotípicas observadas en el músculo LD en diferentes razas (Li *et al.*, 2016, Lan *et al.*, 2009).

*ABHD6* se considera un posible blanco terapéutico para enfermedades que alteran el metabolismo lipídico, como la obesidad y la diabetes tipo II (Zhao *et al.*, 2016, Thomas *et al.*, 2013). La sobre expresión de *GPER1* y *ABHD6* podría contrarrestar el efecto de la dieta con mayor contenido lipídico (tratamiento T15) y relacionarse con la disminución observada en las vías del metabolismo de los carbohidratos.

La mayoría de los genes sub expresados asociados al metabolismo de lípidos y carbohidratos, como los genes *MYC*, *JUNB*, *JUN*, *FOS*, *NR4A2* y *NR4A3*, codifican factores de transcripción y también se relacionan con la homeostasis energética.

Ayuso *et al.*, (2016) sugiere que el factor de transcripción codificado por *MYC* actuaría en la regulación del incremento de grasa en cerdos jóvenes. En el caso de

*FOS* se han encontrado diferentes SNPs asociados a GIM y composición de AG (Puig-Oliveras *et al.*, 2016), por lo cual es un importante gen candidato para estudiar su incidencia sobre estas características de calidad de carne. Los genes *NR4A2* y *NR4A3* son receptores nucleares que se expresan en tejidos con alta demanda energética como el músculo esquelético, participando en funciones como la inflamación, la adipogénesis y el metabolismo energético. Su expresión diferencial en el tejido adiposo de humanos afectaría procesos metabólicos como la lipólisis, la lipogénesis, el transporte de glucosa y el gasto energético (Veum *et al.*, 2011).

La inespecificidad de las vías asociadas al metabolismo de lípidos concuerda con la ausencia de diferencias en GIM y en el perfil de AG observada en los animales en los cuales se analizó la expresión génica (N=6). Esto podría deberse a que la duración del ensayo (5 semanas) no haya permitido que se expresarán diferencias, o bien a que la diferencia en contenido lipídico entre los tratamientos no haya sido suficiente. Asimismo podría deberse al número de individuos estudiados ya que en la totalidad de los animales (N=12) si existieron diferencias en el contenido de AGPI y de ácido linoleico. De todas formas sería esperable que en los animales sometidos a la dieta con mayor aporte lipídico se haya visto aumentada la disponibilidad de lípidos a nivel muscular. Esto explicaría la identificación de genes sobre expresados que regulan negativamente la biosíntesis de lípidos, así como de genes sub expresados relacionados al metabolismo de carbohidratos. En este sentido, Pascual *et al.* (2007) afirma que en dietas isocalóricas, el agregado de lípidos puede inducir una disminución de la síntesis endógena de lípidos a la vez de una reducción en la utilización de carbohidratos, los cuales son la principal fuente para la lipogénesis.

La identificación de genes sobre expresados que indicarían una disminución en la utilización de lípidos, en conjunto con la disminución en vías y genes vinculados al metabolismo de carbohidratos, podrían indicar que el mayor contenido lipídico del tratamiento T15 pudo afectar a estas vías metabólicas. La expresión diferencial de genes y vías relacionadas al metabolismo de lípidos y carbohidratos, muestra el rol clave del músculo esquelético en el metabolismo energético. A su vez, las evidencias que relacionan a estos genes con diferentes enfermedades, hacen que la

profundización en su conocimiento pueda ser de interés en el campo de la biomedicina, si consideramos la importancia del cerdo como organismo modelo.

Cardoso *et al.*, (2017b) afirma que la comprensión que tenemos de aspectos genómicos funcionales relacionados con el contenido de grasa intramuscular (GIM) y rasgos de composición en cerdos es muy limitada. Asimismo en la especie humana muchos de los genes asociados a la deposición de grasa muscular aún no han sido identificados. Estos autores sostienen que investigar los cambios en los perfiles de expresión de ARNm en el músculo en respuesta al aporte de nutrientes constituye una aproximación para identificar genes que cumplen diferentes funciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Los procesos y vías metabólicas relacionados con el desarrollo del músculo esquelético fueron sub expresados en T15 y por lo tanto sobre expresados para T0. Entre los genes identificados como sub expresados en T15 figuran importantes reguladores como *FOS*, *ATF3*, *MYOD1* y *MAFF*.

Hou *et al.*, (2016) sugieren que la expresión diferencial de *FOS* incidiría en la regulación del crecimiento del músculo esquelético. En el caso de *ATF3*, Wang *et al.* 2015 sugieren que sería un gen candidato en la inhibición del crecimiento muscular en razas criollas chinas debido a la mayor expresión en dichas razas. Keller *et al.* (2011) registraron una sub expresión de *FOS* y *ATF3* en cerdos con dietas suplementadas con L-carnitina y proponen que esto tendría un efecto anti apoptótico en el músculo esquelético. Esta posible asociación con la apoptosis hacen que profundizar en el estudio de la expresión de estos genes puede ser de interés, ya que según Siu y Alway (2009) la apoptosis ejerce un efecto sobre la pérdida de masa muscular que se observa durante el envejecimiento y en ciertas patologías, como la distrofia muscular y enfermedades neuromusculares.

En el caso de *MYOD1*, Zhao *et al.*, (2011) señalan que su expresión elevada durante la embriogénesis es necesaria para la diferenciación miogénica, a la vez de inhibir la diferenciación de los adipocitos intramusculares por inhibición de factores adipogénicos. Wan *et al.*, (2016) asociaron la sub expresión de este gen en el músculo LD de cerdos suplementados con cortisol, con un deterioro de la calidad de carne en respuesta al estrés.

En *MAFF* Cardoso *et al.* (2017a) encontraron diferentes niveles de expresión al estudiar el músculo esquelético de cerdos Duroc con diferentes perfiles lipídicos, estando sub expresado en el grupo analizado con mayor contenido de AGPI.

Los animales analizados en ambos tratamientos presentaban 77 días al final del ensayo, por lo cual era esperable la expresión de procesos y vías metabólicas vinculadas al crecimiento muscular en ambos grupos. Sin embargo, el patrón diferencial de expresión, con una menor expresión en los animales alimentados con la dieta con mayor contenido lipídico, estaría indicando un efecto del tratamiento sobre estas vías. Los genes *FOS*, *ATF3*, *MYOD1* y *MAFF*, al codificar factores de transcripción que inciden sobre diferentes vías y procesos, son importantes candidatos que podrían mediar la respuesta del organismo frente a la diferencia en contenido lipídico de los tratamientos utilizados.

Las vías asociadas a la matriz extracelular (ECM) resultaron sobre expresadas en T15. La ECM incide sobre la calidad de carne ya que puede afectar la deposición de grasa intramuscular, el contenido de tejido conectivo y el desarrollo muscular. Esto es debido a que en la ECM de las fibras musculares se localiza la grasa intramuscular, así como el tejido conectivo que también contiene adipocitos. Respecto al desarrollo muscular, las interacciones entre la ECM y las células musculares ocupan un rol central en la regulación de la diferenciación y proliferación de estas células (Velleman, 2012). En la ECM se localizan las células madre mesénquimales, que originan las células miogénicas, y las células satélites que son indispensables para el crecimiento postnatal del músculo. La diferenciación y proliferación de las células madres mesénquimales y de células satélites son reguladas por el ambiente extracelular. Estas células pueden seguir la diferenciación adipogénica, afectando el contenido de grasa intramuscular; fibrogénica, conduciendo a la síntesis de colágeno y aumentando el contenido de tejido conectivo; y miogénica, incrementando la masa muscular (Óvilo *et al.*, 2014, Du y Carlin, 2012).

Entre los genes sobre expresados que forman parte de estas vías encontramos a *ITGA8* que codifica una integrina, *COL11A1* y *COL11A2* que codifican moléculas de colágeno, y *TNC* que codifica a la proteína tenascina C.

Las integrinas interactúan con un gran número de proteínas y los eventos de señalización que las involucran conducen a cambios en la expresión génica (Wehrle-Haller, 2012). Se ha propuesto que actuarían regulando la angiogénesis, por lo cual podrían afectar la adipogénesis debido a la relación entre ambos procesos (Óvilo *et al.*, 2014).

Las moléculas de colágeno son componentes mayores de la ECM y su contenido intramuscular contribuye a la dureza de la carne, afectando la textura y estando relacionado con la tasa de crecimiento. A su vez, el desarrollo de colágeno se relaciona negativamente con el desarrollo de adipocitos en ECM (Óvilo *et al.*, 2014).

En el caso de *TNC*, el mismo ha sido identificado como un potencial gen candidato para rasgos de calidad de carne en cerdos (Kayan *et al.*, 2011).

Pena *et al.*, (2013) y Cánovas *et al.*, (2010) han encontrado el enriquecimiento de estas vías en el músculo LD de cerdos con diferente composición de la grasa intramuscular.

La mayor expresión de las vías ECM en los animales alimentados con la dieta con mayor contenido lipídico podría sugerir un efecto del tratamiento, pudiendo verse afectadas características de calidad de carne, la transducción de señales y los eventos de señalización.

## 6.2 CONCLUSIONES

La inclusión de un 15 % de afrechillo de arroz en la dieta de lechones Pampa Rocha no afectó el comportamiento productivo y las características de carcasa estudiadas.

En cuanto a las variables de calidad de carne, la inclusión de afrechillo de arroz en la dieta incidió sobre la tasa de descenso de pH y generó valores más elevados de luminosidad. Este efecto podría considerarse de tendencia desfavorable pero sin llegar a la producción de una carne de tipo PSE (pálida, suave y exudativa).

Para el tratamiento T15 se obtuvo un mayor porcentaje de ácido linoleico, AGPI y una mayor relación AGPI/AGS, siendo esto beneficioso desde el punto de vista nutricional. Sin embargo, la relación n-6/n-3 no se encuentra dentro de los rangos adecuados tanto en T0 como en T15, siendo importante reducir la misma a través de la inclusión de alimentos con mayor contenido en AGPI de la serie n-3, como por ejemplo de los aceites vegetales de linaza, soja y canola. Las restantes variables estudiadas de calidad de carne no se vieron afectadas.

En función de estos resultados (AGPI/AGS) se concluye que la utilización de afrechillo de arroz en un nivel del 15 % podría considerarse como alternativa en la elaboración de raciones para lechones en etapa de posdestete. Sin embargo, deben considerarse otros factores, como por ejemplo el sistema de producción y otros componentes de la dieta, que podrían haber incidido sobre las variables evaluadas.

La aplicación de la técnica ARN-Seq permitió la identificación de 404 genes con expresión diferencial entre tratamientos, de los cuales 359 genes presentaron función conocida.

Los genes con expresión diferencial se asociaron a diferentes procesos biológicos y vías metabólicas. Dentro de estos procesos y vías, los relacionados con las características fenotípicas estudiadas fueron: 1) el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos, 2) la diferenciación y el crecimiento del tejido muscular y 3) las interacciones de receptores con la matriz extracelular.

Los procesos y vías asociados al metabolismo lipídico no se vieron afectados por las dietas, coincidiendo con la similitud a nivel fenotípico de los animales sobre

los cuales se analizó la expresión génica. Se observó un efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos a través de una sub expresión de estas vías para el tratamiento con mayor contenido lipídico.

En el tratamiento con mayor contenido lipídico hubo una sub expresión de los genes asociados con la diferenciación y el crecimiento del tejido muscular y una sobre expresión de los relacionados con la matriz extracelular.

La expresión diferencial de genes involucrados en estos procesos biológicos proporcionan información que puede ser útil en futuras investigaciones relacionadas con la calidad de la carne, identificándose genes que figuran en la bibliografía como genes candidatos como por ejemplo *PDK4*, *FOS* y *TNC*. Asimismo aportan información que puede resultar valiosa en el estudio de enfermedades humanas relacionadas con el metabolismo energético y el desarrollo muscular, destacándose en este sentido la expresión diferencial de los genes *GPER1*, *ABHD6*, *NR4A2*, *NR4A3*, *FOS* y *ATF3*.

Los diferentes resultados obtenidos constituyen un aporte en la caracterización del cerdo Pampa Rocha.

La aplicación de la técnica de ARN-Seq, debido al gran volumen de datos que proporciona y al permitir comparar diferentes condiciones experimentales, puede considerarse una herramienta valiosa para caracterizar a los recursos zoogenéticos, siendo importante su complementación con otros análisis, principalmente fenotípicos.

### 6.3 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de realización de diversos estudios aplicados en la caracterización de recursos zoogenéticos locales con un enfoque productivo. En el caso de los datos de ARN-Seq, es posible la aplicación de diferentes herramientas bioinformáticas para profundizar en la interpretación biológica de los datos disponibles. Dentro de estos puede mencionarse el estudio de la expresión diferencial de exones y el análisis de variantes en genes asociados a características de calidad de carne, como por ejemplo *KERA*, *PDK4*,

*TNC*, *FOS* y *GOS2*. Asimismo podrán estudiarse genes, procesos biológicos y vías metabólicas que se han relacionado con enfermedades en diferentes especies.

Durante el desarrollo del trabajo experimental que dio origen a la presente tesis también se obtuvo un criobanco de muestras de tejido (hígado) de los animales estudiados que podrán emplearse en futuros análisis de la expresión génica.

Se espera que estos materiales y datos sean utilizados por diferentes investigadoras y que su uso contribuya en la formación de recursos humanos en diferentes áreas, además de incrementar la caracterización de la raza local Pampa Rocha. Asimismo se pretende que la técnica de ARN-Seq pueda ser aplicada en el futuro con el objetivo de investigar a otros recursos zoogenéticos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adzitey F, Nurul H. 2011. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences - a mini review. *International Food Research Journal*. 18(1): 11-20.
- Ayuso M, Fernández A, Núñez Y, Benítez R, Isabel B, Barragán C, Fernández AI, Rey AI, Medrano JF, Cánovas A, González-Bulnes A, López-Bote C, Óvilo C. 2016. Comparative analysis of muscle transcriptome between pig genotypes identifies genes and regulatory mechanisms associated to growth, fatness and metabolism. *PLoS One*. 10(12): e0145162.
- 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.
- Barlocco N, Gómez A, Vadell A, Franco J. 2005. Crecimiento de lechones en sistemas de producción a campo. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*. 23: 67-72. [En línea]. Consultado 5 de marzo de 2018. Disponible en: <http://revistas.unellez.edu.ve/revista/index.php/ruct/article/view/34/31>
- Barlocco N, Vadell A. 2005. Experiencias en la caracterización del cerdo Pampa-Rocha de Uruguay. *Agrociencia Uruguay*. 9(1-2): 495-503.
- Barlocco N, Galietta G, Vadell A, Mondelli M, Ballesteros F. 2003. Evaluación de sistemas de producción de cerdos a campo basados en la utilización de pasturas. 2. Efecto sobre las canales. En III Encuentro Latinoamericano de Especialistas en Sistemas de Producción Porcina a Campo. Marcos Juárez, Argentina. [En línea]. Consultado 5 de marzo de 2018. Disponible en: <https://www.upc.edu.uy/calidad-de-carcasa-carne-y-grasa?download=52:barlocco-y-col-2003-2>
- Bauza R, González A, Silva D, Capra G, Echenique A, Grompone MA. 2007. Evaluación de la inclusión de grano de soja desactivado, afrechillo de arroz integral o suero de queso en la dieta de cerdos engorde. 1. Efecto sobre el comportamiento. *Agrociencia Uruguay*. Volumen Especial, IX Encuentro de

- Nutrición y Producción en Animales Monogástricos: 47-52. [En línea]. Consultado 20 de setiembre de 2017. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/218/155>
- 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. [En línea]. Consultado 7 de abril de 2018. Disponible en: <https://www.upc.edu.uy/caracterizacion-socio-economica-del-sector-porcino?download=168:bell-y-col-2014>
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 25: 1091–1093.
- Blencowe B, Ahmad S, Lee L. 2009. Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes. *Genes & Development*. 23: 1379-1386.
- Braun R, Pattacini S. 2013. Evaluación de ácidos grasos en las carcasas de cerdos alimentados con sorgo termoprocesado durante el crecimiento y la terminación. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa*. 23(1): 25-35.
- Bruford MW, Ginja C, Hoffmann I, Joost S, Orozco-terWengel P, Alberto FJ, Amaral AJ, Barbato M, Biscarini F, Colli L, Costa M, Curik I, Duruz S, Ferenčaković M, Fischer D, Fitak R, Groeneveld LF, Hall SJG, Hanotte O, Hassan F, Helsen P, Iacolina L, Kantanen J, Leempoel K, Lenstra JA, Ajmone-Marsan P, Masembe C, Megens H-J, Miele M, Neuditschko M, Nicolazzi EL, Pompanon F, Roosen J, Sevane N, Smetko A, Štambuk A, Streeter I, Stucki S, Supakorn C, Telo Da Gama L, Tixier-Boichard M, Wegmann D, Zhan X.

2015. Prospects and challenges for the conservation of farm animal genomic resources, 2015-2025. *Frontiers in Genetics*. 6: 314.
- Cánovas A, Quintanilla R, Amills M, Pena R. 2010. Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. *BMC Genomics*. 11: 372.
- 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. Montevideo, Uruguay. INNOTEC, Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay. 6: 11-20.
- Capra G, Echenique A, Grompone MA, Bauza R, González A, Silva D. 2007. 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 Uruguay*. Volumen Especial, IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos: 59-63.
- Carballo C. 2013. Oxidación lipídica y proteica de carne de cerdos Pampa Rocha producidos sobre pasturas. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 51p.
- Carballo C. 2007. Efecto del genotipo y sexo en el comportamiento productivo de cerdos en la etapa de posdestete-recría en un sistema de producción a campo. *Agrociencia Uruguay*. Volumen Especial, IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos: 75-80. [En línea]. Consultado 7 de abril de 2018. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/223/160>
- Cardoso TF, Cánovas A, Canela-Xandri O, González-Prendes R, Amills M, Quintanilla R. 2017a. RNA-seq based detection of differentially expressed genes in the skeletal muscle of Duroc pigs with distinct lipid profiles. *Scientific Reports*. 7: 40005.
- Cardoso TF, Quintanilla R, Tibau J, Gil M, Mármol-Sánchez E, González-Rodríguez O, González-Prendes R, Amills M. 2017b. Nutrient supply affects the mRNA expression profile of the porcine skeletal muscle. *BMC Genomics*. 18: 603.

- Castro G, Montenegro M, Barlocco N, Vadell A, Gagliardi R, Llambí S. 2012. Caracterización zoométrica en el cerdo Pampa Rocha de Uruguay (descriptiva primaria). *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 2(2012): 83-86.
- Castro G. 2007. Situación de los recursos genéticos porcinos locales en Uruguay. *Archivos de Zootecnia*. 56 (1): 783-788.
- Castro G, Fernández G, Delgado J, Rodríguez D. 2004. Contribución al estudio racial del cerdo Mamellado Uruguayo. *Veterinaria (Montevideo)*. 39 (155-156): 11-14.
- Cedrez V. 2013. Síndrome de Estrés Porcino: actualización del problema a nivel nacional y análisis de secuencias del gen RYR1 en cerdos de raza Pampa Rocha. Tesis de Grado Doctor en Ciencias Veterinarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. 98p.
- Chen C, Ai H, Ren J, Li W, Li P, Qiao R, Ouyang J, Yang M, Ma J, Huang L. 2011. A global view of porcine transcriptome in three tissues from a full-sib pair with extreme phenotypes in growth and fat deposition by paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics*. 12(1): 448.
- Coma J, Piquer J, Companys GV. 1999. Calidad de la carne en porcino efecto de la nutrición. En: XV Curso de Especialización, Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Barcelona. España.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Wojciech Szczęśniak M, Gaffney D, Elo L, Zhang X, Mortazavi A. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*. 17: 13.
- Cozzolino D. 2000. Características de los suplementos utilizados en el Uruguay para su empleo en alimentación animal (Serie Técnica N° 110). Montevideo, Uruguay: Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA.
- Du M, Carlin KM. 2012. Meat Science and Muscle Biology Symposium: Extracellular matrix in skeletal muscle development and meat quality. *Journal of Animal Science*. 90(3): 922–923.
- Dugan M, Vahmani P, Turner T, Mapiye C, Juárez M, Prieto N, Beaulieu A, Zijlstra R, Patience J, Aalhus J. 2015. Pork as a Source of Omega-3 (n-3) Fatty Acids. *Journal Clinical Medicine*. 4: 1999–2011.

- Echenique A, Capra G. 2011. Desarrollo de tecnologías para mejora de la calidad de producto en sistemas familiares de producción porcina. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie FPTA. 34: 56.
- Echenique A. 2007. Efecto de la alimentación sobre la calidad de la carne y la grasa de cerdo. En: IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos. Montevideo, Uruguay. 55-63.
- Errea E. 2012. La producción porcina en Uruguay: evolución y perspectivas. En: Anuario 2012, OPYPA (Oficina de Programación y Política Agropecuaria) [En línea]. Consultado 3 de febrero de 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-opypa>.
- FAO-DAD-IS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos). 2018a. [En línea]. Consultado 5 de febrero de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/dad-is/sdg-252/es/>
- FAO-DAD-IS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos). 2018b. [En línea]. Consultado 5 de febrero de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/es/>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. [En línea]. Consultado 5 de febrero de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/home.html>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2015. [En línea]. Consultado 5 de febrero de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/nr/cgrfa/cthemas/animals/es/>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2014. Cerdos y la nutrición humana. [En línea]. Consultado 5 de febrero de 2018. Disponible en: [http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/HH\\_nutrition.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/HH_nutrition.html)
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación

- y la Agricultura. Roma, Italia. Traducción de la versión original en inglés, 2007. [En línea]. Consultado 10 de mayo de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>
- Fenech M, El-Sohehy A, Cahill L, Ferguson L, French T, Shyong Tai E, Milner J, Koh W, Xie L, Zucker M, Buckley M, Cosgrove L, Lockett T, Fung K, Head R. 2011. Nutrigenetics and Nutrigenomics: Viewpoints on the Current Status and Applications in Nutrition Research and Practice. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*. 4: 69–89.
- González A, Bauza R. 2009. Sistemas de producción porcina en Uruguay. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 16 (4): 225-232.
- Grasso N. 2013. Identificación de polimorfismos de un solo nucleótido asociados a la resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos Corriedale. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 75p.
- Hekman J, Johnson J, Kukekova A. 2015. Transcriptome Analysis in Domesticated Species: Challenges and Strategies. *Bioinformatics and Biology Insights*. 9(4): 21–31.
- Hoffmann I. 2010. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*. 41(1): 32-46.
- Hou X, Yang Y, Zhu S, Hua C, Zhou R, Mu Y, Tang Z, Li K. 2016. Comparison of skeletal muscle miRNA and mRNA profiles among three pig breeds. *Molecular Genetics and Genomics*. 291(2): 559-573.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols*. 41: 44-57.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009b. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene list. *Nucleic Acids Research*. 37(1): 1-13.
- Kato H, Kimura T. 2003. Evaluation of the Effects of the Dietary Intake of Proteins and Amino Acids by DNA Microarray Technology. *The Journal of Nutrition*. 133: 2073S-2077S.

- Kayan A, Cinar MU, Uddin MJ, Phatsara C, Wimmers K, Ponsuksili S, Tesfaye D, Looft C, Juengst H, Tholen E, Schellander K. 2011. Polymorphism and expression of the porcine Tenascin C gene associated with meat and carcass quality. *Meat Science*. 89: 76-83.
- Keller J, Ringseis R, Priebe S, Guthke R, Kluge H, Eder K. 2011. Dietary L-carnitine alters gene expression in skeletal muscle of piglets. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(3): 419-429.
- Kukurba KR, Montgomery SB. 2015. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015(11): 951-969.
- Lan J, Lei MG, Zhang YB, Wang JH, Feng XT, Xu DQ, Gui JF, Xiong YZ. 2009. Characterization of the porcine differentially expressed PDK4 gene and association with meat quality. *Molecular Biology Reports*. 36(7): 2003.
- Li XJ, Zhou J, Liu LQ, Qian K, Wang CL. 2016. Identification of genes in longissimus dorsi muscle differentially expressed between Wannanhua and Yorkshire pigs using RNA-sequencing. *Animal Genetics*. 47(3): 324-333.
- Liu Y, Li M, Bo X, Li T, Ma L, Zhai T, Huang T. 2018. Systematic Analysis of Long Non-Coding RNAs and mRNAs in the Ovaries of Duroc Pigs During Different Follicular Stages Using RNA Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 1722.
- Llambí S, Arruga MV. 2018. El puzzle de los genomas de animales domésticos. En: Llambí S, Arruga MV. *Selecciones de Genética Veterinaria I*. Zaragoza, España. 144p.
- Llambí S, Montenegro M, Macedo F, Carballo C, Bell W, Castro G, Vadell A, Gagliardi R, Barlocco N. 2015. Estudio preliminar del efecto de polimorfismos del gen FUT-1 en parámetros reproductivos y productivos en cerdas Pampa Rocha. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 6: 495-499.
- Martínez A. 2001. Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 174p.
- Mernies B, Carballo C, Cabrera MC, Barlocco N, Saadoun A. 2012. Ácidos grasos del músculo Longissimus dorsi de cerdos Pampa Rocha y cruzas con razas Duroc y Large White. *Veterinaria (Montevideo)*. 48:123. (Resumen).

- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Oficina de Estadísticas Agropecuarias). 2017. Anuario Estadístico Agropecuario 2017. [En línea]. Consultado 20 de marzo de 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2013. Censo General Agropecuario 2011. [En línea]. Consultado 3 de enero de 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/censo2011.pdf>
- MGAP-OPYPA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Oficina de Programación y Política Agropecuaria). 2017. Anuario OPYPA 2017. [En línea]. Consultado 3 de enero de 2018. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario\\_opypa\\_2017.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_opypa_2017.pdf)
- Montenegro M, Llambí S, Castro G, Barlocco N, Vadell A, Landi V, Delgado JV, Martínez A. 2015. Genetic characterization of Uruguayan Pampa Rocha pigs with microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*. 38: 48-54.
- Montenegro M. 2012. Caracterización genética de los cerdos Pampa Rocha de Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. PEDECIBA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 118p.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*. 5(7): 621-628.
- Ogłuszka M, Szostak A, te Pas MF, Poławska E, Urbański P, Blicharski T, Pareek CS, Juszczuk-Kubiak E, Dunkelberger JR, Horbańczuk JO, Pierzchała M. 2017. A porcine gluteus medius muscle genome-wide transcriptome analysis: dietary effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on biological mechanisms. *Genes & Nutrition*. 12(1): 4.
- Olsson V, Pickova J. 2005. The influence of production systems on meat quality, with emphasis on pork. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 34(4): 338-343.
- Óvilo C, Benítez R, Fernández A, Núñez Y, Ayuso M, Fernández AI, Rodríguez C, Isabel B, Rey AI, López-Bote C, Silió L. 2014. Longissimus dorsi

- transcriptome analysis of purebred and crossbred Iberian pigs differing in muscle characteristics. *BMC Genomics*. 15: 413.
- Palombo V, Loor JJ, D'Andrea M, Vailati-Riboni M, Shahzad K, Krogh U, Theil PK. 2018. Transcriptional profiling of swine mammary gland during the transition from colostrogenesis to lactogenesis using RNA sequencing. *BMC Genomics*. 19: 322.
- Pascual JV, Rafecas M, Canela MA, Boatella J, Bou R, Barroeta AC, Codony R. 2007. Effect of increasing amounts of a linoleic-rich dietary fat on the fat composition of four pig breeds. Part II: Fatty acid composition in muscle and fat tissues. *Food Chemistry*. 100: 1639–1648.
- Pena RN, Noguera JL, Casellas J, Díaz I, Fernández AI, Folch JM, Ibáñez-Escriche N. 2013. Transcriptional analysis of intramuscular fatty acid composition in the longissimus thoracis muscle of Iberian 3 Landrace back-crossed pigs. *Animal Genetics*. 44: 648–660.
- Peraza P, Rincon G, Sotelo-Silveira J, Ciappesoni G, Islas-Trejo A, Medrano Juan. 2016. Estudio mediante RNA-Seq del transcriptoma de diferentes tejidos de ovinos resistentes y susceptibles a parásitos gastrointestinales. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*. 27(1): 262.
- Piórkowska K, Żukowski K, Ropka-Molik K, Tyra M, Gurgul A. 2018. A comprehensive transcriptome analysis of skeletal muscles in two Polish pig breeds differing in fat and meat quality traits. *Genetics and Molecular Biology*. 41(1):125-136.
- Puig-Oliveras A, Revilla M, Castelló A, Fernández AI, Folch JM, Ballester M. 2016. Expression-based GWAS identifies variants, gene interactions and key regulators affecting intramuscular fatty acid content and composition in porcine meat. *Scientific Reports*. 6: 31803.
- Régnier M, Gourbeyre P, Pinton P, Napper S, Laffite J, Cossalter A, Bailly J, Lippi Y, Bertrand-Michel J, Bracarense APF, Guillou H, Loiseau N, Oswald IP. 2017. Identification of Signaling Pathways Targeted by the Food Contaminant FB1: Transcriptome and Kinome Analysis of Samples from Pig Liver and Intestine. *Molecular Nutrition & Food Research*. 61(12): 1700433.

- Ropka-Molik K, Bereta A, Żukowski K, Tyra M, Piórkowska K, Żak G, Oczkowicz M. 2018. Screening for candidate genes related with histological microstructure, meat quality and carcass characteristic in pig based on RNA-seq data. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 31(10): 1565-1574.
- Rosenvold K, Andersen HJ. 2003. Factors of significance for pork quality: a review. *Meat Science*. 64: 219–2370.
- Salas RCD, Mingala CN. 2016. Genetic Factors Affecting Pork Quality: Halothane and Rendement Napole Genes. *Animal Biotechnology*. 28(2): 148-155.
- Simopoulos AP. 2016. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*. 8(3): 128.
- Siu PM, Alway SE. 2009. Response and adaptation of skeletal muscle to denervation stress: the role of apoptosis in muscle loss. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 14: 432-452.
- Szostak A, Ogłuszka M, te Pas M, Poławska E, Urbański P, Juszczuk-Kubiak E, Blicharski T, Shekhar Pareek C, Dunkelberger J, Horbańczuk J, Pierzchała M. 2016. Effect of a diet enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids on the pig liver transcriptome. *Genes & Nutrition*. 11(1): 9.
- Tartrakoon W, Tartrakoon T, Kitsupsee N. 2016. Effects of the ratio of unsaturated fatty acid to saturated fatty acid on the growth performance, carcass and meat quality of finishing pigs. *Animal Nutrition*. 2: 79-85.
- Teye G, Sheard PR, Whittington FM, Nute GR, Stewart A, Wood JD. 2006. Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality. *Meat Science*. 73: 157–165.
- Thomas G, Betters JL, Lord CC, Brown AL, Marshall S, Ferguson D, Sawyer J, Davis MA, Melchior JT, Blume LC, Howlett AC, Ivanova PT, Milne SB, Myers DS, Mrak I, Leber V, Heier C, Taschler U, Blankman JL, Cravatt BF, Lee RG, Crooke RM, Graham MJ, Zimmermann R, Brown HA, Brown JM. 2013. The serine hydrolase ABHD6 is a critical regulator of the metabolic syndrome. *Cell Reports*. 5(2): 508-520.

- Tikk K, Tikk M, Aaslyng MD, Karlsson AH, Lindahl G, Andersen HJ. 2007. Significance of fat supplemented diets on pork quality – Connections between specific fatty acids and sensory attributes of pork. *Meat Science*. 77: 275–286.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2017. *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. [En línea]. Consultado 3 de enero de 2018. Disponible en: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/livestock-poultry-ma//2010s/2017/livestock-poultry-ma-10-12-2017.pdf>
- Vadell A, Carballo C. 2013. Características identificatorias de la población de cerdos criollos Pampa Rocha. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 20(2): 74-76.
- Vadell A, Barlocco N, Carballo C. 2010. Prolificidad y longevidad productiva de cerdas Pampa Rocha en un sistema de producción al aire libre. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 17: 149-153.
- 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.
- Vadell A, Barlocco N, Methol R, Vaselli M, Castillos A. 1995. Diagnóstico de la producción porcina en el departamento de Rocha. Montevideo, Uruguay. PROBIDES/Facultad de Agronomía, Udelar. 40p.
- Velleman SG. 2012. Meat science and muscle biology symposium: extracellular matrix regulation of skeletal muscle formation. *Journal of Animal Science*. 90(3): 936-941.
- Veum VL, Dankel SN, Gjerde J, Nielsen HJ, Solsvik MH, Haugen C, Christensen BJ, Hoang T, Fadnes DJ, Busch C, Våge V, Sagen, JV, Mellgren G. 2012. The nuclear receptors NUR77, NURR1 and NOR1 in obesity and during fat loss. *International Journal of Obesity*. 36: 1195-1202.
- Wan X, Wang D, Xiong Q, Xiang H, Li H, Wang H, Liu Z, Niu H, Peng J, Jiang S, Chai J. 2016. Elucidating a molecular mechanism that the deterioration of porcine meat quality responds to increased cortisol based on transcriptome sequencing. *Scientific Reports*. 6: 36589.

- Wang Z, Li Q, Chamba Y, Zhang B, Shang P, Zhang H, Wu C. 2015. Identification of Genes Related to Growth and Lipid Deposition from Transcriptome Profiles of Pig Muscle Tissue. *PLoS One*. 10: e0141138.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 10(1): 57–63.
- Wehrle-Haller B. 2012. Structure and function of focal adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*. 24: 116-124.
- Xu Y, Qi X, Hu M, Lin R, Hou Y, Wang Z, Zhou H, Zhao Y, Luan Y, Zhao S, Li X. 2018. Transcriptome Analysis of Adipose Tissue Indicates That the cAMP Signaling Pathway Affects the Feed Efficiency of Pigs. *Genes*. 9(7): 336.
- Zhao S, Mugabo Y, Ballentine G, Attane C, Iglesias J, Poursharifi P, Zhang D, Nguyen TA, Erb H, Prentki R, Peyot ML, Joly E, Tobin S, Fulton S, Brown JM, Madiraju SR, Prentki M. 2016.  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Domain 6 Deletion Induces Adipose Browning and Prevents Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Reports*. 14: 2872-2888.
- Zhao X, Mo D, Li A, Gong W, Xiao S, Zhang Y, Qin L, Niu Y, Guo Y, Liu X, Cong P, He Z, Wang C, Li J, Chen Y. 2011. Comparative analyses by sequencing of transcriptomes during skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness. *PLoS One*. 6: e19774.

## 8. ANEXOS

En esta sección se encuentran los materiales suplementarios correspondientes al Capítulo 5.

Table S1: Intramuscular fat and fatty acids contents (means values).

Characteristics	T0 Mean	SEM	T15 Mean	SEM	p-value
IMF (g/100g)	1.91	0.47	1.97	0.57	0.9 <sup>NS</sup>
Myristic acid (C14:0) <sup>a</sup>	1.62	0.41	1.49	0.21	0.64 <sup>NS</sup>
Palmitic acid (C16:0) <sup>a</sup>	27.95	3.72	27.78	2.52	0.95 <sup>NS</sup>
Stearic acid (C18:0) <sup>a</sup>	11.25	0.94	11.66	0.64	0.57 <sup>NS</sup>
Palmitoleic acid (C16:1) <sup>a</sup>	4.37	0.32	4.01	0.17	0.16 <sup>NS</sup>
Oleic acid (C18:1) <sup>a</sup>	36.03	6.04	34.05	2.71	0.63 <sup>NS</sup>
Linoleic acid (C18:2n6) <sup>a</sup>	11.27	2.21	13.8	0.48	0.12 <sup>NS</sup>
$\alpha$ -Linolenic acid (C18:3n3) <sup>a</sup>	0.80	0.41	0.95	0.39	0.68 <sup>NS</sup>
Arachidonic acid (C20:4n6) <sup>a</sup>	1.54	0.23	1.77	0.27	0.31 <sup>NS</sup>
Other <sup>a,b</sup>	5.16	0.62	4.48	1.39	0.48 <sup>NS</sup>
$\Sigma$ SFA	40.83	3.22	40.94	2.18	0.96 <sup>NS</sup>
$\Sigma$ MUFA	40.4	5.48	38.06	2.77	0.57 <sup>NS</sup>
$\Sigma$ PUFA	13.61	2.72	16.52	0.56	0.14 <sup>NS</sup>

SEM: standard error of means.

IMF: intramuscular fat.

<sup>a</sup> The percentage of each fatty acid relative to the total.

<sup>b</sup> Lipids not identified.

$\Sigma$ SFA: sum of saturated fatty acids (myristic + palmitic + stearic).

$\Sigma$ MUFA: sum of monounsaturated fatty acids (palmitoleic + oleic).

$\Sigma$ PUFA: sum of polyunsaturated fatty acids ( $\alpha$ -linolenic + arachidonic).

<sup>NS</sup> Not significant (p-value  $\geq$  0.05).

Table S2: Detailed list of DEGs identified by RNAseq: Fold change (FC)  $\geq 2$  and p-value  $\leq 0.05$

Largest fold change: T15 vs. T0

Associated Gene Name (SC)	Chromosome	Due to Treatment - FC	Due to Treatment - LogFC	Due to Treatment - p-value
CSDC2	5	2.63	1.40	0.048
NAB2	5	3.29	1.72	0.03
LYZ	5	3.42	1.78	0.02
ENSSSCG00000000629	5	-23.50	-4.55	0.02
A2ML1	5	8.37	3.06	0.04
PIANP	5	-17.95	-4.17	0.03
LRTM2	5	4.27	2.09	0.04
ENSSSCG00000000785	5	-17.61	-4.14	0.045
SLC38A2	5	-3.63	-1.86	0.046
GAS2L3	5	3.33	1.73	0.04
KERA	5	10.22	3.35	0.00
LRRIQ1	5	24.47	4.61	0.02
ODF3B	5	-42.91	-5.42	0.00
HDAC10	5	-2.48	-1.31	0.00
C6orf201	7	-15.81	-3.98	0.00
PRL	7	-33.91	-5.08	0.01
TCF19	7	2.87	1.52	0.02
ATP6V1G2	7	2.66	1.41	0.04
COL11A2	7	12.95	3.69	0.00
GFRAL	7	-62.82	-5.97	0.00
FKBP5	7	2.73	1.45	0.01
PIM1	7	-2.93	-1.55	0.00
VEGFA	7	-2.09	-1.07	0.02
IL17A	7	-10.85	-3.44	0.02

CFAP161	7	-4.00	-2.00	0.04
CIDEB	7	6.16	2.62	0.04
PCK2	7	-3.47	-1.79	0.01
TRAV14DV4	7	-25.73	-4.69	0.02
ARRDC4	7	-2.01	-1.01	0.02
FOS	7	-15.88	-3.99	0.00
ISG12(A)	7	-2.43	-1.28	0.03
ENSSSCG00000002482	7	-27.35	-4.77	0.03
RD3L	7	-17.70	-4.15	0.046
RTL1	7	-103.16	-6.69	0.00
SHCBP1	6	5.40	2.43	0.01
LGALS13	6	-11.05	-3.47	0.03
IGSF23	6	-2.07	-1.05	0.04
FGF21	6	-9.90	-3.31	0.00
PPP1R15A	6	-2.001	-1.00	0.04
CA6	6	-19.06	-4.25	0.00
LIN28A	6	-8.21	-3.04	0.01
COL8A2	6	4.59	2.20	0.02
FHL3	6	-2.56	-1.36	0.04
NT5C1A	6	3.27	1.71	0.00
MOCOS	6	3.54	1.82	0.02
HOOK1	6	41.96	5.39	0.01
FRMD1	1	10.08	3.33	0.02
SLC22A1	1	46.28	5.53	0.01
SAMD5	1	-8.17	-3.03	0.04
ADGRG6	1	2.86	1.51	0.04
ENSSSCG00000004194	1	3.82	1.94	0.04
HEY2	1	4.78	2.26	0.00
HTR1E	1	-25.73	-4.69	0.02
PRSS35	1	7.22	2.85	0.02
COL12A1	1	8.83	3.14	0.00
MRO	1	-17.95	-4.17	0.03

GLDN	1	3.38	1.76	0.01
SLC27A2	1	-22.05	-4.46	0.03
MAP1A	1	-29.32	-4.87	0.01
TGM5	1	-7.58	-2.92	0.02
CHAC1	1	-11.24	-3.49	0.00
SPINT1	1	24.30	4.60	0.03
TRPM1	1	26.01	4.70	0.04
CDH19	1	11.82	3.56	0.00
SERPINB7	1	5.95	2.57	0.04
SLC24A1	1	24.30	4.60	0.03
NOX5	1	4.30	2.10	0.03
SLC1A1	1	3.56	1.83	0.03
TMC1	1	23.96	4.58	0.04
FOXB2	1	43.43	5.44	0.01
PSAT1	1	-2.38	-1.25	0.02
NR4A3	1	-9.71	-3.28	0.00
SUSD1	1	2.71	1.44	0.04
TNC	1	8.80	3.14	0.00
SLC25A25	1	-2.58	-1.37	0.01
LAMC3	1	18.02	4.17	0.00
ENSSSCG00000005922	4	-5.02	-2.33	0.04
WISP1	4	8.97	3.16	0.046
MYC	4	-2.72	-1.44	0.00
NOV	4	2.22	1.15	0.02
CU207250.1	4	29.66	4.89	0.00
SLC26A7	4	41.06	5.36	0.01
SBSPON	4	3.33	1.73	0.00
RGS20	4	49.53	5.63	0.01
SELP	4	3.12	1.64	0.02
SLC19A2	4	-3.00	-1.58	0.01
FCRL6	4	-22.05	-4.46	0.03
EFNA4	4	-3.06	-1.61	0.03

RPTN	4	-38.13	-5.25	0.02
CIART	4	-2.50	-1.32	0.00
GJA5	4	2.80	1.48	0.01
PHGDH	4	-2.65	-1.41	0.02
ENSSSCG00000006723	4	2.07	1.05	0.045
SPAG17	4	-8.46	-3.08	0.04
ENSSSCG00000006793	4	3.49	1.80	0.03
COL11A1	4	6.00	2.59	0.00
CYR61	4	-2.44	-1.29	0.02
RP11-219A15.1	17	-7.30	-2.87	0.04
PLAT	17	2.70	1.44	0.00
OTOR	17	11.03	3.46	0.00
FOXA2	17	-15.11	-3.92	0.03
DEFB123	17	13.96	3.80	0.02
MYH7B	17	-2.83	-1.50	0.01
NNAT	17	5.51	2.46	0.00
GDAP1L1	17	-5.91	-2.56	0.046
SPATA25	17	-24.03	-4.59	0.04
EYA2	17	4.14	2.05	0.01
ZFAND2A	3	-2.48	-1.31	0.00
COL26A1	3	21.83	4.45	0.04
ALKBH4	3	-3.91	-1.97	0.01
TMC5	3	24.09	4.59	0.03
OR1F1	3	-24.40	-4.61	0.046
ASPN	3	2.95	1.56	0.03
C2orf40	3	2.90	1.53	0.03
IL18RAP	3	21.79	4.45	0.045
KIAA1211L	3	27.06	4.76	0.02
C2orf68	3	7.27	2.86	0.048
ACTG2	3	3.79	1.92	0.00
ANTXR1	3	2.25	1.17	0.02
C2orf74	3	22.30	4.48	0.048

KCNK12	3	21.88	4.45	0.03
SRD5A2	3	10.31	3.37	0.01
FAM179A	3	-2.68	-1.42	0.04
CENPA	3	12.96	3.70	0.01
VSNL1	3	-19.58	-4.29	0.00
RPL15	13	2.09	1.06	0.04
PPIC	8	2.10	1.07	0.04
ADAMTS3	8	5.64	2.50	0.046
CXCL10	8	2.83	1.50	0.046
CXCL11	8	6.09	2.61	0.04
ENSSSCG00000009026	8	-2.70	-1.43	0.049
SPP1	8	3.19	1.67	0.04
RXFP2	11	-52.12	-5.70	0.00
SLITRK6	11	4.00	2.00	0.048
GPC6	11	3.06	1.61	0.048
TSSK1B	14	-19.20	-4.26	0.04
KCNK1	14	5.05	2.34	0.02
PPP1R3C	14	-3.42	-1.77	0.00
ENTPD1	14	2.73	1.45	0.01
ENSSSCG00000010549	14	35.50	5.15	0.03
RBM20	14	2.83	1.50	0.02
ZFP36	14	-2.11	-1.08	0.01
CPXM2	14	2.83	1.50	0.01
KNDC1	14	35.02	5.13	0.02
WDR64	10	5.67	2.50	0.04
CFH	10	2.15	1.11	0.03
CRB1	10	-26.45	-4.73	0.02
ZNF367	10	9.36	3.23	0.03
KIF24	10	-3.50	-1.81	0.02
ITGA8	10	3.17	1.66	0.00
ENSSSCG00000011069	10	29.65	4.89	0.01
CREM	10	-2.26	-1.18	0.01

ITIH2	10	-7.56	-2.92	0.04
CSRNP1	13	-3.28	-1.71	0.00
CCK	13	-29.42	-4.88	0.01
FAM198A	13	2.69	1.42	0.02
ENSSSCG00000011324	13	-3.36	-1.75	0.00
UBA7	13	-2.73	-1.45	0.02
LSMEM2	13	-2.20	-1.14	0.02
ABHD6	13	2.55	1.35	0.04
FAM107A	13	3.52	1.82	0.00
BHLHE40	13	-3.26	-1.70	0.01
TRPC1	13	2.72	1.44	0.046
PLD1	13	3.83	1.94	0.01
OSTN	13	12.15	3.60	0.02
TFRC	13	2.10	1.07	0.03
MYLK	13	2.99	1.58	0.02
VGLL3	13	2.60	1.38	0.02
ADAMTS1	13	2.25	1.17	0.03
MX2	13	3.13	1.64	0.01
SYTL5	X	37.40	5.22	0.01
DLG3	X	-2.18	-1.12	0.04
RLIM	X	-17.96	-4.17	0.02
TNMD	X	36.32	5.18	0.00
GPRASP2	X	4.11	2.04	0.049
SLC25A53	X	-20.81	-4.38	0.02
NCBP2L	X	43.15	5.43	0.01
VSIG1	X	51.08	5.67	0.00
ZCCHC12	X	5.59	2.48	0.02
ARHGAP36	X	2.47	1.31	0.02
PPP1R32	2	-4.58	-2.19	0.03
CHRM4	2	-24.67	-4.62	0.03
SYT13	2	-20.79	-4.38	0.03
RCN1	2	2.24	1.16	0.02

PAX6	2	-23.50	-4.55	0.02
ENSSSCG00000013324	2	21.88	4.45	0.03
MYOD1	2	-2.20	-1.13	0.01
DKK3	2	2.84	1.51	0.01
CIRBP	2	-2.45	-1.29	0.01
TUBB4A	2	-3.68	-1.88	0.02
PEX11G	2	-3.01	-1.59	0.03
ICAM5	2	-25.73	-4.69	0.02
PIN1	2	-2.17	-1.12	0.04
JUNB	2	-2.09	-1.06	0.01
SLC5A5	2	21.83	4.45	0.04
COMP	2	20.46	4.35	0.00
CILP2	2	29.56	4.89	0.00
RGS14	2	-3.53	-1.82	0.02
CDHR2	2	-17.82	-4.16	0.04
F2RL1	2	32.67	5.03	0.01
THBS4	2	3.11	1.64	0.03
THBS4	2	2.60	1.38	0.01
LOX	2	4.78	2.26	0.00
SLC27A6	2	4.23	2.08	0.01
EGR1	2	-4.03	-2.01	0.00
PLAC8L1	2	-17.96	-4.17	0.02
STK32A	2	-17.95	-4.17	0.03
OR5AR1	2	-24.40	-4.61	0.046
LRTOMT	9	-17.94	-4.17	0.04
CABIN1	9	7.98	3.00	0.04
ANGPTL5	9	5.60	2.48	0.02
CXCR5	9	-30.38	-4.93	0.01
GRIK4	9	-2.82	-1.50	0.047
UBASH3B	9	2.16	1.11	0.04
OR6T1	9	-24.40	-4.61	0.046
FMOD	9	7.99	3.00	0.00

PLEKHA6	9	2.84	1.50	0.03
PDK4	9	5.57	2.48	0.02
SCIN	9	4.06	2.02	0.01
SEMA3D	9	3.94	1.98	0.00
ENSSSCG00000015472	9	58.14	5.86	0.00
ATF3	9	-6.36	-2.67	0.01
G0S2	9	-7.30	-2.87	0.00
VWC2	9	-24.40	-4.61	0.046
ENSSSCG00000015797	15	6.71	2.75	0.00
KCNJ3	15	-2.70	-1.44	0.00
NR4A2	15	-4.97	-2.31	0.00
ENSSSCG00000015969	15	2.66	1.41	0.04
ALS2CR11	15	-17.70	-4.15	0.046
DNER	15	5.33	2.41	0.046
CHRNA2	15	2.93	1.55	0.02
ASB18	15	-2.08	-1.06	0.04
VIPR2	18	3.39	1.76	0.02
INSIG1	18	-2.17	-1.12	0.01
TMEM139	18	-3.48	-1.80	0.01
IFRD1	18	-2.58	-1.37	0.01
GPR141	18	-28.64	-4.84	0.01
HOXA10	18	-5.51	-2.46	0.03
ANKH	16	2.43	1.28	0.01
FAM134B	16	-3.19	-1.68	0.02
C1QTNF3-AMACR	16	2.10	1.07	0.01
SPEF2	16	5.15	2.36	0.02
PELO	16	-2.21	-1.14	0.02
STC2	16	-2.70	-1.44	0.01
DUSP1	16	-3.02	-1.60	0.00
SPDL1	16	-12.57	-3.65	0.01
SLIT3	16	2.43	1.28	0.01
CCDC40	12	-24.67	-4.62	0.03

PRKCA	12	3.58	1.84	0.00
GH1	12	-50.59	-5.66	0.00
RPRML	12	-24.40	-4.61	0.046
PLEKHH3	12	-3.68	-1.88	0.00
STAT5A	12	-17.96	-4.17	0.02
NR1D1	12	-2.57	-1.36	0.02
CH242-256H23.1	12	-96.47	-6.59	0.00
PNMT	12	-3.55	-1.83	0.00
EPN3	12	-2.61	-1.38	0.03
CHAD	12	9.11	3.19	0.01
ANKFN1	12	-52.06	-5.70	0.00
ABR	12	2.20	1.14	0.03
OR1D5	12	-24.40	-4.61	0.046
TEKT1	12	-5.39	-2.43	0.02
GABARAP	12	-2.40	-1.26	0.049
SLC18A2	14	40.01	5.32	0.01
NAPEPLD	9	54.31	5.76	0.00
CBLN2	1	30.96	4.95	0.02
ENSSSCG00000020944	2	-17.95	-4.17	0.03
COX11	12	-2.53	-1.34	0.02
TMEM51	6	2.65	1.41	0.01
INPP5A	14	-17.96	-4.17	0.02
HOXA10	18	5.57	2.48	0.02
STK26	X	2.07	1.05	0.04
ARMC4	10	19.29	4.27	0.04
CTSF	2	-4.48	-2.16	0.01
AMY2B	4	-7.12	-2.83	0.01
RBM3	X	-2.19	-1.13	0.01
LSM8	18	-5.05	-2.34	0.00
KDM4D	9	-5.50	-2.46	0.03
OR1E1	12	-20.78	-4.38	0.04
NUTM2G	15	-17.82	-4.16	0.04

ENSSSCG00000021980	11	-35.02	-5.13	0.00
RASSF10	2	-3.76	-1.91	0.03
GAD1	15	9.03	3.17	0.02
YLPM1	7	-7.21	-2.85	0.04
HNF1B	12	-23.64	-4.56	0.02
CLDN24	15	-20.80	-4.38	0.02
ENSSSCG00000022472	9	28.85	4.85	0.02
ENSSSCG00000022551	7	3.62	1.85	0.02
EOMES	13	28.90	4.85	0.02
GADD45B	2	-2.54	-1.34	0.01
PPP1R3B	15	-2.63	-1.39	0.00
PRSS45	13	-6.31	-2.66	0.01
ENSSSCG00000023038	7	2.79	1.48	0.02
RMI1	10	4.50	2.17	0.01
ENSSSCG00000023203	7	8.12	3.02	0.04
NEDD4	1	2.67	1.42	0.02
CYP4F22	2	-26.48	-4.73	0.02
CHIA	4	-26.45	-4.73	0.02
ADM2	5	-3.12	-1.64	0.04
SLC5A3	13	-4.69	-2.23	0.02
ENSSSCG00000023797	8	-78.17	-6.29	0.00
NR6A1	1	-8.09	-3.02	0.02
AQP4	6	-2.13	-1.09	0.00
DNAI2	12	44.91	5.49	0.00
GMNC	13	4.84	2.28	0.03
CAND1	5	-3.61	-1.85	0.02
SEMA4C	3	-3.37	-1.75	0.04
SLC26A6	13	-7.80	-2.96	0.01
C16orf89	3	64.68	6.02	0.01
ENSSSCG00000025277	10	-2.22	-1.15	0.00
VPS41	18	-17.96	-4.17	0.02
CSF1R	2	12.50	3.64	0.00

SERTAD3	6	-2.49	-1.32	0.01
ENSSSCG00000025468	13	-4.20	-2.07	0.049
ZGLP1	2	-39.11	-5.29	0.00
RAB9B	X	5.65	2.50	0.02
LCLAT1	3	2.10	1.07	0.01
ENSSSCG00000025956	1	11.89	3.57	0.01
KLHL22	14	-7.42	-2.89	0.03
EPHA3	13	3.48	1.80	0.04
HES1	13	-2.51	-1.33	0.00
SERTAD4	9	3.30	1.72	0.01
TYR	9	-14.05	-3.81	0.03
GPB1	3	2.79	1.48	0.047
DTWD2	2	7.52	2.91	0.04
ENSSSCG00000026470	2	-15.11	-3.92	0.046
TNC	1	7.13	2.83	0.00
DLK2	7	-17.70	-4.15	0.046
CATSPER4	6	-2.47	-1.30	0.00
MAMDC2	1	4.66	2.22	0.04
PLCH1	13	-17.95	-4.17	0.03
ENSSSCG00000026788	1	-22.05	-4.46	0.03
ENSSSCG00000026906	8	29.34	4.87	0.04
PSMB8	7	-3.21	-1.68	0.03
ORM1	1	10.34	3.37	0.04
GBP2	4	-10.79	-3.43	0.01
NUTM2G	18	-22.05	-4.46	0.03
IQCF3	13	-24.40	-4.61	0.047
CTRC	6	-10.70	-3.42	0.00
HIST1H4H	4	-35.10	-5.13	0.01
HHLA2	13	8.03	3.01	0.02
ENSSSCG00000027341	12	2.30	1.20	0.02
OR2L5	2	-24.80	-4.63	0.02
KLF10	4	-2.33	-1.22	0.01

MYL5	8	4.47	2.16	0.03
ASIC1	5	-17.82	-4.16	0.04
ENSSSCG00000027570	6	-30.20	-4.92	0.01
FANCG	1	-2.69	-1.43	0.01
FAM180A	18	4.27	2.09	0.01
IER3	7	-2.58	-1.37	0.00
ENSSSCG00000027635	4	-19.20	-4.26	0.04
ENSSSCG00000027844	3	-15.11	-3.92	0.04
UNC13A	2	13.32	3.74	0.01
SEMA6B	9	8.35	3.06	0.03
C1orf115	10	4.23	2.08	0.02
UNC5CL	7	-2.19	-1.13	0.03
SBK1	3	-2.07	-1.05	0.01
ENSSSCG00000028006	1	-112.76	-6.82	0.00
ZFP36	6	-3.63	-1.86	0.00
NADSYN1	2	-2.54	-1.34	0.049
SIK1	13	-5.28	-2.40	0.00
AMY2B	4	-2.75	-1.46	0.00
BTG2	9	-5.93	-2.57	0.00
ABC7-42404400C24.1	14	3.28	1.71	0.00
RND3	15	-3.43	-1.78	0.00
ENSSSCG00000028430	13	-4.49	-2.17	0.03
ERAS	X	-5.64	-2.50	0.04
ENSSSCG00000028628	4	9.11	3.19	0.01
CEL	1	5.03	2.33	0.01
MYLK4	7	2.70	1.43	0.03
DIO2	6	37.42	5.23	0.01
OR6C3	5	-20.80	-4.38	0.02
ENSSSCG00000028982	10	-2.16	-1.11	0.01
HOXA9	18	-7.49	-2.90	0.01
ERGIC3	17	-2.09	-1.07	0.01
ENSSSCG00000029204	X	2.14	1.10	0.047

SP8	9	-15.10	-3.92	0.049
SESN2	6	-5.67	-2.50	0.00
MYH2	12	-3.55	-1.83	0.02
PRG4	9	8.38	3.07	0.00
EMB	16	2.65	1.41	0.046
ADGRG2	X	4.92	2.30	0.01
HIST1H4L	7	-4.30	-2.10	0.02
SELM	14	-2.25	-1.17	0.02
MKX	10	8.20	3.04	0.04
RPUSD4	9	-2.39	-1.26	0.04
DGKG	13	4.01	2.00	0.01
ENSSSCG00000029956	11	32.55	5.02	0.00
PROKR1	3	-18.27	-4.19	0.04
DEFB1	15	-5.45	-2.45	0.00
MAFF	5	-2.71	-1.44	0.01
STK33	9	-7.03	-2.81	0.00
TRAF7	3	-3.87	-1.95	0.03
ENSSSCG00000030275	1	7.43	2.89	0.03
SLC15A2	13	3.27	1.71	0.04
PigE-108A11.5	6	12.19	3.61	0.02
ENSSSCG00000030447	10	-2.05	-1.03	0.02
ENSSSCG00000030536	15	3.34	1.74	0.047
TNFRSF10C	14	3.58	1.84	0.03
ENSSSCG00000030699	4	4.31	2.11	0.03
IGLV-5	14	12.63	3.66	0.04
JUN	6	-2.12	-1.08	0.03
IGLV-3	14	15.54	3.96	0.00
ENSSSCG00000031053	4	3.74	1.90	0.00

Table S3.1 - Functional analysis using DAVID software (gene ontology-biological processes)

Term	Count	p-value
GO:0010033~response to organic substance	84	0.01
GO:0048468~cell development	62	0.03
GO:1901700~response to oxygen-containing compound	50	0.02
GO:0007166~cell surface receptor signaling pathway	77	0.02
GO:0022008~neurogenesis	49	0.02
GO:0009719~response to endogenous stimulus	51	0.02
GO:2000026~regulation of multicellular organismal development	55	0.02
GO:0014070~response to organic cyclic compound	35	0.02
GO:0009725~response to hormone	33	0.03
GO:0033993~response to lipid	33	0.03
GO:0071310~cellular response to organic substance	64	0.04
GO:1901724~positive regulation of cell proliferation involved in kidney development	4	0.04
GO:0009887~organ morphogenesis	36	0.04
GO:0060537~muscle tissue development	19	0.04
GO:0009991~response to extracellular stimulus	21	0.04
GO:0009605~response to external stimulus	61	0.03
GO:0045595~regulation of cell differentiation	49	0.03
GO:0030099~myeloid cell differentiation	18	0.04
GO:0007267~cell-cell signaling	48	0.04
GO:0033280~response to vitamin D	6	0.04
GO:0045637~regulation of myeloid cell differentiation	13	0.04
GO:0048699~generation of neurons	44	0.04
GO:0002573~myeloid leukocyte differentiation	13	0.04
GO:0003006~developmental process involved in reproduction	26	0.04

GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	29	0.04
GO:0043620~regulation of DNA-templated transcription in response to stress	8	0.04

---

Table S3.2 - Functional analysis using DAVID software (gene ontology-molecular functions)

Term	Count	p-value
GO:0008201~heparin binding	15	8.27 E-4
GO:1901681~sulfur compound binding	16	0.00
GO:0005539~glycosaminoglycan binding	15	0.00

Table S3.3 - Functional analysis using DAVID software (gene ontology-cellular components)

Term	Count	p-value
GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	28	3.33 E-7
GO:0031012~extracellular matrix	32	3.32 E-6
GO:0005615~extracellular space	49	0.00
GO:0044421~extracellular region part	100	0.01
GO:0005576~extracellular región	115	0.01
GO:0005887~integral component of plasma membrane	50	0.03

Table S3.4 - Functional analysis using DAVID software (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways)

Term	Count	p-value
hsa04510:Focal adhesión	15	0.02
hsa04512:ECM-receptor interaction	9	0.04

Table S4.1 - Functional analysis by comparing up and down-regulated genes.  
Analysis performed in ClueGo-Cytoscape.

GO Term	Group	GO	
	p-value*	Groups	Cluster
neurotransmitter secretion	19.0E-3	00	T15
positive regulation of striated muscle tissue development	29.0E-3	01	T0
cellular response to BMP stimulus	29.0E-3	02	T0
negative regulation of neuron death	30.0E-3	03	T0
olfactory bulb development	31.0E-3	04	T15
Axon guidance	18.0E-3	05	T15
Glutamatergic synapse	8.3E-3	06	None Specific
Estrogen signaling pathway	30.0E-3	07	T0
Protein digestion and absorption	28.0E-3	08	T15
Positive regulation of cellular amide metabolic process	30.0E-3	09	T0
Eye photoreceptor cell development	8.1E-3	10	T0
Regulation of DNA-templated transcription, initiation	30.0E-3	11	T0
DNA-templated transcription, initiation	30.0E-3	11	T0
Skeletal muscle tissue development	6.7E-3	12	T0
Skeletal muscle cell differentiation	6.7E-3	12	T0
Positive regulation of epithelial cell proliferation	18.0E-3	13	T0
Cellular response to growth hormone stimulus	18.0E-3	13	T0
JAK-STAT cascade involved in growth hormone signaling pathway	18.0E-3	13	T0
Focal adhesión	1.2E-3	14	T15

ECM-receptor interaction	1.2E-3	14	T15
Positive regulation of endothelial cell proliferation	1.2E-3	14	T0
Regulation of leukocyte migration	18.0E-3	15	T15
Positive regulation of leukocyte migration	18.0E-3	15	T15
Regulation of leukocyte chemotaxis	18.0E-3	15	T15
Germ cell development	13.0E-3	16	T0
Cell maturation	13.0E-3	16	T0
Spermatid development	13.0E-3	16	T0
Sperm capacitation	13.0E-3	16	T0
ERK1 and ERK2 cascade	8.4E-3	17	T0
Myeloid leukocyte differentiation	8.4E-3	17	None Specific
Negative regulation of MAPK cascade	8.4E-3	17	T0
Monocyte differentiation	8.4E-3	17	T0
Negative regulation of ERK1 and ERK2 cascade	8.4E-3	17	T0
Gastrulation	240.0E-6	18	T15
Regulation of blood coagulation	240.0E-6	18	T15
Regulation of wound healing	240.0E-6	18	T15
Endoderm formation	240.0E-6	18	T15
Mesoderm formation	240.0E-6	18	T15
Regulation of platelet activation	240.0E-6	18	T15
Focal adhesion	370.0E-6	19	T15
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	370.0E-6	19	T0
Positive regulation of epithelial cell proliferation	370.0E-6	19	T0
Positive regulation of endothelial cell proliferation	370.0E-6	19	T0

Cellular response to growth hormone stimulus	370.0E-6	19	T0
Monocyte differentiation	370.0E-6	19	T0
Maturity onset diabetes of the young	910.0E-6	20	T0
Pancreas development	910.0E-6	20	T0
Metanephros development	910.0E-6	20	T0
Female gonad development	910.0E-6	20	T0
Regulation of kidney development	910.0E-6	20	T0
Regulation of metanephros development	910.0E-6	20	T0
Monocyte differentiation	910.0E-6	20	T0
Ureteric bud morphogenesis	910.0E-6	20	T0
Rheumatoid arthritis	420.0E-6	21	T0
Positive regulation of epithelial cell proliferation	420.0E-6	21	T0
Positive regulation of endothelial cell proliferation	420.0E-6	21	T0
Female gonad development	420.0E-6	21	T0
ERK1 and ERK2 cascade	420.0E-6	21	T0
Myeloid leukocyte differentiation	420.0E-6	21	None Specific
Monocyte differentiation	420.0E-6	21	T0
Ureteric bud morphogenesis	420.0E-6	21	T0
Trabecula formation	460.0E-6	22	T15
Embryonic placenta development	460.0E-6	22	T0
Cardiac chamber morphogenesis	460.0E-6	22	T15
Inner ear development	460.0E-6	22	T15
Inner ear morphogenesis	460.0E-6	22	T15
Artery development	460.0E-6	22	T15
Labyrinthine layer blood vessel development	460.0E-6	22	T0
Aorta development	460.0E-6	22	T15

Auditory receptor cell differentiation	460.0E-6	22	T15
Choline metabolism in cancer	240.0E-6	23	T15
Rheumatoid arthritis	240.0E-6	23	T0
Regulation of bone resorption	240.0E-6	23	T15
Regulation of myeloid cell differentiation	240.0E-6	23	T0
Positive regulation of myeloid cell differentiation	240.0E-6	23	T0
ERK1 and ERK2 cascade	240.0E-6	23	T0
Myeloid leukocyte differentiation	240.0E-6	23	None Specific
Regulation of myeloid leukocyte differentiation	240.0E-6	23	T0
Monocyte differentiation	240.0E-6	23	T0
Osteoclast differentiation	240.0E-6	23	None Specific
Regulation of osteoclast differentiation	240.0E-6	23	T0
Positive regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol	310.0E-6	24	T15
Regulation of ion homeostasis	310.0E-6	24	T15
cAMP-mediated signaling	310.0E-6	24	T15
Regulation of cyclic nucleotide metabolic process	310.0E-6	24	T15
Regulation of calcium ion transport	310.0E-6	24	T15
Positive regulation of purine nucleotide metabolic process	310.0E-6	24	T15
Calcium ion transmembrane transport	310.0E-6	24	T15
Positive regulation of purine nucleotide biosynthetic process	310.0E-6	24	T15
Regulation of calcium ion transmembrane transport	310.0E-6	24	T15

Regulation of cAMP metabolic process	310.0E-6	24	T15
Cytosolic calcium ion transport	310.0E-6	24	T15
Calcium ion import	310.0E-6	24	T15
Release of sequestered calcium ion into cytosol	310.0E-6	24	T15
Regulation of cellular carbohydrate metabolic process	19.0E-6	25	T0
Regulation of carbohydrate biosynthetic process	19.0E-6	25	T0
Regulation of lipid biosynthetic process	19.0E-6	25	None Specific
Monosaccharide biosynthetic process	19.0E-6	25	T0
Cellular glucose homeostasis	19.0E-6	25	T0
Response to hexose	19.0E-6	25	T0
Glucose homeostasis	19.0E-6	25	T0
Regulation of steroid biosynthetic process	19.0E-6	25	T0
Glucose metabolic process	19.0E-6	25	T0
Cellular response to hexose stimulus	19.0E-6	25	T0
Gluconeogenesis	19.0E-6	25	T0
Regulation of DNA-templated transcription in response to stress	19.0E-6	25	T0
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to stress	19.0E-6	25	T0

\* Corrected with Benjamini-Hochberg

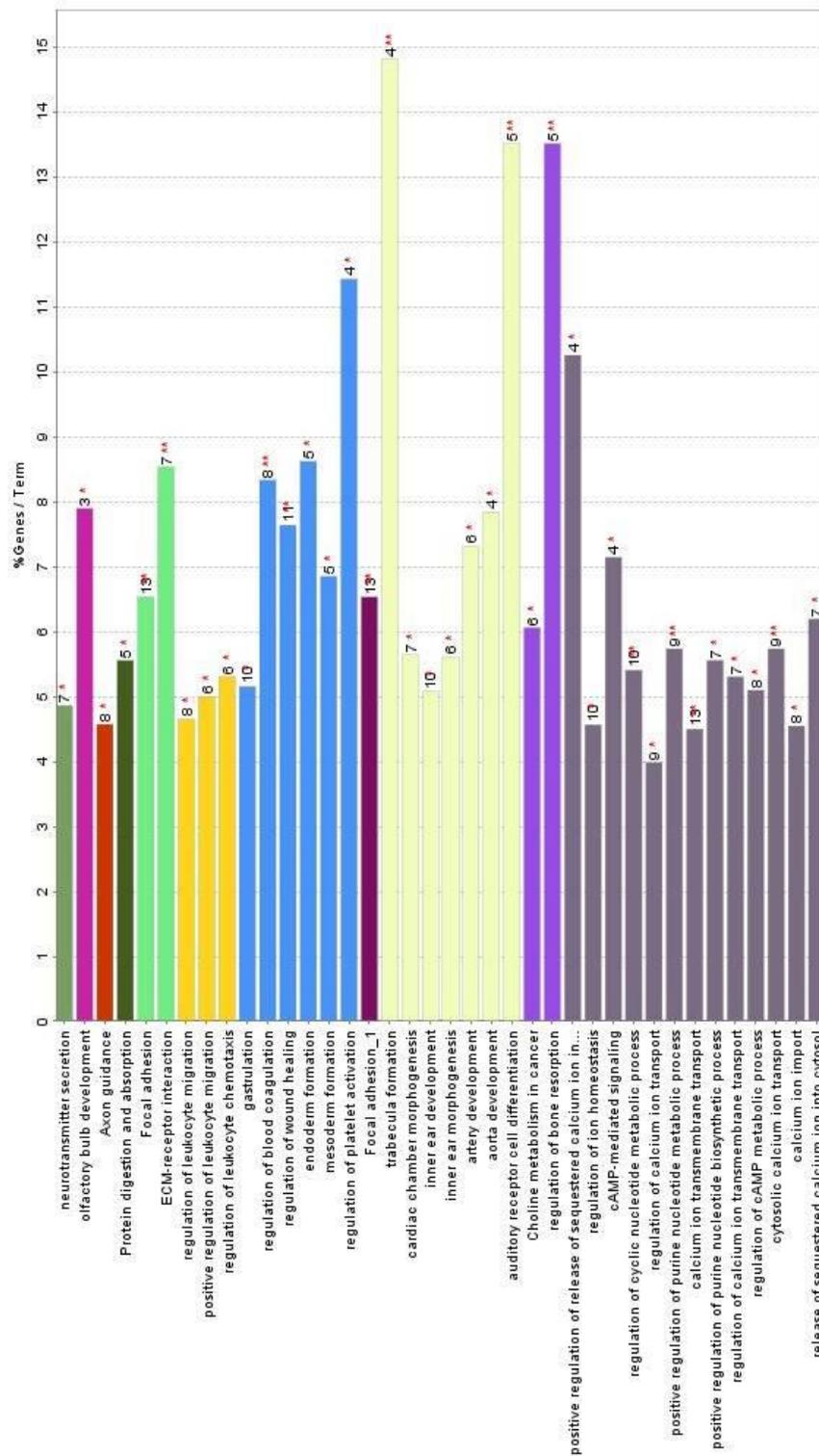


Figure S4.2: Processes specific to the cluster of genes up-regulated in treatment T15. The bars represent the percentage of genes per term and the number of genes associated with the terms is shown as bar label.

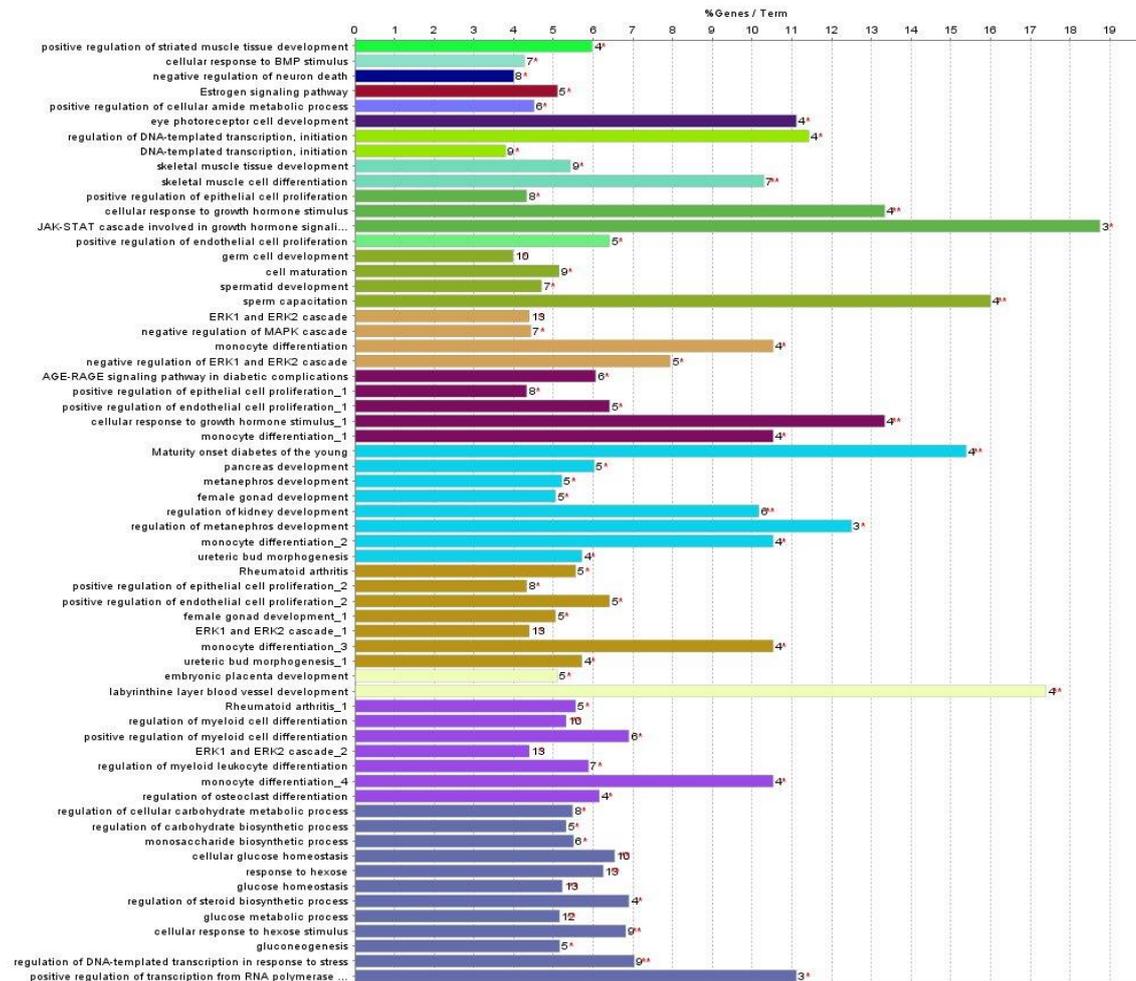


Figure S4.3: Processes specific to the cluster of genes down-regulated in T15 treatment compared to T0. The bars represent the percentage of genes per term and the number of genes associated with the terms is shown as bar label. Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.

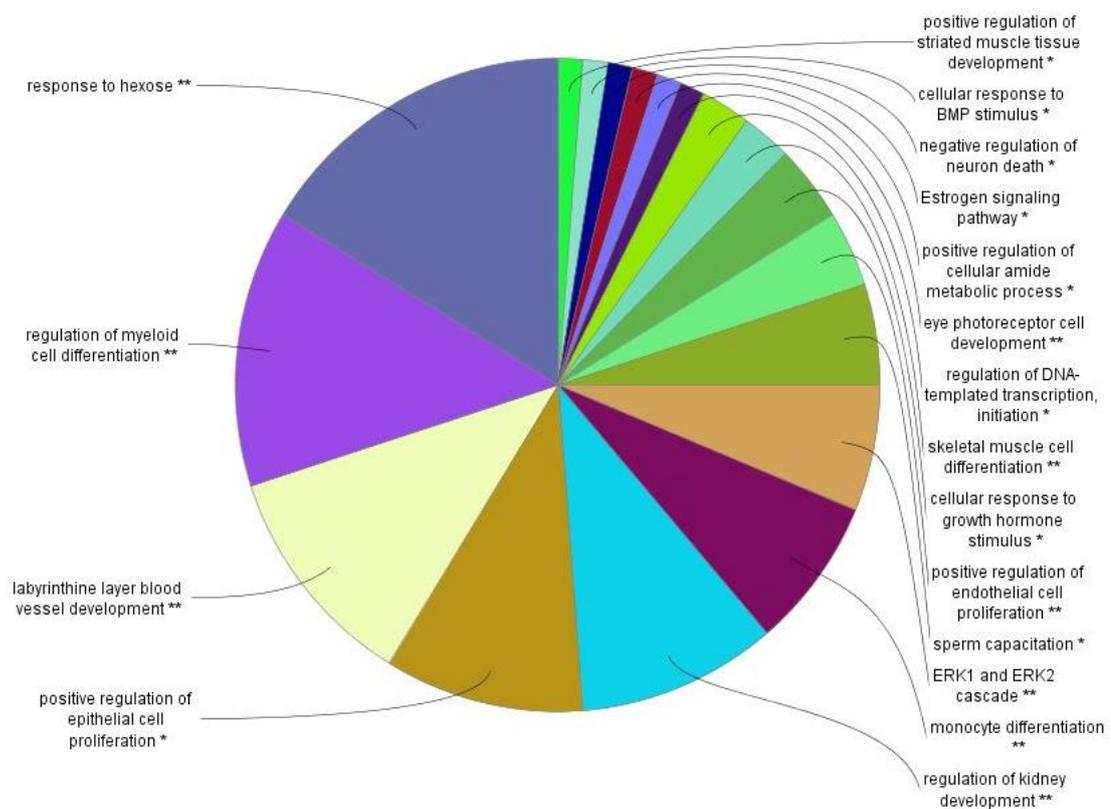


Figure S4.4: Overview chart of biological processes and pathways distribution specific for down-regulated genes in the T15 treatment compared to T0. The name of the group is given by the most representative term (most significant p-value). Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.

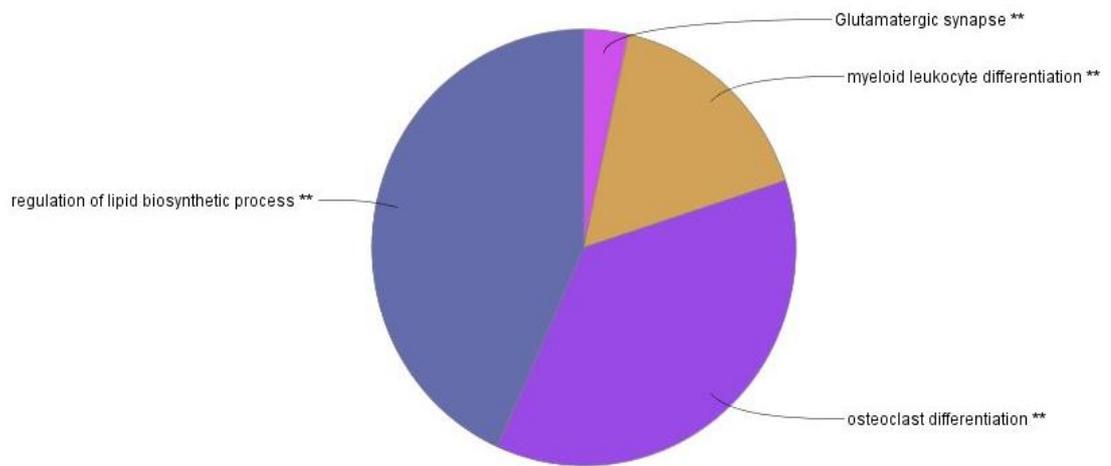


Figure S4.5: Overview chart of processes not specific to any cluster. Analysis and visualization performed in ClueGo-Cytoscape.