

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL TRANSCRIPTOMA DEL TEJIDO ADIPOSO ENTRE CERDOS CON FENOTIPOS EXTREMOS PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN GRASA INTRAMUSCULAR

Corominas, J.^{1,2}, Ramayo-Caldas, Y.^{1,2}, Puig-Oliveras, A.^{1,2}, Estellé, J.^{3,4,5}, Castelló, A.¹, Alves, E.⁶, Pena, R.N.⁷, Ballester, M.¹ y Folch, J.M.^{1,2}

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra, 08193. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ³INRA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI), Equipe Génétique Immunité Santé, Jouy-en-Josas F-78352. ⁴AgroParisTech, UMR 1313 GABI, Jouy-en-Josas F-78352.

⁵CEA, DSV/iRCM/SREIT/LREG, Jouy-en-Josas F-78352. ⁶Departamento Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. Coruña Km7.5, 28040 Madrid. ⁷Genètica i Millora Animal, IRTA, Av Rovira Roure 191, 25198 Lleida.

E-mail: Jordi.corominas@uab.es.

INTRODUCCIÓN

La selección artificial realizada en las especies porcinas comerciales ha provocado cambios en la composición de ácidos grasos de la carne, alterando así su valor nutricional y sus propiedades tecnológicas. Los órganos encargados de regular el balance de ácidos grasos son principalmente el hígado y el tejido adiposo, siendo este último el más importante en cerdos (O'Hea y Leveille, 1969). Por tanto, resulta de gran interés el análisis del transcriptoma del tejido adiposo por su implicación en la determinación de la calidad de la carne porcina. Actualmente, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) permiten el análisis completo del transcriptoma en diferentes individuos con el objetivo de estudiar la variabilidad, tanto funcional como estructural, entre poblaciones o grupos de animales seleccionados. Recientemente, nuestro grupo ha analizado el transcriptoma del hígado en 10 cerdos procedentes de un cruce experimental entre Ibérico y Landrace con fenotipos extremos para la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular (Ramayo-Caldas et al., 2012a). En el presente trabajo se ha secuenciado el transcriptoma del tejido adiposo (grasa dorsal) en 12 animales de la misma población con el objetivo de identificar genes diferencialmente expresados y vías metabólicas relacionadas con diferencias fenotípicas y genéticas observadas en la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal: La población utilizada procede de un retrocruce (BC1-LD) entre verracos F1 (Ibérico x Landrace) y cerdas Landrace. Para este estudio se seleccionaron un total de 12 animales con fenotipos extremos para la composición de ácidos grasos en grasa intramuscular del músculo *longissimus dorsi*: grupos *Low* (L) y *High* (H). La extracción de ARN total del tejido adiposo (grasa dorsal) se realizó con el kit *RiboPure™ Isolation of High Quality Total RNA (Ambion)*.

Análisis de transcriptoma por RNA-seq: La secuenciación se realizó en el CNAG (*Centro Nacional de Análisis Genómico*). Se generó una genoteca *paired-end* para cada animal, con insertos de aproximadamente 300 pb, utilizando el *TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina)*. Las genotecas fueron secuenciadas en un equipo *Illumina HiSeq2000*, mediante lecturas de 2x75 pb. Se generaron un total de 462 millones de lecturas.

Mapeo y ensamblaje de lecturas: El programa *FASTQC* fue utilizado para determinar la calidad de las lecturas generadas y sus estadísticos. Estas lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia (*Sscrofa10.2*) usando el programa *TopHat v2.0.1* (Trapnell et al., 2009) y anotadas con la herramienta *intersectBED* de *BEDtools* (Quinlan et al., 2010). Finalmente, los transcritos fueron ensamblados con el programa *Cufflinks v2.0.2* (Trapnell et al., 2012).

Análisis de la expresión génica: Se determinó la correlación entre el total de lecturas mapeadas para cada gen, obtenidas con el programa *QualiMap v0.5* (García-Alcalde et al., 2012), y los datos de expresión en grasa dorsal procedentes de un *Gene-Chip® Porcine microarray* de *Affymetrix*. Los paquetes de *R DESeq* (Anders et al., 2010) y *EdgR* (Robinson et al., 2010) fueron utilizados para determinar qué genes estaban diferencialmente expresados (DE) entre los dos grupos. Los genes DE fueron analizados con la herramienta *ClueGO* del programa *Cytoscape* (Bindea et al., 2009), con el objetivo de identificar las rutas metabólicas sobrerrepresentadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la secuenciación del transcriptoma del tejido adiposo se generaron un total de 462M lecturas pareadas de 75 pb, de las cuales alrededor del 85% fueron mapeadas sobre la secuencia de referencia del genoma porcino (*Sscrofa10.2*). Las lecturas mapearon mayoritariamente en exones tanto antes (66-72%) como después de ensamblarlas en transcritos (42-55%). Analizando las lecturas mapeadas en cada gen, se observó un total de 15.687 genes. Su expresión en tejido adiposo estaba altamente correlacionada entre los grupos H y L ($r=0.98$). Además, los valores de expresión de RNA-Seq fueron comparados con los obtenidos con *microarrays*, observándose una correlación de *Spearman* de $r=0.68$, en concordancia con trabajos previos (Esteve-Codina et al., 2011; Chen et al., 2011; Ramayo-Caldas et al., 2012a). Para el análisis de expresión comparativa, se eliminaron los genes cuya media de lecturas mapeadas era inferior a 20 (12.731 genes), de los cuales 529 se detectaron como diferencialmente expresados con el paquete *EdgeR* y 426 con el *DESeq* (*fold change* $\geq 1,2$, *p-value* $\leq 0,01$ y *FDR* $\leq 0,1$). Combinando los resultados de los dos programas observamos un solapamiento de 372 genes (Figura 1), de los cuales 291 están sobreexpresados en el grupo L mientras que 81 se encuentran subexpresados en este mismo grupo. Un total de 42 de los genes diferencialmente expresados habían sido identificados previamente en un GWAS para el perfil de ácidos grasos en músculo (Ramayo-Caldas et al., 2012b). Entre las rutas metabólicas sobrerrepresentadas cabe destacar las de señalización del calcio, insulina y adipocitoquinas, así como la ruta de síntesis de ácidos grasos (Tabla 1). Estas rutas de señalización regulan una gran variedad de vías metabólicas y confirman la importancia del tejido adiposo como regulador de la homeostasis energética, más allá de un simple almacén de energía. Además, la sobrerrepresentación de la síntesis de lípidos confirma la implicación de este órgano en la composición de ácidos grasos en músculo y consecuentemente en la determinación de la calidad de la carne en cerdos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S. & Huber, W. 2010. *Genome Bio.* 11(10):R106.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H. et al. 2009. *Bioinformatics* 25(8):1091-3.
- Chen, C., Ai, H., Ren, J. et al. 2011. *BMC Genomics* 12(1):448.
- Esteve-Codina, A., Kofler, R., Palmieri, N. et al. 2011. *BMC Genomics* 12(1):552.
- García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J.

et al. 2012. *Bioinformatics* 28(20):2678-2679. • Jung, W.Y., Kwon, S.G., Son, M. et al. 2012. *PloS ONE* 7(9):e42198. • O’Hea, E.K. & Leveille G.A. 1969. *The Journal of Nutrition* 99(3):338-344. • Quinlan, A.R. & Hall, I.M. 2010. *Bioinformatics* 26(6):841-842. • Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Esteve-Codina, A. et al. 2012. *BMC Genomics* 13(1):547. • Ramayo-Caldas, Y., Mercadé, A., Castelló, A. 2012. *J Anim Sci* 90(9):2883-93. • Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. 2010. *Bioinformatics* 26(1):139-140. • Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L. 2009. *Bioinformatics* 25(9):1105-1111. • Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., et al. 2012. *Nature protocols* 7(3):562-578.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-29821-C02 (*Ministerio de Economía y Competitividad*) y por el Programa de Innovación Consolider-Ingenio 2010 (CSD2007-00036). J. Corominas ha sido financiado con la beca FPI del *Ministerio de Educación* (BES-2009-018223), Y. Ramayo con una beca FPU (AP2008-01450) y A. Puig-Oliveras con una beca PIF (458-01-1/2011).

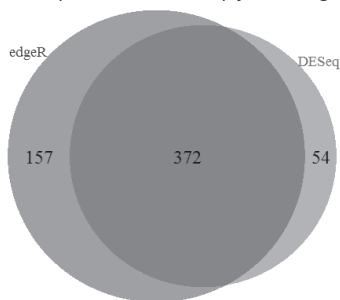


Figura 1 Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados, usando los paquetes de R: *DESeq* y *EdgeR*.

Tabla 1: Rutas metabólicas sobrerrepresentadas en los genes diferencialmente expresados entre grupos (L y H).

Ruta	Genes	p-value
Contracción músculo cardíaco	13	3.95E-07
Cardiomiopatía hipertrófica	12	4.58E-06
Ruta señalización del calcio	15	1.12E-04
Secreción biliar	9	2.02E-04
Glicolisis / Gluconeogénesis	6	1.97E-02
Síntesis de ácidos grasos	2	3.03E-02
Ruta señalización de la insulina	8	3.93E-02
Ruta señalización de adipocitoquinas	5	4.43E-02

DIFFERENTIAL TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN ADIPOSE TISSUE OF PIGS PHENOTYPICALLY EXTREME FOR INTRAMUSCULAR FATTY ACID COMPOSITION

ABSTRACT: The adipose tissue is one of the main organs implicated in the regulation of porcine lipid metabolism and it is involved in the overall fatty acid synthesis. New advances in high-throughput technologies allowed us to characterize the porcine adipose tissue transcriptome architecture. The main goal of this work was to detect the over-represented pathways in 12 Iberian x Landrace crossbred pigs showing extreme phenotypes for intramuscular fatty acid composition (L and H). Data obtained represents 11.5-fold of the porcine genome and most of the reads were mapped in coding regions (66-72%). The RNA-Seq expression data shows a high correlation with microarrays data ($r=0.68$). A differential expression analysis identified 372 differential-expressed genes between both groups. In the L group, 291 genes were detected as up-regulated genes, while only 81 genes were down-regulated. Differential-expressed genes allowed us to identify over-represented pathways such as fatty acid biosynthesis, insulin and adipocytokine signaling pathways. These results will be analyzed to find candidate genes and networks regulating meat quality traits in pigs.

Keywords: RNA-Seq, transcriptome, adipose tissue, pork.