

ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL MÚSCULO PORCINO ASOCIADO A PARÁMETROS DE COLESTEROL Y ENGRASAMIENTO.

Cánovas, A.¹, Casellas, J.¹, Varona, L.¹, Díaz, I.², Quintanilla, R.¹, Pena, RN.¹

¹Genètica i Millora Animal. IRTA–Lleida. Rovira Roure,191, 25198. Lleida.

²Tecnologia dels Aliments. IRTA–Monells. 17121, Monells.

angela.canovas@irta.es

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han detectado múltiples QTL para caracteres de calidad de carne en porcino (Ovilo *et al.*, 2000; Perez-Enciso *et al.*, 2000). No obstante, la identificación de la mutación causal de los QTL detectados es complicada debido al gran número de genes presentes en cada región cromosómica y al desequilibrio de ligamiento generado en las poblaciones experimentales (Varona *et al.*, 2005).

El objetivo del presente trabajo es detectar e identificar genes involucrados en el metabolismo de los lípidos en porcino, mediante el análisis de expresión génica por *microarrays* de oligómeros porcinos en muestras de músculo procedente de animales con niveles extremos para una combinación lineal de parámetros de colesterol y engrasamiento. Esta aproximación nos permitirá definir un mapa de genes para niveles de colesterol y engrasamiento en porcino, incrementando así el conocimiento de la base genética de los caracteres relacionados con la calidad de carne y la composición de lípidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El material animal utilizado en el presente estudio procede de una línea comercial Duroc con alto contenido de grasa intramuscular, utilizada en la producción de jamón curado de calidad. Con animales de esta línea se generó una población experimental de 370 machos distribuidos en cinco familias de medios hermanos paternos. Estos animales fueron castrados y controlados durante el periodo de cebo en el Centro de Control Porcino del IRTA. Para los 370 individuos se midieron los niveles de lípidos plasmáticos a dos edades, se registraron diversos caracteres relacionados con el grado de engrasamiento y la calidad de la carne al sacrificio (sobre los 120 kg de peso vivo y 190 días de edad), y posteriormente se analizó el contenido y composición de grasa intramuscular de los músculos *Gluteus medius* y *Longissimus dorsi* en el Centro de Tecnología de la Carne (IRTA-Monells).

En función de diversos análisis de componentes principales, se seleccionó un índice para clasificar a los animales en grupos extremos, tomando como criterio la maximización de las diferencias entre grupos para una serie de caracteres relacionados con el metabolismo lipídico, tales como la concentración plasmática de colesterol, lipoproteínas y triglicéridos, el porcentaje de grasa intramuscular, y su composición en ácidos grasos. Finalmente, se procesaron un total de 70 muestras de *Gluteus medius* correspondientes a los animales más extremos para parámetros de colesterol y engrasamiento, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla1. Animales analizados en el experimento de hibridación en microarrays

Línea	Nº animales
ALTA	35
BAJA	35
TOTAL	70

Extracción de ARN y control de calidad

La extracción, aislamiento y purificación del ARN total de los animales seleccionados se realizó con el kit RiboPure™ (*Ambion*). Debido al bajo rendimiento de extracción de este tipo de tejido fue necesario realizar dos extracciones para cada muestra para así alcanzar las concentraciones requeridas en el protocolo de marcaje e hibridación.

La integridad y pureza del ARN extraído fue analizada mediante electroforesis en un equipo *Bioanalyzer* (*Agilent*; Figura 1). Los valores RIN (*RNA Integrity Number*) obtenidos estaban comprendidos entre 6,7 y 8,9, indicando la buena calidad de las muestras (Schroeder *et al.*, 2006).

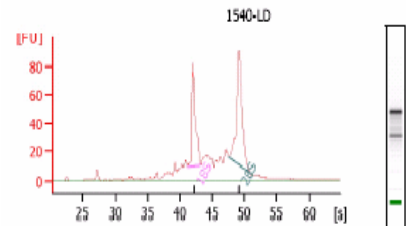


Figura 1. Electroferograma calidad ARN

Microarrays y control de calidad

Para el análisis en *microarrays* se utilizó el *GeneChip Porcine Genome Arrays*® (*Affymetrix*) que contiene 21.105 sondas de 25 bases diseñadas a partir de secuencias porcinas. Se realizó una hibridación individual (no competitiva) para cada muestra. Una vez escaneados los arrays, se obtuvieron las intensidades para cada una de las sondas.

Antes de procesar los datos, se realizó un control de calidad de los arrays con la función “qc” del paquete *Simpleaffy* de Bioconductor (R). Esta función obtiene el factor de escalado, los ratios de sondas 3’ y 5’, el porcentaje de genes detectados, la estimación de la integridad del ADNc y la intensidad del *background* para cada array. De los 70 arrays procesados, sólo dos de ellos fueron eliminados por no haber alcanzado el valor óptimo en alguno de los parámetros controlados (Wilson y Miller, 2005).

Análisis estadístico

Previamente al análisis estadístico se procedió a la corrección del *background* y la normalización de los datos. Con este fin se testaron dos algoritmos de preprocesado, MAS5.0 y RMA, dando mejor resultado el último de ellos en cuanto a normalización global de los datos

Una vez normalizados los datos mediante RMA, abordamos el estudio de la expresión diferencial entre las líneas de ALTO y BAJO nivel de engrasamiento mediante dos métodos distintos;

MÉTODO- 1) Un *test* de t entre los niveles de expresión en las líneas de ALTO y BAJO nivel de engrasamiento, realizado mediante el paquete *RMA_Express* y *Analysis Array Tools* (<http://stat-www.berkeley.edu/users/bolstad/RMAExpress/RMAExpress.html>).

MÉTODO- 2) Un análisis bayesiano mediante un modelo mixto de varianza residual heterogénea:

$$Y_{ijkl} = A_i + G_j + T_k(G_j) + e_{ijkl}$$

En este modelo se estableció como efecto fijo el *array* (**A**) y como efectos aleatorios el gen (**G**) y el tratamiento (**T**: línea ALTA o BAJA), jerarquizado a gen, siendo **e** el vector de residuos. El análisis bayesiano del modelo se realizó mediante muestreo de Gibbs (Gelfand y Smith, 1990). Asumiendo *a priori* normales para la verosimilitud, **G** y **T** (efectos aleatorios), y *a priori* planas para **A** y los componentes de varianza. Se realizaron un total de 100.000 iteraciones, descartando las 10.000 primeras iteraciones (*burn-in*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos comparando los niveles de expresión en *Gluteus medius* entre animales con niveles ALTOS vs niveles BAJOS de colesterol y engrasamiento.

Tabla 2. Genes cuyo nivel de expresión difirió significativamente entre los animales de la línea ALTA y la línea BAJA, según los dos análisis realizados.

Análisis	Nº genes con $p\text{-value} < 10^{-7}/10^{-9}$	Nº genes con ratio $>1,5$
Test de t	1007 ($p\text{-value} < 10^{-7}$)	140
Modelo mixto de varianza residual heterogénea	500 ($p\text{-value} < 10^{-9}$)	158

El test de t realizado utilizando el *RMA_Express/Array Tools* detectó más de 1000 genes cuya expresión diferencial tenía una significación inferior a 10^{-7} . De estos genes, 140 mostraban una expresión relativa 1,5 veces superior en la línea ALTA vs la línea BAJA.

En cuanto al análisis bayesiano considerando un modelo mixto, se obtuvieron 500 genes con un nivel de significación inferior a 10^{-9} . De estos, 158 mostraban una ratio entre clases mayor a 1,5 (Tabla 2).

Como se puede observar en la Tabla 2, los resultados obtenidos con los dos métodos fueron consistentes. Es más, comparando la lista de genes obtenidos, 152 de los 158 genes detectados con ratios superiores a 1,5 en el análisis 2 están presentes entre los genes con un nivel de significación inferior a 10^{-7} obtenidos en el análisis 1, difiriendo únicamente en 6 genes.

De la gran mayoría de estos 152 genes se conoce su homónimo humano, lo que hace posible predecir su función biológica. Así, los genes altamente significativos y con diferencias de expresión mayores a 1,5 están relacionados con una variedad de funciones tales como: el metabolismo de los lípidos, factores de transcripción y el procesamiento de ARNm, Actualmente desconocemos la función en sólo 7 de estos 152 genes (4.5%).

El número tan elevado de genes expresados diferencialmente en nuestro experimento podría ser debido a la gran potencia estadística alcanzada al trabajar con un número elevado de réplicas biológicas, que pueden ser interpretadas como medidas independientes del mismo registro (Hwa Yard y Speed, 2002) (en este caso expresión génica en músculo). Wolfinger y colaboradores (2001) atribuyen la obtención de un número más elevado de genes expresados diferencialmente al modelo mixto de varianza residual heterogénea. Asimismo, el tipo de caracteres analizados, susceptibles de ser afectados por numerosas vías metabólicas, también podría contribuir a la obtención de un elevado número de genes diferencialmente expresados.

Por último mencionar que, a la luz de estos resultados y teniendo en cuenta la función que pueda potencialmente afectar al engrasamiento muscular, se ha realizado una selección de posibles genes para validar los resultados del experimento de microarrays mediante PCR cuantitativa.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (GEN2003-20658-C05-05). RN PENA recibió una ayuda de contratación INIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Óvilo, C., Pérez-Enciso, M., Barragán, C., Clop, A., Rodríguez, MC., Oliver, MA., Toro, MA., Noguera, JL. 2000. *Mamm. Genome* 11:344-346.
- Pérez-Enciso, M., Clop, A., Noguera, JL., Óvilo, C., Coll, A., Folch, JM^o, Babot, D., Estany, J., Oliver, MA., Diaz, I., Sánchez, A. 2000. *Jour. Anim. Sci.* 78:2525-2531.
- Varona, L., Gómez-Raya, L., Rauw, WM, Noguera, JL. 2005. *Journal of animal breeding and genetics.*122:30-36.
- Gelfand, AE. y Smith, AFM. 1990. *J. Am. Stat. Assoc.* 85: 398-409.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. 2006. *BMC Mol Biol.* 31;7:3.
- Tsai, S., Cassady, JP., Freking, BA., Nonneman, DJ., Rohrer, GA., Piedrahita, JA,. 2006. *Animal Genetics,* 37, 422-431.
- Wilson, CL., Miller, CJ. 2005. *Bioinformatics;* 21(18):3683-5.
- Wolfinger R.D., Gibson G., Wolfinger E.D., Bennett L., Hamadeh H., Bushel R., Afshari C., Paules R.S. 2001. *J. Comput. Biol.* 8:625-637.
- Hwa Yard and Speed. 2002. *Nature Reviews* 3:579-588.