

ESTUDIOS DE EXPRESIÓN Y DE ASOCIACIÓN DEL EFECTO DEL GEN *PTHLH* SOBRE EL NÚMERO DE MAMAS EN UN CRUCE F₂ ENTRE CERDO *IBÉRICO* Y *MEISHAN*.¹

Martínez, M.¹, Noguera, J.L.¹, Tomás, A.², Alves, E.³, Pena, R.N.¹

¹Genética i Millora Animal. IRTA. Lleida. Spain. ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. UAB. Bellaterra. Spain. ³Departamento de Mejora Genética Animal. SGIT-INIA. Madrid. Spain
maria.martinez@irta.es

INTRODUCCIÓN

El factor de diferenciación PTHLH (*parathyroid hormone-like hormone*) ha sido descrito como un modulador local del desarrollo epitelial en el feto, influyendo en el desarrollo de huesos, dientes, glándulas mamarias y pezones. Cormier *et al.* (2003) observaron que la PTHLH se expresa en placenta y en una gran variedad de tejidos embrionarios, sin embargo, su función en tejidos adultos no está bien estudiada. Rodríguez *et al.* (2005) detectó, en el mismo cruce F₂ *Ibérico* x *Meishan* del presente trabajo, un QTL en el cromosoma 5 con efecto en el número de mamas, cromosoma en el que se encuentra el gen PTHLH. Además, se ha observado que una menor expresión del receptor de la PTHLH provoca una disminución del desarrollo mamario y de los pezones (Kobayashi *et al.*, 2005). Por lo tanto, el gen de la PTHLH podría ser un buen gen candidato para explicar la variabilidad en el número de mamas en porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio de expresión

Diseño experimental. Los niveles de expresión se midieron en 18 tejidos, usando, cuando era posible, dos muestras de distintos animales para cada uno de los tejidos, lo que resulta un total de 33 muestras analizadas. Los animales procedían de diferentes orígenes (*Duroc*, *Meishan*, y F₁ y F₂ *Ibérico* x *Meishan*). Como muestra calibradora se utilizó un *pool* con todas las muestras utilizadas en el estudio.

Amplificación y cuantificación. En humana, se han descrito cuatro variantes de ARNm por procesamiento alternativo de exones. Estas cuatro variantes dan lugar a dos proteínas que difieren en su extremo C-terminal. Tan sólo una de las variantes, similar a la variante 4 humana, ha sido secuenciada en cerdo (Chomdej *et al.*, 2004). Usando información de las secuencias de cerdo, ratón y humana, se han diseñado dos juegos de cebadores y sondas TaqMan, uno para las variantes que presentan el exón 1 (variantes 1 y 2) y otro para las que presentan el exón 3 (variantes 3 y 4). Con la intención de usar el gen endógeno más adecuado para el estudio de expresión relativa, se realizó un estudio comparativo de cinco genes frecuentemente usados como control en este tipo de estudios, calculando la estabilidad del gen mediante el software *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). Estos genes fueron *Ubiquitin C* (UbC), *β-2-Microglobulin* (B2M); *Ribosomal protein L32* (RPL32); *Guanine nucleotide binding protein β 2 like 1* (GNB2L1) e *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (HPRT1). El gen finalmente escogido como gen endógeno fue el HPRT1, debido a su mayor estabilidad. Las secuencias de los cebadores y las sondas TaqMan tanto de las variantes de PTHLH como de la HPRT1 aparecen en la tabla 1. La amplificación y cuantificación se realizó por PCR cuantitativa en un *ABI 7500 Real Time PCR System*.

Tabla 1. Secuencias de cebadores y sondas TaqMan usadas en el estudio de expresión.

Nombre	Secuencia
qPTHLH_1+2_F	CAG GGT GTG TGG AAT CAA CTT TC
qPTHLH_1+2_F_FAM	FAM - ACC AGA GGA GGT CCC CAG AGC CA - TAMRA
qPTHLH_3+4_F	CAC AGT TGG AGT AAC TGG TTC CTA AA
qPTHLH_3+4_F_FAM	FAM - AGT CCC CAG AGC CAG AGG ATA CGA TGC - TAMRA
qPTHLH_R	CGA CGC TCC ACT GCT GAA
HPRT1_F	AAG ATG GTC AAG GTT GCA AGC T
HPRT1_R	ATT TCA AAT CCA ACA AAG TCT GGT CTA
HPRT1_JOE	JOE - TGG TGA AAA GGA CCC CTC GAA GTG TTG - TAMRA

¹ Estudio financiado por el proyecto AGL2004-08368-C03/GAN.

Estudio de asociación

Diseño experimental. Para llevar a cabo este estudio se han utilizado tres generaciones de un cruce experimental F_2 entre cerdo *Ibérico* y *Meishan*. Estas dos razas se caracterizan por presentar valores extremos en los caracteres reproductivos, entre los que está el número de mamas.

Hasta el momento se han utilizado un total de 592 animales, de los cuales 20 pertenecen a la generación parental (3 machos *Ibéricos* y 17 hembras *Meishan*), 90 pertenecen a la F_1 y 569 a la F_2 . Sin embargo, para el estudio de asociación propiamente dicho se han utilizado únicamente las generaciones F_1 y F_2 del cruce, ya que no disponemos del número de mamas de los parentales.

Genotipado. Se diseñó un experimento de discriminación alélica para el polimorfismo identificado por Chomdej *et al.* (2004) en la región codificante del gen de la PTHLH. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 6 μ l conteniendo 3 μ l de TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x), 0.6 μ l de Primer Mix (10x) y 25 ng de ADN genómico. La amplificación se realizó en un *ABI 7500 Real Time PCR System* con un perfil térmico consistente en 50°C durante 2 minutos, seguido de 95°C durante 10 minutos y por último 50 ciclos de 92°C durante 15 segundos más 60°C durante 1 minuto y 30 segundos.

Análisis estadístico. El análisis se realizó mediante un modelo de efectos fijos con los efectos genotipo (3 niveles) y generación (2 niveles) con el procedimiento *GLM* del paquete estadístico SAS. El efecto sexo no fue incluido ya que en los análisis preliminares no se observaron diferencias significativas entre machos y hembras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de expresión

Como puede observarse en la figura 1, el gen de la PTHLH porcina se expresa en todos los tejidos testados excepto en placenta, a pesar de que fue precisamente en placenta donde Cormier *et al.* (2003) observaron expresión. Además, en ciertos tejidos como el hígado sólo uno de los pares de variantes pudo ser identificado sugiriendo un fenómeno de expresión diferencial para esas variantes. La expresión es en general bastante variable entre tejidos y algunos de los tejidos muestran niveles muy distintos en diferentes animales. Sin embargo, resulta interesante comprobar que en otros tejidos como ovario y útero la expresión es elevada y constante. También está activo en tejidos epiteliales, como piel o glándula mamaria.

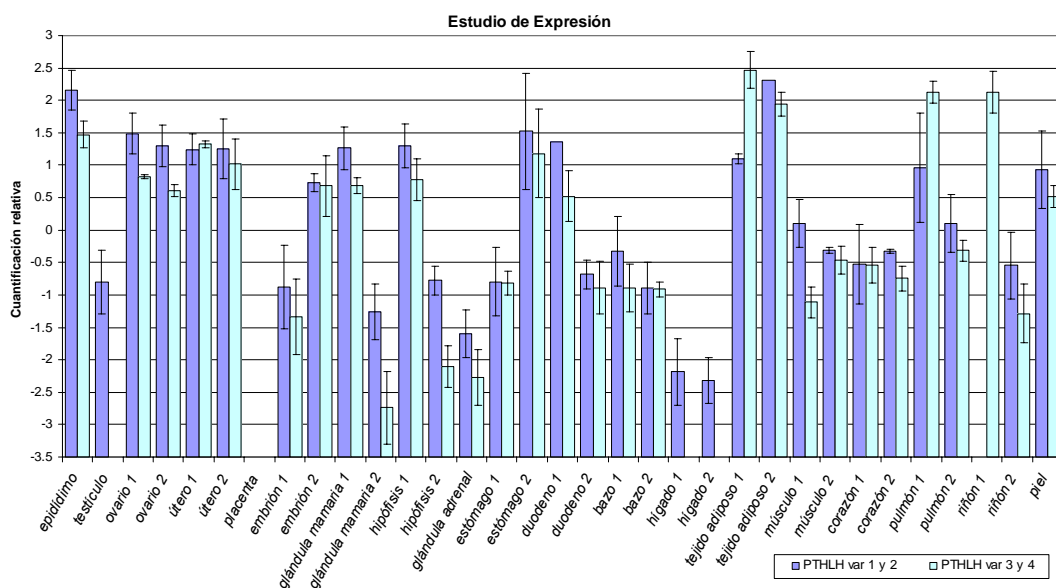


Figura. 1. Niveles de expresión de cada uno de los tejidos del estudio para las dos variantes del gen PTHLH relativa a un *pool* de tejidos.

Estudio de asociación

Al genotipar los parentales, observamos que los machos Ibéricos fundadores eran todos homocigotos para el alelo C, mientras que en las hembras *Meishan* había segregación, siendo el alelo C el más frecuente (figura 2).

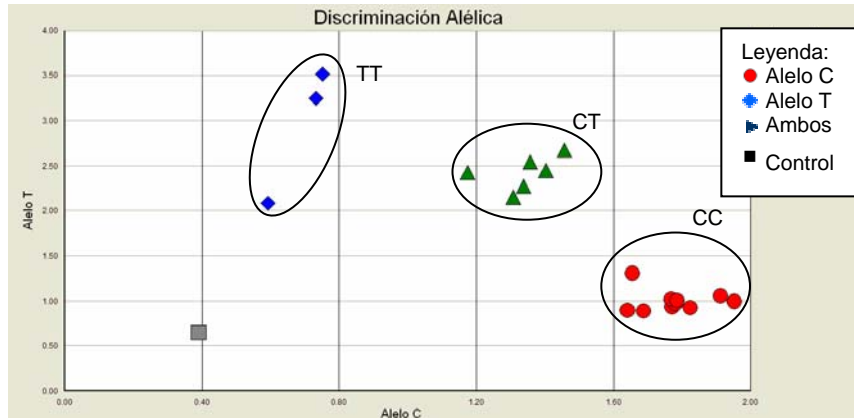


Figura 2. Genotipado de los parentales de la población experimental Ibérico x *Meishan*. Los tres machos ibéricos aparecen en el grupo de los homocigotos CC.

Como se muestra en la tabla 2, se detectan diferencias significativas entre los homocigotos para el alelo C y el resto de genotipos. Los homocigotos CC presentan 0,40 mamas menos que los heterocigotos ($P=0,0004$) y 0,81 mamas menos que los homocigotos para el alelo T ($P=0,025$).

Tabla 2. Tamaño muestral (n), medias (LSM) y error estándar (se) del número de mamas para cada uno de los genotipos observados.

Genotipo	n	LSM	se
CC	477	13,40 ^a	0,08
CT	170	13,80 ^b	0,10
TT	12	14,21 ^b	0,36

^{ab}Valores con distinto superíndice difieren significativamente ($P < 0,05$)

Estamos trabajando en corroborar estos resultados con modelos estadísticos alternativos para comprobar si el gen PTHLH está relacionado con el QTL observado por Rodríguez *et al.* (2005) en esta misma población F_2 .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHOMDEJ S.; PONSUKSILI S.; SCHELLANDER K.; WIMMERS K. 2004. *Animal Genetics*. 35:151-152.
- CORMIER S.; DELEZOIDE A.L.; SILVE C. 2003. *Gene Expression Patterns*. 3:59-63.
- KOBAYASHI T.; KRONENBERG H.M.; FOLEY J. 2005. *Developmental dynamics*. 233:794-803.
- RODRÍGUEZ C.; TOMÁS A.; ALVES E.; RAMÍREZ O.; ARQUÉ M.; MUÑOZ G.; BARRAGÁN C.; VARONA L.; SILIÓ L.; AMILLS M.; NOGUERA J.L. 2005. *Animal Genetics*. 36(6):490-6.
- VANDESOMPELE J.; DE PRETER K.; PATTYN F.; POPPE B.; VAN ROY N.; DE PAEPE A.; SPELEMAN F. 2002. *Genome Biology*. 3(7):34.1-34.11.
- ZHANG X.; DING L.; SANDFORD A.J. 2005. *Molecular Biology*. 6:4.