

PUESTA A PUNTO DE MARCADORES MIO Y FIBROGÉNICOS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN VACUNO DE RAZA PIRENAICA

Martínez Del Pino, L., Urrutia, O., Arana, A., Alfonso, L., Mendizábal, J.A. y Soret, B. ETSIA, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. lara.martinez@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

El músculo, la grasa, el tejido conectivo y el hueso, es decir los componentes principales de la canal, proceden en gran medida de células precursoras comunes (Du *et al.*, 2013). Cada vez existen más evidencias que indican que el desarrollo del tejido adiposo intramuscular (IM) está muy ligado al de las fibras musculares. Aunque los mecanismos implicados son todavía ampliamente desconocidos, se considera que puede haber una priorización o competición por la hipertrofia celular en estos tejidos que estaría mediada por factores adipogénicos, miogénicos y fibrogénicos y también por determinadas mioquinas y adipocinas (Bonnet *et al.*, 2010).

Un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del tejido adiposo IM en el ganado vacuno podría ayudar a identificar estrategias que permitan modificar la proporción entre músculo y grasa, mejorando la calidad de la carne de vacuno y adaptando este producto a las demandas del consumidor. Una herramienta que puede permitir la identificación de factores implicados en el desarrollo del tejido IM, analizando diferencias en la cantidad de RNA mensajero expresado bajo distintas hipótesis experimentales, es la cuantificación de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Por ello, el objetivo de este trabajo es la puesta a punto de marcadores miogénicos y fibrogénicos mediante RT-qPCR con el fin de estudiar su posible relación con el desarrollo de la grasa IM en terneros de raza Pirenaica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los marcadores seleccionados, en función de su implicación en los procesos celulares y metabólicos de interés, fueron: *Myogenic factor 5 (Myf5)*, *Myogenic differentiation 1 (MyoD1)* y *Myogenin (MyoG)*, implicados en procesos miogénicos; *Myostatin (MSTN)* regulador negativo del desarrollo muscular; *Fibronectin 1 (FN1)*, *Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)*, *Fibroblast growth factor 2 (FGF2)* y *Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1)*, relacionados con la fibrogénesis (Buckingham, 2001; Chen *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2013; Gosh *et al.*, 2005).

Se seleccionaron también cinco genes de referencia: *β-actina*, *CNL3*, *RFLPO*, *PPIA* y *TOP2B*, utilizados en numerosos estudios debido a la estabilidad de su expresión en diferentes condiciones como variaciones en edad, sexo del individuo o tipo de tejido (Bonnet *et al.*, 2013; Waters *et al.*, 2009).

Se extrajo ARNm de muestras de los músculos *Masseter*, *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* obtenidas de cuatro terneros de raza Pirenaica sacrificados con pesos comerciales. Posteriormente se procedió a la síntesis de ADNc, utilizando en ambas etapas kits comerciales.

Se eligieron, bien a través de fuentes bibliográficas bien por diseño propio usando el programa Primer3, cebadores que amplificaban una región de entre 100 y 200 pb, aproximadamente, para cada uno de los marcadores. Los amplicones obtenidos se clonaron en el vector comercial pGEMTeasy (Promega) y los vectores con el inserto se extrajeron y diluyeron de forma seriada en ARNt para después amplificarlos por medio de RT-qPCR (SYBR Green). Se calcularon las eficiencias de amplificación de cada cebador con los datos de las curvas estándar siguiendo el método descrito por Rasmussen *et al.* (2001).

Por otro lado, con los datos de amplificación de los cinco genes de referencia se seleccionaron aquellos más estables mediante el uso de RefFinder (Jacob *et al.*, 2013), un programa que utiliza los algoritmos disponibles para los métodos geNorm, Normfinder, Bestkeeper y el método comparativo ΔCt.

Finalmente, se comprobó la efectividad de cada pareja de cebadores utilizando pools del ADNc obtenido de muestras de los mismos terneros y músculos y se calculó el nivel de expresión relativo mediante el método $\Delta\Delta C_T$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores medios de Ct, pendientes, coeficientes de determinación (R^2) y eficiencia de los cebadores seleccionados se muestran en la Tabla 1. Las eficiencias obtenidas son todas cercanas a 2 y los índices de determinación superiores a 0,97, indicando que la cuantificación de la expresión de los marcadores cumple los criterios para ser considerada correcta (Taylor *et al.*, 2010).

En cuanto a los genes de referencia, la Tabla 2 muestra el orden de estabilidad de cada gen. El programa RefFinder examina y asigna un orden de estabilidad a cada gen basado en la media geométrica del orden establecido por cada uno de los cuatro métodos mencionados. El gen que mostró valores más adecuados según este parámetro fue *TOP2B*. Entre los otros genes, *CLN3* presentaba el siguiente mejor valor de estabilidad, mientras que el gen de la β -actina estaba en tercera posición. Autores como Vandesompele *et al.*, (2002) proponen que el uso de un solo gen de referencia es insuficiente por lo que recomiendan el uso de al menos dos. En este caso, y a pesar de que *CLN3* mostraba mayor estabilidad que la β -actina, se optó por esta última además del *TOP2B*, en orden a realizar comparaciones más aproximadas con otros experimentos, ya que este gen ha sido ampliamente utilizado.

Los resultados obtenidos con los pools de ADNc en el experimento preliminar para comprobar la efectividad de los marcadores, mostraron que en el músculo *Masseter* los niveles de expresión de algunos marcadores miogénicos eran menores en relación con los músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* (Figura 1). Atendiendo a los valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$, *MyoD1* se expresa 9 veces más y *MSTN 5* y *3,5* veces más en el *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* que en el *Masseter*, respectivamente. También para *Myf5* y *MyoG* se observa una menor expresión en este músculo mientras que por ejemplo *FN1*, marcador fibrogénico, se expresa 4 y 3 veces más en el *Masseter* y *Longissimus* que en el *Semitendinosus*, respectivamente. Las diferencias observadas podrían estar relacionadas con las características de los músculos, ya que mientras el *Masseter* presenta predominancia de fibras lentas de tipo I y metabolismo oxidativo, *Longissimus* y *Semitendinosus* tienen una mayor proporción de fibras rápidas tipo IIA y metabolismo más glicolítico (Picard *et al.*, 1996), relacionándose éste con un mayor desarrollo muscular y una reducida deposición de grasa intramuscular (Hocquette *et al.*, 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buckingham, M. 2001. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 440-448.
- Bonnet *et al.*, 2010. *Animal* 4 (7), 1093–1109
- Bonnet *et al.*, 2013. *Animal*. 7: 1344-1353
- Chen *et al.*, 2005. *Neurology* 65: 856-834
- Duarte *et al.*, 2013. *J. Anim. Sci.* 91: 2938-2946
- Du *et al.*, 2013. *J. Anim. Sci.* 91: 1419–1427
- Gosh *et al.*, 2005. *Cardiovasc. Pathol.* 14: 28-36
- Hocquette *et al.* 2010 *Animal* 4 (2), 303-319.
- Jacob *et al.*, 2013. *Plos One* 8: e59180
- Picard *et al.*, 1996 *BAM* 6(5): 361-372
- Rasmussen *et al.*, 2001. *Quantification on the LightCycler*. Pag. 21-34
- Taylor *et al.*, 2010 *Methods*. 50: S1-S5
- Vandesompele *et al.*, 2002. *Genome Biol.* 2002. 3: 34.1- 34.11
- Waters *et al.*, 2009. *Anim. Sci.* 87: 244-52.

Tabla 1. Marcadores y genes de referencia seleccionados.

Gen	Nº acc. GenBank	pb	Ct Promedio	Pendiente	R ²	Eficiencia
<i>Myf5</i> ¹	NM_174116.1	220	20,04	-3,32	1	2,00
<i>MyoD1</i>	NM_001040478.2	72	26,47	-3,34	0,99	1,99
<i>MyoG</i>	NM_001111325.1	67	22,89	-3,29	1	2,02
<i>GDF8</i> ¹	AF320998.1	238	20,71	-3,31	1	2,00
<i>FN1</i>	NM_001163778.1	149	22,97	-3,07	1	2,11
<i>FGFR1</i>	NM_001110207.1	166	23,73	-3,35	1	1,99
<i>FGF2</i>	NM_174056.3	165	18,93	-3,18	0,97	2,06
<i>TGFβ1</i>	NM_001166068.1	147	23,80	-3,21	1	2,05

<i>β-actina</i>	BC142413	140	21,28	-3,36	0,98	1,98
<i>CNL3</i>	NM_001075174.2	62	29,32	-3,15	0,97	2,07
<i>RFLPO</i>	NM_001012682.1	227	21,68	-3,18	0,99	2,06
<i>PPIA</i>	XM_001252497	116	23,79	-3,25	0,99	2,03
<i>TOP2B</i>	XM_001254709.4	62	25,98	-3,02	0,99	2,14

¹ cebadores de diseño propio

Tabla 2. Orden de estabilidad para los genes de referencia (RefFinder).

Método	Orden				
	1	2	3	4	5
Delta Ct	TOP2B	CNL3	<i>β-actina</i>	RFLPO	PPIA
BestKeeper	<i>β-actina</i>	TOP2B	CNL3	PPIA	RFLPO
Normfinder	TOP2B	CNL3	<i>β actina</i>	RFLPO	PPIA
Genorm	TOP2B/CLN3		RFLPO	<i>β-actina</i>	PPIA
Recomendado¹	TOP2B	CNL3	<i>β actina</i>	RFLPO	PPIA

¹ Ordenados de acuerdo a la media geométrica de los valores de rango numérico de los cuatro métodos (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>)

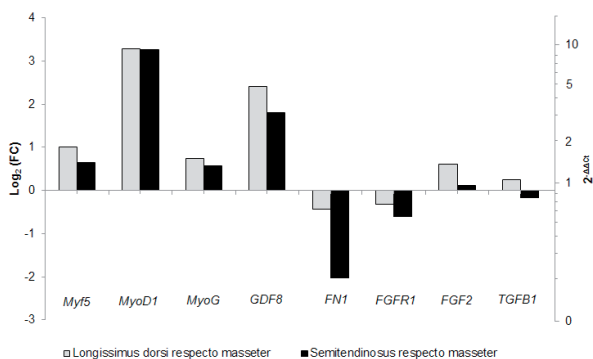


Figura 1. Expresión relativa (Log_2FC y $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) de los marcadores mio y fibrogénicos en pools de cDNA en muestras de tres músculos de terneros de raza Pirenaica.

MIO AND FIBROGENIC MARKERS RELATED TO THE DEVELOPMENT OF INTRAMUSCULAR FAT IN PIRENAICA BEEF

ABSTRACT: Fat, muscle, bone and connective tissue proceed from the same mesenchymal cells. A better knowledge of the relationship between myogenic and fibrogenic factors and intramuscular fat development could be of importance to improve quality of beef. RT-qPCR is an accurate technique to measure gene expression under different experimental conditions. Then, primers to analyze markers involved in myogenesis (*Myf5*, *MyoD1*, *MyoG*), fibrogenesis (*FN1*, *FGFR1*, *FGF2*, *TGFβ1*) and *myostatin* (*GDF8*) were selected. Pirenaica young bulls ($n=4$) were used to obtain mRNA from the muscles *Masseter*, *Longissimus dorsi* and *Semitendinosus*. Efficiencies and R^2 values were calculated, showing good adjustment. As the reliability of qPCR depends on normalization against stable reference genes, five genes were tested to find out the most suitable (*β-actin*, *CNL3*, *RFLPO*, *PPIA* and *TOP2B*). Based on the stability evaluation of the genes (RefFinder) *TOP2B* and *β-actin* were selected to be used as reference genes in this study. Finally, the preliminary results obtained with cDNA pools showed that *Masseter* presented lower expression of the myogenic markers and *GDF8* while it had higher expression for some fibrogenic factors (*FN1*). These results could be related with the differences in metabolism and fiber composition of the muscles studied.

Keywords: intramuscular fat, myogenesis, fibrogenesis, qPCR.