

ESTRATEGIAS DE NORMALIZACIÓN PARA LA ESTIMACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MICROARN EN LA LECHE DE VACA

Abou el qassim, L. y Royo, L.J.

Servicio Regional De Investigación Y Desarrollo Agroalimentario, carretera de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias; ljroyo@serida.org

INTRODUCCIÓN

Los microARNs (miARNs) son pequeños ARNs no codificantes de 21-25 nucleótidos que realizan diversas funciones dentro de las células, incluida la regulación de la expresión de genes (He & Hannon, 2004). Su uso como biomarcadores no invasivos es un área activa de investigación (Colitti *et al.*, 2019; Billa *et al.*, 2019). Su cuantificación requiere técnicas altamente sensibles y específicas como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Sin embargo, las variables técnicas introducidas durante los pasos experimentales pueden ocultar la verdadera respuesta biológica (Faraldi *et al.*, 2019). Comúnmente, se utilizan estrategias de normalización basadas en miARNs endógenos (miARNs internos con expresión estable entre las muestras) u oligonucleótidos exógenos añadidos durante la extracción en concentraciones parecidas y conocidas (Faraldi *et al.*, 2019). Estudiando las variaciones de los perfiles de miARNs en leche cruda de vaca procedente de diferentes sistemas de producción (Abouelqassim, 2017; Abouelqassim *et al.*, 2018), en las células y la grasa de la leche (Li *et al.*, 2016), se identificó un sistema de normalización interno para la fase grasa de la leche, obtenida bajo sistemas de producción diferentes, usando el algoritmo GeNorm (Abouelqassim, 2017). Sin embargo, la determinación de los miARNs normalizadores en la fase de células no fue tan evidente. El objetivo de este trabajo es probar dos diferentes técnicas de normalización, para mostrar la importancia del sistema de normalización sobre el resultado de un estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron 35 muestras de células de leche (del tanque) pertenecientes a ganaderías de diferentes sistemas de producción. Las muestras fueron agrupadas en dos grupos diferentes: *Grupo 1-Intensivo (n=22) (>40% concentrados y sin forraje verde) y *Grupo 2-extensivo (n=13) (<40% concentrados y >2.5kg de hierba verde por animal). Para analizar la expresión de los miARNs diferenciadores (bta-mir-197-3p, bta-mir-2284, bta-mir-2285, bta-mir-28a5p, bta-mir-3432a y bta-mir-574) en cada uno de los grupos se testaron dos estrategias distintas de normalización: 1) Normalizar con miARNs internos. El análisis de geNorm se llevó a cabo con 22 muestras representativas del ensayo y 6 miARN de expresión estable (bta-miR-6119-3p, bta-miR-103, bta-miR-107, bta-miR-181a, bta-miR-342 y bta-miR-345-3p) seleccionados de los resultados de secuenciación. 2) Normalizar con el número de células somáticas de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis de geNorm, el valor PV no fue por debajo del umbral 0.15 lo que indica que el factor de normalización no es del todo fiable. Como recomienda GeNorm, se eligieron los 3 miARN más estables: bta-miR-103, bta-miR-107 y bta-miR-181. En este caso se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sistemas de producción para el bta-mir-2285. Sin embargo, normalizando con células somáticas, esta diferencia de expresión de bta-mir-2285 no es significativa.

CONCLUSIÓN

El sistema de normalización influye significativamente en el resultado final. De ahí la importancia de realizar un estudio de funcionalidad del miARN bta-mir-2285 y su compatibilidad con nuestro estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou el Qassim, L. 2017. (Master's Thesis) CIHEAM, IAMZ. 129 pp. • Abou el Qassim, L. *et al.*, 2018. XIX Reunión de Mejora Genética Animal. León, Spain • Billa, P.A. *et al.*, 2019. BMC genomics 20(1) :621. • Colitti, M. *et al.*, 2019. Research in Veterinary Science 122: 148-155. • Faraldi, M. *et al.*, 2019. Scientific Reports 9(1): 1-13 • He, L. & Hannon, G.J. 2004. Nature Reviews Genetics 5: 522-531 • Li, R. *et al.*, 2016. PLoS One 11: e0154129.

Agradecimientos: Apoyo parcial de la subvención INIA y FEDER (RTA2014-00086-C03-02; RTA2015-0061-C02-01) y Principado de Asturias (PCTI 2018-2020, GRUPIN: IDI2018-000237). L. Abou el Qassim es beneficiaria de la beca predoctoral Severo Ochoa (BP17-49). Agradecemos al personal del Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA y ganaderos asturianos.