

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN MÚSCULO POR MEDIO DE RT-qPCR.

Martínez Del Pino¹, L., Echeverría, I., Arana, A., Alfonso, L., Mendizábal, J.A. y Soret, B.
¹ETSIA, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. lara.martinez@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) permite la cuantificación de cambios en la expresión génica de forma precisa y produce resultados de cuantificación fiables y rápidos (Pfaffl, 2001). Sin embargo, un amplio rango de factores además del animal, el tejido o el tratamiento experimental utilizados, pueden afectar a la expresión génica (Steibel et al., 2009) aumentando la variabilidad total del experimento y, por lo tanto, dificultando la interpretación de los resultados obtenidos. El objetivo principal de este trabajo es el estudio de las principales fuentes de variabilidad experimental que afectan a la cuantificación de la expresión génica por medio de RT-qPCR de genes clave en el desarrollo de la grasa intramuscular (GIM). Para ello, se ha estudiado la expresión de 4 genes relacionados con la adipogénesis en terneros de las razas Pirenaica y Frisona en dos músculos: *longissimus thoracis* (LT) y *masseter* (MS). Conocer en qué medida los distintos factores experimentales contribuyen a la variabilidad de los resultados contribuirá a minimizarla y mejorar así los diseños experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo ARNm de muestras de los músculos LT y MS de terneros de las razas Pirenaica (n=4) y Frisona (n=4) sacrificados con edades y pesos comerciales. Posteriormente se procedió a la síntesis de ADNc, utilizando en ambas etapas kits comerciales, para después amplificarlo por medio de RT-qPCR (SYBR Green). Se estudió la expresión de 4 genes relacionados con la formación de grasa intramuscular (GIM): *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPARG), *CCAAT/enhancer-binding protein α* (CEBPA), *fatty acid binding protein 4* (FABP4) y *wingless-type MMTV integration site family 10B* (WNT10B) y de dos genes de referencia: *β -actin* (ACTB) y *Topoisomerase II-beta* (TOP2B). Se siguió un diseño anidado que tenía en cuenta los animales (A), la muestra, es decir, las extracciones de RNA realizadas de cada porción de músculo muestreado (M), la transcripción reversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR): [(nA=4) x (nM=3) x (nRT=2) x (nqPCR=2)]. Se realizó una descomposición de la varianza de los factores que contribuyen a la varianza total del experimento analizando los resultados de la RT-qPCR mediante el procedimiento NESTED (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para ello se usó el siguiente modelo para cada raza (i) y cada gen (j): $Y_{ijklmn} = \mu + A_k + M_l(A_k) + R_m(M_l(A_k)) + e_{ijklmn}$. Donde; Y_{ijklmn} es el dato de Cq obtenido, A_k es el efecto del kth animal; $M_l(A_k)$ es el efecto de la lth muestra tomada del kth animal; $R_m(M_l(A_k))$ es el efecto de la mth reacción de RT de la lth muestra tomada del kth animal y e_{ijklmn} es el efecto residual de cada qPCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La raza Frisona, de aptitud lechera pero cuyos terneros machos se utilizan para la producción de carne, presenta un desarrollo precoz mientras que la Pirenaica, muy valorada por su aptitud cárnica, es considerada de desarrollo tardío (Soret et al., 2016). Por otro lado, el músculo LT tiene un metabolismo predominantemente glicolítico (Hwang et al., 2010) mientras que, por el contrario, el metabolismo que domina en el músculo MS es el oxidativo (Picard et al., 1996), lo que está relacionado con un mayor contenido en fosfolípidos y triglicéridos (Hocquette et al., 2010). Teniendo en cuenta las diferencias mencionadas en cuanto al desarrollo de la grasa de ambas razas y al metabolismo de los dos músculos incluidos en este estudio, podrían esperarse diferencias en la expresión de los genes PPARG, CEBPA y FABP4, cuya expresión se relaciona positivamente con la deposición de GIM (Duarte et al., 2013; Michal et al., 2006) y WNT10B, bloqueador de la adipogénesis y que parece tener relación con la inhibición de la deposición de GIM (Luo et al., 2009). Sin embargo, la capacidad para detectar una expresión diferencial entre los genes estudiados puede estar limitada por una alta variabilidad asociada a los resultados en experimentos de RT-qPCR y la confusión entre la variación biológica y la variación asociada al trabajo experimental lo que podría dificultar la detección de diferencias con relevancia biológica. Además de la etapa de amplificación (qPCR), las etapas experimentales que le preceden,

como el muestreo y la RT, también pueden tener un efecto significativo en la variabilidad total (Tichopad et al., 2009). En el presente trabajo se han tenido en cuenta las contribuciones a la varianza total de cada una de las etapas analíticas indicadas: Animal, Muestra, RT y qPCR, para el estudio de los citados genes adipogénicos. Los factores Muestra y RT mostraron el mayor porcentaje de variabilidad (Tablas 1 y 2) (Figura 1), lo que concuerda con lo observado por otros autores (Tichopad et al., 2009) y presentaron entre los dos factores un total de 76% de la variabilidad total en el caso del músculo *LT*, tanto para los terneros Pirenaicos como para los Frisones, y de 84% en el caso del músculo *MS* en ambas razas (Figura 1). La aportación de la qPCR a la variabilidad total fue baja para los dos músculos en las dos razas y en los genes estudiados, siendo el factor que mostraba la repetibilidad más alta. Por este motivo, la inclusión de repeticiones de qPCR en el diseño de experimentos es recomendable solo para evitar la pérdida de un resultado en caso de reacciones fallidas. La variabilidad debida al animal, aunque fue menor en comparación con el resto de factores, también resultó ser la más difícil de estimar adecuadamente dado el escaso número de animales utilizados. Por lo tanto, en vista de los resultados obtenidos, sería adecuado incluir réplicas de Muestra y RT en el diseño de futuros experimentos debido a la alta variabilidad que aportan a los resultados, independientemente de la raza o el músculo utilizados. De esta forma se podrían detectar de manera más eficiente cambios en la expresión génica, de menor magnitud pero con un efecto biológico relevante en el proceso de la deposición de GIM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pfaffl, M.W. 2001. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45
- Steibel, J.P., Poletto, R., Coussens, P.M. & Rosa, G.J. 2009. *Genomics.* 94(2):146-52
- Soret, B., Mendizabal, J.A., Arana, A. & Alfonso, L. 2016. *Animal.* 10(12):2018-26.
- Hwang, Y.H., Kim, G.D., Jeong, J.Y., Hur, S.J. & Joo, S.T. 2010. *Meat Sci.*;86(2):456-61.
- Picard, B., Helene, G. & Geay Y. 1996. *Appl Myol.*;6(5).
- Hocquette, J.F., Gondret, F., Baeza, E., Medale, F., Jurie, C. & Pethick, D.W. 2010. *Animal.* 4(2):303-19.
- Duarte, M.S. et al. 2013. *J. Anim. Sci.* :91(6):2938-46.
- Michal, J.J., Zhang, Z.W., Gaskins, C.T. & Jiang, Z. 2006. *Anim. Genet.* 37(4):400-2
- Luo, H.F., Wei, H.K., Huang, F.R., Zhou, Z., Jiang, S.W. & Peng, J. 2009. *Lipids.*44(11):999-1010.
- Tichopad, A., Kitchen, R., Riedmaier, I., Becker, C., Stahlberg, A. & Kubista, M. 2009. *Clin. Chem.* 55(10):1816-23

Agradecimientos: Los autores agradecen a la asociación ASPINA la ayuda con la selección de los animales y a las empresas "La Protectora" y "Vacuno de Navarra" la ayuda para la realización del muestreo. Parte de este trabajo forma parte del proyecto de investigación RTA2013-00046-C03-03 (INIA)

Tabla 1. Valores de *Cq* medio, y desviaciones estándar estimadas para el factor animal y los factores instrumentales (muestra, RT y qPCR) y desviación estándar total en el músculo *longissimus thoracis* de terneros Frisones y Pirenaicos para los genes adipogénicos *PPARG*, *CEBPA*, *FABP4* y *WNT10B* y los genes de referencia *ACTB* y *TOP2B*.

	Pirenaicos						Frisones					
	<i>PPARG</i>	<i>CEBPA</i>	<i>FABP4</i>	<i>WNT10B</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>	<i>PPARG</i>	<i>CEBPA</i>	<i>FABP4</i>	<i>WNT10B</i>	<i>ACTB</i>	<i>TOP2B</i>
<i>Cq</i> medio	26,43	28,90	25,63	32,20	22,98	24,21	26,28	26,93	22,19	30,17	20,52	23,93
Animal	0,40	0,31	0,00	0,28	0,00	0,22	0,48	0,37	0,48	0,44	0,00	0,22
Muestra	0,49	0,37	1,51	0,69	0,80	0,60	0,57	0,79	1,09	0,78	0,66	0,48
RT	0,53	0,50	0,96	1,64	1,45	1,27	0,40	0,50	0,33	0,24	0,48	0,41
qPCR	0,62	0,48	0,54	1,08	0,72	0,48	0,23	0,14	0,13	0,39	0,27	0,22
Total	1,03	0,84	1,87	2,10	1,80	1,50	0,87	1,02	1,24	1,01	0,86	0,71

Tabla 2. Valores de Cq medio, y desviaciones estándar estimadas para el factor animal y los factores instrumentales (muestra, RT y qPCR) y desviación estándar total en el músculo *masseter* de terneros Pirenaicos y Frisones para los genes adipogénicos PPARG, CEBPA, FABP4 y WNT10B y los genes de referencia ACTB y TOP2B.

	Pirenaicos						Frisones					
	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B	ACTB	TOP2B	PPARG	CEBPA	FABP4	WNT10B	ACTB	TOP2B
Cq medio	26,38	28,79	26,72	31,34	22,12	23,91	26,09	26,80	22,41	29,69	20,31	23,36
Animal	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Muestra	0,77	1,05	0,57	0,87	0,72	0,00	0,58	0,68	1,43	0,53	0,27	0,48
RT	0,54	0,63	0,47	0,54	1,10	1,49	0,31	0,39	0,37	0,34	0,45	0,36
qPCR	0,29	0,48	0,76	0,56	0,52	0,22	0,15	0,15	0,23	0,37	0,28	0,14
Total	0,99	1,31	1,14	1,17	1,41	1,51	0,68	0,79	1,50	0,73	0,60	0,62

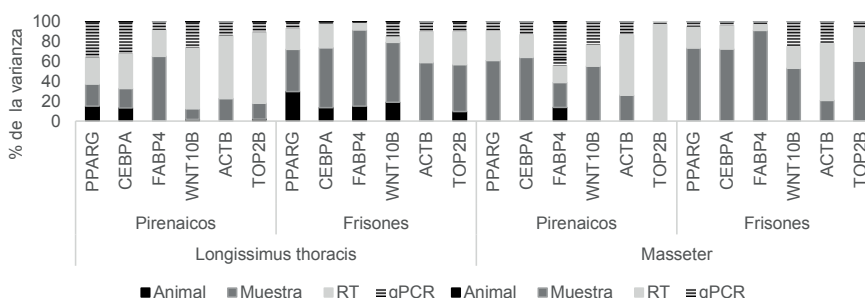


Figura 1. Aportaciones a la varianza de los distintos factores considerados en el estudio (Animal, muestra, RT y qPCR) expresados como porcentajes en los músculos *LT* y *MS* de terneros Pirenaicos y Frisones para los genes adipogénicos PPARG, CEBPA, FABP4 y WNT10B y los genes de referencia ACTB y TOP2B.

VARIABILITY STUDY OF THE GENETIC EXPRESSION ANALYSIS IN MUSCLE BY RT-qPCR

ABSTRACT: Real time reverse transcription PCR (RT-qPCR) allows quantification of the changes in gene expression and can be a useful technique due to its specificity, sensitivity and simplicity. However, a wide range of analytical situations, apart from the animal, the tissue or the experimental treatment assayed, may affect gene expression and produce variability which reduces the ability to detect statistical significance. In the present study, gene expression of some key adipogenic genes (PPARG, CEBPA, FABP4 and WNT10B) was analyzed in the muscles *longissimus thoracis* (*LT*) and *masseter* (*MS*) of Pirenaica (N=4) and Friesian (n=4) young bulls. RT-qPCR results were analyzed following a nested design in order to implement appropriate experimental designs minimizing gene expression variability. Regarding the results of the variability study, the analytical factors that added higher variability to the gene expression were the Sampling and the reverse transcription (RT), representing together 76% of total variability in *LT* muscle and 84% in *MS* muscle of Pirenaica and Friesian young bulls. Therefore, it would be appropriate to include those replicates in the design of future experiments in order to achieve a more accurate analysis of the results and detect lower relevant differences in gene expression.

Keywords: qPCR, Nested design, Variability.