ANÁLISIS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS PARA PROLIFICIDAD EN UN CRUCE F_2 ENTRE CERDO *IBÉRICO* Y *MEISHAN*. RESULTADOS PRELIMINARES

Martínez-Giner, M.[1], Pena, RN.[1], Fernández-Rodríguez, A.[2], Tomàs, A.[3] y Noguera, JL.[1]
[1]Genètica i Millora Animal. IRTA. Lleida. España. [2]Departamento de Mejora Genética Animal. INIA. Madrid. España. [3]Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. UAB. Bellaterra. España. maria.martinez@irta.cat

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente estudio es la caracterización de la base genética de caracteres reproductivos de interés económico en porcino como son la prolificidad, el número de mamas y la supervivencia de los lechones. Para ello, disponemos de un cruce F_2 entre Meishan e Ibérico (Rodriguez *et al*., 2005). Estas razas presentan grandes diferencias fenotípicas en los caracteres reproductivos. La raza Meishan se caracteriza por una alta prolificidad, mientras que en Ibérico el tamaño de camada es sensiblemente menor (Dèspres *et al*., 1992; Toro *et al*., 1986).

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el objetivo de caracterizar las diferencias en prolificidad entre hembras F_2, a nivel de expresión génica, se extrajeron un total de 63 muestras de ARN de ovario, útero e hipófisis de cerdas de alta (11.48 lechones nacidos vivos) y baja prolificidad (5.78 lechones nacidos vivos) en distintos momentos del ciclo reproductivo (celo, 15 y 45 días de gestación) tal y como se indica en la tabla 1. Este diseño nos permite realizar comparaciones de expresión génica entre tejidos, entre estados fisiológicos y entre animales de alta y baja prolificidad. La extracción de ARN total se realizó mediante el kit Ribopure (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza del ARN y su concentración fue evaluada con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y verificada en un 2100 Bioanalyzer (Agilent). Estos ARNs fueron hibridados en microchips de oligonucleótidos porcino (*GeneChip® Porcine Genome Array,* Affymetrix, 24123 sondas). La hibridación y lectura de los *microarrays* se llevó a cabo en la Unidad de soporte científico-técnico del hospital *Vall d'Hebron* de Barcelona.

Tabla 1. *Distribución de muestras analizadas mediante microarrays por tejido (A), estado reproductivo al sacrificio (B) y prolificidad (C).*

	Celo[(B)]		15 días[(B)]		45 días[(B)]		Total
	Alta[(C)]	Baja[(C)]	Alta[(C)]	Baja[(C)]	Alta[(C)]	Baja[(C)]	
Hipófisis[(A)]	4	4	3	2	3	3	19
Ovario[(A)]	4	4	4	4	3	3	22
Útero[(A)]	4	4	4	4	3	3	22
Total	12	12	11	10	9	9	63

Todos los *microarray*s pasaron el control de calidad realizado mediante las herramientas bioinformáticas *Bioconductor*, testándose diferentes indicadores de calidad tanto dentro como entre *microarray*s. Los datos de intensidades obtenidos en la lectura fueron procesados mediante distintos métodos de sumarización como los algoritmos MAS5, RMA y GCRMA, decidiendo utilizar los resultados obtenidos con RMA debido a su mayor robustez y a que realiza una normalización más completa de los datos. Además, fueron eliminados los datos de las sondas cuya intensidad no alcanzaba el mínimo detectable, aquellos cuya anotación era incompleta o cuyo gen no estaba anotado, así como aquellos cuyo *match score* con el gen al que pertenecen era menor de 50.

El análisis de clusters fue realizado con el software *PermutMatrix* (Caraux y Pinloche, 2005) y los datos de funcionalidad en procesos biológicos se obtuvieron con *Onto-express*, herramienta del *OntoTools* (http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress/). Para obtener la lista de genes diferencialmente expresados entre animales de alta y baja prolificidad, utilizamos el programa *EMMIX* (McLachlan *et al*. 1999), que toma la distribución de los datos como una

mezcla de distribuciones normales, y calcula la probabilidad de que cada gen pertenezca a cada una de las distintas distribuciones. En el caso de nuestros datos, se ajustaron dos distribuciones, una centrada en la media y con una menor desviación estándar que agrupa la mayor parte de los datos, y otra con mayor desviación estándar en la que se incluyen ambas colas de la distribución real. Los genes diferencialmente expresados son aquellos que presentan una mayor probabilidad de pertenecer a esta segunda distribución, con una probabilidad posterior corregida por el método *False Discovery Rate* (FDR). Este análisis se realizó por separado para cada uno de los tejidos. En los análisis previos descartamos tres de los *microarray*s, ya que provenían de un animal perteneciente al grupo de 15 días de gestación pero que probablemente no estaba gestante, por lo que no podía ser incluido en ninguno de los estados fisiológicos descritos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de clusters de los *microarray*s muestra que la mayor variación es debida al tejido, sobre todo al comparar la hipófisis con los otros dos tejidos, siendo el estado fisiológico el siguiente en el caso de útero y ovario (Figura 1A). Al realizar dicho análisis por separado para cada tejido, observamos una clara diferencia en ovario entre las hembras gestantes (15 y 45 días) y en celo, así mismo, las diferencias en el caso del útero se dan entre hembras a 45 días de gestación y el resto. En hipófisis no hay una clara distinción entre estados fisiológicos (Figura 1B).

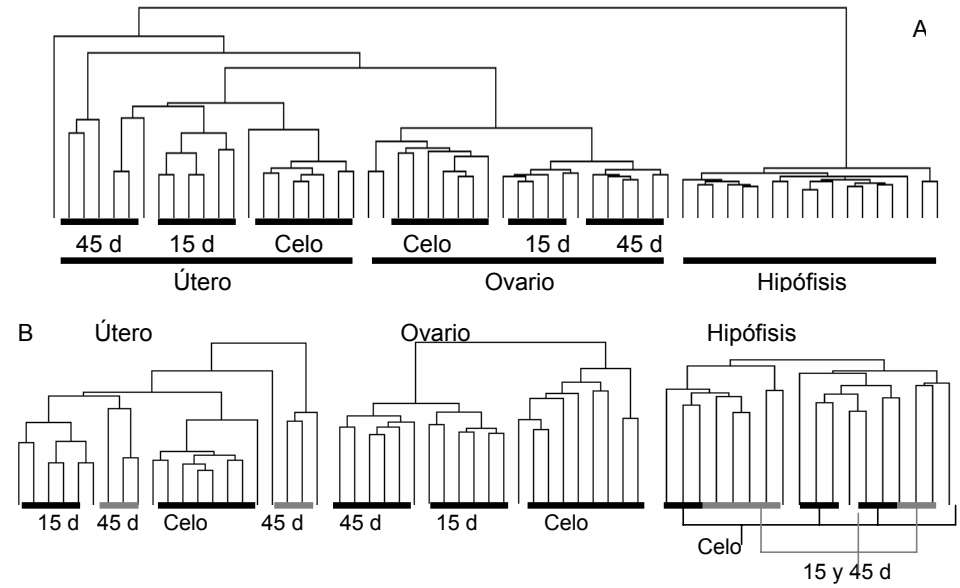


Figura 1. *A: Representación de los clusters en los que se agrupan los distintos microarrays utilizados en el experimento. B: Representación del mismo análisis realizado por separado para cada uno de los tejidos.*

Comparando los distintos estados fisiológicos en todos los tejidos, obtuvimos 496 genes diferencialmente expresados entre celo y 15 días de gestación y 816 entre 15 y 45 días de gestación. Al analizar por separado cada tejido buscando el número de genes diferencialmente expresados entre alta y baja prolificidad, obtenemos 293 genes en hipófisis, 471 en ovario y 61 en útero, tomando la probabilidad posterior correspondiente al punto de corte dado por el FDR<0.05. El número de genes diferencialmente expresados en ovario es aproximadamente el doble del observado en hipófisis para una misma probabilidad posterior y es mucho menor en útero. Debido a que la comparación entre alta y baja

prolificidad es la que más nos interesa desde el punto de vista de la producción porcina, nos centraremos en ella a la hora de realizar el resto de análisis.

En cuanto al grupo funcional al que pertenecen estos genes diferencialmente expresados, la mayor parte de ellos (210 en hipófisis y 307 en ovario) pertenecen al grupo de procesos celulares (Figura 2). Sin embargo, los genes más interesantes desde el punto de vista reproductivo aparecen en dos grupos principalmente: Reproducción (con 14 genes en hipófisis y 17 en ovario) y Procesos de desarrollo (65 en hipófisis y 117 en ovario).

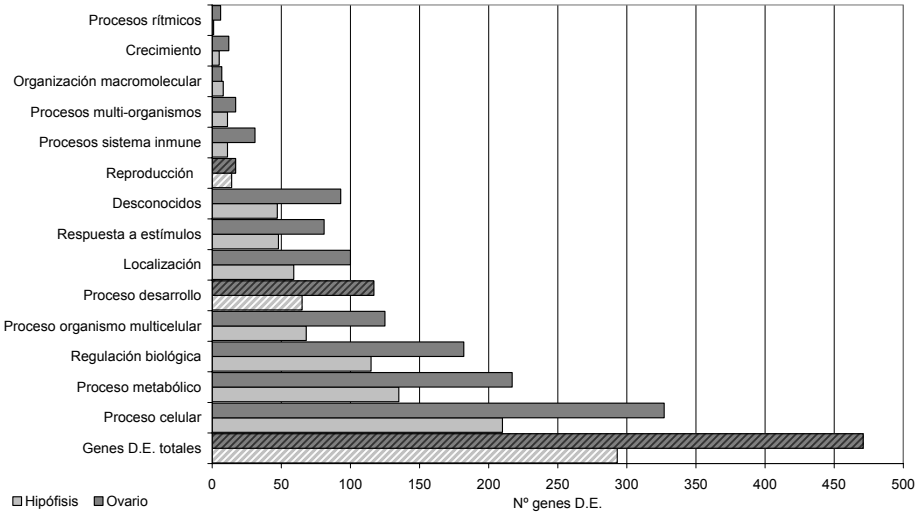


Figura 2. *Representación del número de genes que pertenecen a cada uno de los grupos funcionales. Los grupos de mayor importancia y el total han sido marcados con líneas diagonales.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

♦ Caraux, G. & Pinloche, S. Bioinformatics. 2005 21(7):1280-1281. ♦ Dèspres, P., Martinat-Botte, F., Lagant, H., Terqui, M. & Legault, C. J. de la Recherche Porcine en France 1992 24, 345-350. ♦ McLachlan, GJ., Peel, D., Basford, KE. & Adams, P. J. of Stat. Softw. 1999, 4:2. ♦ Rodriguez, M.C., Rodríguez, C., Tomás, A., Alves, E., Ramirez, O., Arqué, M., Muñoz, G., Barragán, C., Varona, L., Silió, L., Amills, M. & Noguera J.L**.** Anim Genet 2005, 36:490-6. ♦ Toro, MA., Dobao, MT., Rodriganez, J. & Silio L. Genet Sel Evol 1986 18**,** 173-183.

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

MICROARRAY ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES FOR PROLIFICACY IN AN F_2 INTERCROSS BETWEEN IBERIAN AND MEISHAN PIGS. PRELIMINARY RESULTS.

ABSTRACT: We have generated an F_2 cross between *Iberian* and *Meishan* pigs, with the aim to study genes affecting reproductive traits such as prolificacy, maternal capacity and piglet survival we generated. RNA from ovary, uterus and pituitary gland from sows at different reproductive stages (heat, 15 day and 45 days of gestation) were hybridised in porcine microchips in order to characterize gene expression in sows differing in prolificacy. First results show differences between sows at different prolificacy level in pituitary gland (293 genes) and ovary (471 genes).
Keywords: microarrays, pigs, Iberian, Meishan, prolificacy