

METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO *IN VITRO* DE FACTORES QUE AFECTAN A LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE LA ADIPOGÉNESIS: MUESTRAS INDIVIDUALES vs. MEZCLA DE INDIVIDUOS

A. Arana, B. Soret, P. Martínez, J. Egozcue, L. Alfonso
Dep. Prod. Agraria, Univ. Púb. Navarra, 31006 Pamplona, aarana@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

Es bien conocida la existencia de importantes diferencias entre especies en cuanto al desarrollo y metabolismo del tejido adiposo. Por ello, a pesar de que la adipogénesis y su regulación se han estudiado de forma extensiva en humanos y en algunos animales de granja como en la especie porcina, es de interés investigar las características y factores que influyen en el desarrollo de este tejido en otras especies como los animales rumiantes. Así, en este trabajo utilizamos el ovino como modelo para estudiar a nivel molecular el efecto de ácido retinoico (RA) sobre la diferenciación de preadipocitos. El RA se ha descrito como inhibidor de este proceso en otros modelos experimentales (Xue et al., 1996; Kawada et al., 2000, Brandebourg, 2005) aunque su efecto en el tejido adiposo de rumiantes no está bien descrito. La aproximación experimental que utilizamos para poder llevar a cabo ese estudio es el cultivo primario de adipocitos y el análisis de la expresión génica mediante la técnica que combina la retrotranscripción a partir de RNA y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a tiempo real, método que está confirmado como muy sensible, eficiente, rápido y reproducible.

Sin embargo, los trabajos de expresión de RT-PCR en tiempo real muestran una importante variabilidad asociada al muestreo de las células utilizadas. Esa variabilidad, unida a la dificultad de trabajar con experimentos de gran tamaño, dificulta contrastar hipótesis experimentales sobre factores que diferencialmente afecten a la expresión génica. Un ejemplo es el estudio del efecto del ácido retinoico sobre la inhibición de la expresión de los genes implicados en la diferenciación de los preadipocitos en ovino (Martínez et al., 2006). Al igual que se ha trabajado haciendo mezclas de muestras obtenidas en distintas zonas de un mismo tumor para diferenciar tipos de cáncer superando la heterogeneidad existente entre muestras (Blackhall et al., 2004), partimos de la hipótesis de que la heterogeneidad existente entre animales puede superarse trabajando con una mezcla de células precursoras procedentes de diferentes animales. Por ello, se plantea como objetivo de este trabajo comparar los resultados obtenidos al cultivar células de distintos corderos por separado *versus* cultivos de células mezcladas de distintos corderos, considerando un mismo tamaño experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado células procedentes del depósito omental de tres corderos. Una vez tomadas las muestras tras el sacrificio de los animales, se procedió a la digestión del tejido adiposo con colagenasa para obtener las células de la fracción estromovascular. Dichas células se mantuvieron en una estufa de cultivo (5% CO₂ en aire, 37°C) con medio de cultivo que permite su proliferación (M199 con 20% New born calf serum) y tras alcanzar la fase de confluencia se indujo su diferenciación en preadipocitos cambiando el medio de cultivo por DMEN-F12 con insulina 1.6 µg/ml, triiodotironina 2nM, dexametasona 10nM, rosiglitazona 10⁻⁷M y all trans retinoic acid 10⁻⁶M. Se tomaron extractos para análisis de expresión génica el día que se inicia la diferenciación y los días 2, 5 y 7. Se cultivaron de forma simultánea las células procedentes de cada uno de los tres animales así como tres réplicas de una mezcla de células de los tres corderos (pooles), de forma que de cada experimento se dispuso de 48 datos de expresión: 3 unidades experimentales, 4 días, 2 tratamientos y 2 repeticiones.

Los genes de elección para estudiar el efecto del RA sobre la diferenciación de los preadipocitos fueron: CCAA Enhancer Binding Protein α (C/EBP α , factor de transcripción clave para el inicio de la adipogénesis), Lipoprotein lipasa (LPL) y Acetyl CoA carboxylasa (ACC), enzimas clave del metabolismo lipídico. El gen utilizado como control endógeno fue

la ciclofilina. Los valores de expresión de cada gen se obtuvieron promediando los valores de las dos muestras repetidas para cada unidad experimental. Posteriormente se normalizaron, siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), respecto a los valores de ciclofilina y relativos al día 0 de cultivo. El modelo utilizado para analizar por separado los datos de los dos ensayos (datos individuales y datos mezclados) fue el siguiente: $y_{ijk} = \mu + trat_i + día_j + ani - pool_k + e_{ijk}$ siendo y_{ijk} el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del animal o pool k ($k=1,2,3$; considerado aleatorio), sometido al tratamiento i ($i=1,2$, para los tratamientos control y retinol; considerado fijo) y analizado el día j ($j=1,2,3$, para los días 2, 5 y 7 de cultivo; considerado fijo). Con ese modelo, se obtuvo la significación del factor *trat*, así como la diferencia entre sus dos niveles (Retinol menos Control). Dado que en trabajos previos con más cantidad de datos se ha observado cierta falta de normalidad, básicamente asociada a la falta de asimetría, también se analizaron los datos (i) transformados a la escala logarítmica (\log_{10}) utilizando el mismo modelo, y (ii) en la escala original pero mediante pruebas no paramétricas (prueba Wilcoxon-Mann-Whitney).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados recogidos en la Figura 1 muestran la elevada variabilidad que existe en la expresión medida en distintos animales para los tres genes. También se observa que la variabilidad es menor cuando se usan mezclas y que la heterogeneidad en el perfil de la expresión es menor, luego parece que se cumple la hipótesis de partida. La comparación de la evolución del nivel de expresión génica de los marcadores estudiados en el curso de la diferenciación entre tratamientos (Retinol vs Control) indica, tanto para los resultados obtenidos con los corderos individuales como para la mezcla, que el retinol tiene un papel inhibitorio de la expresión de los tres genes, de la misma forma que se ha observado en otras especies (Brandebourg y Hu, 2005). No obstante, la heterogeneidad de los resultados entre animales (que no entre pools) dificulta llegar a esta conclusión.

Si nos atenemos a los resultados del análisis estadístico de los datos (Tabla 1), podemos ver como la elevada variabilidad existente entre la expresión en distintos animales impide obtener estimaciones significativas del efecto del retinol en el experimento que trata individualmente a los animales. Sin embargo, ese efecto sí se puede considerar estadísticamente significativo trabajando con mezcla de animales. Las estimaciones del efecto son semejantes pero el error estándar es relevantemente inferior en el experimento pool. Estos resultados se confirman al trabajar con datos transformados y pruebas no paramétricas, como puede observarse en la Tabla 2.

En definitiva, trabajar con mezcla de animales puede ser una alternativa para aumentar la potencia estadística de un experimento de tamaño establecido. En este trabajo, con tal solo un pequeño experimento, se ve como es posible revelar el papel inhibitorio del RA sobre el factor de transcripción C/EBP α y los genes de las enzimas ACC, LPL. Pese a todo, hay que tener en cuenta que la unidad de inferencia cambia y cuando se trabaja con mezclas se pierde la información referente a las peculiaridades de cada animal que en determinados estudios puede ser de interés, como podría ser el caso en el que se considere información fenotípica y/o familiar.

Agradecimientos: Trabajo financiado por MCYT (AGL2003-02806)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blackhall F.H., Pintilie M., Wigle D.A., Jurisica I., Liu N., Radulovich N., Johnston M.R., Keshavjee S., Tsao M.S., 2004. Neoplasia 6(6):761-7.
- Brandebourg T.D., Hu C.Y., 2005. J. Anim. Sci. 83:98-107
- Kawada T., Kamei Y., Fujita A., Hida Y., Takahashi N., Sugimoto E., Fushiki T., 2000. Biofactors 13:103-109.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Methods 25:402-408
- Martínez P., Arana A., Encío I., Alfoso L., Soret B., 2006. Joint Annual Meeting ASAS-ADSA, USA.
- Xue J.C., Schwarz E.J., Chawla A., Lazar M.A., 1996. Mol.Cell.Biol. 16: 1567-1575.

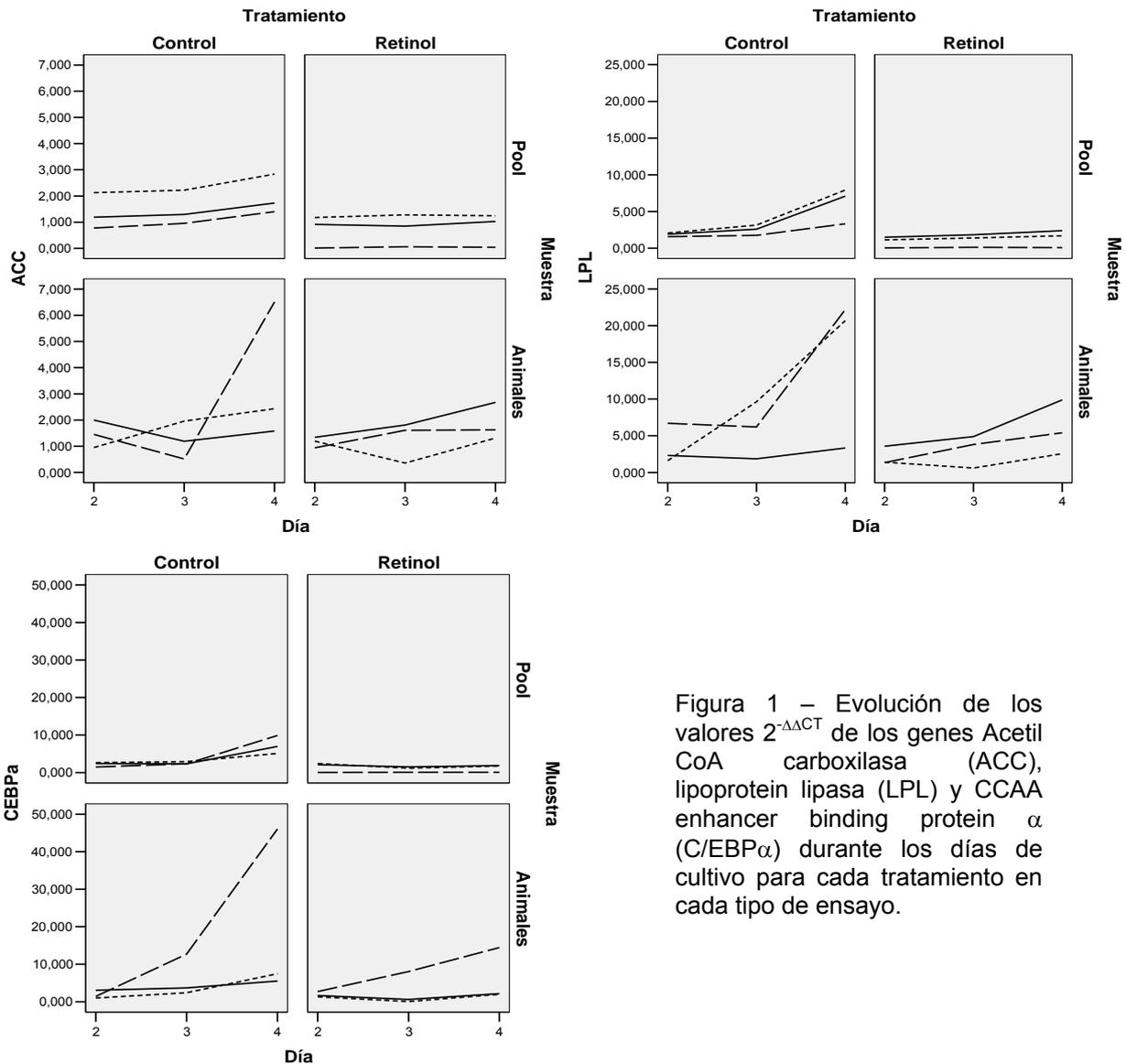


Figura 1 – Evolución de los valores $2^{-\Delta\Delta CT}$ de los genes Acetil CoA carboxilasa (ACC), lipoprotein lipasa (LPL) y CCAA enhancer binding protein α (C/EBP α) durante los días de cultivo para cada tratamiento en cada tipo de ensayo.

Tabla 1 – Resultado del análisis de los datos $2^{-\Delta\Delta CT}$ en escala original para los genes Acetil CoA carboxilasa (ACC), lipoprotein lipasa (LPL) y CCAA enhancer binding protein α (C/EBP α).

Gen	Efecto del retinol (\pm s.e.) ¹		Significación	
	Animal	Pool	Animal	Pool
ACC	-0.64 (\pm 0.59)	-0.88 (\pm 0.11)	0.298	0.000
LPL	-4.56 (\pm 2.46)	-2.35 (\pm 0.60)	0.089	0.002
C/EBP α	-5.59 (\pm 3.99)	-2.78 (\pm 0.90)	0.186	0.009

(¹) Valor del tratamiento con retinol menos el tratamiento control

Tabla 2 – Significación del efecto del retinol analizando datos transformados [$\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$] y pruebas no paramétricas (Wilcoxon-Mann-Whitney) para los genes Acetil CoA carboxilasa (ACC), lipoprotein lipasa (LPL) y CCAA enhancer binding protein α (C/EBP α).

Gen	Datos transformados		Prueba no paramétrica	
	Animal	Pool	Animal	Pool
ACC	0.376	0.004	0.508	0.012
LPL	0.109	0.001	0.200	0.003
C/EBP α	0.053	0.004	0.171	0.003