



Universitat Autònoma de Barcelona

**Influencia del consumo de ácidos grasos sobre la expresión
génica en pollo de carne determinado por microarray**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR: Elisa Cánovas Zambudio

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Ana Barroeta Lajusticia y Edgar García Manzanilla

PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR EN EL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL DEL DEPARTAMENT DE CIÈNCIA
ANIMAL I DELS ALIMENTS

BELLATERRA, 2013



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

La Dra. **Ana Barroeta Lajusticia**, Catedrática de Universidad y el Dr. **Edgar García Manzanilla** del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “Influencia del consumo de ácidos grasos sobre la expresión génica en pollo de carne determinado por microarray” presentada por Elisa Cánovas Zambudio para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección y, considerándola acabada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Bellaterra a 26 de Septiembre del 2013.

Dra. Ana Barroeta Lajusticia

Dr. Edgar García Manzanilla

RECONOCIMIENTOS

La realización de la presente tesis ha sido posible gracias a la colaboración que el grupo de Nutrició Animal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona ha mantenido con el Departament de Nutrició Animal del Institut de Recerca en Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Mas de Bover y con el Servei Veterinari de Genètica Molecular (SVGGM) de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. La presente tesis ha sido realizada gracias a una beca de formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad, con la financiación de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CYCIT AGL2007-65898-C02).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis directores de tesis la Dra. Ana Barroeta Lajusticia y el Dr. Edgar García Manzanilla, por sus enseñanzas y dedicación en mi formación doctoral, por su ayuda, apoyo y confianza que han depositado en mí durante todo este tiempo.

A Anna Tomas, Ali, y a mi director de tesina Marcel por haberme ayudado, explicado todo lo que han podido y más sobre genética, así como por transmitirme su optimismo y alegría durante la realización de este proyecto.

A todos los compañeros y amigos de Nutrición Animal. A cada uno de ellos por haberme ayudado en el trabajo en la medida que han podido, por su comprensión, transmitirme su optimismo y por haber compartido buenos momentos, charlas y risas durante todos estos años. Muchas gracias a todos.

A mi madre Carmen, a mi hermana Mari Carmen, a mi padre José, y a mi tita Carmen, por confiar en mí incondicionalmente en la realización de este proyecto, por su apoyo constante tanto moral como económico en la medida de lo posible, apoyo permanente casi cada día, por su comprensión, por transmitirme fuerza para seguir adelante, en definitiva, por apoyarme durante todos estos años de proyecto así como en las decisiones tomadas sobre mi vida y mi independencia. Mil gracias a los cuatro. Os quiero.

A mis amigas de Barcelona, mil gracias a todas por haberme apoyado, escuchado, motivado y animado constantemente para la realización y finalización de este proyecto, confiando en mí en todo momento, Mil gracias, otra vez. Todas ellas han aportado a mi vida estos sentimientos casi de igual manera, aun así comenzaré agradeciendo a la primera persona que apareció en mi vida en Barcelona, apoyándome en todo momento y comprendiéndome desde la época de los comienzos de la tesis hasta ahora, Anna Esteve; durante esta época también conocí a otra gran amiga (Ana). ¿Os acordáis de esas largas charlas? Charlas sobre

posibles soluciones a problemas experimentales que me iban surgiendo de la tesis, charlas sobre la vida, sobre amores, etc. Para mí fuisteis uno de mis pilares más importantes casi durante los 3 primeros años de tesis. Mil gracias a las dos.

Agradecimientos estos dos últimos años y esta última fase de la tesis a amigas que me han escuchado, comprendido, me han dado fuerza, apoyado, animado, transmitido energía e incluso sacado de casa, haciéndome sentir muy acogida en Barcelona; entre ellas están (las nombraré por orden alfabético porque todas han aportado su grano de arena en esta ayuda hacia mi realización personal y hacia el final de la tesis): Aida, Annita, Elena, Gemma, Mery, Paola, Sandra y Sofía. Os quiero a todas. Espero no dejarme a ninguna.

A mis amigos y amigas de Murcia por haberme escuchado durante mis años en Barcelona, por su comprensión, sus visitas para animarme, e incluso venir desde Murcia sólo para ayudarme en las mudanzas en mis pisos de Barcelona. Mil gracias a Alex, Cris, Juan, Julia, Loli y Mavi.

A mis nuevos compañeros y amigos, Alan y Víctor por hacerme sentir genial, apoyarme, animarme y acogerme como si fuese una más de su familia. Muchas gracias a los dos.

En último lugar, y no por ello menos importante, a Jose María, un gran amigo, ya que me ha escuchado durante este último año, compartiendo charlas telefónicas, aportándome positivismo, motivación y empuje moral para poder terminar este proyecto. Muchas gracias Jose María.

En general, agradezco a todos aquellos que me escucharon, motivaron, confiaron en mí, ayudaron en todos los aspectos de mi vida: aquellos que de alguna manera me han alentado a llegar al final. Mil gracias a todos. Esta tesis tiene un poco de todos vosotros.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADFI	<i>Average daily feed intake</i>		
ADG	<i>Average daily gain</i>		
ADN	Ácido desoxirribonucleico	DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
AFP	<i>Abdominal fat pad</i>		
AG	Ácidos grasos	FA	<i>Fatty acids</i>
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados	MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids</i>
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados	PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
AGS	Ácidos grasos saturados	SFA	<i>Saturated fatty acids</i>
ALC	Ácido linoleico conjugado		
ARN	Ácido ribonucleico	RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ARNc	Ácido ribonucleico complementario	cRNA	<i>Complementary ribonucleic acid</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
AVIELA	<i>Avian IEL array</i>		
BW	<i>Body weight</i>		
CF	<i>Crude fiber</i>		
CIELA	<i>Chicken intestinal IEL array</i>		
CP	<i>Crude protein</i>		
DGS	Depósitos de grasa separable		
DHA	Ácido docosahexaenoico	DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>
EE	<i>Ether extract</i>		
EEM	Error estándar de la media	MSE	<i>Pooled standard deviation</i>
EMA	Energía metabolizable aparente	AME	<i>Apparent metabolizable energy</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico	EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i>
GO	Ontología de los genes		
HPLC	Cromatografía líquida de alto		

	rendimiento
MAQC	<i>Microarray Quality Control Project</i>
NGS	<i>Next Generation Secuenqing,</i> secuenciación de última generación o secuenciación masiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa o a tiempo real
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RNA-Seq	<i>RNA sequencing</i>
RT-qPCR	Transcripción Reversa-PCR cuantitativa
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TFA	<i>Total fatty acids</i>

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral es evaluar los efectos de dietas ricas en diferentes tipos de ácidos grasos (saturados, poli-insaturados omega 6 y omega 3) sobre el transcriptoma de grasa abdominal, hígado y músculo esquelético en pollos de engorde mediante el uso de *GeneChip* microarrays. En concreto se investiga que genes y vías metabólicas, de las conocidas hasta el momento, se ven afectadas en el pollo de carne al ingerir raciones con distinto grado de insaturación y se comprueba si los cambios en la expresión de determinados genes y vías metabólicas, descritos en experimentos previos, también se observan mediante el uso de *GeneChip* microarrays. En una segunda fase, se estudia la evolución con la edad del pollo del nivel de expresión de diferentes genes seleccionados a partir de los resultados obtenidos del experimento anterior y de la bibliografía existente en esta área para pollos de carne.

Se diseñó un ensayo con pollos de carne alimentados con 4 piensos experimentales, una dieta baja en grasa (0,5% de grasa añadida) y 3 raciones suplementadas con 10% de diferentes grasas: sebo, como fuente de AGS de cadena larga, aceite n-3 (70% aceite de linaza + 30% aceite de pescado) rico en AGPI n-3 y aceite de girasol, rico en AGPI n-6. Dentro de este ensayo se desarrollaron dos estudios en paralelo. Uno para estudiar las variaciones producidas por las dietas experimentales en el transcriptoma de la grasa abdominal, el hígado y el músculo esquelético de pollos de carne de 50 días. Otro para estudiar la evolución en el tiempo de la expresión de genes seleccionados. Para ello se tomaron muestras de estos mismos tejidos (grasa abdominal, hígado y músculo) a lo largo del crecimiento de los pollos, tras 0, 10, 21, 35 y 45 días de administración de los piensos experimentales. Los piensos experimentales se suministraron a los animales desde el día 14 de vida.

Cambios fenotípicos. Los rendimientos productivos de los animales se registraron como una comprobación previa de que se producían los cambios fenotípicos esperados. Así, efectivamente, los animales alimentados con la dieta rica en ácidos grasos omega-3 presentaron un menor depósito de grasa abdominal comparados con aquellos alimentados con dietas ricas en ácidos grasos saturados. Los cambios en la composición de los diferentes tejidos también fueron los esperados con composiciones que reflejaban los

perfiles de ácidos grasos de las dietas. Los animales alimentados con dietas bajas en grasa, y con menor contenido en energía, tal y como se había comprobado en experimentos previos, presentaron rendimientos completamente diferentes al resto de grupos.

Estudio del transcriptoma. La dieta rica en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 fue la que indujo mayores cambios en los transcriptomas estudiados, sobretodo en el caso de grasa abdominal y músculo esquelético. En el caso de la grasa abdominal la dieta rica en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 produjo cambios respecto a todas las otras dietas y, sobre todo, con variaciones en vías metabólicas poco específicas o relacionadas con la metabolización de diferentes moléculas. En el caso del músculo las diferencias de expresión se encontraron fundamentalmente entre la dieta rica en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 en comparación con la dieta rica en ácidos grasos saturados, y la mayoría de las vías afectadas estaban relacionadas con el sistema inmune.

Estudio de genes seleccionados. En este estudio se seleccionaron genes de interés según los resultados obtenidos en el estudio del transcriptoma y la bibliografía disponible. No todos los genes seleccionados mostraron cambios en respuesta a las diferentes dietas o al tiempo de consumo de estas. Los genes ITGB2, FABP7, LIPA, GSTA3, LITAF mostraron diferencias en su expresión en grasa abdominal entre los pollos alimentados con la dieta rica en ácidos grasos insaturados omega-3 y los alimentados con omega-6 o saturados. El gen CYP2C18 mostró mayores niveles de expresión en hígado en animales alimentados dietas ricas en ácidos grasos poli-insaturados n-3 y n-6 en comparación con aquellos alimentados con saturados. Los genes CLU y ITGB2 en grasa abdominal, CYP2C18, PCK1, PPARa, PPARg y FASN en hígado y ITGB2 y FABP4 en músculo mostraron cambios en su expresión con la edad del animal.

De estos estudios podemos concluir que el transcriptoma de la grasa abdominal es mucho más sensible a cambios en la composición de la grasa de la dieta que el transcriptoma del hígado o del músculo esquelético. Además, dietas ricas en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 producen transcriptomas muy diferentes a aquellos producidos por dietas ricas en ácidos grasos omega-6, saturados o incluso por dietas bajas en grasa en la grasa abdominal y el músculo esquelético. Los genes que presentaron cambios debido a las dietas o a la edad identificados en el presente trabajo, están principalmente relacionados con la metabolización de lípidos y otras moléculas y con la respuesta inmune, y son de

Resumen

interés para futuros estudios en pollos de engorde relacionados con el metabolismo lipídico o el desarrollo de los animales.

SUMMARY

The general aim of this PhD thesis is to assess the effects that diets rich in different fatty acid families (saturated, poly-unsaturated omega-6, or omega-3) have on the transcriptome of adipose tissue, liver, and skeletal muscle in broiler chickens, using *GeneChip* microarrays. In particular, this work wants to describe differences in gene/pathway expression in broiler chickens fed diets differing in their unsaturation degree, and want to verify those differences in genes/pathways expression previously described in literature. In a second part of this PhD Thesis, we describe the time-evolution of the expression of genes selected from those found important in the microarray data and in literature on broiler chickens.

In this work, broiler chickens were fed 4 different experimental diets, a low-fat diet (0.5% added fat) and 3 diets supplemented with 10% of three different fats: tallow, rich in saturated fatty acids, a mixture of n3 oils (70% linseed oil + 30% fish oil) rich in poly-unsaturated omega-3 fatty acids, and sunflower oil rich in poly-unsaturated omega-6 fatty acids. This work includes two experiments that were developed parallel in time. First experiment studies the effects of the experimental diets on transcriptomes of abdominal fat, liver, and skeletal muscle in 50 days old broiler chicken; second experiment describes time-evolution of the expression of selected genes depending on the diets. Abdominal fat, liver, and skeletal muscle were sampled in broiler chickens on days 0, 10, 21, 35, and 45 after experimental feeds were introduced to the animals on day 14 of age.

Phenotype changes. Productive performance was registered as a pre-requisite before we could proceed to run microarray analysis. Chickens fed the diet rich in poly-unsaturated omega-3 fatty acids showed lower deposition of abdominal compared to those fed the diet rich in saturated fatty acids. The different studied tissues also showed the expected changes in composition mimicking fatty acid profile of the respective diets. Broiler chickens fed low fat diet, and so with lower energy levels, showed productive performance records completely different to all other treatments, as expected.

Study of transcriptome. Diet rich in poly-unsaturated omega-3 fatty acids induced most of the important observed changes in expression, especially in abdominal fat and skeletal muscle. For abdominal fat, diet rich in poly-unsaturated omega-3 fatty acids

induced changes compared to all other diets, affecting several unspecific pathways related to metabolism of different molecules. For skeletal muscle, differential expression was mainly found between the diet rich in poly-unsaturated omega-3 fatty acids and diet rich in saturated fatty acids. Most of the pathways affected in this case were related to immune response.

Study of selected genes. A group of genes were selected based on results obtained from the microarray experiment and previous results available on literature. Not all selected genes were differentially expressed among diets or time points. Genes ITGB2, FABP7, LIPA, GSTA3, LITAF showed differences on expression in abdominal fat of broiler chickens fed the diet rich in poly-unsaturated omega-3 fatty acids compared to those fed diets rich in poly-unsaturated omega-6 or saturated fatty acids. Gene CYP2C18 showed increased expression levels in liver of broiler chickens fed diets rich in poly-unsaturated omega-3 or omega-6 fatty acids compared to those fed saturated fatty acids. Genes CLU and ITGB2, in abdominal fat, genes CYP2C18, PCK1, PPAR α , PPAR γ and FASN in liver and genes ITGB2 and FABP4 in skeletal muscle were affected by the age of the broiler chicken.

As conclusions, we can say the transcriptome of the adipose tissue is more sensible to changes in the composition of the fat included in the diet than liver or muscle transcriptomes. Moreover, diets rich in poly-unsaturated omega-3 fatty acids resulted in very different transcriptomes when compared to diets rich in saturated or poly-unsaturated omega-6 fatty acids, or even when compared to low fat diet. Genes differentially expressed among diets or sampling days were mainly related to metabolism of different molecules and to immune response. These are genes of interest for future studies related to lipid metabolism or development in broiler chickens.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Relación entre Grasa Dietética y Deposición de Grasa en Pollos de Carne.....	5
1.2. Ciencias ómicas: Nutrigenómica.....	11
1.2.1. Genómica.....	14
1.2.2. Proteómica.....	15
1.2.3. Metabolómica.....	16
1.2.4. Transcriptómica. Técnicas de Cuantificación de Expresión Génica...17	
1.2.4.1. Northern-Blot.....	18
1.2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	18
1.2.4.3. Microarrays de expresión génica.....	19
1.2.4.3.1. Microarrays en pollo.....	25
1.2.4.4. <i>RNA sequencing</i> : actualidad en técnicas de cuantificación de expresión génica.....	32
1.3. Referencias bibliográficas.....	33
2. CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	47
3. CAPÍTULO 3. INFLUENCIA DE LA GRASA DIETÉTICA EN LOS RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS, LA DIGESTIBILIDAD DE LA ENERGÍA Y LA GRASA Y LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DEL HÍGADO, MÚSCULO Y LA GRASA EN POLLOS.....	51
3.1. Introduction.....	53
3.2. Materials and Methods.....	53
3.3. Results.....	57
3.4. Discussion.....	60
3.5. References.....	62

4. CAPÍTULO 4. INFLUENCIA DE LA GRASA DIETÉTICA EN EL TRANSCRIPTOMA DEL HÍGADO, MÚSCULO Y GRASA EN POLLOS DE CARNE.....	65
4.1. Introduction.....	67
4.2. Materials and Methods.....	67
4.3. Results.....	71
4.4. Discussion.....	76
4.5. References.....	79
5. CAPÍTULO 5. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE GRASA DIETÉTICA EN LA EXPRESIÓN DE GENES SELECCIONADOS EN GRASA ABDOMINAL, MÚSCULO E HÍGADO DE POLLOS DE CARNE.....	85
5.1. Introduction.....	87
5.2. Materials and Methods.....	87
5.3. Results.....	89
5.4. Discussion.....	93
5.5. References.....	98
6. CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	105

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Esta tesis es parte de una línea de investigación del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la UAB*, que se inició hace más de 25 años y en la que se han estudiado diferentes aspectos teórico-prácticos de la influencia de los lípidos dietéticos sobre los rendimientos productivos y la calidad de los productos derivados del pollo de carne, broiler. Estos estudios se han llevado a cabo gracias a la financiación a través de diferentes proyectos de investigación (CICYT ALI 91-0991-C02-02, HA94-153, HA1996-0095, HA97-0133, CICYT ALI 95-0602, CICYT ALI99-0452-C02-01, INIA RTA03-060-C2-2, UE, Food-ct-2004-007020 y CYCIT AGL2007-65898-C02) y ha sido objeto de las memorias de Tesis Doctoral de sucesivos investigadores en formación (A. Barroeta, 1989; A. Blanch, 1994; S. López-Ferrer, 1999; L. Cortinas, 2004; C. Villaverde, 2005 y G. Ferrini, 2009). En este contexto, cabe destacar el estudio realizado sobre las diferencias en los rendimientos productivos y la composición de la canal entre animales alimentados con dietas isoenergéticas, que difieren únicamente en el perfil de ácidos grasos (AG), en particular, dietas ricas en ácidos grasos saturados (AGS) comparadas con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

En la alimentación de pollos de carne, es habitual y de gran importancia, adicionar grasas en la formulación de las dietas, ya que permite incrementar el nivel energético de la ración. Además, la inclusión de materias grasas en el pienso puede utilizarse para modificar la composición lipídica de la carne de pollo. De esta manera, es sabido que la cantidad y tipo de grasa añadida al pienso pueden afectar tanto al perfil en ácidos grasos de los tejidos, como al depósito de grasa en pollos de carne.

Así, en la bibliografía encontramos numerosos trabajos que estudian la relación entre la composición de la grasa que consume el animal y el perfil de ácidos grasos (AG) que deposita (Yau et al., 1991; Pinchasov y Nir, 1992; Scaife et al., 1994; Sanz et al., 1999; Blanch et al., 2000; Sanz et al., 2000; Crespo y Esteve García, 2001; Bou et al., 2004; Fébel et al., 2008; Viveros et al., 2009). También se ha demostrado que los pollos que consumen piensos ricos en AGPI tienen menos depósito de grasa abdominal en comparación con los que comen piensos ricos en ácidos grasos saturados (AGS) (Barroeta, 1989; Vilà y Esteve-García, 1996; Sanz et al., 1999, 2000; Crespo y Esteve-García, 2001). Resultado sorprendente, si consideramos que las grasas poliinsaturadas tienen un mayor contenido en energía metabolizable que las grasas saturadas.

Considerando todos estos trabajos, Ferrini et al. (2008), estudiaron las modificaciones que se producían en el depósito de grasa en la piel y grasa abdominal de los pollos de carne tras suministrarles diferentes fuentes de grasas añadidas al pienso (sebo, aceite de girasol rico en oleico, aceite de girasol rico en linoleico, aceite de linaza y una mezcla: 55% sebo + 10% girasol rico en linoleico + 35% linaza). Estos autores observaron como la cantidad de ácidos grasos totales era mayor en los animales que consumieron AGS (sebo) que en los tratamientos ricos en AGPI, siendo el menor depósito de grasa el encontrado en el tratamiento con AGPI n-3. Tanto en la grasa abdominal (%) como en la piel (%), el perfil de AG reflejaba la composición lipídica de la ración consumida, así los animales del tratamiento con sebo depositaban más AGS mientras que los animales del tratamiento con linaza depositaban más AGPI n-3.

Más allá de aspectos de producción y calidad de carne de pollo, es importante conocer la repercusión del consumo de AGPI, en especial de la serie n-3, respecto al consumo de AGS, sobre el organismo. Además de las investigaciones anteriores, algunos trabajos han llegado a la conclusión de que el consumo de AGPI va acompañado de un aumento en la actividad de enzimas relacionadas con la β -oxidación (Keller et al., 1993; Rise y Galli, 1999; Sanz et al., 2000) mientras que en otros, se apunta a un mayor ritmo de lipogénesis que conllevaría a un mayor coste energético y por lo tanto sería depositada menos grasa (Emmans, 1994; Crespo y Esteve-García, 2002c). Otros estudios también han demostrado que los AGPI n-3 de la dieta tienen efectos muy importantes sobre la respuesta inmune, con una clara disminución de la respuesta inflamatoria y una potenciación de la respuesta humoral (Al-Khalifa et al., 2012; Maroufyan et al., 2012). Sin embargo, todavía no están claramente establecidos los mecanismos responsables de las diferencias en la cantidad de grasa depositada por el animal que se producen al consumir diferentes tipos de grasas. Por ello, en base a estas aproximaciones, es esencial realizar más esfuerzos investigadores para conocer en profundidad los mecanismos implicados en todos estos procesos relacionados con el metabolismo lipídico en las aves. Algunos de los trabajos citados anteriormente (Yeh et al., 1970; Ferrini et al., 2005; Puthongsiriporn y Scheideler, 2005; Cherian, 2007; He et al., 2007; Smink et al., 2010; Royan et al., 2011; Al-Khalifa et al., 2012; Maroufyan et al., 2012) describen cambios de expresión génica en vías metabólicas concretas pero no se dispone de una visión global de los cambios que se

producen en el organismo. Este enfoque global nos ayudaría a entender que papel tienen los AG consumidos en las modificaciones que se producen en las distintas rutas metabólicas, de una forma integrada y más real.

Los cambios en el metabolismo energético y lipídico, en el sistema inmune y en el desarrollo neurológico, entre otros, son de gran interés en humanos y mayoritariamente se han estudiado en modelos, en particular, ratones y ratas. Así, algunos de los mecanismos que causan los efectos de los AGPI n-3 se han descrito en ratones, sin embargo aun quedan muchos aspectos por clarificar. La aparición de nuevas tecnologías -ómicas ofrece una nueva oportunidad de profundizar en estos mecanismos de acción de una manera mucho más eficiente y completa y hace posible plantearse este tipo de aproximaciones en el caso de los efectos de los AG de la dieta en el metabolismo lipídico del pollo. En esta tesis decidimos utilizar una de estas tecnologías para estudiar las diferencias generadas por diferentes perfiles de AG dietéticos en el perfil de expresión génica de determinados tejidos. Aunque las tecnologías -ómicas no presentan el mismo nivel de desarrollo en el pollo que en el ratón o el humano, sí que existe una gran cantidad de información sobre aspectos importantes del metabolismo lipídico de las aves, y en particular de los efectos de los AGPI comparados con los AGS dietéticos.

Este trabajo se plantea no como una respuesta a todas las preguntas pendientes, sino como una primera aproximación -ómica a este tema que nos permita encaminar futuras investigaciones y abra nuevos caminos. Así, en la presente revisión bibliográfica se realiza una breve descripción de la información disponible sobre los efectos de los AGPI dietéticos comparados con los AGS en pollos broiler. A continuación se describen las diferentes técnicas -ómicas disponibles para el estudio de estos efectos y en especial la técnica elegida para el presente estudio.

1.1. Relación entre Grasa Dietética y Deposición de Grasa en Pollos de Carne

En mamíferos y aves, el principal sitio de deposición de grasa es el tejido adiposo, en particular, los adipocitos donde se depositan los triglicéridos de reserva. En el caso del pollo, el tejido adiposo, tiene muy limitada la capacidad de síntesis de ácidos grasos, y la

mayoría de la grasa almacenada proviene directamente de la dieta o bien de la síntesis endógena realizada en el hígado (Griffin y Hermier, 1988). La grasa corporal del pollo se distribuye en el organismo formando parte de diversos tejidos pero sobretodo en depósitos de grasa separables, especialmente la grasa abdominal y la piel. Las Tablas 1.1, y 1.2 dan una idea de la importancia de estos depósitos. Vemos como la grasa abdominal, representa el 2-3% del peso vivo en pollos de 2,5-2,7 kg en el trabajo de Crespo y Esteve-García (2002a), lo que supone un 16,6% del total de grasa corporal, mientras que en el trabajo de Ferrini et al. (2008) la grasa constituía el 0,8-1,8% del peso vivo en pollos de 1,8-2,3 kg, lo que representa el 8,8% del total de grasa corporal. Además, estos últimos autores determinaron que la piel tiene un valor que oscila entre el 6 y 7,5% del total del peso vivo y constituye un 46% del total de grasa corporal. Así, la grasa abdominal y la piel representan un porcentaje muy elevado del total de grasa corporal del pollo. La grasa abdominal es un depósito de grasa separable de especial importancia en pollos que ha sido utilizado en una gran variedad de estudios ya que está directamente relacionado con los lípidos circulantes de lipogénesis hepática o de la ración.

Tabla 1.1. Efecto de la grasa de la dieta sobre el peso de los depósitos de grasa separable y el porcentaje que estos representan del total del peso vivo. Crespo y Esteve-García (2002a).

Tratamiento	SEBO	OLIVA	GIRASOL	LINAZA	EEM
Grasa mesentérica, g	22,9 ^a	21,8 ^{ab}	15,5 ^c	17,2 ^{bc}	5,480
Grasa mesentérica, %	0,82 ^a	0,77 ^{ab}	0,57 ^c	0,63 ^{bc}	0,192
Grasa del cuello, g	14,5 ^{ab}	17,4 ^a	14,0 ^{ab}	11,2 ^b	4,260
Grasa del cuello, %	0,53 ^{ab}	0,63 ^a	0,52 ^{ab}	0,41 ^b	0,157
Grasa sartorial, g	7,92	6,66	5,55	6,22	1,979
Grasa sartorial, %	0,29	0,24	0,2	0,23	0,075
Total DGS, g	45,3 ^a	45,9 ^a	35,1 ^b	34,5 ^b	9,280
Total DGS, %	1,64 ^a	1,64 ^a	1,29 ^b	1,27 ^b	0,331
Grasa abdominal, g	79,2 ^a	76,3 ^a	55,9 ^b	62,4 ^b	15,240
Grasa abdominal, %	2,87 ^a	2,73 ^{ab}	2,04 ^c	2,31 ^{bc}	0,561
Total depósitos grasos, g	124,5 ^a	122,2 ^a	90,5 ^b	96,9 ^b	24,200
Total depósitos grasos, %	4,51 ^a	4,37 ^a	3,30 ^b	3,59 ^b	0,857

^{a-c} Las medias sin ninguna letra en común en el superíndice dentro de una misma línea son diferentes ($P < 0,05$). ¹ Las dietas utilizadas fueron: 10% de sebo, 10% de aceite de oliva, 10% de aceite de girasol, 10% de aceite de linaza. DGS: Depósitos de grasa separables = grasa mesentérica + grasa del cuello + grasa sartorial. Total depósitos grasos = DGS + grasa abdominal. EEM: Error estándar de la media.

Tabla 1.2. Efecto de la grasa de la dieta en el peso vivo del animal, peso de la canal (desangrado y eviscerado), y peso y porcentaje respecto al peso vivo de la grasa abdominal y la piel. Ferrini et al. (2008).

Tratamiento	BAJA EN GRASA	SEBO	GIRASOL OLEICO	GIRASOL LINOLEICO	LINAZA	MEZCLA	EEM
Peso vivo, g	1828 ^c	2153 ^{ab}	2158 ^{ab}	2069 ^b	2097 ^b	2235 ^a	153,4
Carcasa, g	1627 ^c	1924 ^{ab}	1927 ^a	1838 ^b	1865 ^b	2001 ^a	141,4
Carcasa, %	88,9	89,1	88,3	88,9	89,0	89,5	0,97
Grasa abdominal, g	15,9 ^d	37,6 ^a	32,0 ^b	26,7 ^{bc}	26,3 ^c	40,0 ^a	9,28
Grasa abdominal, %	0,87 ^c	1,75 ^a	1,47 ^b	1,29 ^b	1,24 ^b	1,79 ^a	0,418
Piel, g	111 ^d	159 ^{ab}	164 ^a	151 ^{bc}	145 ^c	168 ^a	21,2
Piel, %	6,07 ^c	7,39 ^a	7,45 ^a	7,34 ^a	6,94 ^b	7,52 ^a	0,726

^{a-d} Las medias sin ninguna letra en común en el superíndice dentro de una misma línea son diferentes ($P < 0,05$). Las dietas utilizadas fueron: baja en grasa, 10% de sebo, 10% de aceite de girasol rico en ácido oleico, 10% de aceite de girasol, 10% aceite de linaza y una mezcla de 55% de sebo, 35% de aceite de linaza y 10% de aceite de girasol. EEM: Error estándar de la media.

En pollos de carne, la selección genética es la mayor responsable en las mejoras de rendimientos. En las últimas décadas esta selección se ha orientado a la mejora de la eficiencia de producción de músculo y a la reducción del porcentaje de grasa corporal. Sin embargo, existen otros factores que pueden afectar tanto al nivel de grasa depositada en el pollo como al perfil en ácidos grasos de este depósito: el sexo, la edad, el medio ambiente y, especialmente, la nutrición como se refleja en las Tablas 1.1, y 1.2. Los factores nutricionales que afectan a la deposición de grasa en el pollo son principalmente: la concentración energética de la ración, la relación entre la energía y la proteína, la inclusión de grasa en la ración y el perfil en AG de la misma.

En comparaciones con dietas isoenergéticas e isoproteicas, la grasa presente en los tejidos del animal puede ser de origen exógeno y endógeno, y el grado de la deposición lipídica depende del balance entre la grasa digerida, la grasa sintetizada y la grasa catabolizada por el organismo. La lipogénesis hepática aumenta cuando la energía de la dieta es aportada en forma de carbohidratos, y se reduce al usar fuentes lipídicas (Tanaka et al., 1983a, b). Así se establece un balance entre la contribución exógena y la síntesis endógena de lípidos, permaneciendo el contenido total de lípidos más o menos dentro de un rango (Saadoun y Leclercq, 1987).

El perfil de AG depositado por el pollo reflejará más el perfil de la dieta cuanto mayor sea la cantidad de grasa en el pienso. Los AG resultantes de la síntesis endógena, depositados en el pollo tras alimentarlo con una dieta sin grasa añadida son AGS, principalmente palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), y ácidos grasos monoinsaturados

(AGMI), principalmente oleico (C18:1 n-9) y palmitoleico (C16:1 n-7) (Renner y Hill, 1961; Donaldson, 1979, 1985; Grompone et al., 1994). Muchos trabajos han utilizado diferentes fuentes de grasa para cambiar el perfil de AG del depósito de grasa del pollo. Así, se ha visto que el contenido de AGS se puede aumentar proporcionando al pollo aceite de coco o aceite de palma; el contenido en oleico con aceite de oliva; el contenido de ácido linoleico con aceite de colza, girasol y soja; el contenido de ácido linolénico con aceite de linaza y el contenido en ácidos eicosapentaenoico (EPA; C20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA; C22:6 n-3) con aceite de pescado (Hulan et al., 1988, 1989; Asghar et al., 1990; Yau et al., 1991; Chanmugam et al., 1992; Ajuyah et al., 1993a, b; Scaife et al., 1994; Nam et al., 1997; López-Ferrer et al., 1999a, b; Surai y Sparks, 2000; Crespo y Esteve-García, 2002a, b, c; Ahn et al., 2006; Bou et al., 2006; Lin et al., 2006; Rebolé et al., 2006; Ferrini et al., 2008; Viveros et al., 2009). No obstante, no todos los AG son modificados de igual forma. La variación del contenido en AGS es más limitada que en AGPI. Además, la fracción poliinsaturada varía de forma inversa a la monoinsaturada. De hecho, los AGS como el ácido esteárico (C18:0) y AGMI como el palmitoleico (C16:1 n-7) y el oleico (C18:1 n-9) en el tejido adiposo del pollo de carne parecen estar bajo un control metabólico más estricto y sus porcentajes son menos dependientes del contenido de la ración, ya que pueden tener su origen en la lipogénesis endógena (síntesis de *novo* a partir de proteína e hidratos de carbono).

Por otro lado, la cantidad de grasa y el perfil de AG de la dieta también afectan la deposición total de grasa en el pollo. Deaton et al. (1981) mostró que al aumentar el nivel de grasa añadida al pienso (4, 7 y 10%) aumenta la grasa corporal total y el porcentaje de grasa abdominal del pollo de carne. En cuanto al perfil de AG de la dieta, pollos alimentados con dietas isoenergéticas, si estas son ricas en AGPI, tienen un menor depósito de grasa abdominal que pollos alimentados con dietas ricas en AGS. Crespo y Esteve García (2002a) (Tabla 1.1) demostraron como el consumo de raciones ricas en AGPI provoca un menor depósito de grasa abdominal y de otros depósitos de grasa separables (grasa mesentérica, grasa del cuello y grasa sartorial) respecto al consumo de raciones ricas en AGS o AGMI. Ferrini et al. (2008) (Tabla 1.2) observaron como el depósito de AG totales es mayor en los pollos que consumen dietas ricas en AGS (sebo) que en los alimentados con dietas ricas en AGPI, siendo el menor depósito de grasa el encontrado en

el tratamiento con AGPI n-3. Esta reducción en la cantidad de AG totales se evidencia tanto en la grasa abdominal como en la piel. El consumo de piensos ricos en AGPI comparado con raciones altas en AGS, produjo una reducción aproximada de un 7% de la piel y un 25 % de la grasa abdominal en el pollo de carne. Además, en ambos tejidos, el perfil de AG reflejaba la composición lipídica del pienso.

Este fenómeno es sorprendente si se tiene en cuenta que en pollos se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el grado de insaturación y el valor de energía metabolizable aparente (EMA), es decir, conforme aumenta la relación AGPI:AGS de la grasa, aumenta la EMA (Blanch et al., 1995). Por ello, cabría esperar que el consumo de AGPI, con un mayor contenido de EMA, diera una mayor deposición de grasa corporal que el consumo de AGS. Sin embargo, los resultados de diferentes estudios realizados demuestran lo contrario. La incorporación de grasa rica en AGPI en la dieta produce una menor deposición de grasa en el animal. Hay diferentes teorías que explican este fenómeno, partiendo de que debemos suponer que existe una pérdida de energía provocada por el consumo de AGPI. Algunas investigaciones llevadas a cabo en este campo estudian cómo afecta la administración de piensos con diferente composición lipídica al ritmo de lipogénesis endógena en pollos de carne. Estos trabajos apuntan a un mayor ritmo de lipogénesis que conllevaría un mayor coste energético y menor depósito de grasa (Emmans, 1994; Crespo y Esteve-García, 2002c). En otros casos, el consumo de AGPI provocó una disminución de la lipogénesis hepática asociada a una reducción de la actividad de enzimas implicadas en la lipogénesis, como el enzima málico y la enzima ATP citrato sintetasa (Yeh et al., 1970) o bien un aumento en la actividad de enzimas relacionados con la β -oxidación (Keller et al., 1993; Rise y Galli, 1999; Sanz et al., 2000; Ferrini et al., 2005; Smink et al., 2010).

Otros autores sugieren cambios en el metabolismo energético a nivel sistémico como por ejemplo en la expresión de enzimas del metabolismo lipídico, como la lipoprotein lipasa (LPL) (Sato y Akiba, 2002) aunque estos mismos autores concluyeron que la expresión de la LPL en pollos se ve menos afectada por la nutrición que en mamíferos. Las concentraciones de las hormonas tiroideas en plasma también podrían estar relacionada con menor deposición de grasa en animales alimentados con AGPI n-3 (Rosebrough et al., 1999; Collin et al., 2003; Ferrini et al., 2005; Swennen et al., 2005). Ferrini et al. (2005)

observó cómo se producía un aumento de la hormona T3 en suero y un menor depósito de grasa abdominal en los pollos que consumían AGPI n-3 frente a los que consumían AGS. Otro cambio observado es que el tipo de AG puede influir en el metabolismo de la glucosa (cantidad de glucosa absorbida por diferentes tejidos), lo que alteraría el metabolismo energético del pollo (Newman et al., 2005).

Todos estos cambios podrían estar motivados por cambios en la expresión de algunos genes. Cada año aparecen pruebas de que los AG afectan directa o indirectamente la expresión de determinados genes a través de factores de transcripción como son PPARs, HNF-4 α , NF- κ β , RXR α , SREBP-1c, LXR α y LXR β (Afman y Müller, 2012). Estos cambios además en muchos casos justifican la estrecha relación que existe entre el metabolismo lipídico y la respuesta inmune del animal. En general, dietas altas en AGPI n-3 inducen cambios en la producción de eicosanoides proinflamatorios promoviendo la inmunidad humoral y disminuyendo respuestas de tipo inflamatorio (Puthongsiriporn y Scheideler, 2005; Al-Khalifa et al., 2012; Maroufyan et al. 2012). Selvaraj et al. (2010) demostraron que las dietas suplementadas con luteína y AGPI tienen efecto antiinflamatorio a través de cambios en la expresión de PPARs y RXRs que disminuyen la producción de IL-1 β en muestras de hígado y bazo en pollos. Por otra parte, Royan et al. (2011) relacionaron los PPARs con la deposición de lípidos según tipo de grasa dietética.

Sin embargo, todavía queda mucho camino por recorrer para entender los mecanismos moleculares mediante los cuales los diferentes AG generan estas diferencias en la cantidad de grasa depositada por el pollo. Por ello resultaría interesante establecer el papel de los diferentes AG de la ración sobre la regulación de diferentes etapas del metabolismo lipídico. Hasta el momento los trabajos en pollos de carne que estudian la repercusión de las grasas consumidas sobre el metabolismo suelen abordar aspectos puntuales del metabolismo en vías concretas. Este tipo de estudios son muy necesarios para la comprensión de estos mecanismos. Sin embargo, en esta tesis nos planteamos una exploración general de estos mecanismos mediante tecnologías -ómicas.

1.2. Ciencias ómicas. Nutrigenómica

En el siglo XXI, las ciencias biológicas han iniciado una nueva era debido a la aplicación de nuevas técnicas de biología molecular, con resultados como el proyecto del Genoma Humano y los desarrollos tecnológicos asociados (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). En este sentido, en el campo de la nutrición se ha desarrollado una nueva ciencia denominada nutrigenómica. Podemos encontrar diferentes definiciones de esta ciencia pero básicamente es la disciplina que se ocupa del estudio del impacto de la nutrición sobre los procesos fisiológicos, a través de cambios en la expresión de genes (Bauman et al., 2011). Los nutrientes de la dieta regulan la expresión génica, directa o indirectamente, a través de las siguientes vías (Figura 1.1, Kaput y Rodriguez, 2004):

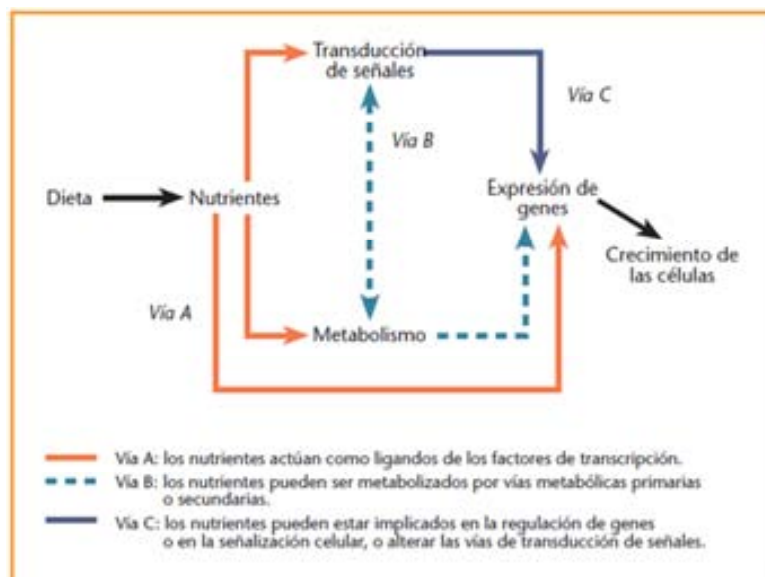


Figura 1.1. Destino y papel de los nutrientes en las células (Kaput y Rodriguez, 2004).

1. Son incorporados a las rutas metabólicas primarias o secundarias, alterando las concentraciones de sustratos o intermediarios (Vía B). Un ejemplo son los AG metabolizados en la β -oxidación para producir energía. La alteración del balance energético intracelular altera indirectamente la expresión génica por cambios en la homeostasis de NAD celular (Lin y Guarente, 2003).

2. Influyen sobre las rutas de señalización celular o de transducción de señales (Vía C). Por ejemplo, el té verde contiene polifenoles que inhiben la fosforilación de la tirosina del receptor *Her-2/neu*, por lo que inhibe la ruta del NF- κ B y previene el desarrollo de algunas formas de cáncer de mama (Dong, 2000).
3. Actúan como ligandos de factores de transcripción (Vía A), como los receptores nucleares, que modulan la transcripción de ciertos genes y por lo tanto la producción de una proteína. Por ejemplo, la mayoría de los genes involucrados en el metabolismo de los AG, están regulados por uno de los miembros de la familia de receptores nucleares llamados PPARs, es decir, estos receptores nucleares actúan como sensores para los ácidos grasos.

Una vez explicados los mecanismos de interacción nutriente-gen, surge la necesidad de saber el interés que despierta la nutrigenómica en el área de la producción avícola. La nutrigenómica en este campo es de gran importancia en estudios sobre la eficiencia de aprovechamiento de los nutrientes, sobre la resistencia a las enfermedades y sobre el rendimiento reproductivo (Dawson, 2006; Klasing, 2007; Kogut, 2009; Ashwell, 2010). Algunos ejemplos de aplicación en la industria avícola son los estudios de aditivos que influyen en la respuesta inmune (Kim et al., 2010); en gallos reproductores, el estudio de la suplementación con selenio orgánico para aumentar la concentración de esperma, el volumen y la vitalidad del esperma (Brennan et al., 2011); o la optimización de la alimentación para reducir la incidencia de trastornos como la ascitis, el síndrome de muerte súbita o la discondroplasia (Klasing, 2007).

Explicado el concepto nutrigenómica resulta interesante saber que tecnologías se utilizan en el estudio de la interacción nutriente-gen. Para ello, se introduce el concepto de ciencias -ómicas que recogen aquellas disciplinas que aportan una visión global de los procesos biológicos fruto de los avances logrados tanto en el campo de la biología como en el campo de la bioinformática, siendo las -ómicas más utilizadas en nutrición la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica (Kato, 2008; Zduńczyk y Pareek, 2009). A grandes rasgos, la transcriptómica se define como el estudio del conjunto de ácido ribonucleico (ARN) que existe en una célula, tejido u órgano; la proteómica se dedica al estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función; y la

metabolómica se dedica al estudio del conjunto de moléculas que constituyen los metabolitos de procesos específicos. La Figura 1.2, muestra un breve resumen de cómo estas ciencias abarcan las diferentes etapas de la producción de proteínas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células de un organismo contiene la información genética necesaria para la construcción de sus proteínas. Mediante un proceso conocido como transcripción, esta información se copia a una molécula de ARNm. La información codificada en la molécula de ARNm es interpretada a través de un proceso denominado traducción y que tiene como fin la construcción de la proteína. Por lo tanto, la concentración de una proteína depende de la cantidad y estabilidad de las moléculas de ARNm producidas a partir de su gen (Nguyen et al., 2002). Las proteínas junto con muchos otros productos de diferentes procesos metabólicos serán parte del denominado metaboloma.

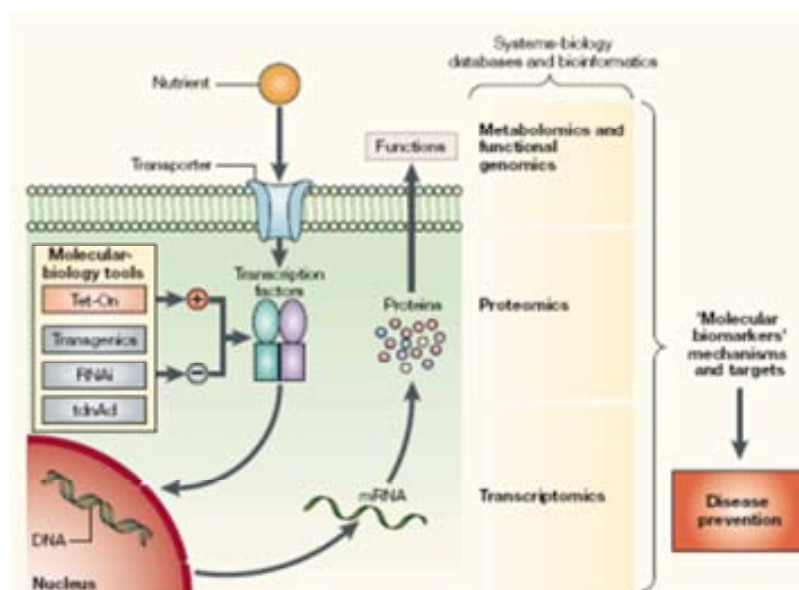


Figura 1.2. Esquema representativo de transcriptómica, proteómica y metabolómica (Müller y Kersten, 2003).

Así, podemos aproximarnos al efecto de los nutrientes sobre la traducción de la información contenida en los genes a proteínas a diferentes niveles de este proceso. Cada una de estas aproximaciones tiene ventajas e inconvenientes. La medición resultante de la transcripción no incluye las posibles modificaciones post-transcripción, pudiendo ser diferente del resultado final. Sin embargo esta tecnología es más utilizada porque es más

sencilla y está más desarrollada. El estudio de las proteínas tiene más dificultades técnicas debido sobre todo a que son estructuras tridimensionales muy complejas. En los siguientes apartados se describen brevemente las diferentes opciones disponibles para centrarnos a continuación en la utilizada en la presente tesis.

1.2.1. Genómica

Se denomina genoma al conjunto de ADN de una célula u organismo. A pesar que el genoma de los individuos de una especie es casi idéntico, no todos los individuos son iguales (Fujita, 2007). La genómica es la disciplina de la genética que tiene por objetivo la secuenciación, y el análisis estructural y funcional del genoma. La acumulación de secuencias genéticas en bases de datos internacionales como *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) crece exponencialmente desde mediados de los años 90 y los genomas enteros de varias especies vegetales cultivadas y animales domésticos han sido ya secuenciados. En el caso del genoma del pollo (*Gallus gallus*), la secuencia final fue publicada en *Nature* (Hillier et al., 2004). El genoma del pollo tiene un contenido haploide de $1,2 \times 10^9$ pares de bases de ADN, incluyendo 20.000-23.000 genes en 39 pares de cromosomas (Burt, 2002; Hillier et al., 2004).

En el área de producción animal, la genómica ha sido capaz de contribuir a la mejora animal por medio del desarrollo de mapas genéticos (Kappes et al., 1997). Estos mapas incluyen marcadores moleculares que constituyen los puntos de referencia para posicionar las regiones cromosómicas que controlan variables de importancia económica. Contando con esta información molecular del genoma se puede desarrollar un marcador que ayude en la identificación de animales con condiciones superiores para una característica productiva (Casas, 2006). El interés en el uso de los marcadores moleculares se ha concentrado en la precisión de la predicción del mérito genético de animales para características que son difíciles o costosas de medir. Estas características incluyen la eficiencia alimenticia, la eficiencia reproductiva, la resistencia a enfermedades y la composición de la canal (Thallman, 2004). En el caso del pollo, la información del genoma del pollo es utilizada por las compañías de genética avícola para mejorar los programas de selección. Se han identificado más de 2.400 QTLs (quantitative trait loci) para caracteres

incluyendo aquellos relacionados con comportamiento, resistencia a enfermedades, calidad del huevo, capacidad para poner más o menos huevos, crecimiento y numerosos trastornos metabólicos en pollos (Fulton, 2012). También, se han identificado 2,8 millones de SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) lo que significa que se pueden establecer asociaciones entre marcadores SNPs y caracteres, permitiendo una selección más precisa para múltiples caracteres (Burt, 2005). El principal objetivo de las compañías de reproducción es conseguir proteínas de alta calidad tanto del huevo como de la carne y a coste asequible. La genómica podría entenderse como un modo de conseguir este objetivo más rápido que a través de los métodos tradicionales de selección, sin embargo, todavía existen dificultades diversas (Fulton, 2012). Así, la genómica es un modo complementario de describir la variación disponible dentro de las poblaciones y de usar las mismas mediciones del fenotipo para hacer que las decisiones sobre la selección sean más acertadas. Es probable que los beneficios sean mayores para los caracteres que son difíciles de medir, especialmente los de la resistencia a enfermedades y del bienestar, o los de baja heredabilidad como algunos caracteres reproductivos (Mckay, 2009).

1.2.2. Proteómica

El estudio del proteoma es más complicado que el del genoma por la complejidad estructural de las proteínas y por las complicaciones técnicas que ello supone. Además, el proteoma sufre modificaciones según el tipo de célula, las condiciones fisiológicas y la edad, entre otros. Las técnicas más usadas en proteómica son la electroforesis en gel de dos dimensiones y la espectrometría de masas (Müller y Kersten, 2003). La electroforesis en gel de dos dimensiones permite la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular, mientras que la espectrometría de masas identifica las proteínas ya separadas. Otra técnica usada en proteómica son los arrays de proteínas. Los arrays de proteínas a diferencia del array de expresión génica presentan la dificultad de que las proteínas han de plegarse correctamente para ser totalmente funcionales y deben mantenerse las conformaciones nativas de las proteínas para obtener resultados significativos.

Los principales objetivos perseguidos con el uso de la proteómica son:

1. Estudio de expresión diferencial de los componentes del proteoma a consecuencia de alteraciones fisiopatológicas o inducidas por agentes externos.
2. Estudio de las interacciones proteína-proteína. Esto es especialmente útil para determinar socios potenciales en las cascadas de señalización celular ya que la mayoría de proteínas no actúan solas.
3. Identificación de proteínas y caracterización de sus modificaciones postraduccionales (Zduńczyk y Pareek, 2009).

En pollos de carne, la proteómica ha dado algunos resultados interesantes. Ha sido útil para evaluar el efecto que tiene la metionina de la dieta sobre la expresión de proteínas en la pechuga. De 190 proteínas identificadas en el músculo pectoral mayor, 3 se consideraron biomarcadores regulados por la deficiencia de metionina en la dieta de pollos de carne (Corzo et al., 2006). También ha servido para identificar nuevas proteínas en los huevos de gallinas pasando de unas 50 proteínas conocidas a cientos de nuevos componentes en el huevo (Guérin-Dubiard et al., 2006; Gautron et al., 2007). Sin embargo, el estudio del proteoma del pollo sigue presentando obstáculos considerables, derivados de la alta complejidad de las proteínas y de los costes que esto conlleva.

1.2.3. Metabolómica

La metabolómica representa el paso final en la comprensión de la función de los genes y de las proteínas producidas (Müller y Kersten, 2003). La metabolómica es la disciplina que estudia el metaboloma. El metaboloma es el conjunto completo de metabolitos (pequeñas moléculas orgánicas) presentes en una célula, tejido u órgano (García-Vallejo, 2004). El metaboloma es más complejo que el proteoma, es muy dinámico y cambia ante la menor señal física o química. Por lo tanto, para estudiar el metaboloma se necesita a veces primero separar los metabolitos y luego detectarlos. En este sentido, las técnicas que usa la metabolómica son: la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía de gases-

espectrometría de masas. Las técnicas de HPLC y de cromatografía de gases se usan para separar los metabolitos mientras que las técnicas de RMN y espectrometría de masas se usan para la detección de metabolitos. Estos métodos son capaces de cuantificar la gran variedad de compuestos que pueden encontrarse en una muestra simple (Corthésy-Theulaz et al., 2005).

Entre las posibles aplicaciones de la metabolómica está el hecho de correlacionar los perfiles de metabolitos de fluidos y órganos con patologías, tóxicos, constitución genética y dietas. De hecho, el estudio de cómo varía el metaboloma a causa de un fármaco, un tóxico o una patología recibe a veces el nombre concreto de metabonomía. En el ámbito de la nutrición animal, y dentro del campo de la metabolómica, existen estudios orientados a ver cómo afectan los nutrientes de la dieta al metaboloma en órganos o tejidos seleccionados (Zduńczyk y Pareek, 2009).

1.2.4. Transcriptómica. Técnicas de Cuantificación de Expresión Génica

La transcriptómica es la disciplina que se encarga del estudio del transcriptoma, que se define como el conjunto de transcritos de una célula en un momento determinado del desarrollo o en una determinada condición fisiológica (Wang et al., 2009). Los tres principales objetivos de la transcriptómica son:

- 1) Catalogar todas las especies de transcritos, es decir ARNm, ARN no codificante y otros ARN.
- 2) Determinar la estructura transcripcional de los genes, las modificaciones post-transcripcionales y los patrones de *splicing*.
- 3) Cuantificar los diferentes niveles de expresión de cada transcrito durante el desarrollo y bajo diferentes condiciones (Wang et al., 2009).

La transcriptómica permite cuantificar el nivel de expresión de los genes utilizando diferentes técnicas desarrolladas a lo largo de las últimas décadas, desde algunas más tradicionales como el Northern-Blot descrito en 1975 (Reue, 1998) o la posteriormente descrita reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Higuchi et al., 1992), pasando por el

microarray de expresión hasta llegar a la más reciente *RNA sequencing* (RNA-seq). El uso de estas técnicas en diferentes áreas de la biología en muchos casos es una cuestión de coste. En esta tesis la tecnología utilizada son los microarrays a pesar de que en la actualidad existe la posibilidad de utilizar técnicas de RNA-seq a precios asequibles. El microarray de expresión permite cuantificar miles de moléculas de ARNm al mismo tiempo permitiendo obtener una visión global de la expresión de todos los genes, algo que todavía no es posible en tecnologías como proteómica y metabolómica ya que no es posible medir todo el proteoma o metaboloma de forma conjunta (Davis y Milner, 2004; De Hoog y Mann, 2004).

1.2.4.1. Northern-Blot

Uno de los métodos clásicos más utilizados para la detección y cuantificación del ARNm presente en una célula ha sido el Northern-Blot. En este análisis una sonda radioactiva en solución se une con un ARNm inmovilizado en un soporte. El principio fundamental de esta técnica es la hibridación, basada en la complementariedad de las bases. Las señales son detectadas por rayos X y finalmente, la cuantificación se lleva a cabo mediante técnicas de densitometría (Reue, 1998). La principal debilidad de este método es la detección. En este caso, la detección de la radioactividad emitida requiere pasos adicionales como la autorradiografía y, en algunas ocasiones, el escaneo con detectores de radiaciones β y γ , que aumentan hasta 100 veces la sensibilidad de la técnica. Esta técnica fue muy utilizada en el pasado, pero tiene la limitación del número de genes que detecta. Actualmente se requieren resultados globales que incluyen miles de genes a la vez, y que son imposibles de detectar por radioactividad (Barrero, 2005).

1.2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La PCR se utiliza para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN presente en una muestra. La qPCR (PCR cuantitativa o a tiempo real) se puede utilizar siguiendo el mismo principio para cuantificar el ADN presente en una muestra. Si la muestra de origen es ARN hace falta un paso previo de ARN a ADNc utilizando una

transcriptasa inversa (RT-PCR). Finalmente, la RT-qPCR nos permite cuantificar ARN a partir del número de copias amplificadas de esa secuencia de ADNc concreta (Kubista et al., 2006). Para la cuantificación, se mide la cantidad de amplicón producido (conjunto de moléculas de ADN idénticas que resultan en cada ciclo de PCR). La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen de forma cuantitativa al amplicón, de tal manera que a mayor producto se emitirá mayor fluorescencia. Los sistemas de qPCR detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN o ADN iniciales (Bustin y Mueller, 2005). El principio fundamental en qPCR es la hibridación pero su debilidad también es la detección. Además de eso y al igual que en el caso de Northern-Blot, esta técnica se encuentra limitada por el número de genes a estudiar, que en este caso se ve determinado por el número de muestras de la placa (normalmente 96) (Barrero, 2005).

1.2.4.3. Microarrays de expresión génica

La tecnología denominada microarray ha sido desarrollada durante la llamada primera era post-genómica. El gran cambio en la era post-genómica se ha caracterizado no tanto por lo que se podía medir, sino por la cantidad de mediciones simultáneas que se podían realizar (Sánchez-Pla et al., 2012). A pesar de que existen diversos tipos de microarrays que aplican metodologías muy variadas dependiendo de las sondas utilizadas (proteínas, tejidos, SNPs...) en este apartado nos vamos a centrar en los microarrays de expresión génica que es una tecnología de transcriptómica (Suárez et al., 2009). Un chip de microarray es un sustrato sólido (cristal, plástico o sílice) en el que se expanden una serie de sondas específicas (moléculas inmovilizadas de ADNc sobre el sustrato sólido) que se exponen a una muestra diana (en este estudio ARNc). El funcionamiento de los microarrays consiste en la hibridación entre las sondas específicas y las moléculas diana contenidas en la muestra problema. El nivel de hibridación se indica mediante fluorescencia, se visualiza con la ayuda de un escáner e indica el nivel de expresión del gen en relación a las sondas

correspondientes (Heller, 2002; Bilitewski, 2009). Los microarrays de expresión génica se pueden dividir fundamentalmente en:

Microarrays de ADNc, de dos colores o “spotted” arrays. Los microarrays de dos colores fueron descubiertos a mediados de los años 90 (Schena et al., 1995). La fabricación de estos arrays se lleva a cabo imprimiendo las sondas (ADNc o secuencias largas de oligonucleótidos) en el sustrato sólido de vidrio, cuyas secuencias se obtienen de información almacenada en bases de datos de secuencias como *GenBank*, *dbEST*, etc. En este caso, cada gen está representado, aproximadamente, por una sonda (Suárez et al., 2009). El principio fundamental de estos microarrays se basa en la hibridación competitiva de dos muestras con un mismo microarray, cada una de las cuales ha sido marcada con un marcador fluorescente diferente (la muestra experimental se marca con el fluorocromo Cy5 y la muestra de referencia o control se marca con el fluorocromo Cy3, rojo y verde, respectivamente) (Nguyen et al., 2002). Después de la hibridación, el array se ilumina con un láser que provoca que el marcador fluorescente emita fluorescencia de uno u otro color generando dos imágenes que se superpondrán para su análisis conjunto. La cantidad de fluorescencia generada es proporcional a la cantidad de ARNm presente en la muestra problema (Duggan et al., 1999; Suárez et al., 2009). El resultado final es un valor que representa el nivel de expresión de una muestra respecto a la otra por lo que se le denomina expresión relativa. La Figura 1.3, ilustra la representación esquemática de microarrays de dos colores.

Microarrays de un color o arrays de oligonucleótidos. El diseño de los microarrays de un color es más avanzado que el de dos colores. En este caso, las sondas se sintetizan directamente sobre el chip, en vez de sinterizarlas in vitro y adherirlas después. Aquí, cada sonda es un oligonucleótido, generalmente de 25-50 bases de longitud, y cada gen está representado por un grupo de sondas cortas en lugar de una sola sonda. En los microarrays de un color, las muestras están marcadas únicamente con un marcador fluorescente. En cada array solamente se hibrida una muestra, por lo que no se da la hibridación competitiva como pasa en los arrays de dos colores. El valor que se obtiene después de iluminar el array con el láser es una medida numérica que se obtiene directamente del escáner, es decir no

está referida al valor de otra muestra por lo que recibe el nombre de expresión absoluta (Suárez et al., 2009). La Figura 1.3, muestra la representación esquemática de microarrays de un color. En el caso de microarrays de un color, *Affymetrix* es la compañía líder de este tipo de microarrays denominados genéricamente *Gene Chips*, aunque también los fabrican otras compañías como *Illumina* y *Agilent*. En este caso, cada sonda es un oligonucleótido de 25 bases de longitud y cada gen está representado por un grupo de 11 a 20 pares de sondas (*probe pairs*) (Irizarry et al., 2003; Dalma-Weiszhausz et al., 2006).

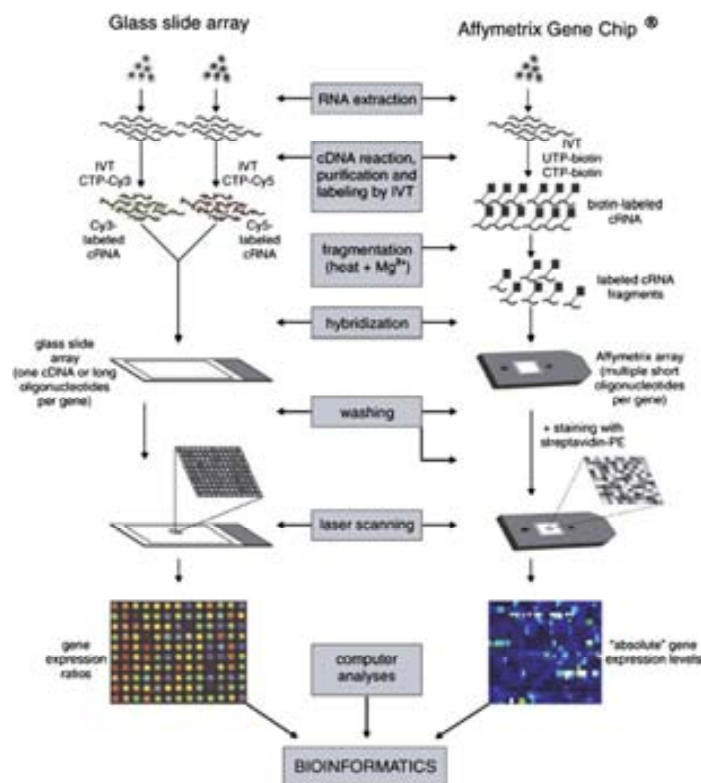


Figura 1.3. Pasos en un experimento de microarray de dos colores (izquierda) y de un color (derecha) (Sánchez et al., 2012).

En esta tesis se han utilizado microarrays de oligonucleótidos de un color, *Gene Chips* de *Affymetrix*. Una vez comentados los diferentes tipos de microarrays de expresión que existen, a continuación, detallaremos brevemente el proceso que se sigue en un experimento de este tipo (Figura 1.4). En primer lugar, se realiza la extracción del ARNm de las muestras a procesar, muestras problema. Este paso es común en el caso de arrays de dos colores como en el de un color. La calidad y cantidad del ARNm obtenido ha de ser

controlado ya que puede influir directamente en la precisión final de los resultados. El ARNm es una molécula que se degrada fácilmente por enzimas habitualmente presentes en la muestra, por lo que se transforma en una molécula más estable, el ADNc, que contiene la misma información. Posteriormente, el ADNc vuelve a transformarse en ARNc para continuar con el proceso. La cantidad inicial de ARNc es amplificada utilizando enzimas y cebadores específicos. Después el ARNc es marcado con una molécula fluorescente y fragmentado en trozos más pequeños que se puedan unir a las sondas fijadas en el array, mediante el proceso de hibridación. El array es iluminado mediante un láser y se mide la intensidad de la fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de ARNm de cada gen presente en la muestra inicial y al grado de asociación con la sonda o grupo de sondas correspondientes.

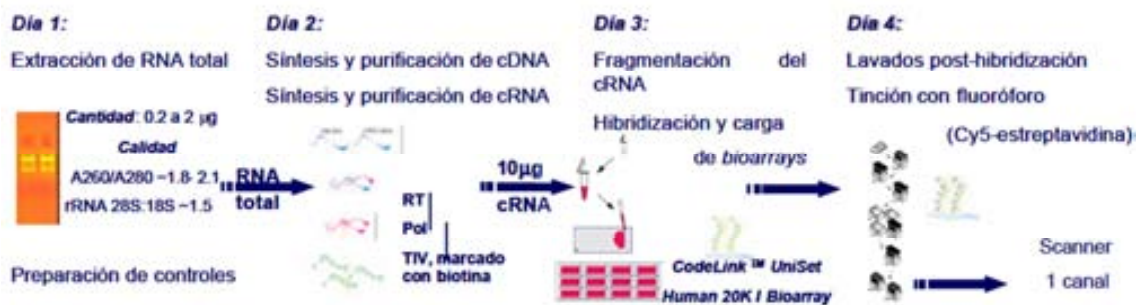


Figura 1.4. Experimento de arrays de un color (Barrero, 2005).

Esta técnica genera un volumen enorme de resultados y es imprescindible aplicar los métodos adecuados que permitan extraer la información que se genera (Wang et al., 2009). El manejo de datos requiere el uso de sistemas bioinformáticos complejos y métodos estadísticos actualizados para procesar la información. Los datos sufren un proceso de control de calidad y normalización previo al análisis que puede realizarse de diferentes maneras. El análisis de los datos propiamente dicho pretende encontrar genes diferencialmente expresados entre dos o más condiciones. En este análisis se dispone de diferentes estrategias y el reto más importante es la gran cantidad de comparaciones que se generan y por tanto la detección de los falsos positivos mediante diferentes técnicas de corrección de comparaciones múltiples. La determinación de los genes diferencialmente expresados se basa finalmente en diferencias en el nivel de expresión (*fold-change*) entre

condiciones, en los valores de significación (*p-valor*) de estas diferencias obtenidos a partir de modelos estadísticos y en parámetros similares.

Una vez obtenidos aquellos genes diferencialmente expresados entre condiciones se inicia el análisis funcional de los datos en el que el objetivo será proponer aquellos mecanismos o vías metabólicas implicadas en los cambios observados en las diferentes condiciones estudiadas. Existen diferentes aproximaciones que permiten obtener esta información y este es un campo en constante evolución. Una de las aproximaciones más populares y estandarizadas es el uso de la ontología de genes (GO, <http://www.geneontology.org/>) para clasificar los genes diferencialmente expresados (Khatri y Draghici, 2005). Los principios de organización de la GO tienen como base la idea de que un gen tiene una o más funciones moleculares, usadas en uno o más procesos biológicos y puede asociarse a uno o más componentes de la célula. A partir del conocimiento de los términos de la GO y de atribución de éstos a los datos de microarrays, se pueden hacer listas de vías en la que están implicados los genes diferencialmente expresados o se pueden visualizar las vías metabólicas que están siendo modificadas mediante el uso del llamado enriquecimiento (Hung et al., 2012). Este método realiza análisis estadísticos para determinar si los genes diferencialmente expresados forman parte de alguna vía metabólica “enriquecida” más allá de lo que sería esperable por azar. Además del uso de la GO existen las aproximaciones mediante el uso de análisis de rutas metabólicas (pathway analysis) o de interacciones y redes de genes (network analysis) que son mucho más informativas y completas pero que requieren un mayor dominio de las herramientas disponibles (Shoemaker y Panchenko, 2007; Khatri et al., 2012). Un último paso sería el estudio de hipótesis concretas utilizando los datos obtenidos. Todas estas técnicas están en continuo desarrollo y mejora y deben entenderse como herramientas complementarias para un mismo fin. En todos estos procesos existe un punto clave que puede limitar los resultados obtenidos, la calidad y número de genes anotados para el genoma de la especie estudiada, esto es la calidad y cantidad de información biológica asociada a secuencias concretas de cada genoma. En el caso de especies domésticas, la anotación es ciertamente mejor que en el caso de la mayoría de especies salvajes, sin embargo, la anotación en especies como el pollo aún es mucho peor que en el caso de las especies principales como los humanos, el ratón o la rata.

Finalmente, a modo de resumen las principales limitaciones de los microarrays son los siguientes:

1. Aunque se puedan estudiar muchos genes a la vez, se hace con mucho menos detalle y más ruido (sobretudo por hibridación no específica) (Wang et al., 2009).
2. La anotación incorrecta o incompleta de secuencias del genoma tanto humano como de otras especies da lugar a errores en el microarray ya que no se podrán identificar mARNs ausentes en las bases de datos (Wang et al., 2009).
3. Aunque cada vez este es un inconveniente menor, es una técnica cara y por lo tanto, no ha podido incorporarse como análisis rutinario.
4. En cuanto a las limitaciones técnicas, es importante destacar la falta de reproducibilidad entre estudios. La variabilidad de los parámetros implicados debería ser mínima, de manera que la detección de cambios en la expresión de los genes pudieran atribuirse exclusivamente a la propia muestra (Sánchez-Pla et al., 2012).
5. El tratamiento y análisis de los datos es complejo y existen multitud de métodos disponibles. La inadecuada aplicación de la metodología estadística puede dar lugar a problemas de falsos positivos y negativos.

Por todo lo anterior y debido a la dificultad de estandarizar los estudios de microarrays, en el año 2005 se puso en marcha un proyecto denominado *Microarray Quality Control Project* (MAQC) promovido para investigar la fiabilidad y utilidad de la técnica. El objetivo final del proyecto es la elaboración de una guía de referencia que estandarice el uso del microarray (<http://www.fda.gov/nctr/science/centers/toxicoinformatics/maq>) (Shi et al., 2006, 2010). Todas estas limitaciones han dado paso a otras tecnologías denominadas en su conjunto *Next Generation Sequencing*, secuenciación de última generación o secuenciación masiva (NGS) y que pueden ser aplicadas en el ámbito de la transcriptómica. En concreto, para los estudios de transcriptómica se utiliza la técnica RNA-Seq que se caracteriza por utilizar estas plataformas de NGS y que se explicará más adelante. Las tecnologías de NGS han empezado a asentarse a partir de 2007 teniendo un crecimiento exponencial hasta 2011

(Perdacher, 2011) y por supuesto hasta ahora, y es por ello por lo que no han sido utilizadas en nuestros experimentos, ya que nuestro trabajo de investigación forma parte del proyecto CYCIT (AGL2007-65898-C02) cuya memoria fue descrita en 2006.

1.2.4.3.1. Microarrays en pollo

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios utilizando microarrays en diferentes especies, sobretodo, en humanos, ratones, ratas y en menor proporción en pollo y otras especies domésticas. En la búsqueda bibliográfica realizada se ha encontrado un total de 50.000 artículos, aproximadamente, sobre microarrays de los cuales, 17.306 pertenecen a humana, 5.552 artículos tratan sobre microarrays en ratón, 5.698 tratan sobre microarrays en rata y solo 385 artículos se centran en pollos. En cuanto a los artículos de microarrays hallados en la bibliografía en estas especies relacionados con nutrición, se han encontrado 271 artículos en humana, 411 en ratón, 223 en rata y 25 en pollo. Estos datos nos indican, que el número de estudios realizados en humana usando microarrays es muy superior al de otras especies y que dentro de cada especie, el porcentaje de estudios enfocados a nutrición no supera el 10% (1,6% de los ensayos en humana, 7,4% en ratón, 4% en rata y 6,4% en pollo). En la mayoría de especies, el uso de microarrays se ha enfocado sobre todo al estudio de enfermedades. Esto se debe, en parte, al interés de la investigación en el campo de la prevención y desarrollo de enfermedades humanas pero también al hecho de que el microarray detecta mejor diferencias de expresión entre individuos sanos y afectados por diversas patologías, que no entre individuos sanos a los que se les somete a otro tipo de variaciones que suponen menor variación. En los estudios relativos a la nutrición, los animales, y especialmente el ratón, suelen utilizarse como modelo experimental. Esto es así, probablemente, porque en el caso de los animales y especialmente rata, ratón y pollo podemos controlar su genética, el manejo y especialmente su alimentación, se puede controlar la ingestión evitando así errores que se arrastrarían en humana, en los que existe más variabilidad y es difícil controlar todos los factores externos; además, son experimentos más económicos y que permiten una extrapolación de los resultados. A continuación comentamos, por especie, los estudios sobre microarrays que incluyen lípidos como base de la dieta (Figura 1.5):

Humanos: 88 artículos. De los cuales, 36 artículos están relacionados con dietas basadas en alto contenido en grasa (40-50% de kilocalorías de la dieta procede de la grasa), 2 artículos se encuentran relacionados con AGS, 1 artículo se encuentra relacionado con AGMI, 9 artículos están relacionados con AGPI n-3, 4 artículos relacionados con AGPI n-6 y 5 artículos relacionados con ácido linoleico conjugado (ALC).

Ratón: 254 artículos. De los cuales, 160 artículos están relacionados con dietas basadas en alto contenido en grasa (14-60% de las kilocalorías de la dieta procede de la grasa), 2 artículos se encuentran relacionados con AGS, 4 artículos están relacionados con AGMI, 15 artículos están relacionados con AGPI n-3, 8 artículos relacionados con AGPI n-6 y 7 artículos están relacionados con ALC.

Rata: 79 artículos. De los cuales, 37 artículos relacionados con dietas basadas en alto contenido en grasa (40-55% de las kilocalorías de la dieta procede de la grasa), 1 artículo se encuentra relacionado con AGS, 1 artículo está relacionado con AGMI, 18 artículos se encuentran relacionados con AGPI n-3, 9 artículos relacionados con AGPI n-6 y 1 artículo está relacionado con ALC.

La Figura 1.5 muestra cómo en diferentes especies el factor lipídico más estudiado es el nivel de grasa de la dieta seguido del tipo de grasa consumida (humana 36 vs 21; ratón 160 vs 36; rata 37 vs 30). Dentro del tipo de grasa de la dieta, las familias de ácidos grasos más estudiadas han sido la n-3 y la n-6.

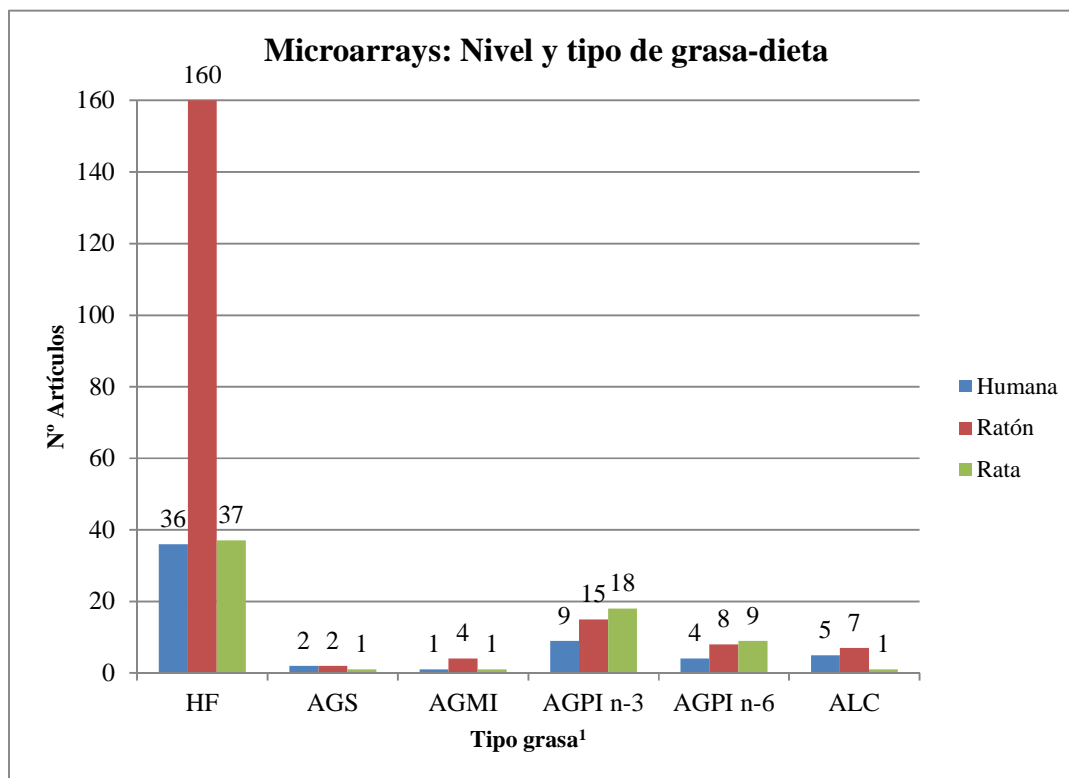


Figura 1.5. Número de artículos de microarrays relacionados con nivel y tipo de grasa de la dieta en humana, ratón, rata. ¹HF: Alto contenido en grasa; AGS: Ácido graso saturado; AGMI: Ácido graso monoinsaturado; AGPI n-3: Ácido graso poliinsaturado n-3; AGPI n-6: Ácido graso poliinsaturado n-6; ALC: Ácido linoleico conjugado.

Como ya se ha comentado anteriormente, en la bibliografía se han encontrado 385 artículos que utilizan microarrays en aves de producción. En las Tablas 1.3, y 1.4, se muestra el número de artículos más relevantes que usaron microarrays diferenciando el tipo de ave utilizada (pollos de carne, gallina de puesta y pavo), el área de estudio (microbiología, inmunología y patología en la Tabla 1.3, y nutrición en la Tabla 1.4) donde se describe el tratamiento, tipo de plataforma de array utilizada, y el número de genes diferencialmente expresados (mínimo, máximo y media) en los tejidos más representativos. Podemos observar como del total, 82 artículos están enfocados a microbiología (21,3%), 69 a inmunología (17,9%) y 29 a patología (7,5%). Estos estudios centrados en temas clínicos se diferencian de los estudios clásicos de genética en que en este caso se estudia la

expresión de un gen individual o número reducido de genes, mientras que con la tecnología de microarrays podemos tener la expresión de miles de genes, muchos de ellos no anotados y mejorar el conocimiento de las rutas metabólicas en las que participan.

Por otro lado, se han encontrado 25 artículos (6,49%) relacionados con el estudio de la nutrición/crecimiento en aves de producción (Tabla 1.4) que incluyen trabajos que comparan diferentes líneas genéticas y también estudian variaciones entre líneas magras y grasas. Dentro de estos artículos nos centraremos en las investigaciones que se han realizado utilizando microarrays en muestras de tejido adiposo, hígado y músculo, ya que son los tejidos utilizados en nuestro estudio experimental. En muestras de hígado, se han utilizado microarrays para dilucidar los genes implicados en la síntesis lipídica diferencialmente expresados entre líneas magras y grasas en pollos (Bourneuf et al., 2006; Wang et al., 2010). También se han visto diferencias de expresión génica en muestras de hígado de pollos de seis semanas de edad expuestos a bajas dosis de ácido perfluorooctanoico o de sulfonato de perfluorooctano, en comparación con un control salino (Yeung et al., 2007). Estos resultados muestran las diferencias de expresión génica que se producen en los pollos dependiendo de la dosis y el tipo de tóxico y observaron entre 240 y 480 genes, diferencialmente expresados, implicados en metabolismo lipídico, transporte de electrones e iones, transporte lipídico y proteólisis.

En tejido muscular, se ha realizado un estudio comparando pollos de carne y gallinas de puesta, para investigar los cambios en el perfil de expresión génica (Zheng et al., 2009). Se han encontrado 543 genes diferencialmente expresados relacionados con diferenciación y proliferación celular, degradación proteica y genes relacionados con crecimiento y desarrollo muscular entre otros. Este estudio nos da una idea sobre las diferencias en el desarrollo y crecimiento muscular entre dos tipos de aves seleccionadas de forma diferencial para producción de carne o producción de huevos.

Sibut et al. (2011) utilizaron dos líneas de pollo, grasa y magra, así como pollos resultantes de su cruzamiento, y compararon la expresión génica en muestras de músculo. En la comparación de línea grasa, con alto contenido en glucógeno, frente a línea magra, con bajo contenido en glucógeno, se encontraron 197 genes diferencialmente expresados. Mientras que al comparar los pollos con niveles más altos de glucógeno frente a los de nivel más bajo, resultantes del cruzamiento, se observaron 254 genes diferencialmente

expresados. La mayoría de estos genes están implicados en el metabolismo lipídico, en el metabolismo de carbohidratos y en el almacenamiento de glucógeno en músculo en el pollo. Otro estudio más reciente (Cui et al., 2012), ha proporcionado diferencias de expresión génica a lo largo del desarrollo de la pechuga, entre dos pollos de diferente origen genético: *Beijing-You* y *Arbor Acres* (broiler). Se tomó como punto de partida los resultados de expresión génica por medio de la técnica microarray, en muestras de pechuga del primer día de edad, cuando todavía no presentaba depósito de grasa intramuscular. Al contrastar los resultados de expresión de la pechuga en días posteriores (21, 42, 90 y 120 días de edad) se han encontrado 1.310 genes diferencialmente expresados en los pollos *Beijing-You* y 1.080 genes en los pollos *Arbor Acres*. De ellos, entre 34 y 70 genes están relacionados con metabolismo lipídico o procesos relacionados con el desarrollo muscular. Este estudio ayuda a la identificación de genes candidatos relacionados con metabolismo lipídico y desarrollo muscular.

Tal y como se observa en la Tabla 1.4, la revisión bibliográfica realizada, no ha encontrado trabajos que estudien de qué manera el consumo de diferentes tipos de AG provoca diferencias de expresión génica en pollos de carne utilizando la tecnología de microarrays. Todo lo anterior refuerza la novedad e interés de nuestro estudio experimental, utilizando diferentes tipos de AG en la dieta de los pollos de carne con el objetivo de determinar cómo afecta su consumo en la expresión génica de tejidos relacionados con el depósito de grasa (tejido adiposo), la síntesis endógena de lípidos (hígado) y en tejidos esqueléticos de mayor gasto energético (músculo).

Tabla 1.3. Número de artículos relacionados con microbiología, inmunología y patología en pollos de carne, gallina de puesta y pavo utilizando la tecnología de microarrays, donde se describe el área de estudio, tejidos, plataformas de microarrays y genes diferencialmente expresados.

Especie	Pollo								Gallina		Pavo	
	I	Hcs	H	B	M	S	T	C.E	I	O	I	H
Tejido¹												
Tratamiento												
Infección:												
<i>Campylobacter jejuni</i>	6	1	1	1	1						1	1
<i>Clostridium perfringens</i>	2			2							1	
<i>Eimeria species</i>	3								1			
<i>Enterococcus species</i>	3	2			1							
<i>Escherichia coli</i>				1								
<i>Pasteurella multocida</i>						1						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1		1		1				1	1		
<i>Salmonella entérica</i>	2				1				1		1	
<i>Salmonella enteritidis</i>	3									1		
<i>Staphylococcus aureus</i>			1									
<i>Avian infectious laryngotracheitis virus (ILTV)</i>								1				
<i>Avian influenza A virus (H9N2)</i>				2								
<i>Avian influenza viruses (H5N1)</i>								1				
<i>Marek's disease virus</i>			1	5								
Otros: infección e inmunidad	1				1		1	2				
Cáncer:										1		
Plataforma²												
<i>Affymetrix Genome Chicken Array</i>	1		1	2						1		
AVIELA	1								1			
<i>Chicken 44K oligo microarray Agilent</i>	4			3				2		1		
<i>Chicken immune microarray</i>				2								
CIELA	1											
<i>Gallus gallus Roslin/ARK CoRe Array Ready Oligo Set V1.0</i>							1					
Otros	14	3	3	4	5	1		2	2	1	3	1
Genes diferencialmente expresados												
Valor mínimo	2	12	9	5	9	40		213	74	27	4	
Media	119	100	84	675	21	179	108	1767	244	94	98	47
Valor máximo	564	262	269	4317	36	372		6290	350	135	297	

¹I: Intestino; Hcs: Heces; H: Hígado; B: Bazo; M: Músculo; S: Sangre; T: Tráquea; C.E: Células embrionarias; O: Ovario. ²AVIELA: *Avian IEL array*; CIELA: *Chicken intestinal IEL array*.

Tabla 1.4. Número de artículos relacionados con dieta, productividad y calidad de producto en pollos de carne y gallinas de puesta donde se describe el tejido, plataforma utilizada y genes diferencialmente expresados.

Especie	Pollo					Gallina		
	A	H	M	I	B	A	M	I
Tratamiento¹								
Dieta:								
Aminoácidos (Line et al., 2010)				1				
Ayuno 48 horas (Désert et al., 2008)		1						
Fitonutrientes (Kim et al., 2010; Lillehoj et al., 2011)				2				
Hormona de crecimiento (Wang et al., 2007b)		1						
<i>Mannan-oligosaccharides</i> (levadura) (Xiao et al., 2012)				1				
Medicamentos (Sarson et al., 2009)					1			
PC + PCSVM (Rebel et al., 2006)								1
Planta de Ajo (Kim et al., 2012)				1				
Tóxicos (PFOA, PFOS) (Yeung et al., 2007)		1						
Comparación estirpes o poblaciones:								
(Wang et al., 2006)	1					1		
(Zheng et al., 2009)			1				1	
(Cui et al., 2012)			1					
Comparación línea magra-grasa:								
(Bourneuf et al., 2006; Wang et al., 2010)		2						
(Wang et al., 2007a)	1							
(Sibut et al., 2011)			1					
Plataforma								
<i>Affymetrix Genome Chicken Array</i>	1	1	1	2			1	
<i>ARK-Genomics 20K chicken oligonucleotide</i>		1	1					
<i>Avian IEL array</i>				2				
<i>cDNA microarrays del instituto Beijing Genomics</i>	1	1				1		
<i>Chicken Gene Expression Microarray Agilent</i>			1	1	1			
Otros		2						1
Genes diferencialmente expresados								
Valor mínimo	42	13	197	62		42		
Media	113	1018	675	439	118	54	543	31
Valor máximo	230	3532	1310	1227		67		

¹PC: Pienso comercial; PCSVM: Pienso comercial suplementado con vitaminas y minerales; PFOA: Ácido perfluorooctanoico; PFOS: Sulfonato de perfluorooctano. ²A: Adiposo; H: Hígado; M: Músculo; I: Intestino; B: Bazo.

1.2.4.4. RNA sequencing: actualidad en técnicas de cuantificación de expresión génica

La técnica RNA-Seq se basa en la secuenciación masiva de ADNc mediante tecnologías de secuenciación de última generación (NGS). El objetivo final es la obtención de la información global sobre el contenido de transcritos de una muestra. Esta técnica permite medir, de forma eficiente, niveles de expresión génica, identificar eventos de *splicing* alternativo e identificar SNPs (Wang et al., 2009). Así, proporciona un poder similar al microarray pero se amplía la capacidad de analizar aspectos más difíciles, que el microarray no puede abarcar, tales como el *splicing* alternativo y el descubrimiento de nuevos transcritos. Además, el empleo de la NGS consigue una resolución muy superior a la de los microarrays, ya que no se limita a las mutaciones conocidas y necesita cantidades de ARN iniciales mucho menores (Sánchez-Pla et al., 2012).

Las plataformas de las tecnologías de NGS actualmente en el mercado son la pirosecuenciación (Roche-454), la secuenciación por síntesis o secuenciación *Solexa* (*Illumina*) y secuenciación por ligación o secuenciación *Solid* (*Applied Biosystems*). La Figura 1.6 describe las tres tecnologías (Sánchez-Pla et al., 2012). De manera resumida, las tres tecnologías incluyen un primer paso donde el ADN es fragmentado y ligado con adaptadores, un segundo paso que consiste en la amplificación clonal de los fragmentos originales (por PCR de emulsión o por “*Bridge PCR*”) y finalmente un tercer paso de secuenciación en paralelo utilizando los métodos de secuenciación comentados anteriormente (Sánchez-Pla et al., 2012). En la actualidad, las tres tecnologías son rápidas, proporcionan un alto rendimiento y los precios ya son competitivos incluso comparados con los del microarray (Medini et al., 2008; Schadt et al., 2010; Pareek et al., 2011).

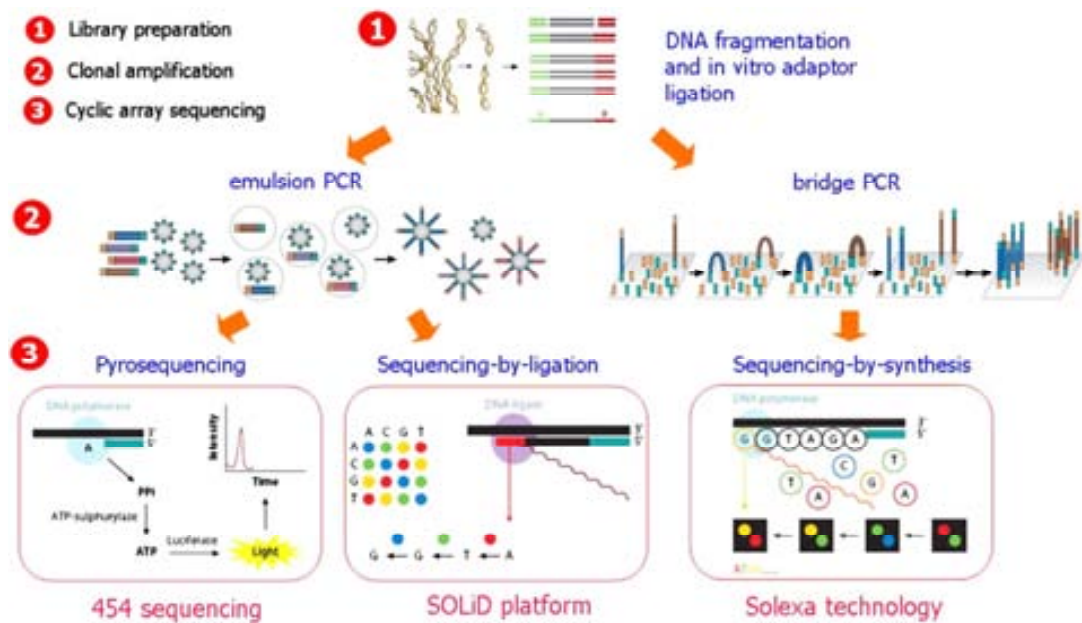


Figura 1.6. Tecnologías de secuenciación de última generación que dominan el mercado actualmente (Sánchez-Pla et al., 2012).

En la bibliografía se han encontrado 24 artículos que hablen sobre RNA-Seq y sobre tecnologías de secuenciación de última generación en pollos. La pirosecuenciación e *Illumina* son las más utilizadas y están enfocadas al estudio de la secuenciación de transcriptomas, al descubrimiento de SNPs y a la identificación de ARNs no codificantes, mientras que *Solid* es la menos utilizada en general y se ha dirigido más al descubrimiento de SNPs.

1.3. Referencias bibliográficas

Afman, L. A., & Müller, M. (2012). Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 51(1), 63-70.

Ahn, D., Wolfe, F., & Sim, J. (2006). Dietary α -Linolenic acid and mixed tocopherols, and packaging influences on lipid stability in broiler chicken breast and leg muscle. *Journal of Food Science*, 60(5), 1013-1018.

Ajuyah, A., Hardin, R., & Sim, J. (1993a). Dietary antioxidants and storage affect chemical characteristics of ω -3 fatty acid enriched broiler chicken meats. *Journal of Food Science*, 58(1), 43-46.

Ajuyah, A., Hardin, R., & Sim, J. (1993b). Effect of dietary full-fat flax seed with and without antioxidant on the fatty acid composition of major lipid classes of chicken meats. *Poultry Science*, 72(1), 125-136.

Al-Khalifa, H., Givens, D., Rymer, C., & Yaqoob, P. (2012). Effect of n-3 fatty acids on immune function in broiler chickens. *Poultry Science*, 91(1), 74-88.

Asghar, A., Lin, C., Gray, J., Buckley, D., Booren, A., & Flegal, C. (1990). Effects of dietary oils and α -Tocopherol supplementation on membranal lipid oxidation in broiler meat. *Journal of Food Science*, 55(1), 46-50.

Ashwell, C. M. (2010). Nutrigenomics for poultry-new tools for maximizing performance.

Barrero, P. R. (2005). Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química Viva*, 4(3), 91-100.

Barroeta, A. C. (1989). Aportación al estudio de la utilización de materias grasas en alimentación aviar. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Bauman, D. E., Harvatine, K. J., & Lock, A. L. (2011). Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 31, 299-319.

Bilitewski, U. (2009). DNA microarrays: an introduction to the technology. *Microchip Methods in Diagnostics*, 509, 1-14.

Blanch, A. (1994). Valoració nutritiva de diferents matèries greixoses utilitzades a l'alimentació d'aus domèstiques. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Blanch, A., Barroeta, A. C., Baucells, M. D., & Puchal, F. (1995). The nutritive value of dietary fats in relation to their chemical composition. Apparent fat availability and metabolizable energy in two-week-old chicks. *Poultry Science*, 74(8), 1335-1340.

Blanch, A., Barroeta, A., Baucells, M., & Puchal, F. (2000). Effect of the nutritive value of dietary fats in relation to their chemical composition on fatty acid profiles of abdominal and skin fat in finishing chickens. *Archiv Für Geflügelkunde*, 64(1), 14-18.

Bou, R., Grimpa, S., Baucells, M. D., Codony, R., & Guardiola, F. (2006). Dose and duration effect of α -tocopheryl acetate supplementation on chicken meat fatty acid composition, tocopherol content, and oxidative status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5020-5026.

Bou, R., Guardiola, F., Tres, A., Barroeta, A., & Codony, R. (2004). Effect of dietary fish oil, alpha-tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poultry Science*, 83(2), 282-292.

Bourneuf, E., Hérault, F., Chicault, C., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., et al. (2006). Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene*, 372, 162-170.

Brennan, K., Crowds, C., Cantor, A., Pescatore, A., Barger, J., Horgan, K., et al. (2011). Effects of organic and inorganic dietary selenium supplementation on gene expression profiles in oviduct tissue from broiler-breeder hens. *Animal Reproduction Science*, 125(1), 180-188.

Burt, D. W. (2002). Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 96(1-4), 97-112.

Burt, D. W. (2005). Chicken genome: Current status and future opportunities. *Genome Research*, 15(12), 1692-1698.

Bustin, S., & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109, 365-379.

Casas, E. (2006). Application of genomics to identify genes influencing economically important traits in livestock. *Archivos Latinoamericanos De Producción Animal*, 14(1).

Chanmugam, P., Boudreau, M., Boutte, T., Park, R., Hebert, J., Berrio, L., et al. (1992). Incorporation of different types of n-3 fatty acids into tissue lipids of poultry. *Poultry Science*, 71(3), 516-521.

Cherian, G. (2007). Metabolic and cardiovascular diseases in poultry: Role of dietary lipids. *Poultry Science*, 86(5), 1012-1016.

Collin, A., Malheiros, R. D., Moraes, V. M., Van As, P., Darras, V. M., Taouis, M., et al. (2003). Effects of dietary macronutrient content on energy metabolism and

uncoupling protein mRNA expression in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 90(2), 261-270.

Corthésy-Theulaz, I., den Dunnen, J. T., Ferré, P., Geurts, J. M., Müller, M., van Belzen, N., & van Ommen, B. (2005). Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Annals of nutrition and metabolism*, 49(6), 355-365.

Cortinas, L. (2004). Niveles de ácidos grasos poliinsaturados Y α -tocoferol en el pienso de broilers: equilibrio entre composición lipídica y estabilidad oxidativa de la carne. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Corzo, A., Kidd, M., Dozier, W., Shack, L., & Burgess, S. (2006). Protein expression of pectoralis major muscle in chickens in response to dietary methionine status. *British Journal of Nutrition*, 95(04), 703-708.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2001). Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science*, 80(1), 71-78.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2002a). Dietary polyunsaturated fatty acids decrease fat deposition in separable fat depots but not in the remainder carcass. *Poultry Science*, 81(4), 512-518.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2002b). Nutrient and fatty acid deposition in broilers fed different dietary fatty acid profiles. *Poultry Science*, 81(10), 1533-1542.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2002c). Dietary linseed oil produces lower abdominal fat deposition but higher de novo fatty acid synthesis in broiler chickens. *Poultry Science*, 81(10), 1555-1562.

Cui, H. X., Liu, R. R., Zhao, G. P., Zheng, M. Q., Chen, J. L., & Wen, J. (2012). Identification of differentially expressed genes and pathways for intramuscular fat deposition in pectoralis major tissues of fast-and slow-growing chickens. *BMC Genomics*, 13(1), 213.

Dalma-Weiszhausz, D. D., Warrington, J., Tanimoto, E. Y., & Miyada, C. G. (2006). The affymetrix GeneChip platform: An overview. *Methods in Enzymology*, 410, 3-28.

Davis, C. D., & Milner, J. (2004). Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. *Mutation Research*, 551(1-2), 51-64.

Dawson, K. A. (2006). Nutrigenomics: Feeding the genes for improved fertility. *Animal Reproduction Science*, 96(3), 312-322.

De Hoog, C. L., & Mann, M. (2004). Proteomics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5, 267-293.

Deaton, J., McNaughton, J., Reece, F., & Lott, B. (1981). Abdominal fat of broilers as influenced by dietary level of animal fat. *Poultry Science*, 60(6), 1250-1253.

Désert, C., Duclos, M. J., Blavy, P., Lecerf, F., Moreews, F., Klopp, C., et al. (2008). Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. *BMC Genomics*, 9(1), 611.

Donaldson, W. E. (1979). Regulation of fatty acid synthesis. *Federation Proceedings*, 38(12), 2617-2621.

Donaldson, W. E. (1985). Lipogenesis and body fat in chicks: Effects of calorie-protein ratio and dietary fat. *Poultry Science*, 64(6), 1199-1204.

Dong, Z. (2000). Effects of food factors on signal transduction pathways. *Biofactors*, 12(1-4), 17-28.

Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., & Trent, J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 21, 10-14.

Emmans, G. (1994). Effective energy: A concept of energy utilization applied across species. *British Journal of Nutrition*, 71(06), 801-821.

Fébel, H., Mezes, M., Palfy, T., Herman, A., Gundel, J., Lugasi, A., et al. (2008). Effect of dietary fatty acid pattern on growth, body fat composition and antioxidant parameters in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), 369-376.

Ferrini, G. (2009). Efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre la cantidad y distribución de lípidos en el pollo de carne. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Ferrini, G., Baucells, M., Esteve-Garcia, E., & Barroeta, A. (2008). Dietary polyunsaturated fat reduces skin fat as well as abdominal fat in broiler chickens. *Poultry Science*, 87(3), 528-535.

Ferrini, G., Menoyo, D., Esteve-García, E., & Barroeta, A. C. (2005). Effect of ω 3 or saturated dietary fatty acids on lipid metabolism parameters in broiler chickens. In *Proc. 15th European Symposium of Poultry Nutrition, Balantofüred, Hungary* (pp. 541-543).

Fujita, R. (2007). Genómica y su aplicación en producción animal. *Archivos Latinoamericanos De Produccion Animal*, 15(S1), 67-68.

Fulton, J. (2012). Genomic selection for poultry breeding. *Animal Frontiers*, 2(1), 30-36.

García-Vallejo, F. (2004). La genómica nutricional: Un nuevo paradigma de la investigación de la nutrición humana. *Colombia Médica*, 35, 150-160.

Gautron, J., Nau, F., Mann, K., Guerin-Dubiard, C., Rehault, S., Hincke, M., et al. (2007). Molecular approaches for the identification of novel egg components. *World's Poultry Science Journal*, 63(01), 82-90.

Griffin, H. D., & Hermier, D. (1988). Plasma lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *Leanness in Domestic Birds*, 175-201.

Grompone, M. A., Guerra, J. F., Pazos, N. A., Méndez, E., Lucas, E., Jachmanián, I., et al. (1994). Fraccionamiento térmico de aceite de pollo. *Grasas y Aceites*, 45(6), 390-394.

Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Mollé, D., Désert, C., Croguennec, T., & Nau, F. (2006). Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3901-3910.

He, X., Yang, X., & Guo, Y. (2007). Effects of different dietary oil sources on immune function in cyclophosphamide immunosuppressed chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 139(3), 186-200.

Heller, M. J. (2002). DNA microarray technology: Devices, systems, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4(1), 129-153.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.

Hillier, L. D. W., Miller, W., Birney, E., Warren, W., Hardison, R. C., Ponting, C. P., et al. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432(7018), 695-716.

Hulan, H., Ackman, R., Ratnayake, W., & Proudfoot, F. (1989). Omega-3 fatty acid levels and general performance of commercial broilers fed practical levels of redfish meal. *Poultry Science*, 68(1), 153-162.

Hulan, H., Proudfoot, F., Ackman, R., & Ratnayake, W. (1988). Omega-3 fatty acid levels and performance of broiler chickens fed redfish meal or redfish oil. *Canadian Journal of Animal Science*, 68(2), 533-547.

Hung, J. H., Yang, T. H., Hu, Z., Weng, Z., & DeLisi, C. (2012). Gene set enrichment analysis: performance evaluation and usage guidelines. *Briefings in Bioinformatics*, 13(3), 281-291.

Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., & Speed, T. P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Research*, 31(4), e15-e15.

Kappes, S., Keele, J. W., Stone, R. T., McGraw, R. A., Sonstegard, T. S., Smith, T., et al. (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7(3), 235-249.

Kaput, J., & Rodriguez, R. L. (2004). Nutritional genomics: The next frontier in the postgenomic era. *Physiological Genomics*, 16(2), 166-177.

Kato, H. (2008). Nutrigenomics: The cutting edge and asian perspectives. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(Suppl 1), 12-15.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., & Wahli, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(6), 2160-2164.

Khatri, P., & Drăghici, S. (2005). Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics*, 21(18), 3587-3595.

Khatri, P., Sirota, M., & Butte, A. J. (2012). Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS Computational Biology*, 8(2), e1002375.

Kim, D., Lillehoj, H., Lee, S., Jang, S., & Bravo, D. (2010). High-throughput gene expression analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral feeding of carvacrol, cinnamaldehyde, or capsicum oleoresin. *Poultry Science*, 89(1), 68-81.

Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lillehoj, E. P., & Bravo, D. (2012). Improved resistance to eimeria acervulina infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *British Journal of Nutrition*, 1(1), 1-13.

Klasing, K. (2007). Nutrition and the immune system. *British Poultry Science*, 48(5), 525-537.

Kogut, M. (2009). Impact of nutrition on the innate immune response to infection in poultry. *The Journal of Applied Poultry Research*, 18(1), 111-124.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2), 95-125.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.

Lillehoj, H., Kim, D., Bravo, D., & Lee, S. (2011). Effects of dietary plant-derived phytonutrients on the genome-wide profiles and coccidiosis resistance in the broiler chickens. *BMC Proceedings*, 5 (Suppl 4), S34.

Lin, C., Gray, J., Asghar, A., Buckley, D., Booren, A., & Flegal, C. (2006). Effects of dietary oils and α -tocopherol supplementation on lipid composition and stability of broiler meat. *Journal of Food Science*, 54(6), 1457-1460.

Lin, S. J., & Guarente, L. (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 241-246.

Line, J., Hiatt, K., Guard-Bouldin, J., & Seal, B. (2010). Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2), 198-202.

López-Ferrer, S. (1999). Enriquecimiento de la carne de pollo con ácidos grasos omega-3. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

López-Ferrer, S., Baucells, M., Barroeta, A., & Grashorn, M. (1999a). Influence of vegetable oil sources on quality parameters of broiler meat. *Archiv Für Geflügelkunde*, 63, 29-35.

López-Ferrer, S., Baucells, M., Barroeta, A., & Grashorn, M. (1999b). N-3 enrichment of chicken meat using fish oil: Alternative substitution with rapeseed and linseed oils. *Poultry Science*, 78(3), 356-365.

Maroufyan, E., Kasim, A., Ebrahimi, M., Loh, T., Hair-Bejo, M., & Soleimani, A. (2012). Dietary methionine and n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio reduce adverse effects of infectious bursal disease in broilers. *Poultry Science*, *91*(9), 2173-2182.

McKay, J. (2009). La genética en la avicultura comercial moderna. *Selecciones Avícolas*.

Medini, D., Serruto, D., Parkhill, J., Relman, D. A., Donati, C., Moxon, R., ... & Rappuoli, R. (2008). Microbiology in the post-genomic era. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(6), 419-430.

Müller, M., & Kersten, S. (2003). Nutrigenomics: Goals and strategies. *Nature Reviews Genetics*, *4*(4), 315-322.

Nam, K. T., Lee, H., Min, B. S., & Kang, C. W. (1997). Influence of dietary supplementation with linseed and vitamin E on fatty acids, α -tocopherol and lipid peroxidation in muscles of broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, *66*(1), 149-158.

Newman, R., Bryden, W., Kirby, A., Storlien, L., & Downing, J. (2005). Dietary n-3 and n-6 fatty acids alter avian glucose metabolism. *British Poultry Science*, *46*(1), 104-113.

Nguyen, D. V., Bulak Arpat, A., Wang, N., & Carroll, R. J. (2002). DNA microarray experiments: Biological and technological aspects. *Biometrics*, *58*(4), 701-717.

Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, *52*(4), 413-435.

Perdacher, M. A. (2011). Next-Generation Sequencing and its Applications in RNA-Seq. Theory part of the Bachelorthesis. Hagenberg.

Pinchasov, Y., & Nir, I. (1992). Effect of dietary polyunsaturated fatty acid concentration on performance, fat deposition, and carcass fatty acid composition in broiler chickens. *Poultry Science*, *71*(9), 1504-1512.

Puthongsiriporn, U., & Scheideler, S. (2005). Effects of dietary ratio of linoleic to linolenic acid on performance, antibody production, and in vitro lymphocyte proliferation in two strains of leghorn pullet chicks. *Poultry Science*, *84*(6), 846-857.

Rebel, J. M., Van Hemert, S., Hoekman, A. J., Balk, F. R., Stockhofe-Zurwieden, N., Bakker, D., et al. (2006). Maternal diet influences gene expression in intestine of

offspring in chicken (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(4), 502-508.

Rebolé, A., Rodríguez, M., Ortiz, L., Alzueta, C., Centeno, C., Viveros, A., et al. (2006). Effect of dietary high-oleic acid sunflower seed, palm oil and vitamin E supplementation on broiler performance, fatty acid composition and oxidation susceptibility of meat. *British Poultry Science*, 47(5), 581-591.

Renner, R., & Hill, F. (1961). Factors affecting the absorbability of saturated fatty acids in the chick. *The Journal of Nutrition*, 74(3), 254-258.

Reue, K. (1998). mRNA quantitation techniques: Considerations for experimental design and application. *The Journal of Nutrition*, 128(11), 2038-2044.

Rise, P., & Galli, C. (1999). Arachidonic and docosahexaenoic acids differentially affect the expression of fatty acyl-CoA oxidase, protein kinase C and lipid peroxidation in HepG2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 60(5), 367-370.

Rosebrough, R., McMurtry, J., & Vasilatos-Younken, R. (1999). Dietary fat and protein interactions in the broiler. *Poultry Science*, 78(7), 992-998.

Royan, M., Meng, G. Y., Othman, F., Sazili, A. Q., & Navidshad, B. (2011). Effects of conjugated linoleic acid, fish oil and soybean oil on PPARs (α & γ) mRNA expression in broiler chickens and their relation to body fat deposits. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 8581-8595.

Saadoun, A., & Leclercq, B. (1987). In vivo lipogenesis of genetically lean and fat chickens: Effects of nutritional state and dietary fat. *The Journal of Nutrition*, 117(3), 428-435.

Sánchez-Pla, A., Reverter, F., Ruíz de Villa, M. C., & Comabella, M. (2012). Transcriptomics: mRNA and alternative splicing. *Journal of Neuroimmunology*, 248(1-2), 23-31.

Sanz, M., Flores, A., Perez de Ayala, P., & Lopez-Bote, C. J. (1999). Higher lipid accumulation in broilers fed on saturated fats than in those fed on unsaturated fats. *British Poultry Science*, 40, 95-101.

Sanz, M., Lopez-Bote, C. J., Menoyo, D., & Bautista, J. M. (2000). Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and b-oxidation is higher in broiler chickens

fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. *The Journal of Nutrition*, 130, 3034-3037.

Sarson, A. J., Wang, Y., Kang, Z., Dowd, S. E., Lu, Y., Yu, H., et al. (2009). Gene expression profiling within the spleen of *Clostridium perfringens*-challenged broilers fed antibiotic-medicated and non-medicated diets. *BMC Genomics*, 10(1), 260.

Sato, K., & Akiba, Y. (2002). Lipoprotein lipase mRNA expression in abdominal adipose tissue is little modified by age and nutritional state in broiler chickens. *Poultry Science*, 81(6), 846.

Scaife, J., Moyo, J., Galbraith, H., Michie, W., & Campbell, V. (1994). Effect of different dietary supplemental fats and oils on the tissue fatty acid composition and growth of female broilers. *British Poultry Science*, 35(1), 107-118.

Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(R2), R227-R240.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.

Selvaraj, R. K., Shanmugasundaram, R., & Klasing, K. C. (2010). Effects of dietary lutein and PUFA on PPAR and RXR isomer expression in chickens during an inflammatory response. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157(3), 198-203.

Shi, L., Campbell, G., Jones, W. D., Campagne, F., Wen, Z., Walker, S. J., et al. (2010). The MicroArray quality control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nature Biotechnology*, 28(8), 827.

Shi, L., Reid, L. H., Jones, W. D., Shippy, R., Warrington, J. A., Baker, S. C., et al. (2006). The MicroArray quality control (MAQC) project shows inter-and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nature Biotechnology*, 24(9), 1151-1161.

Shoemaker, B. A., & Panchenko, A. R. (2007). Deciphering protein-protein interactions. Part I. experimental techniques and databases. *PLoS Computational Biology*, 3(3), e42.

Sibut, V., Hennequet-Antier, C., Le Bihan-Duval, E., Marthey, S., Duclos, M. J., & Berri, C. (2011). Identification of differentially expressed genes in chickens differing in muscle glycogen content and meat quality. *BMC Genomics*, *12*(1), 112.

Smink, W., Gerrits, W. J. J., Hovenier, R., Geelen, M. J. H., Verstegen, M. W. A., & Beynen, A. C. (2010). Effect of dietary fat sources on fatty acid deposition and lipid metabolism in broiler chickens. *Poultry Science*, *89*(11), 2432-2440.

Suárez, E., Burguete, A., & Mclachlan, G. J. (2009). Microarray data analysis for differential expression: A tutorial. *PR Health Sciences Journal*, *28*(2).

Surai, P., & Sparks, N. (2000). Tissue-specific fatty acid and alpha-tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poultry Science*, *79*(8), 1132-1142.

Swennen, Q., Janssens, G., Millet, S., Vansant, G., Decuyper, E., & Buyse, J. (2005). Effects of substitution between fat and protein on feed intake and its regulatory mechanisms in broiler chickens: Endocrine functioning and intermediary metabolism. *Poultry Science*, *84*(7), 1051-1057.

Tanaka, K., Ohtani, S., & Shigeno, K. (1983a). Effect of increasing dietary energy on hepatic lipogenesis in growing chicks. I. Increasing energy by carbohydrate supplementation. *Poultry Science*, *62*(3), 445-451.

Tanaka, K., Ohtani, S., & Shigeno, K. (1983b). Effect of increasing dietary energy on hepatic lipogenesis in growing chicks. II. Increasing energy by fat or protein supplementation. *Poultry Science*, *62*(3), 452-458.

Thallman, R. M. (2004). DNA testing and marker assisted selection. *Proceedings Beef Improvement*, *2528*, 20-25.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science Signalling*, *291*(5507), 1304-1351.

Vilà, B., & Esteve-García, E. (1996). Studies on acid oils and fatty acids for chickens. I. influence of age, rate of inclusion and degree of saturation on fat digestibility and metabolisable energy of acid oils. *British Poultry Science*, *37*, 105-117.

Villaverde, C. (2005). Interaction between dietary polyunsaturated fatty acids and vitamin e in body lipid composition and (alfa)-tocopherol content of broiler chickens. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Viveros, A., Ortiz, L., Rodríguez, M., Rebolé, A., Alzueta, C., Arijá, I., et al. (2009). Interaction of dietary high-oleic-acid sunflower hulls and different fat sources in broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1), 141-151.

Wang, H., Li, H., Wang, Q., Wang, Y., Han, H., & Shi, H. (2006). Microarray analysis of adipose tissue gene expression profiles between two chicken breeds. *Journal of Biosciences*, 31(5), 565-573.

Wang, H., Li, H., Wang, Q., Zhang, X., Wang, S., Wang, Y., et al. (2007a). Profiling of chicken adipose tissue gene expression by genome array. *BMC Genomics*, 8(1), 193.

Wang, H., Wang, Q., Zhang, X., Gu, X., Wang, N., Wu, S., et al. (2010). Microarray analysis of genes differentially expressed in the liver of lean and fat chickens. *Animal*, 4(04), 513-522.

Wang, X., Carré, W., Saxton, A., & Cogburn, L. (2007b). Manipulation of thyroid status and/or GH injection alters hepatic gene expression in the juvenile chicken. *Cytogenetic and Genome Research*, 117(1-4), 174-188.

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.

Xiao, R., Power, R., Mallonee, D., Routt, K., Spangler, L., Pescatore, A., et al. (2012). Effects of yeast cell wall-derived mannan-oligosaccharides on jejunal gene expression in young broiler chickens. *Poultry Science*, 91(7), 1660-1669.

Yau, J. C., Denton, J., Bailey, C., & Sams, A. (1991). Customizing the fatty acid content of broiler tissues. *Poultry Science*, 70(1), 167-172.

Yeh, Y. Y., Leveille, G. A., & Wiley, J. H. (1970). Influence of dietary lipid on lipogenesis and on the activity of malic enzyme and citrate cleavage enzyme in liver of the growing chick. *Journal of Nutrition*, 100, 917-924.

Yeung, L. W. Y., Guruge, K. S., Yamanaka, N., Miyazaki, S., & Lam, P. K. S. (2007). Differential expression of chicken hepatic genes responsive to PFOA and PFOS. *Toxicology*, 237(1), 111-125.

Zduńczyk, Z., & Pareek, C. S. (2009). Application of nutrigenomics tools in animal feeding and nutritional research. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 463, 44.

Zheng, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, N., Wang, X. J., & Zhu, D. (2009). Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens. *BMC Genomics*, *10*(1), 87.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

En la revisión bibliográfica se ha descrito como el nivel de inclusión de grasa y el perfil de AG grasos de la ración en pollos de carne afecta al contenido y a la composición lipídica del animal. Así, se ha demostrado que el perfil de AG de la dieta no sólo afecta a la composición lipídica del animal, sino que también puede producir cambios en la cantidad de grasa depositada. En particular, el consumo de raciones ricas en AGPI provoca una disminución de la grasa depositada con respecto a raciones ricas en AGS. Además, los AGPI n-3 de la dieta modifican las tasas de lipogénesis y β -oxidación endógena y tienen un efecto muy importante sobre la respuesta inmune del pollo.

La descripción de estos mecanismos se ha realizado hasta la fecha mediante el estudio de rutas metabólicas concretas y sus pasos limitantes. En esta tesis se plantea como objetivo general el uso de las tecnologías -ómicas, en particular *GeneChip* microarrays, para estudiar de una manera global los cambios producidos en el transcriptoma del pollo de carne al alimentarlo con diferentes AG. En particular se plantean los siguientes objetivos:

1. Determinar, mediante el uso de *GeneChip* microarrays, qué genes y las principales vías metabólicas, de las conocidas hasta el momento, se ven afectadas en el pollo de carne al ingerir raciones con distinto grado de insaturación (Capítulo 4).
2. Comprobar si los cambios en la expresión de determinados genes y vías metabólicas, descritos en experimentos previos, también se observan mediante el uso de *GeneChip* microarrays (Capítulo 4).
3. Estudiar la evolución con la edad del pollo y el tiempo de administración del pienso, del nivel de expresión de diferentes genes seleccionados a partir de los resultados obtenidos del experimento anterior y de la bibliografía existente en esta área para pollos de carne (Capítulo 5).

Para alcanzar estos objetivos, se diseñó un ensayo con pollos de carne alimentados con diferentes dietas. Se utilizaron 4 piensos experimentales, una dieta baja en grasa (0,5% de grasa añadida) y 3 raciones suplementadas con 10% de diferentes grasas: sebo, como fuente de AGS de cadena larga, aceite n-3 (70% aceite de linaza + 30% aceite de pescado) rico en AGPI n-3 y aceite de girasol, rico en AGPI n-6. Se desarrollaron dos estudios en paralelo, por un lado, se estudiaron las variaciones producidas por el consumo de las

diferentes dietas experimentales, en el transcriptoma de la grasa abdominal, el hígado y el músculo esquelético de pollos de carne de 50 días mediante el uso de *GeneChip* microarrays. Por otro lado y en paralelo, se estudió la evolución en el tiempo, de la expresión de genes seleccionados según la información obtenida en la prueba 1 y disponible en la bibliografía. Para ello se tomaron muestras de estos mismos tejidos (grasa abdominal, hígado y músculo) a lo largo del crecimiento, tras 0, 10, 21, 35 y 45 días de administración de los piensos experimentales.

CAPÍTULO 3

**INFLUENCIA DE LA GRASA DIETÉTICA EN LOS RENDIMIENTOS
PRODUCTIVOS, LA DIGESTIBILIDAD DE LA ENERGÍA Y LA
GRASA Y LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DEL HÍGADO,
MÚSCULO Y LA GRASA EN POLLOS**

**INFLUENCE OF DIETARY FAT ON PRODUCTIVE
PERFORMANCE, ENERGY AND FAT DIGESTIBILITY, AND
LIVER, MUSCLE AND FAT FATTY ACID COMPOSITION IN
BROILERS**

3.1. Introduction

As discussed in the literature review, the fatty acids (FA) profile of the diet influences not only the lipid profile of the chicken, but also the total fat deposition in the animal. The inclusion of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the diets reduces the amount of total body fat and abdominal fat pad (AFP) deposited compared to chickens fed diets with similar metabolizable energy levels but rich in saturated fatty acids (SFA) or monounsaturated fatty acids (MUFA). This fact has been extensively described by several authors (Sanz et al., 1999, 2000; Crespo y Esteve García, 2001, 2002a, b, c; Villaverde et al., 2005).

The objective of this chapter was to corroborate the known phenotypic effects of the different fat sources on broiler chicken productive performance and fat depots in the chickens that will be used for the following chapters.

3.2. Materials and Methods

The trial was performed at the animal facilities of the Servei de Granges i Camps Experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, Barcelona, Spain). The experimental procedures received the prior approval from the Animal Protocol Review Committee of the UAB, following the European Union Guidelines for the ethical care and handling of animals under experimental conditions.

Experimental Diets

Four experimental diets, based on wheat and soybean-meal, were formulated according to FEDNA recommendations (Fedna, 2008). A basal diet (diet B) with no added fat was supplemented with 10 % of tallow, rich in SFA (diet S), 10% of sunflower oil, rich in n-6 PUFA (diet N6), or 10 % of a blend of fish oil and linseed oil, rich in n-3 PUFA (diet N3). The experimental diets were provided from 14 to 50 days of life. Feed samples were taken at the beginning and throughout the experimental period for proximal Weende (AOAC 2005), crude energy, and FA analyses. Composition and FA profiles of the experimental diets are shown in Tables 3.1, 3.2, and Figure 3.1.

Table 3.1. Ingredient composition of chicken experimental diets, as fed bases

	B	S	N3	N6
Ingredient, %				
Wheat	68.80	55.30	55.30	55.30
Soybean 48	26.60	31.10	31.10	31.10
Tallow	-	10.00	-	-
Linseed oil	-	-	7.50	-
Fish oil	-	-	2.50	-
Sunflower oil	0.50	-	-	10.00
DL-Methionine, 99%	0.25	0.25	0.25	0.25
L-Threonine	0.03	-	-	-
L-Lysine	0.23	0.13	0.13	0.13
Calcium Carbonate	1.65	1.30	1.30	1.30
Dicalcium phosphate	1.14	1.25	1.25	1.25
Salt	0.40	0.32	0.32	0.32
Vitamin and mineral premix ¹	0.40	0.40	0.40	0.40

B: 0.5% Sunflower oil; S: 10% Tallow; N3: 10% linseed oil + fish oil (75:25); N6: 10 % Sunflower oil.

¹Provided per kg of diet: vitamin A: 6,000 IU; vitamin D3: 1,200 IU; vitamin E: 10 mg; vitamin K₃: 1.5 mg; vitamin B₁: 1.1 mg; vitamin B₂: 4 mg; vitamin B₆: 1.5 mg; vitamin B₁₂: 9 µg; folic acid: 4 mg; biotin: 50 µg; calcium pantothenate: 6 mg; nicotinic acid: 21 mg; choline: 360mg; Mn: 75 mg; Zn: 50 mg; I: 0.18 mg; Fe: 30 mg; Cu: 3 mg; Se: 0.2 mg; Co: 0.2 mg; Ethoxyquin: 16 mg.

Table 3.2. Nutrient analyzed composition of broiler chicken experimental diets, as fed bases

	B	S	N3	N6
Dry matter, %	88.50	89.75	90.11	89.97
Crude protein, %	19.72	19.46	19.98	19.18
Ether extract, %	2.70	11.42	11.46	11.44
Crude fiber, %	3.00	2.65	2.79	2.80
Ash, %	5.73	5.97	5.76	5.80
AME calculated, kcal/kg of feed	2826	3300	3300	3300
AME analyzed, kcal/kg of feed	3903	4476	4437	4331
Fatty acids, mg /g feed				
C14:0	0.26	3.23	0.25	0.24
C16:0	4.43	25.67	7.31	9.42
C16:1	0.00	2.34	0.17	0.14
C18:0	0.88	18.69	2.80	3.86
C18:1n9t + C18:1n9c	5.02	34.73	17.61	26.25
C18:2n6c	15.65	15.55	21.91	61.45
C18:3n3	1.27	1.74	35.82	1.67
EPA, eicosapentaenoic acid	0.00	0.00	9.13	0.12
DHA, docosaheaxaenoic acid	0.00	0.00	6.59	0.08

¹Analytical values are means of 4 determinations. Table shows only those fatty acids representing more than 1 mg fatty acid /g feed in any feed.

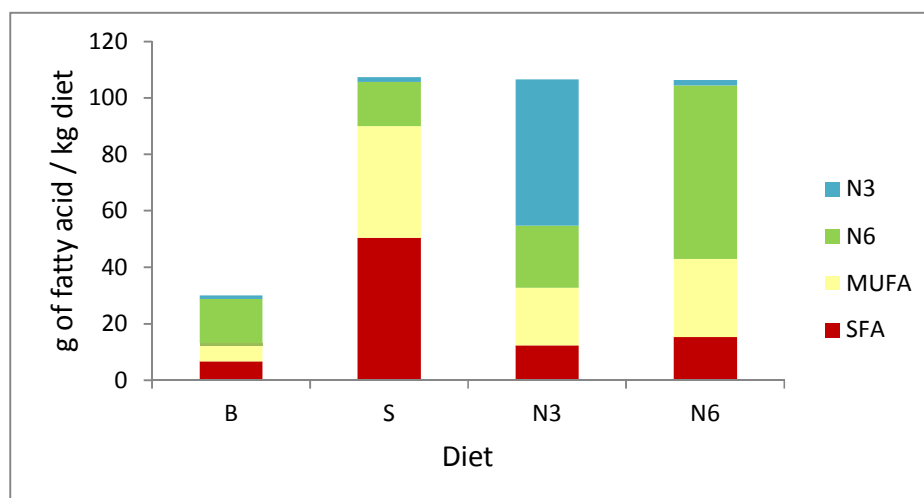


Figure 3.1. Fatty acid profile of the experimental diets, mg fatty acid /g feed. SFA = saturated fatty acids, MUFA = monounsaturated fatty acids, N3 = omega-3 fatty acids, N6 = omega-6 fatty acids.

Birds Management and Sampling

A total of 132 1-day-old female broiler chicks (Ross-308 strain), obtained from a commercial hatchery (Terra-Avant S.A., Anglés, Spain), were placed together in a temperature-controlled brooder with continuous lighting area. From hatch to Day 13, animals were given free access to water and commercial chick starter diet (19 % CP, 5 % EE, 3.7 % CF, 5.2 % Ash) containing sunflower oil as the main fat source. On their 14th day of age, 6 control birds randomly selected were killed by cervical dislocation, and 120 chicks (average BW = 406 ± 2.6 g) were randomly divided into 4 groups, 30 birds per experimental treatment, and placed in 6 cages (5 birds / cage; 6 replicates per treatment). Then, at 24 and 35 days of age, 1 chicken per cage (6 chickens per treatment per day) were killed. On day 35 of age 48 birds (2 birds / cage) were randomly selected and placed in individual cages (12 birds / treatment). Then, at 49, and 58 days of age, 6 chickens per treatment per day were killed. Throughout the study, feed and water were supplied ad libitum, and animals were raised under controlled conditions of light and temperature, as recommended by the breeder, and feed consumption and body weight were recorded to determine the average daily feed intake (ADFI), the average daily gain (ADG), and the feed to gain ratio (F:G).

On the chickens killed at 14, 24, 35, 49, and 58 days of age, abdominal fat (from the pro-ventriculus surrounding the gizzard down to the cloaca), liver, and left Sartorius muscle

were sampled, immediately frozen in liquid nitrogen, and samples were kept at -80°C until further analysis (see Chapters 4 and 5). On birds killed on day 49, AFP was weighted, and an extra sample of each organ was lyophilized and stored at -20 °C for crude fat determination and FA profile analysis presented in this chapter.

Digestibility Study

Digestibility study was carried out according to the European reference method (Bourdillon et al., 1990). Total excreta were collected for 48 h between days 42 and 44, in order to calculate the apparent metabolizable energy content of the experimental diets and total FA digestibility. Excreta were weighed, homogenized (Robot Coupe, Model Blixer 3B, France) and a representative sample (10 % of total excreta) was frozen at -20°C, lyophilized (Kinetic Thermal System, condenser Dura-Dry™, Model FD2055D0T000, USA), ground, and stored at -20°C until further analysis. Chemical composition of feed and excreta was determined according to the following methods of the AOAC (2005): dry matter content (934.01), ash content (942.05), crude protein (984.13), ether extract (920.39) and crude fiber (962.09). Gross energy (GE) was determined using an adiabatic bomb calorimeter (IKA-Kalorimeter system C4000, JankelKunkel; Staufen, Germany). The apparent metabolizable energy of the diets was calculated according to Villaverde et al. (2005). Apparent digestibility coefficients of FA were calculated as the difference between the amount ingested and the amount excreted, expressed as the percentage of the amount ingested.

Total Lipid and FA Composition

The FA profile of the experimental diets and the excreta were determined according to Sukhija and Palmquist (1988). FA composition of the liver, the AFP, and the muscle was analyzed as previously described (Carrapiso et al., 2000). Both techniques consist of a direct trans-esterification, lipid extraction, and FA methylation was achieved in only one step. Nonadecanoic acid (C19; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was added at the beginning of the procedure as an internal standard. The methyl esters extracts were injected in a Gas-Chromatograph (HP6890, Agilent, Walfbrom, Germany). FA were identified by matching their retention times of the simple peaks with those of their relative

standards (Supelco® 37 component FAME Mix, Sigma-Aldrich Biotechnology LP and Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA). Peak areas were integrated and converted to concentration with comparison with the internal standard-peak area. The formula: $FA_x = (\text{Area } FA_x / \text{Area } C19) \times (\mu\text{g } C19 / \text{sample weight})$ was used to calculate the FA concentration. FA are expressed as mg per g of tissue. Five chickens from each treatment were used.

Statistical Methods

Effects of the unsaturation degree on growth performance, digestibility, FA composition, and fat content were analyzed by one-way ANOVA using SAS 9.2. For growth performance (body weight, ADG, ADFI, and F:G), the cage was considered as the experimental unit, whereas for the rest of the parameters, the experimental unit was the chicken. Tukey's correction was used for multiple means comparison and alpha level used for determination of significance was 0.05.

3.3. Results

Table 3.3 shows productive performance results for the experimental period. Chickens fed diet S had higher BW than those fed diets B ($P < 0.001$) and N3 ($P = 0.002$). BW was also higher for chickens fed diet N6 and N3 compared to those fed B ($P = 0.001$ and 0.045). Chickens fed diet B also had the lower percentage of AFP compared to all other groups ($P < 0.001$ in all cases) and chickens fed diet N3 showed lower AFP than those fed diets N6 ($P = 0.01$) and S ($P = 0.003$).

Table 3.3. Productive performance of the chickens feed the experimental diets containing different fat amounts and sources from days 14 to 46 of age

Item	B	S	N3	N6	SEM	P-value
BW 14d, g	400	406	406	412	5.36	0.355
BW 46d, g	2779 ^c	3150 ^a	2933 ^b	3033 ^{ab}	40.8	<0.001
Abdominal fat pad, % of BW 46d	1.14 ^c	2.57 ^a	2.08 ^b	2.52 ^a	0.091	<0.001
ADG, g/animal/d	77.1 ^c	88.1 ^a	81.8 ^b	84.4 ^b	0.93	<0.001
ADFI, g/animal/d	147.9 ^b	156.5 ^a	142.2 ^c	140.0 ^c	1.35	<0.001
F:G, g/g	1.92 ^a	1.78 ^b	1.74 ^b	1.66 ^c	0.018	<0.001

BW: body weight, ADG: average daily gain, ADFI: average daily feed intake, F:G: feed to gain ratio, B: Basal diet, N3: omega 3 diet, N6: omega 6 diet, S: saturated diet, SEM: Standard error of the mean. Values presenting different letters within rows are significantly different (P value < 0.05).

The ADG was higher for animals fed diets S compared to those fed diets B ($P < 0.001$), N6 ($P = 0.035$) and N3 ($P < 0.001$), and for chickens fed N3 and N6 compared to those fed diet B ($P < 0.001$ in both cases). The ADFI was higher for chickens fed diet S compared to those fed all other diets ($P < 0.001$ in all cases), and for chickens fed B compared to those fed diets N6 ($P = 0.016$), and N3 ($P < 0.001$). As a results, chickens fed diet B showed the highest F:G, followed by chickens fed diets S and N3, and the lowest F:G ratio was the one for chickens fed diet N6.

Table 3.4 shows digestibility results for the experimental period. Apparent metabolizable energy (AME) did not show differences among diets, however digestibility of total fatty acids (TFA) and all FA families were affected by diet. Animals fed diets rich in PUFA showed higher digestibility of TFA than chicken fed diets S or B ($P < 0.001$ in all cases). Digestibility of SFA was higher in chickens fed diet N6 than in those fed diet B and S, and in chickens fed N3 and N6 diets than in those fed S ($P < 0.001$ in all cases). Digestibility of MUFA was higher in chickens fed diet N6 than in those fed diet B ($P < 0.001$) and N3 ($P = 0.029$), and in chickens fed S diet than in those fed B ($P < 0.001$). Digestibility of PUFA was higher in chickens fed diets N6 and N3 than in those fed diet B and S ($P = 0.001$ in all cases). In the case of N3 digestibility, chickens fed diet N3 showed higher digestibility than those fed diets B ($P < 0.001$), S ($P = 0.001$), and N6 ($P = 0.027$), and chickens fed diet N6 had higher digestibility than those fed diet B ($P = 0.006$). Finally, digestibility of N6 was higher in chickens fed diet N6 than in those fed diets B ($P < 0.001$), S ($P < 0.011$), and N3 ($P = 0.001$), and chickens fed diet N3 had higher digestibility than those fed diets B ($P = 0.017$) and S ($P = 0.041$).

Table 3.4. Digestibility of the metabolizable energy and fatty acids in experimental animals

Item	B	S	N3	N6	SEM	P value
AME	82.6	80.2	82.3	83.2	1.08	0.195
TFA	85.9 ^b	84.6 ^b	92.8 ^a	94.6 ^a	0.76	<0.001
SFA	86.3 ^b	77.4 ^c	89.1 ^{ab}	92.2 ^a	0.91	<0.001
MUFA	83.9 ^c	92.8 ^{ab}	92.2 ^b	95.0 ^a	0.67	<0.001
PUFA	86.5 ^b	87.3 ^b	93.6 ^a	95.0 ^a	0.75	<0.001
N3 PUFA	84.2 ^c	88.2 ^{bc}	95.1 ^a	90.2 ^b	1.16	<0.001
N6 PUFA	86.7 ^c	87.1 ^c	90.2 ^b	95.2 ^a	0.81	<0.001

AME: apparent metabolizable energy, TFA: total fatty acids, SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids, B: Basal diet, N3: omega 3 diet, N6: omega 6 diet, S: saturated diet, SEM: Standard error of the mean. Values presenting different letters within rows are significantly different (P value < 0.05).

Table 3.5 shows FA composition of muscle, AFP, and liver on animals killed on day 49 of age. No difference was found on the TFA content of any of the studied organs. However, FA profile was affected by diet. In muscle, SFA and MUFA were higher in those animals fed diet S than in those fed N3 ($P = 0.007$ and 0.003) and N6 ($P = 0.049$ and 0.035) diets. However, PUFA were higher in animals fed diet N6 compared to those fed diets B ($P = 0.012$) and S ($P = 0.007$). In AFP, chickens fed diets N6 and N3 showed lower concentrations of SFA and MUFA and higher concentrations of PUFA than those fed diets B and S (all differences showed p values < 0.001). Concerning liver, concentrations of SFA and MUFA showed high variability among animals and no differences were detected among treatments. Only PUFA showed higher concentrations for those animals fed diets N3 and N6 compared to those fed diets B ($P < 0.001$ and $= 0.006$) and S ($P < 0.001$ and $= 0.004$).

Table 3.5. Fatty acid composition of muscle, abdominal fat, and liver of experimental animals

	B	S	N3	N6	SEM	P-value
Muscle, mg of FA/g tissue						
TFA	53.1	67.2	43.8	63.7	9.36	0.269
SFA	18.1 ^{ab}	23.2 ^a	12.4 ^b	15.6 ^b	2.08	0.009
MUFA	21.6 ^{ab}	32.1 ^a	9.8 ^b	17.0 ^b	3.88	0.005
PUFA	13.4 ^b	11.9 ^b	21.6 ^{ab}	31.0 ^a	3.84	0.005
Abdominal fat, mg of FA/g tissue						
TFA	839	824	823	854	14.9	0.455
SFA	280 ^a	289 ^a	171 ^b	182 ^b	5.6	<0.001
MUFA	415 ^a	446 ^a	236 ^b	268 ^b	9.7	<0.001
PUFA	143 ^b	88 ^c	416 ^a	403 ^a	6.1	<0.001
Liver, mg of FA/g tissue						
TFA	154	161	214	176	29.8	0.522
SFA	64.9	64.5	88.3	68.0	13.21	0.544
MUFA	55.1	63.5	57.7	49.3	13.48	0.901
PUFA	34.9 ^b	33.5 ^b	67.8 ^a	58.9 ^a	4.33	<0.001

FA: fatty acids, TFA: total fatty acids, SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids, B: Basal diet, N3: omega 3 diet, N6: omega 6 diet, S: saturated diet, SEM: Standard error of the mean. Values presenting different letters within rows are significantly different (P value < 0.05).

3.4. Discussion

Phenotype changes expected to happen should be confirmed before proceeding in a microarray experiment. The results observed in chickens productive performance and composition in this experiment due to the different dietary fat sources were in agreement with the changes previously described in literature except for the fact that chickens fed diet N6 resembled more those fed diet S than those fed diet N3 in some aspects. Productive performance results showed that diet B induced completely different results in chickens than all other diets as expected. This diet, lower in energy and fat than all other diets, has been used in the past in different experiments by Crespo and Esteve-Garcia (2001, 2002a, b, c) and Ferrini et al., (2008) as a diet showing the minimum fat content as a control. It differs from the other experimental diets in two factors (fat and energy levels), thus discussion is more difficult, but otherwise it would be impossible to decrease fat to a minimum in diet B maintaining the high energy level required by chickens as in diets S, N3, or N6 for a optimal growth. Concerning the high fat diets, chickens fed diet N3 showed the expected lower ADG and AFP and it also showed a reduced ADFI and F:G ratio compared to chickens fed diet S. Chickens fed diet N6 also showed lower ADG, ADFI when compared to those fed diet S but they showed similar percentage of AFP. These differences among diets could be expected to some extent. Crespo and Esteve-Garcia studied the differences in productive performance and body composition among chickens fed isoenergetic diets with different sources of fat (tallow, olive oil, sunflower oil, linseed oil) in a series of experiments (Crespo and Esteve-Garcia, 2001, 2002a, b, c). In all cases animals fed linseed oil (N3 PUFA) showed lower percentage of AFP and better conversion than those fed tallow (SFA). However, chickens fed sunflower oil (N6 PUFA) showed reduced percentage of AFP and better conversion than those fed tallow only in some cases. On the other hand, Sanz et al., (1999, 2000) found consistent lower AFP in animals fed sunflower (N6 PUFA) than in those fed tallow or lard (SFA). However they found no difference in productive performance. Ferrini et al. (2008) and Newman et al. (2002) also found higher percentage of AFP when compared chickens fed diets rich in SFA to chickens fed diets rich in PUFA, both N3 and N6. However, these differences were only present in skin for chickens fed diets rich N3 compared to those fed diets rich in SFA (Ferrini et al.,

2008). These effects have been also widely studied and reported in mice and humans for CLA, DHA, and EPA compared to diets rich in SFA (Li et al., 2008).

Despite the higher percentage of AFP shown by chickens fed diets rich in SFA compared to those fed diets rich in PUFA, Villaverde et al. (2004) demonstrated how TFA digestibility decreases as diet saturation increases. In addition, adding PUFA to chicken diets affects digestibility of all FA types, and not only PUFA. Ferrini et al. (2008) showed lower digestibility of all FA types comparing chickens fed SFA to chickens fed PUFA. In our experiment, TFA and the different FA types digestibility was lower for chickens fed the diet rich in SFA compared to those fed PUFA rich diets, as expected. Ferrini et al. (2008) also showed lower percentage of AME, which was observed only numerically in the present study and by Crespo and Esteve-Garcia, 2002c.

The different tissues studied had different FA profiles depending on the different diets. Muscle and AFP showed clear changes in all FA types as shown by Crespo and Esteve-Garcia (2001). In particular, muscle and AFP of animals fed diet S showed higher concentrations of SFA and MUFA, and lower concentrations of PUFA. On the other hand, liver showed a much higher variability among samples and did not show that many differences among diets. Only PUFA showed changes in liver FA profile. Crespo and Esteve-Garcia (2002b) also found liver to be less affected by dietary fats than other studied tissues. Poureslami et al. (2010) also studied tissue FA profile but they used diets different only in part of the FA. In their results enrichment found was similar although fat efficiency deposition was better for PUFA enriched diets as for other mixed fat sources used in other experiments.

In this section we have demonstrated the expected phenotype changes in productive performance, digestibility and AFP, muscle, and liver composition in the animals sampled for the analysis to be presented in the following two chapter. Thus, it is now justified to proceed with the gene transcription data.

3.5. References

Animal, F. E. D. N., Lázaro, R., & Mateos, G. G. (2008). Necesidades nutricionales para avicultura: Pollos de carne y aves de puesta. *Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal*. Madrid, Spain.

AOAC, (2005). *Official methods of analysis of AOAC international*. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, USA.

Bourdillon, A., Carré, B., Conan, L., Francesch, M., Fuentes, M., Huyghebaert, G., ... & Wiseman, J. (1990). European reference method of in vivo determination of metabolisable energy in poultry: reproducibility, effect of age, comparison with predicted values. *British Poultry Science*, *31*(3), 567-576.

Carrapiso, A. I., Luisa Timon, M. A., Jesus Petron, M. A., Tejada, J. F., & García, C. (2000). In situ transesterification of fatty acids from Iberian pig subcutaneous adipose tissue. *Meat Science*, *56*(2), 159-164.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2001). Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science*, *80*(1), 71-78.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2002a). Dietary polyunsaturated fatty acids decrease fat deposition in separable fat depots but not in the remainder carcass. *Poultry Science*, *81*(4), 512-518.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2002b). Dietary linseed oil produces lower abdominal fat deposition but higher de novo fatty acid synthesis in broiler chickens. *Poultry Science*, *81*(10), 1555-1562.

Crespo, N., & Esteve-Garcia, E. (2002c). Nutrient and fatty acid deposition in broilers fed different dietary fatty acid profiles. *Poultry Science*, *81*(10), 1533-1542.

Ferrini, G., Baucells, M. D., Esteve-Garcia, E., & Barroeta, A. C. (2008). Dietary polyunsaturated fat reduces skin fat as well as abdominal fat in broiler chickens. *Poultry Science*, *87*(3), 528-535.

Li, J. J., Huang, C. J., & Xie, D. (2008). Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Molecular Nutrition & Food Research*, *52*(6), 631-645.

Newman, R. E., Bryden, W. L., Fleck, E., Ashes, J. R., Buttemer, W. A., Storlien, L. H., & Downing, J. A. (2002). Dietary n-3 and n-6 fatty acids alter avian metabolism: metabolism and abdominal fat deposition. *British Journal of Nutrition*, 88(01), 11-18.

Poureslami, R., Raes, K., Turchini, G. M., Huyghebaert, G., & De Smet, S. (2010). Effect of diet, sex and age on fatty acid metabolism in broiler chickens: n-3 and n-6 PUFA. *British Journal of Nutrition*, 104(02), 189-197.

Sanz, M., Flores, A., Perez de Ayala, P., & Lopez-Bote, C. J. (1999). Higher lipid accumulation in broilers fed on saturated fats than in those fed on unsaturated fats. *British Poultry Science*, 40, 95-101.

Sanz, M., Lopez-Bote, C. J., Menoyo, D., & Bautista, J. M. (2000). Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and b-oxidation is higher in broiler chickens fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. *The Journal of Nutrition*, 130, 3034-3037.

Sukhija, P. S., & Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6), 1202-1206.

Villaverde, C., Baucells, M. D., Cortinas, L., Hervera, M., & Barroeta, A. C. (2005). Chemical composition and energy content of chickens in response to different levels of dietary polyunsaturated fatty acids. *Archives of Animal Nutrition*, 59(4), 281-292.

Villaverde, C., Cortinas, L., Barroeta, A. C., Martín-Orúe, S. M., & Baucells, M. D. (2004). Relationship between dietary unsaturation and vitamin E in poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88(3-4), 143-149.

CAPÍTULO 4

**INFLUENCIA DE LA GRASA DIETÉTICA EN EL
TRANSCRIPTOMA DEL HIGADO, MÚSCULO Y GRASA EN
POLLOS DE CARNE**

**INFLUENCE OF DIETARY FAT ON LIVER, MUSCLE, AND FAT
TRANSCRIPTOME IN BROILERS**

4.1. Introduction

The study of gene expression as affected by different diets has clarified many of the effects that nutrients have on metabolism. Quantifying the expression of particular genes using classical methods such as qPCR has been very useful so far and it is still needed in many experimental approaches. However, these techniques are not as efficient as new –omic techniques when it comes to explore general changes in gene expression, or new pathways not described previously. Omic techniques have been already used in chickens in some particular fields of interest such genetics, in order to identify markers for growth or fatness, and in pathology, in order to understand pathogen's mechanisms of infection and the immune response triggered. Experiments using –omic techniques to study the effects of different diets on the transcriptome of chickens are still very few. One of the most studied aspects in this field are the effects of fasting on the chicken transcriptome. However there is no information on the effects of different dietary fat sources on chicken transcriptome.

Thus, the aim of this study was to use GeneChip microarray technology as an –omic approach, in order to compare gene expression patterns in abdominal fat, liver, and skeletal muscle of chickens fed diets varying in their FA profile.

4.2. Materials and Methods

Samples, RNA extraction, and microarray analysis and hybridization

Samples were collected as described in chapter 3. Samples from 3 female broiler chickens per treatment from those killed on day 49 of age were used in this experiment. Total RNA was extracted from 150 to 200 mg of bulk abdominal adipose tissue, 30 mg of liver, and 50 mg of muscle of thigh as described by Ribopure Kit (Ambion, Inc., Austin, TX, USA). The total RNA purified was quantified on a Nanodrop 1000A Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and their quality was analyzed by capillary electrophoresis using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Complementary DNA was synthesized by reverse transcription with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Microarray targets were prepared with 15 µg of total RNA from the different samples. RNA labelling, hybridization, and scanning were conducted by a commercial Affymetrix array service (Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain). Reverse transcription of RNA and synthesis of biotin-labelled cRNA with one round of amplification were carried out following the standard Affymetrix one-cycle protocol according to the manufacturer's instructions. Samples were hybridized to the Genechip Chicken Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) as described in the Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual.

Microarray data analysis

Data analysis was performed with Bioconductor (Gentleman et al., 2004) implemented in R 2.6.0 (<http://cran.r-project.org/>). The images were processed with Microarray Analysis Suite 5.0 (affimetrix, USA) in which the scanned images were assessed by visual inspection, and then median signals were read and saved as CEL files.

The raw data were background corrected, normalized, and converted to expression-level data using the Robust Multichip Average (RMA) algorithm (Irizarry et al., 2003). Previous to any analysis data were submitted to non-specific filtering to remove low signal genes (genes whose mean signal per group was below the 66 percentile of all signals) and low variability genes (genes whose standard deviation was below the 66 percentile of all standard deviations). This left 8440 genes to be included in the analysis. The selection of differentially expressed genes between conditions was based on a linear model analysis with empirical Bayes moderation of the variance estimates following the methodology developed by Smyth (Smyth et al., 2004). Significance threshold was set to a false discovery rate (FDR, Benjamini and Hochberg, 1995) of 0.05.

Annotation of those genes differentially expressed depending on the diets was explored using an automatic tool based on BLAST (McCarthy et al., 2006). Differentially expressed mRNAs with significant similarities to transcripts in databases available on BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were selected for functional classification using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; Huang et al., 2009) and agriGO (Du et al., 2010).

Quantitative Real time PCR

Real time RT-PCR was used to confirm the differentially expressed genes from the data obtained by cDNA microarrays. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) was considered to be a stably expressed house keeping gene, and was used as an interference gene. Gene-specific primers were designed according to the mRNA sequences in the GenBank. The primer sequences and GenBank accession No. are showed in Table 4.1. Reverse transcriptions were performed according to High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For the first strand cDNA synthesis, the 20 μ l reaction mixture included 5 μ l total RNA (200 ng/ μ l), 2 μ l 10xRT buffer (1.0 mL), 0.80 μ l 25xdNTP Mix (100 mM), 2.0 μ l 10x RT Random Primers (1.0 mL), 1 μ l MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/ μ l), 1 μ l RNase Inhibitor (100 μ l), 9.2 μ l Nuclease-free H₂O. The reaction mixture was incubated for 10 minutes at 25 °C, heated at 37°C for 120 minutes and then heated at 85 ° C for 5 minutes. Reactions were carried out in FastStart Universal SYBR Green Master (Rox). For these genes, the thermal profile consisted of a denaturation step at 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Resulting qPCR data were Log₂ transformed, analyzed using by ANOVA using the GLM procedure of SAS 9.2, and compared to expression data from microarray by linear regression. Alpha level for determination of significance was 0.05.

Table 4.1. The primer sequences and GenBank accession No.

Gene	Gene title	Accession No	Primer sequence 5' to 3'
CLU	Clusterin	AF119370	F: CAGCAGCCTCCTGGATCAG R: GAGTTTTGGAGAACACCGTGGT
ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	NM_205251	F: AATACCGCAGGTTTGAGAAGGA R: TTGAACAGAGGATTATCAGCTTCGT
FABP7	Fatty acid binding protein 7, brain	X65459	F: GCTTTAAACTCGGCGAGGAA R: CAGGGTCACAACCTGATTTGCA
LIPA	Lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Wolman disease)	AJ719682	F: GAGGATGGGTACATTCTTTCTGTAAAC R: AGCAGGCCTTGGACCTTTG
LITAF	Lipoplysaccharide-induced TNF factor	NM_204267	F: CTTTTGTGCTGTTTATTTTCAGTCATAT R: CACATTGATTCTACTGTCTCCTCAT
ME3	Malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	XM_003640570	F: CCCTGGCCAAGGAAACAAC R: GTCACCTCAGCAGCAATAGACTGT
CYP2C18	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18	M25469	F: CAGAAAAATTTGACCCAGGACACT R: AGATGCGTTTTTCTGCAGAGA
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	NM_205471	F: GCCGAGCACAAAAGGAAAAATTAT R: AAATTGTAGCCAAAAAATGGTCTCA
FABP4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	NM_204290	F: CTACCTGGCCTGACAAAATGTG R: AGCCATCTCCTGGTAGCAAAC
GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	XM_422110	F: AAGAGAAAAATATGCTTGAGAAGTTTCC R: TTCGCCCTCGTAGCAGATCT
GSTA3	Glutathione S-transferase alpha 3	L15386	F: CCCAGTCTTTGAGAAGGTTTTGAA R: CCGCTAAAATGGTTTCCAGTAAA
LPL*	Lipoprotein lipase	NM_205282	F: GAAGAGGGGAGGTGCCAAGA R: TCACAGGGATGAACAGACTCCAT
PPARA*	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	AF163809	F: GCCATCATTGCTGTGGAGAT R: AGTGCAGTTTCAGTACATGCACAAT
PPARG*	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001001460	F: GGGACAAGGCCTCTGGATTT R: TTGTTCTTCGAAAAAAGCCCTTA
FASN*	Fatty acid synthase	J03860	F: CGGGCAAAGACTCACAATGA R: TGCGGTGATCTCCTTCAATG
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	AJ132697	F: GGTCATCATGGACAGGACAG R: ACCCTTGAGTACACAGAGAGCTACAA

*Genes studied only in chapter 5.

4.3. Results

Figures 4.1 and 4.2 allow for general visualization of expression data. The heat map in figure 4.1 shows how each organ, abdominal fat, liver, and skeletal muscle, showed a characteristic expression pattern. Differences among diets were much lighter, although some differences in expression can easily be seen in the heat map. Thus, when all data was analyzed by hierarchical clustering, as shown in figure 4.2, samples formed 3 clear clusters by organ and separation by diets was only clear in abdominal fat.

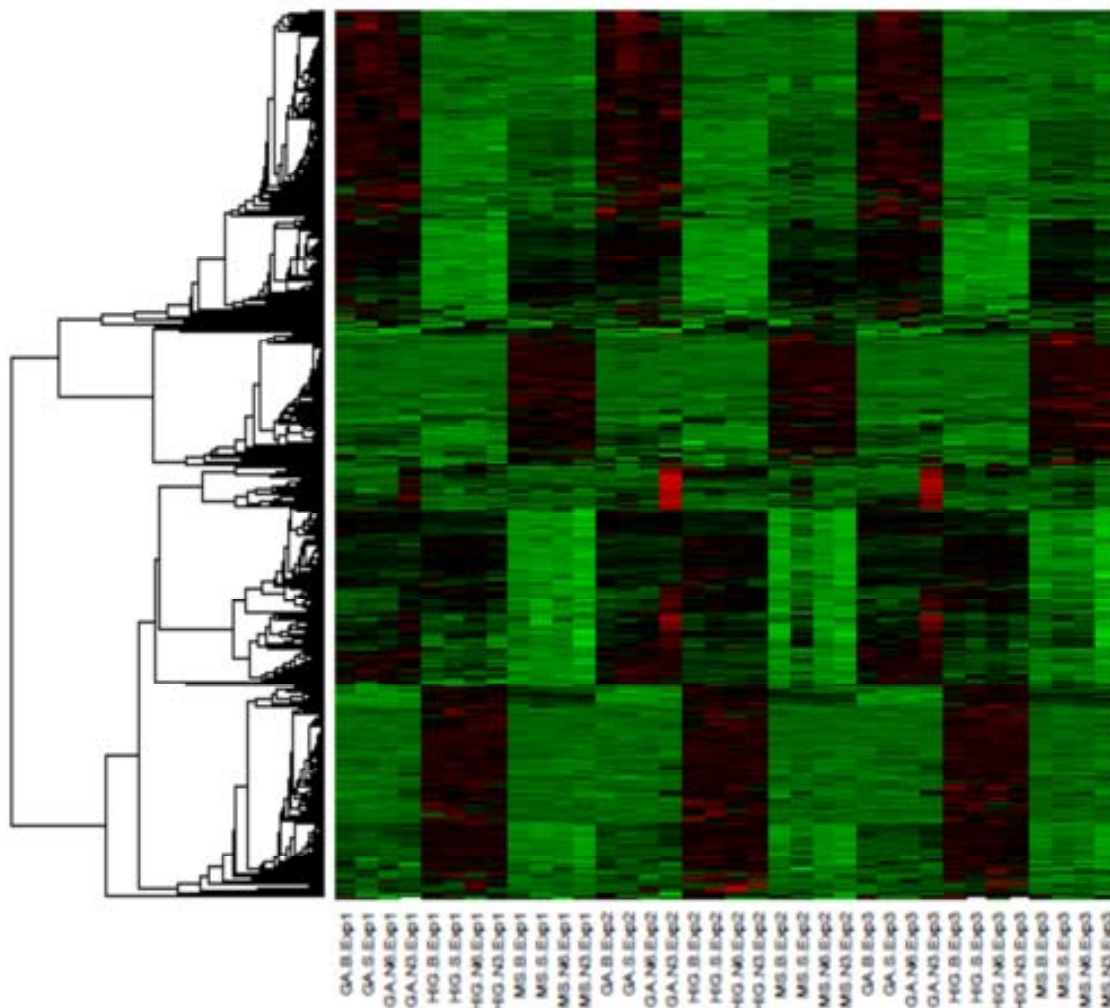


Figure 4.1. Heat map of the differentially expressed genes among diets. Experimental diets were a low fat basal diet (B), and three diets including 10% of either saturated (S), poly-unsaturated n-3 (N3) or n-6 (N6) fatty acids. Studied tissues were abdominal fat (GA), liver (HIG) and skeletal muscle (MS). Red represents increased mRNA levels and green shows decrease mRNA levels for differentially expressed genes (FDR < 0.05). In microarray analysis each sample is called an experiment and so Exp 1, 2, and 3 represent samples 1, 2, and 3.

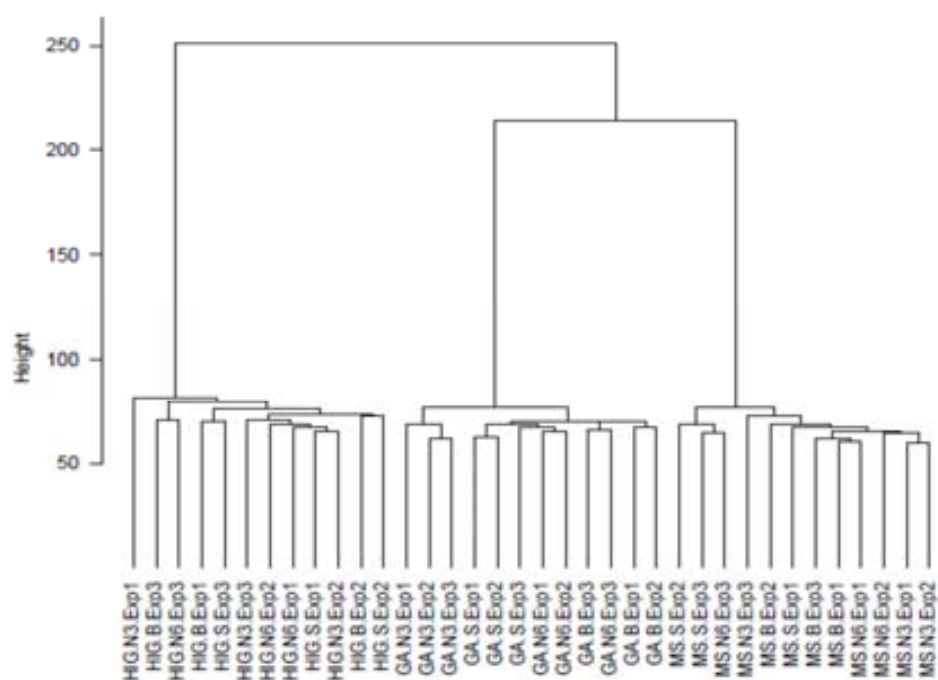


Figure 4.2. Hierarchical clustering of samples. Diets were a low fat basal diet (B), and three diets including 10% of either saturated (S), poly-unsaturated n-3 (N3) or n-6 (N6) fatty acids. Studied tissues were abdominal fat (GA), liver (HIG) and skeletal muscle (MS).

Then, gene expression profiles of abdominal fat, liver, and skeletal muscle were compared among diets. Table 4.2 shows the number of probes with modified expression among diets in the different organs (FDR 0.05). Abdominal fat was the organ showing more changes in the different diet comparisons. Comparisons involving diet N3 were the ones that showed more differentially expressed genes. Liver did not show more than 20 differentially expressed genes in any diet comparisons, and in the case of muscle, diet N3 induced a high number of differentially expressed genes when compared to diet S. For all tissues, the S vs N3 comparison was the one showing a higher number of differentially expressed genes with 366, 46, and 379 genes in abdominal fat, liver, and skeletal muscle, respectively.

Only those comparisons marked in grey shadow in Table 4.2 were further studied. Other comparisons were considered to present not enough changes in gene expression to warrant good results in further steps.

Table 4.2. Number of probes up/down regulated in abdominal adipose tissue, liver tissue, and muscle tissue depending on the diets compared (FDR 0.05).

	S vs B	N6 vs B	N6 vs S	N3 vs B	N3 vs S	N3 vs N6
Abdominal fat						
UP	53	25	10	169	221	134
DOWN	24	9	6	121	190	58
Liver						
UP	4	9	18	19	14	11
DOWN	3	4	13	18	16	12
Muscle						
UP	0	4	3	3	66	4
DOWN	0	4	3	7	354	18

Experimental diets were a low fat basal diet (B), and three diets including 10% of either saturated (S), poly-unsaturated n-3 (N3) or n-6 (N6) fatty acids.

All comparisons including diet N3 in abdominal fat showed a high number of common differentially (up and down-regulated) expressed genes, as shown in figure 4.3. Those genes with similar significant expression changes in all three comparisons involving diet N3 in abdominal fat are shown in Table 4.3. On the other hand, many of the genes differentially expressed by N3 diet compared to S in muscle and abdominal fat, were not common between them.

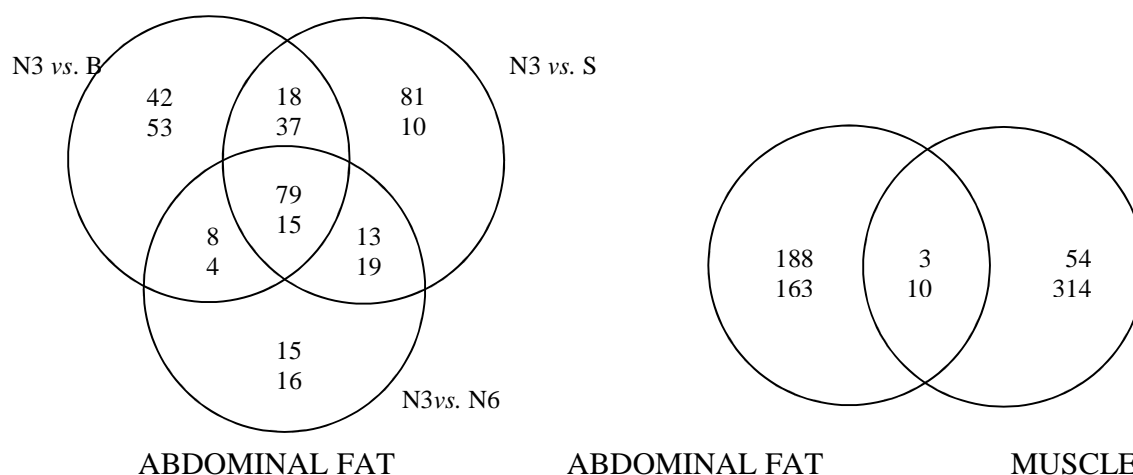


Figure 4.3. Genes up (number on top) or down regulated in one or more of the comparisons studied. On the left diagram, all the comparisons including N3 PUFA in abdominal fat are shown; on the right diagram the N3 vs S comparison is shown for abdominal fat (AF) and skeletal muscle (SM). Low fat basal diet (B) diets including 10% of either saturated (S), poly-unsaturated n-3 (N3) or n-6 (N6) fatty acids

Table 4.3. Probes differentially expressed (fold change (FC) and adjusted Pvalue (adjP)) in abdominal fat in comparisons including diet N3.

Probe set ID	Gene Symbol	B vs N3		N6 vs N3		S vs N3	
		adjP	FC	adjP	FC	adjP	FC
Gga.2620.1.S1_at	TTR	0.000	-5.40	0.000	-5.72	0.000	-5.50
Gga.7004.1.S1_at	LOC420301	0.000	-5.51	0.000	-5.48	0.000	-5.53
Gga.11456.1.S1_at	CSTA	0.000	-5.48	0.000	-5.40	0.000	-5.35
GgaAffx.10104.2.S1_s_at	ATP6V0D2	0.000	-5.53	0.000	-5.27	0.000	-5.29
GgaAffx.11429.1.S1_s_at	MMP7	0.000	-4.32	0.000	-4.78	0.000	-4.81
Gga.17647.1.S1_at	NCF2	0.000	-4.24	0.000	-4.69	0.000	-4.40
Gga.2533.1.S1_s_at	GSTA3	0.001	-3.50	0.000	-3.75	0.000	-3.99
Gga.8578.1.S1_at	NA	0.000	-3.59	0.000	-3.87	0.000	-3.68
Gga.11378.1.S1_s_at	PMP2	0.000	-3.66	0.000	-3.73	0.000	-3.39
Gga.3551.1.S1_at	SPP1	0.001	-3.61	0.001	-3.68	0.001	-3.47
Gga.6650.3.S1_a_at	PDCD1LG2	0.000	-3.04	0.000	-2.87	0.000	-3.46
Gga.8116.1.S1_at	SLC46A3	0.000	-3.01	0.000	-3.11	0.000	-3.03
Gga.155.1.S1_s_at	LGALS3	0.001	-3.21	0.001	-3.16	0.003	-2.68
GgaAffx.10526.2.S1_s_at	ATP6V1C2	0.000	-3.28	0.000	-2.77	0.000	-2.98
Gga.12454.1.S1_at	RLN3	0.008	-2.62	0.003	-2.98	0.001	-3.17
Gga.10042.1.S1_a_at	RCJMB04_25116	0.000	-2.48	0.000	-2.83	0.000	-3.20
Gga.10968.1.S1_s_at	GSTO1	0.000	-2.73	0.000	-2.82	0.000	-2.54
Gga.2637.1.S1_at	MCOLN2	0.000	-2.70	0.000	-2.64	0.000	-2.72
Gga.12800.1.S1_at	MMP3	0.000	-2.64	0.000	-2.67	0.000	-2.69
Gga.8173.1.S1_at	C11orf34	0.000	-2.57	0.000	-2.78	0.000	-2.57
GgaAffx.10393.1.S1_at	CYBB	0.000	-2.81	0.001	-2.40	0.000	-2.55
GgaAffx.3968.1.S1_at	TM4SF19	0.000	-2.48	0.000	-2.29	0.000	-2.50
Gga.17090.1.S1_s_at	SCIN	0.000	-2.16	0.000	-2.43	0.000	-2.58
Gga.11579.1.S1_at	LOC415661	0.003	-2.47	0.045	-1.79	0.001	-2.60
Gga.16662.1.S1_at	C1QTNF4	0.001	-2.20	0.001	-2.28	0.001	-2.30
Gga.3383.1.S1_at	LITAF	0.000	-2.11	0.000	-2.07	0.000	-2.36
Gga.4318.1.S1_at	FABP7	0.001	-2.54	0.008	-2.07	0.009	-1.90
Gga.16863.1.S1_s_at	GAL10	0.003	-2.10	0.002	-2.23	0.004	-1.99
Gga.14426.1.S1_at	LIPA	0.001	-2.24	0.006	-1.89	0.001	-2.09
Gga.2039.1.S1_at	HMOX1	0.000	-2.07	0.000	-1.87	0.000	-2.13
GgaAffx.11658.1.S1_s_at	RCJMB04_3f13	0.000	-2.12	0.000	-1.97	0.000	-1.96
GgaAffx.21400.1.S1_at	NA	0.001	-1.96	0.000	-2.08	0.001	-1.96
Gga.5132.1.S1_at	F7	0.002	-2.08	0.004	-1.95	0.002	-1.97
Gga.483.1.S1_at	LOC395818	0.007	-1.73	0.001	-2.12	0.001	-2.11
GgaAffx.21123.1.S1_s_at	CTSB	0.000	-1.99	0.000	-1.74	0.000	-1.97
Gga.1563.1.S1_at	NA	0.000	-2.01	0.001	-1.80	0.001	-1.72
Gga.15580.1.S1_at	SLC24A4	0.001	-1.94	0.002	-1.88	0.004	-1.69
Gga.8154.1.S1_at	RAB17	0.011	-1.67	0.008	-1.78	0.001	-2.03

GgaAffx.24111.1.S1_s_at	LOC429329	0.016	-1.86	0.010	-2.06	0.046	-1.54
Gga.10818.2.S1_a_at	LOC429567	0.005	-1.99	0.048	-1.53	0.013	-1.72
Gga.4193.1.S1_at	NA	0.003	-1.61	0.001	-1.79	0.001	-1.73
Gga.5955.1.S1_at	LOC425935	0.005	-1.49	0.008	-1.48	0.000	-2.08
Gga.10177.1.S1_at	PTPN5	0.008	-1.50	0.001	-1.94	0.007	-1.49
Gga.10915.1.S1_a_at	TMEM156	0.000	-1.67	0.003	-1.29	0.000	-1.96
Gga.7601.1.S1_at	GALNS	0.001	-1.69	0.001	-1.60	0.001	-1.57
GgaAffx.3506.1.S1_at	EVI2B	0.002	-1.61	0.004	-1.52	0.001	-1.71
Gga.7829.2.S1_a_at	C15orf48	0.014	-1.46	0.018	-1.49	0.002	-1.83
Gga.7092.1.S1_at	WDFY4	0.011	-1.64	0.039	-1.43	0.007	-1.69
Gga.198.1.S1_at	MMP9	0.002	-1.40	0.002	-1.43	0.000	-1.79
Gga.2472.1.S1_at	RDH12	0.035	-1.50	0.043	-1.52	0.021	-1.59
Gga.21.1.S1_a_at	IL2RG	0.005	-1.46	0.004	-1.52	0.002	-1.54
Gga.423.1.S1_at	CLU	0.007	-1.57	0.006	-1.62	0.021	-1.32
Gga.5856.1.S1_at	SLC9A2	0.003	-1.48	0.016	-1.27	0.001	-1.55
Gga.4507.1.S1_at	ITGB2	0.011	-1.49	0.025	-1.38	0.012	-1.43
Gga.16689.1.S1_s_at	PARVB	0.002	-1.52	0.013	-1.25	0.003	-1.38
GgaAffx.10140.2.S1_s_at	SLC17A5	0.000	-1.61	0.007	-1.18	0.003	-1.22
GgaAffx.26128.1.S1_at	GAA	0.009	-1.25	0.008	-1.32	0.006	-1.26
Gga.13899.1.S1_at	NA	0.003	-1.58	0.045	-1.15	0.038	-1.09
Gga.9764.1.S1_at	NA	0.002	-1.14	0.000	-1.32	0.001	-1.24
Gga.1114.1.S1_at	CIP1	0.003	-1.24	0.004	-1.24	0.005	-1.16
GgaAffx.6161.1.S1_s_at	PTPRE	0.017	-1.11	0.024	-1.10	0.002	-1.42
GgaAffx.23610.3.S1_at	SLC22A2	0.013	-1.30	0.027	-1.23	0.039	-1.08
Gga.6529.1.S1_at	FCER1G	0.003	-1.19	0.007	-1.13	0.002	-1.23
Gga.4511.1.S1_at	TCIRG1	0.018	-1.14	0.021	-1.18	0.016	-1.14
GgaAffx.12857.1.S1_s_at	ABHD12	0.002	-1.07	0.001	-1.15	0.001	-1.09
Gga.9773.1.S1_s_at	RBM24	0.015	-1.03	0.008	-1.16	0.010	-1.07
GgaAffx.10384.1.S1_at	SRPX	0.000	1.42	0.001	1.01	0.000	1.08
GgaAffx.20942.1.S1_s_at	NA	0.001	1.37	0.020	1.03	0.005	1.12
GgaAffx.3296.1.S1_at	OLFML1	0.000	1.37	0.000	1.36	0.003	1.05
Gga.10902.1.S1_at	RASL11A	0.001	1.47	0.011	1.14	0.004	1.21
GgaAffx.8765.2.S1_at	GFPT2	0.013	1.04	0.001	1.41	0.000	1.76
Gga.632.1.S1_at	AGTR1	0.002	1.67	0.019	1.31	0.004	1.45
Gga.2961.1.S1_at	GREM1	0.008	1.46	0.034	1.24	0.000	2.66
Gga.19740.1.S1_at	NA	0.006	1.48	0.029	1.26	0.000	2.74
Gga.3745.1.S2_at	CPZ	0.000	2.19	0.013	1.53	0.002	1.80
Gga.2200.1.S1_at	CYR61	0.034	1.62	0.047	1.62	0.001	2.40
Gga.14533.1.S1_at	NA	0.047	1.79	0.018	2.17	0.001	2.84
Gga.1448.1.S1_at	NA	0.013	2.03	0.013	2.11	0.000	3.01

Diets were a low fat basal diet (B), and three diets including 10% of either saturated (S), poly-unsaturated n-3 (N3) or n-6 (N6) fatty acids.

Finally functional modeling was done using GO and KEGG pathways enrichment analysis. Table 4.4 shows the main enriched pathways in KEGG pathways. Diet N3 in abdominal fat induced mainly enrichment of pathways involved in the metabolism of different molecules such as retinol and toxic compounds. In contrast, diet N3 induced changes in expression of a high number of genes involved in immune response pathways in skeletal muscle.

Tabla 4.4. Main enriched terms from KEGG pathways in selected diet comparisons in abdominal fat (AF) and skeletal muscle (SM).

Term	AF N3 vs B		AF N3 vs N6		AF N3 vs S		SM N3 vs S	
gga04142:Lysosome	14	<0.001	11	<0.001	14	<0.001		-
gga00830:Retinol metabolism	4	0.017		-		-		-
gga00982:Drug metabolism	4	0.017	3	0.049		-		-
gga00531:Glycosaminoglycan degradation	3	0.054	3	0.025	4	0.011		-
gga00980:Metab. of xenobiotics by cytP450		-	3	0.049		-		-
gga04530:Tight junction		-		-	7	0.046		-
gga04650:Nk cell mediated cytotoxicity		-		-		-	9	<0.001
gga04514:Cell adhesion molecules (CAMs)		-		-		-	8	0.012
gga04510:Focal adhesión		-		-		-	11	0.013

Diets were a low fat basal diet (B), and three diets including 10% of either saturated (S), poly-unsaturated n-3 (N3) or n-6 (N6) fatty acids.

Finally, some of the main changes in gene expression identified by microarray were confirmed by qPCR. Correlation coefficients for genes studied by qPCR were 0.77 for CLU, 0.97 for ITGB2, 0.86 for FABP7, 0.95 for LIPA, 0.92 for LITAF, 0.96 for GSTA3, and 0.42 for ME3 in abdominal fat; 0.79 CYP2C18 and 0.89 PCK1 in liver; and 0.96 for GPD1, 0.99 for FABP4, 0.94 for ITGB2, and 0.57 for GSTA3 in muscle. All these genes also showed significant differential expression in the qPCR results.

4.4. Discussion

Diets used in the present experiment induced the expected phenotypical differences known from previous literature in chickens; mainly a lower fat deposition for those animals fed diets rich in n3 PUFA compared to those fed diets rich in saturated fatty acids, as described in chapter 3. Diets rich in n3 PUFA are also known to have effects on many other

functions like the immune response or neurological development (Makrides et al., 2010). Thus, in the present study, it was expected that most of the differentially expressed genes were found on those diet comparisons including diet N3. This result was clearly observed; however, abdominal fat was not expected to be the organ presenting most of the differentially expressed genes as it finally was.

Liver is known to be the main organ controlling FA metabolism, abdominal fat is thought to store FA from dietary or endogenous origins (Griffin and Hermier, 1988), and skeletal lipid muscle metabolism is affected by diet and liver metabolism (de Fourmestraux et al., 2004) and mainly lipid beta-oxidation process is performed. In a similar experiment using microarrays in mice liver samples fed diets differing in FA composition, Berger et al. (2002) described how dietary PUFA increased FA β -oxidation with no changes in PPAR expression, decreased FA synthesis via down regulation of SREBP, and increased glucose synthesis via PCK1. Thus liver was expected to show clear differences in the expression of pathways involved in lipid metabolism such as those controlled by PPARs, SREBP, HNF-4 α , RXRs, LXRs, and involving genes such as LPL, PCK1, and FASN (Afman and Müller, 2012; Jump et al., 2013). All these genes are present in the chicken GeneChip but were not differentially expressed in the present experiment, neither were the pathways they form part of, despite of dramatic differences found in FA deposition.

Some of these genes may mediate the effects of PUFA despite they were not differentially expressed among diets in the current experiment. PPAR α and PPAR γ , in particular, are nuclear receptors that play critical roles in the catabolism and storage of FA and are activated by very low concentrations of various FAs and FA analogues (Kliwer et al., 1997). Effects of PUFA in murine liver transcriptome are very similar those induced by PPAR α -specific activators (Cherkaoui-Malki et al., 2001). However, PPARs normally do not show differential expression due to PUFA treatment in mice (Berger et al., 2002; Carlsson et al., 2001). In the present experiment PPARs expression was also not affected in agreement with experiments comparing dietary FA sources in mice. This lack of changes in PPAR expression indicates that differences in the transcription of genes involved in the catabolism and storage of FA are likely due to the direct activation of PPARs and not by changes in its expression. However, experiments in mice did show changes in some genes

and pathways dependent on PPARs activation and involved in FA metabolism. Most of these genes were not differentially expressed in the present experiment. There are no previous experiments in using microarrays in chickens in this subject and so more research is needed in order to clarify if this may be a species difference on PUFA effects or other mechanisms are involved. It is well known that changes in activation of these pathways are affected by many factors such as age, gender, diet (Sato et al., 2004; Teran-Garcia et al., 2007; Sanyasu et al., 2013), or more importantly interactions with other nutrients (Selvaraj and Klasing, 2006; Selvaraj et al., 2010).

Berger et al. (2006) showed that feeding PUFA to mice actually mimicked the effects of fasted metabolic state (Corton et al., 2004; Bauer et al., 2004; Lee, 2010), and a state in which hepatocytes are dividing (Satyanarayana et al., 2004). However they observed up regulated mitochondrial and peroxisomal FA β -oxidation transcripts or not depending of the data analysis they performed (Berger et al., 2002; 2006). Fasting has been also studied in chickens using microarrays and it induces similar changes in the transcriptome as in mammals (Desert et al., 2008; Sherlock et al., 2012). Some of the differentially expressed genes found in the present experiment are described in literature as involved in changes promoted by fasting or PUFA rich diets in mice or chicken. For example the CYP2 family (Bourneuf et al., 2005), FABP family (Bolduc et al., 2004; Bauer et al., 2004) are repeatedly cited as main players in these processes. These gene families will be further discussed in chapter 5.

In spite of not showing some expected differences, chickens fed the different diets did show characteristic transcriptomes depending on the diet, especially those fed diet N3. It is interesting to remark that many of the differentially expressed genes in abdominal fat due to diet N3 were the same no matter what diet we compare diet N3 to. This fact indicates a similar effect of n3 PUFA even when compared to low fat diets. However, the effects of n3 PUFA on the transcriptome were clearly organ specific as indicated by the very few common genes showing differential expression in both abdominal fat and muscle.

Functional modeling of data was done using different available resources and several challenges needed to be addressed. First, chicken is one of the domestic species with more annotations available; however, most of the annotations are obtained by computational methods and are based in information from humans or rodents. Thus the

“humanization” of chicken data may induce wrong annotations (van den Berg et al., 2010). Second, most of the experiments found in literature using microarrays in chickens to study changes in transcriptome compare extreme situations such as healthy vs. Ill, or fed vs. fasted animals. Variations in diets are expected to induce lighter changes in transcriptome and so differences are harder to find. Most of the pathway enrichments found in abdominal fat were related to metabolism of different molecules and most changes found in muscle had to do with immune system. Those changes found in abdominal fat make sense to some extent as pathways that may be involved in the metabolism of FAs when diets rich in n3 FA are fed to chickens. This pathways seem to indicate that the chicken understand the excess of n3 PUFAs as something to be metabolized and not stored. The changes in muscle are more difficult to understand. Muscle clearly showed enrichment in several immune pathways. Immune cells have been found to have functions in FA metabolism in chickens (Cornax et al., 2013). What the meaning of such changes is in this organ is hard to hypothesize with the current knowledge.

Results presented in the present chapter provide the first insights of the effects of PUFA on liver, adipose tissue and muscle at a transcriptome level in chicken. The results highlight some genes and its possible important role in the lower fat deposition induced by PUFA rich diets in chicken but also present some contradictory results. Further analysis of data and new experiments will provide complementary information.

4.5. References

Afman, L. A., & Müller, M. (2012). Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 51(1), 63-70.

Bauer, M., Hamm, A. C., Bonaus, M., Jacob, A., Jaekel, J., Schorle, H., ... & Katzenberger, J. D. (2004). Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span-prolonging processes. *Physiological Genomics*, 17(2), 230-244.

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.

Berger, A., Mutch, D. M., German, J. B., & Roberts, M. A. (2002). Dietary effects of arachidonate-rich fungal oil and fish oil on murine hepatic and hippocampal gene expression. *Lipids in Health and Disease*, 1(2), 8-5.

Berger, A., Roberts, M. A., & Hoff, B. (2006). How dietary arachidonic-and docosahexaenoic-acid rich oils differentially affect the murine hepatic transcriptome. *Lipids in Health and Disease*, 5(1), 10.

Bolduc, C., Larose, M., Lafond, N., Yoshioka, M., Rodrigue, M. A., Morissette, J., ... & St-Amand, J. (2004). Adipose tissue transcriptome by serial analysis of gene expression. *Obesity Research*, 12(5), 750-757.

Bourneuf, E., Héroult, F., Chicault, C., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., et al. (2006). Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene*, 372, 162-170.

Carlsson, L., Lindén, D., Jalouli, M., & Oscarsson, J. (2001). Effects of fatty acids and growth hormone on liver fatty acid binding protein and PPAR α in rat liver. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 281(4), E772-E781.

Cherkaoui-Malki, M., Meyer, K., Cao, W. Q., Latruffe, N., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., Bradfield, C. A., & Reddy, J. K. (2001). Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expression*, 9(6), 291-304.

Cornax, I., Walzem, R. L., Larner, C., Macfarlane, R. D., & Klasing, K. C. (2013). Mobilization of ectopic yolk in *Gallus gallus domesticus*: a novel reverse lipid transport process. *The Journal of Experimental Biology*, 216(10), 1949-1958.

Corton, J. C., Apte, U., Anderson, S. P., Limaye, P., Yoon, L., Latendresse, J., ... & Mehendale, H. M. (2004). Mimetics of caloric restriction include agonists of lipid-activated nuclear receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46204-46212.

Da Wei Huang, B. T. S., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44-57.

De Fourmestraux, V., Neubauer, H., Poussin, C., Farmer, P., Falquet, L., Burcelin, R., ... & Thorens, B. (2004). Transcript profiling suggests that differential metabolic

adaptation of mice to a high fat diet is associated with changes in liver to muscle lipid fluxes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50743–50753.

Désert, C., Duclos, M. J., Blavy, P., Lecerf, F., Moreews, F., Klopp, C., et al. (2008). Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. *BMC Genomics*, 9(1), 611.

Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., & Su, Z. (2010). AgriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl 2), W64-W70.

Edvardsson, U., Brockenhuus von Löwenhielm, H., Panfilov, O., Nyström, A. C., Nilsson, F., & Dahllöf, B. (2003). Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Proteomics*, 3(4), 468-478.

Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., ... & Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5(10), R80.

Griffin, H. D., & Hermier, D. (1988). Plasma lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *Leanness in Domestic Birds*, 175-201.

Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., & Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4(2), 249-264.

Jump, D. B., Tripathy, S., & Depner, C. M. (2013). Fatty Acid-Regulated Transcription Factors in the Liver. *Annual Review of Nutrition*, 33, 249-269.

Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., & Lehmann, J. M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4318-4323.

Lee, C. Y. (2010). Fasting and sampling time affect liver gene expression of high-fat diet-fed mice. *Animal*, 4(05), 709-713.

Li, H., Wu, G., Zhang, J., & Yang, N. (2010). Identification of the heart-type fatty acid-binding protein as a major gene for chicken fatty acid metabolism by Bayesian network analysis. *Poultry Science*, 89(9), 1825-1833.

Makrides, M., Smithers, L. G., & Gibson, R. A. (2010). Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in neurodevelopment and growth. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 65, 123-133.

McCarthy, F. M., Wang, N., Magee, G. B., Nanduri, B., Lawrence, M. L., Camon, E. B., ... & Burgess, S. C. (2006). AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics*, 7(1), 229.

Sato, K., Fukao, K., Seki, Y., & Akiba, Y. (2004). Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration. *Poultry Science*, 83(8), 1342-1347.

Satyanarayana, A., Geffers, R., Manns, M. P., Buer, J., & Rudolph, K. L. (2004). Gene expression profile at the G1/S transition of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Cell Cycle*, 3(11), 1405-1417.

Selvaraj, R. K., & Klasing, K. C. (2006). Lutein and eicosapentaenoic acid interact to modify iNOS mRNA levels through the PPARgamma/RXR pathway in chickens and HD11 cell lines. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1610-1616.

Selvaraj, R. K., Shanmugasundaram, R., & Klasing, K. C. (2010). Effects of dietary lutein and PUFA on PPAR and RXR isomer expression in chickens during an inflammatory response. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157(3), 198-203.

Sherlock, L., Wathes, C. M., Cheng, Z., & Wathes, D. C. (2012). Differential hepatic gene expression in the broiler chicken in response to the combined stressors of food withdrawal, catching and transport at the end of production. *Stress*, 15(3), 293-305.

Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1), 3.

Teran-Garcia, M., Adamson, A., Yu, G., Rufo, C., Suchankova, G., Dreesen, T., ... & Gettys, T. (2007). Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF-Y binding to the Fasn promoter by SREBP-1c. *Biochemical Journal*, 402, 591-600.

Van den Berg, B. H., McCarthy, F. M., Lamont, S. J., & Burgess, S. C. (2010). Re-annotation is an essential step in systems biology modeling of functional genomics data. *PLoS One*, 5(5), e10642.

Wang, H., Li, H., Wang, Q., Zhang, X., Wang, S., Wang, Y., et al. (2007). Profiling of chicken adipose tissue gene expression by genome array. *BMC Genomics*, 8(1), 193.

Wang, H., Wang, Q., Zhang, X., Gu, X., Wang, N., Wu, S., et al. (2010). Microarray analysis of genes differentially expressed in the liver of lean and fat chickens. *Animal*, 4(04), 513-522.

Yu, K., & Shu, G. (2013). Fatty Acid and Transcriptome Profiling of Longissimus Dorsi Muscles between Pig Breeds Differing in Meat Quality. *International Journal of Biological Sciences*, 9(1), 108-118.

CAPÍTULO 5

**EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE GRASA DIETÉTICA EN
LA EXPRESIÓN DE GENES SELECCIONADOS EN GRASA
ABDOMINAL, MÚSCULO Y HIGADO DE POLLOS DE CARNE**

**EFFECTS OF DIFFERENT DIETARY FAT SOURCES ON THE
EXPRESSION OF SELECTED GENES IN ABDOMINAL FAT,
MUSCLE AND LIVER IN BROILER CHICKENS**

5.1. Introduction

Changes in the expression of key genes or pathways are important determinants of fat accumulation in different tissues. These genes or pathways may depend on the species but some mechanisms are quite conserved among species. For example, there is important evidence that the activation of transcription factors SREBP1c and PPAR γ regulate lipid storage by increasing the expression of enzymes that increase the synthesis and storage of TGs. These transcription factors regulate the activity of enzymes such as LPL, which increases uptake of FA from the circulation, or FAS and G3PDH, which both promote TG synthesis (Al-Hasani and Joost, 2005). There is evidence that the supplementation of mice (Ruzickova et al., 2004), humans (Hill et al., 2007) and other species diets with n-3 PUFA may promote a reduction in body fat deposition and there is some evidence that it happens through the regulation of the above described pathways. However, more studies which investigate the impact of altering the dietary FA profile on the expression of genes involved in lipid metabolism are still needed. Some studies show the involvement of the already described pathways (Muhlhausler et al., 2010); however, results vary among studies due to the differences among species, organs, or external factors such as age or diet.

In the present work, we studied the diet- and age-dependent expression of genes with two basic not-excluding criteria. First, those genes showing consistent differences between dietary treatments in each organ in the previous microarray experiment (chapter 4) were included. Second, some genes expected to be affected by dietary treatments but not necessarily showing interesting results in the performed microarray experiment were included.

5.2. Materials and Methods

Samples and RNA extraction

Sample obtention is described in chapter 3. Samples (abdominal fat, liver and skeletal muscle) from 3 female broiler chickens per treatment from days 14, 24, 35, 49 and 59 of age were used in this experiment. Only samples from animals fed diets S, N3 and N6 were used. Total RNA was extracted from 150 to 200 mg of bulk abdominal adipose

tissue, 30 mg of liver, and 50 mg of muscle of thigh as described by Ribopure Kit (Ambion, Inc., Austin, TX, USA). The total RNA purified was quantified on a Nanodrop 1000A Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and their quality was analyzed by capillary electrophoresis using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Complementary DNA was synthesized by reverse transcription with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Real-time PCR quantitation of mRNA and primer design

Gene-specific primers were designed according to the mRNA sequences in the GenBank. The primer sequences and GenBank accession No. are shown in Table 4.1 (previous chapter). Reverse transcription was performed according to High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For the first strand cDNA synthesis, the 20 μ l reaction mixture included 5 μ l total RNA (200 ng/ μ l), 2 μ l 10xRT buffer (1.0 mL), 0.80 μ l 25xdNTP Mix (100 mM), 2.0 μ l 10x RT Random Primers (1.0 mL), 1 μ l MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/ μ l), 1 μ l RNase Inhibitor (100 μ l), 9.2 μ l Nuclease-free H₂O. The reaction mixture was incubated for 10 minutes at 25 °C, heated at 37°C for 120 minutes and then heated at 85 °C for 5 minutes.

The studied genes were Clusterin (CLU), Integrin beta-2 (ITGB2), Fatty acid binding protein 7 (FABP7), Lipase A lysosomal acid cholesterol esterase (LIPA), Lipopolysaccharide-induced TNF factor (LITAF), Glutathione S-transferase alpha 3 (GSTA3), Malic enzyme 3 NADP(+)-dependent mitochondrial (ME3), Lipoprotein lipase (LPL), Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA) and gamma (PPARG) and Fatty acid synthase (FASN) for abdominal adipose tissue; Cytochrome P450 family 2 subfamily C polypeptide 18 (CYP2C18) and Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, Cytosolic (PCK1), Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA) and gamma (PPARG) and Fatty acid synthase (FASN) for liver; and Fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4), Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1), Glutathione S-transferase alpha 3 (GSTA3), Integrin beta-2 (ITGB2) and Lipoprotein lipase (LPL) for muscle of thigh. Reactions were carried out in FastStart Universal SYBR Green Master (Rox). For these genes, the thermal profile consisted of a denaturation step at 95°C for 10

minutes, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The 20 μ l reaction mixture included: 1 μ l DNA (100ng), 2 μ l Tampon gold x10 (1.0 mL) , 1 μ l dNTP's (5mM each), 0.60 primer Forward (10 μ M each), 0.60 primer Revest (10 μ M each), 2 μ l Mg Cl₂ (25 mM), 0.20 μ l AmpliTaq gold (5U/ μ l), 12.60 μ l Nuclease-free H₂O. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) was considered to be a stably expressed housekeeping gene, and was used as an inter-reference gene. Its PCR amplification conditions are the same like the other genes. Sequencing reactions were performed with the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle and resolved in a 3730 capillary electrophoresis device (Applied Biosystem).

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using general linear models through GLM procedure of SAS 9.2 (Cary, NC, USA) using diet and days as classification factors. The interaction was also included in the model. Differences between treatments means were tested using Tukey's correction for multiple comparisons. Alpha level for significance was 0.05 and main effects trends were discussed for alpha 0.10.

5.3. Results

The P-values for all genes and tissues studied are showed in Table 5.1. Results for expression of genes studied in abdominal fat are presented in Table 5.2. Genes ITGB2, FABP7, LIPA, and GSTA3 showed differences and LITAF tended to show differences among diets in this tissue. In all cases the genes were over expressed in animals fed the n3 PUFA rich diet compared to those fed n6 PUFA and SFA rich diets. Genes CLU, ITGB2 increased and PPAR α tended to increase their expression over time. Gene FASN showed and interaction between diet and time with no clear pattern.

Results for genes studied in liver are presented in Table 5.3. In liver, only CYP2C18 was affected by dietary treatments among all studied genes. Both, animals fed n3 and n6 PUFA diets had increased expression levels of this genes compared to those fed SFA. On the other hand, all genes studied in liver changed or tended to change their expression levels over time. Gene CYP2C18 showed a decrease in expression levels in the last time

point studied (59 days of age). Genes PCK1, PPAR α , PPAR γ showed an interaction effect between diet and time. PCK1 was only increased for animals fed the n-3 rich diet from day 49 to 59. PPAR α showed only a higher level on day 24 for animals fed the n-3 rich diet compared to any other animal or day except for day 59 when all treatments showed a similar expression level. PPAR γ showed a pick in expression level for those animals fed diet rich in n-6 PUFA on day 59. FASN tended to show a U-shaped pattern of expression over time with higher expression levels in the first and last time points studied when compared to intermediate time points.

Results for genes studied in muscle are presented in Table 5.4. Only FABP4 and ITGB2 showed differences in this tissue. Gene ITGB2 showed and FABP4 tended to show an increase in expression over time.

Table 5.1. Statistical effects of dietary fat source and day of sacrifice on the expression of selected genes in abdominal fat, liver and muscle in broiler chickens.

Gene		Diet	Day	Interaction
FAT				
CLU	Clusterin	0.224	0.032	0.909
ITGB2	Integrin, β 2*	0.052	0.017	0.499
FABP7	Fatty acid binding protein 7, brain	<0.001	0.255	0.055
LIPA	Lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase	<0.001	0.414	0.275
LITAF	Lipopolysaccharide-induced TNF factor	0.097	0.217	0.561
GSTA3	Glutathione S-transferase α 3	0.002	0.340	0.758
ME3	Malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	0.295	0.497	0.218
LPL	Lipoprotein lipase	0.413	0.857	0.184
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor α	0.537	0.063	0.199
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	0.194	0.125	0.139
FASN	Fatty acid synthase	0.740	0.019	0.001
LIVER				
CYP2C18	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18	<0.001	<0.001	0.068
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	0.219	0.004	0.004
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor α	0.141	0.003	0.008
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	0.561	0.002	0.002
FASN	Fatty acid synthase	0.651	0.077	0.652
MUSCLE				
FABP4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	0.725	0.066	0.788
GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	0.278	0.237	0.502
GSTA3	Glutathione S-transferase α 3	0.347	0.118	0.749
ITGB2	Integrin, β 2*	0.534	0.001	0.723
LPL	Lipoprotein lipase	0.659	0.203	0.796

*complement component 3 receptor 3 and 4 subunit

Table 5.2. Time evolution of the expression of selected genes from abdominal fat depending on the dietary fat source

Studied gene Diet	Days					Mean values
	14	24	35	49	59	
Clusterin						
S		0.83	1.19	2.35	2.51	1.72
N3	1.08	0.72	1.89	3.08	4.61	2.58
N6		0.71	0.99	1.68	2.17	1.39
Mean values		0.75 ^b	1.36 ^{ab}	2.37 ^{ab}	3.10 ^a	
ITGB2						
S		1.01	1.11	1.88	2.07	1.52 ^{ab}
N3	1.02	1.07	1.86	1.96	1.82	1.68 ^a
N6		1.06	0.98	1.26	1.38	1.17 ^b
Mean values		1.05 ^b	1.32 ^{ab}	1.7 ^a	1.76 ^a	
FABP7						
S		1.04	1.63	1.56	1.51	1.43 ^b
N3	1.89 ^b	4.15	2.76	1.54	2.95	2.85 ^a
N6		1.05	0.96	0.93	0.95	0.97 ^b
Mean values		2.08	1.78	1.34	1.80	
LIPA						
S		1.4 ^{ab}	1.44 ^{ab}	1.6 ^{ab}	1.46 ^{ab}	1.47 ^b
N3	1.4 ^{ab}	1.59 ^{ab}	3.31 ^{ab}	3.48 ^a	2.57 ^{ab}	2.74 ^a
N6		1.53 ^{ab}	1.33 ^{ab}	1.17 ^b	1.31 ^{ab}	1.34 ^b
Mean values		1.51	2.02	2.09	1.78	
LITAF						
S		1.62	1.73	1.92	1.82	1.77
N3	1.18	1.90	4.05	3.96	4.24	3.54
N6		1.67	1.74	1.59	4.98	2.49
Mean values		1.73	2.5	2.49	3.68	
GSTA3						
S		1.42	1.46	1.30	1.56	1.43 ^b
N3	1.32	1.69	2.61	1.96	2.66	2.23 ^a
N6		1.25	1.29	1.45	1.55	1.39 ^b
Mean values		1.45	1.79	1.57	1.92	
Malic Enzyme 3						
S		1.35	1.21	1.57	1.49	1.41
N3	1.57	0.98	1.17	1.43	1.32	1.22
N6		1.26	1.92	1.16	1.48	1.46
Mean values		1.20	1.43	1.39	1.43	
Lipoprotein Lipase						
S		2.26	1.82	1.93	1.73	1.94
N3	0.68	1.77	2.06	1.21	1.86	1.73
N6		1.86	1.65	2.2	2.11	1.96
Mean values		1.96	1.84	1.78	1.9	
PPARα						
S		0.58	0.46	0.71	0.76	0.63
N3	0.86	0.55	0.86	0.61	0.89	0.73
N6		0.48	0.48	0.93	0.75	0.66
Mean values		0.54	0.60	0.75	0.80	
PPARγ						
S		0.55	0.48	0.58	0.49	0.52
N3	0.71	0.48	0.61	0.53	0.59	0.55
N6		0.55	0.53	1.02	0.53	0.66
Mean values		0.52	0.54	0.71	0.54	
Fatty Acid Synthase						
S		3.68 ^{abc}	2.42 ^{bc}	4.63 ^a	3.64 ^{abc}	3.59
N3	1.70	3.22 ^{abc}	3.53 ^{abc}	2.06 ^c	4.74 ^a	3.39
N6		3.57 ^{abc}	2.78 ^{bc}	4.16 ^{ab}	3.71 ^{abc}	3.56
Mean values		3.49 ^{ab}	2.91 ^b	3.62 ^{ab}	4.03 ^a	

Integrin beta-2 (ITGB2), Fatty acid binding protein 7 (FABP7), Lipase A lysosomal acid cholesterol esterase (LIPA), Lipopolysaccharide-induced TNF factor (LITAF), Glutathione S-transferase alpha 3 (GSTA3), Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA) and gamma (PPARG)

Table 5.3. Time evolution of the expression of genes from liver and muscle depending on the dietary fat

Studied gene	Diet	Days				Mean values	
		14	24	35	49		59
Liver CYP2C18							
S			2.48	2.91	2.10	0.44	1.98
N3	1.04		9.17	8.04	5.48	0.18	5.72
N6			7.16	5.62	5.53	1.03	4.84
Mean values			6.28	5.52	4.37	0.56	
Liver PCK1							
S			15.22	26.19	0.80	21.18	20.41
N3	6.30		17.68	8.99	2.23	52.73	10.91
N6			28.30	15.16	0.15	0.04	15.85
Mean values			20.40	16.78	1.06	24.65	
Liver PPAR α							
S			8.56 ^{bc}	6.74 ^{bc}	5.93 ^{bc}	10.41 ^{bc}	7.91
N3	1.83 ^c		19.13 ^a	5.80 ^{bc}	4.74 ^{bc}	11.09 ^{bc}	10.19
N6			4.90 ^{bc}	5.34 ^{bc}	7.11 ^{bc}	12.09 ^b	7.36
Mean values			10.87 ^a	5.96 ^b	5.92 ^b	11.2 ^a	
Liver PPAR γ							
S			1.56 ^{ab}	0.79 ^b	0.97 ^b	1.40 ^{ab}	1.18
N3	1.37 ^{ab}		2.09 ^a	1.04 ^b	0.75 ^b	0.97 ^b	1.21
N6			1.02 ^b	0.90 ^b	1.28 ^{ab}	2.18 ^a	1.34
Mean values			1.55 ^a	0.91 ^b	1 ^b	1.52 ^a	
Liver Fatty Acid Synthase							
S			6.59	3.17	2.03	5.75	4.39
N3	1.72		7.67	5.31	0.46	4.47	4.48
N6			5.51	3.52	3.99	10.17	5.80
Mean values			6.59	4.00	2.16	6.80	
Muscle FABP4							
S			0.49	1.34	2.17	0.87	1.22
N3	2.37		0.56	0.77	2.02	1.99	1.34
N6			0.47	0.99	1.26	1.31	1.01
Mean values			0.51	1.03	1.82	1.39	
Muscle GPD1							
S			0.90	1.91	1.61	0.84	1.31
N3	1.49		0.54	0.78	0.83	1.49	0.91
N6			0.42	1.07	1.03	1.08	0.90
Mean values			0.62	1.25	1.16	1.14	
Muscle GSTA3							
S			1.37	1.79	1.67	1.20	1.51
N3	1.18		1.46	1.60	2.55	1.44	1.76
N6			0.90	1.50	1.66	1.45	1.38
Mean values			1.24	1.63	1.96	1.36	
Muscle Integrin beta-2							
S			2.36	5.73	10.02	6.18	6.07
N3	2.11		2.08	2.82	6.12	8.09	4.78
N6			2.14	4.10	10.47	7.82	6.13
Mean values			2.2 ^c	4.22 ^{bc}	8.87 ^a	7.36 ^{ab}	
Muscle Lipoprotein Lipase							
S			0.55	0.53	0.43	0.29	0.45
N3	0.66		0.43	0.51	0.33	0.32	0.39
N6			0.46	0.31	0.49	0.25	0.38
Mean values			0.48	0.45	0.41	0.29	

Cytochrome P450 family 2 subfam C polypeptide 18 (CYP2C18), Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1), Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and γ (PPAR γ), Fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4), Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1), Glutathione S-transferase α 3 (GSTA3)

5.4. Discussion

Genes FABP7, LIPA, and ME3 in adipose tissue, PCK1 in liver, and FABP4 and GPD1 in muscle, were selected to be studied in the present work among those involved in lipid metabolism. Changes in adipose tissue ME3, liver PCK1, and muscle FABP4 and GPD1 in the array experiment were confirmed by qPCR. However, these genes did not show the same differences found in the array experiment when studied along time. On the other hand, adipose tissue FABP7 and LIPA showed clear differences.

The FABPs family is a group of carrier proteins for FA and other hydrophobic ligands such as eicosanoids and retinoids (Chmurzyńska, 2006). They facilitate the transfer of FA between extra- and intracellular membranes and some of them transport lipids from outer cell membrane to certain intracellular receptors such as PPAR γ (Tan et al., 2002). The most abundant FABP in mammal adipose tissue is FABP4 which has been related to lipolysis in mice (Coe et al., 1999; Baar et al., 2005), and to lower fatness in chickens through the PPAR γ pathway (Wang et al., 2009b; Shi et al., 2010a, b). In this experiment, FABP4 tended to be increased with age in muscle, but was not affected by diet. FABP3 has also been repeatedly described as key protein in FA metabolism in chickens and other avian species (Guglielmo et al., 1998; Li et al., 2005). No effect of diets was found on FABP3 in the array experiment. However, we did find an increase in FABP7 in adipose tissue of animals fed diet N3 compared to those fed diets S and N6. FABP7 has been described in chickens as related to Kupffer cells function in liver by Abdelwahab et al. (2003) who proposed a role mediating n3 PUFA effects on immune function. Its function in adipose tissue has not been explored, but it might be involved in the functions of macrophages in adipose tissue as lipid modulator cell.

LIPA (or Lysosomal acid lipase; LAL) also showed a clear increase in its expression on those animals fed diet N3 compared to those fed diets S or N6. This result is quite interesting because the GenChip array includes 5 SNPs codifying LIPA, and 4 of them were over expressed following the same pattern among diets. On the other hand, phylogenetic analysis has demonstrated the distinct nature of the vertebrate LIPA gene family in comparison with other vertebrate acid lipases. It seems to evolve from an ancestral LIPA gene anterior to vertebrates (Holmes et al., 2011). All these characteristics

make LIPA an interesting gene to be studied. LIPA is part of the TG lipase gene family which has critical roles in lipid metabolism of animals. The egg development in hens is a unique site for lipid deposition (Schneider et al., 1998) that makes functions of lipases in chickens distinct from those in mammals. Recently, Sato et al. (2010) described the expression of several lipases related to TG metabolism in hen. Genes for LPL, HTGL, and LIPH were the most expressed lipase gene in adipose tissue, liver, and muscle respectively. LPL is a widely studied enzyme that hydrolyzes lipids in lipoproteins into FFA and monoglycerides. In the present experiment we studied LPL expression levels in adipose tissue and muscle, however no differences were found among diets. Other lipases studied by Sato et al. (2010) were endothelial lipase (EL, LIPG), carboxyl ester lipase (CEL), hormone sensible lipase (HSL, LIPE) and adipose triglyceride lipase (ATGL, patatin-like phospholipase domain-containing 2 (PNPLA2)). LIPA was not investigated by Sato et al. and so we cannot know how it compared to LPL in Sato's study, but it is well known that it is functionally important in chicken adipose tissue (Khoo et al., 1976) and our results show that it is expressed to similar levels than LPL. LIPA is required for the hydrolysis of cholesteryl esters and TG that are delivered to lysosomes by LDL (Goldstein et al., 1975) and so it plays an important role in lipid catabolism. In humans, LIPA has been extensively studied because its lack reduces lipid clearance from particular tissues and promotes its accumulation. Increased expression of LIPA in adipose tissue related to lower lipid accumulation due to n3 PUFA has been previously identified in other tissues (Elner, 2002) but has not been investigated in adipose tissue. It has also been described the preference of LIPA to process PUFA over SFA. Moreover, LIPA has been recently identified to play an important role in immune cells, not only in immune function (Qu et al., 2009) but also in lipid management by macrophages in different tissues (Yan et al., 2006; Ouimet et al., 2011).

The remaining studied genes (CLU and LITAF in adipose tissue, CYP2C18 in liver, and ITGB2 and GSTA3 in adipose tissue and muscle) have no direct relation to lipid metabolism but were considered of interest representing the effects of n3 PUFA on immune and detoxifying functions.

Despite changes found in the microarray experiment, CLU did not show differences in expression between diets in the present experiment; however it showed a clear increase

in its expression with age. CLU is a ubiquitous protein, highly conserved across species, which interacts with many different molecules (Jones and Jomary, 2002). These characteristics make clarification of its biological roles very difficult. It has received many names and, in fact, it is present in certain HDLs in humans (Kelso et al., 1994) and is called apolipoprotein J. It has been related to membrane lipid recycling, apoptotic cell death, and stress-induced secreted chaperone function, amongst others and it has been involved in different tumors and Alzheimer's disease (Jones and Jomary, 2002). In chickens, CLU is described as one of the proteins often found over expressed in -omic approaches to egg protein descriptions. It is present in eggshell matrix and egg white preventing the premature aggregation and precipitation of shell matrix components for ordered mineralization in the uterine fluid (Mann et al., 2003) and it has been related to certain embryo development phases (Liu et al., 2013). In addition, it has also been related to immune function in embryo fibroblasts (Morgan et al., 2001). Mikrou and Zarkadis (2010) did a spatial and temporal description of its expression as part of the complement membrane attack complex. They describe its expression from d0 of embryo to d5 of neonate liver. In the present experiment we provide evidence of the increase of its expression in growing chicken but we are unable to provide a functional reasoning for it.

Adipose tissue ITGB2 and LITAF are genes clearly related to immune function and both tended to be increased by n3 PUFA. Integrins like ITGB2 are known to participate in cell adhesion as well as cell-surface mediated signaling. ITGB2 codifies protein CD18, the beta subunit of four different structures together with CD11a, b, c, and d (Tan, 2012). They interact with ligands like intercellular adhesion molecules (ICAMs) or lipopolysaccharides (LPS) and modulate migration of different leukocyte to inflammation or infection sites (Hubbard and Rothlein, 2000). These molecules have been extensively studied in mammals, but little is known in avian species. Bilsland and Springer (1994) isolated and sequenced an avian ITGB2 cDNA and showed it to be highly homologous to the human and murine counterparts and showed its functionality. No previous references have been found of dietary FA effects on ITGB2 expression. However, molecules derived from FA such as lipoxins and resolvins are known to modulate leukocyte adhesion to different tissues and promote inflammation resolution (Filep et al., 2002). ITGB2 was also clearly increased with age of chickens in both fat and muscle. It makes sense for these molecules to

increase with age as the immune system develops, however, tissues like muscle don't normally have important immune activity and so ITGB2 may be involved in other functions.

LITAF, also known as SIMPLE (small integral membrane protein of the lysosome/late endosome) and PIG-7 (p53 inducible gene-7) was identified as a gene up regulated by bacterial cell wall components, including LPS, and was therefore proposed to be a pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-inducible gene (Polyak et al., 1997; Myokai et al., 1999; Moriwaki et al., 2001). In chickens, it has been characterized (Hong et al., 2006) and has been shown to be affected by insemination and moulting (Sundaresan et al., 2007; Das et al., 2009) and to be related to antibody response to *Clostridium alpha* toxin (Sumners et al., 2012) or status of *Salmonella* infection (Chaussé et al., 2011; Malek and Lamont, 2004). Concerning nutritional effects, xanthophylls decreased its expression as did for other pro-inflammatory cytokine expression (IL-1 β , IL-6, IFN- γ) in the liver, duodenum, jejunum and ileum (Gao et al., 2012). Only a trend was observed in the present experiment for diet N3 to increase LITAF levels. Given its direct relation to inflammation it is contradictory that it is increased by a nutrient with clear anti-inflammatory effects as is n3 PUFA.

Finally, diet N3 increased expression of 2 enzymes involved in detoxifying pathways, liver CYP2C18 and abdominal fat GSTA3. CYP2C18 gene encodes a member of the cytochrome P450 superfamily. Cytochrome P450 catalyze many reactions involved in drug metabolism and synthesis of cholesterol, steroids and other lipids. These enzymes have been known for long time and have been extensively studied in humans and mice. However, first description of CYP2C family in avian species happened in 2002 (Baader et al., 2002) and available information in this species is much more scarce. Expression of some of the enzymes in the CYP2C family has been genetically related to lower body fat in chickens by Bourneuf et al. (2006). Effects of diet on this family of enzymes has not been studied in chickens, however, it has been proposed in other species that certain FA promote the expression of CYP2C through PPARs (Cizkova et al., 2012). Besides, EPA and DHA not only act as modulators of CYP2C expression, but also are metabolized by these enzymes competing with SFA and n6 PUFA. Thus, an increase in dietary n3 PUFA can produce a shift in active metabolites derived from CYP2C action (Barbosa-Sicard et al.,

2005; Konkel and Schunck, 2011). Expression levels of CYP2C18 in this experiment dropped with age of chickens. This drop may indicate a temporary function of this gene in growing animals.

Glutathione S-transferases are a family of detoxification enzymes that play an important role in cytoprotective function against molecules such as lipid peroxides or toxins in adipocytes (Valdivia et al., 2001). Glutathione S-transferase class α , where GSTA3 is included, is also involved in other signaling pathways related to adipocyte differentiation in mammals. For example, they facilitate the formation of different activating ligands for the transcription factor PPAR γ (Jowsey et al., 2003). Wang et al. (2009a) showed GSTA and GSTT1 up-regulated in adipose tissue of genetically fat birds compared with lean birds. This may imply that these 2 proteins are also involved in signaling pathways related to adipocyte proliferation and differentiation in chicken. In any case, the up-regulation of GSTA3 in N3 diet fed animals may be related to the higher susceptibility of n3 PUFA to oxidation as a cytoprotective mechanism.

Genes such as PPAR α , PPAR γ , SREBP-1c, HNF-4 α , RXR α , LXR α , LXR β , LPL, and FASN have central roles in lipid metabolism (Afman and Müller, 2012). As mentioned in chapter 4, PUFA rich diets were expected to affect the expression of genes such as LPL or PCK1 when compared to SFA rich diets. However, the expression of the above mentioned genes was not affected by the dietary treatments in the microarray experiment. In the present experiment, we included some of these genes (PPAR α , PPAR γ , LPL, and FASN) to confirm microarray results in contrast to literature and no differences were found between diets. These results were contradictory with some literature; however, different genes known to be involved in lipid metabolism did show effects of the diets in the microarray experiment.

As a summary, genes FABP7, LIPA, ITGB2, LITAF, and GSTA3 in abdominal fat and CYP2C18 in liver were identified in the present work as genes to be taken into account in future studies about lipid metabolism in chickens. Some interesting changes in other genes were identified depending on age of the chickens. For those genes expected to show differential expression in the microarray experiment that did not and were included for qPCR confirmation, the results agreed with those found with the GeneChip.

5.5. References

- Abdelwahab, S. A., Owada, Y., Kitanaka, N., Iwasa, H., Sakagami, H., & Kondo, H. (2003). Localization of brain-type fatty acid-binding protein in Kupffer cells of mice and its transient decrease in response to lipopolysaccharide. *Histochemistry and Cell Biology*, 119(6), 469-475.
- Afman, L. A., & Müller, M. (2012). Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 51(1), 63-70.
- Al-Hasani, H., & Joost, H. G. (2005). Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4), 589-603.
- Baader, M., Gnerre, C., Stegeman, J. J., & Meyer, U. A. (2002). Transcriptional activation of cytochrome P450 CYP2C45 by drugs is mediated by the chicken xenobiotic receptor (CXR) interacting with a phenobarbital response enhancer unit. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15647-15653.
- Baar, R. A., Dingfelder, C. S., Smith, L. A., Bernlohr, D. A., Wu, C., Lange, A. J., & Parks, E. J. (2005). Investigation of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2^{-/-} mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 288(1), E187-E193.
- Barbosa-Sicard, E., Markovic, M., Honeck, H., Christ, B., Muller, D. N., & Schunck, W. H. (2005). Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(4), 1275-1281.
- Bilsland, C. A., & Springer, T. A. (1994). Cloning and expression of the chicken CD18 cDNA. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(4), 501-506.
- Bourneuf, E., Hérault, F., Chicault, C., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., ... & Diot, C. (2006). Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene*, 372, 162-170.
- Chaussé, A. M., Grépinet, O., Bottreau, E., Le, Vern, Y., Menanteau, P., Trotereau, J., ... & Velge, P. (2011). Expression of toll-like receptor 4 and downstream effectors in

selected cecal cell subpopulations of chicks resistant or susceptible to Salmonella carrier state. *Infection and Immunity*, 79(8), 3445-3454.

Chmurzyńska, A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*, 47(1), 39-48.

Cizkova, K., Konieczna, A., Erdosova, B., Lichnovska, R., & Ehrmann, J. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptors in regulation of cytochromes P450: new way to overcome multidrug resistance?. *BioMed Research International*, 2012.

Coe, N. R., Simpson, M. A., & Bernlohr, D. A. (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *Journal of Lipid Research*, 40(5), 967-972.

Das, S. C., Isobe, N., Yoshimura, Y. (2009). Changes in the expression of interleukin-1beta and lipopolysaccharide-induced TNF factor in the oviduct of laying hens in response to artificial insemination. *Reproduction*, 37(3), 527-536.

Elner, V. M. (2002). Retinal pigment epithelial acid lipase activity and lipoprotein receptors: effects of dietary omega-3 fatty acids. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 100, 301-338.

Filep, J. G., Zouki, C., Petasis, N. A., Hachicha, M., & Serhan, C. N. (2002). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 modulate adhesion molecule expression on human leukocytes in whole blood and inhibit neutrophil-endothelial cell adhesion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 507, 223-228.

Gao, Y. Y., Xie, Q. M., Jin, L., Sun, B. L., Ji, J., Chen, F., ... & Bi, Y. Z. (2012). Supplementation of xanthophylls decreased proinflammatory and increased anti-inflammatory cytokines in hens and chicks. *British Journal of Nutrition*, 108(10), 1746-1755.

Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L., & Brown, M. S. (1975). Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *Journal of Biological Chemistry*, 250(21), 8487-8495.

Guglielmo, C. G., Haunerland, N. H., & Williams, T. D. (1998). Fatty acid binding protein, a major protein in the flight muscle of migrating western sandpipers. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 119(3), 549-555.

Hill, A. M., Buckley, J. D., Murphy, K. J., & Howe, P. R. (2007). Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1267-1274.

Holmes, R. S., VandeBerg, J. L., & Cox, L. A. (2011). Genomics and proteomics of vertebrate cholesterol ester lipase (LIPA) and cholesterol 25-hydroxylase (CH25H). *3 Biotech*, 1(2), 99-109.

Hong, Y. H., Lillehoj, H. S., Hyen, Lee, S., Woon, Park, D., & Lillehoj, E. P. (2006). Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF). *Developmental & Comparative Immunology*, 30(10), 919-929.

Hubbard, A. K., & Rothlein, R. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1379-1386.

Jones, S. E., & Jomary, C. (2002). Clusterin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(5), 427-431.

Jowsey, I. R., Smith, S. A., & Hayes, J. D. (2003). Expression of the murine glutathione S-transferase $\alpha 3$ (GSTA3) subunit is markedly induced during adipocyte differentiation: Activation of the GSTA3 gene promoter by the pro-adipogenic eicosanoid 15-deoxy- $\Delta 12$, 14-prostaglandin J₂. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), 1226-1235.

Kelso, G. J., Stuart, W. D., Richter, R. J., Furlong, C. E., Jordan-Starck, T. C., & Harmony, J. A. (1994). Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry*, 33(3), 832-839.

Khoo, J. C., Steinberg, D., Huang, J. J., & Vagelos, P. R. (1976). Triglyceride, diglyceride, monoglyceride, and cholesterol ester hydrolases in chicken adipose tissue activated by adenosine 3': 5'-Monophosphate-dependent protein kinase. Chromatographic resolution and immunochemical differentiation from lipoprotein lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 251(10), 2882-2890.

Konkel, A., & Schunck, W. H. (2011). Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(1), 210-222.

Li, D. L., Chen, J. L., Wen, J., Zhao, G. P., Zheng, M. Q., & Liu, C. (2013). Growth, carcass and meat traits and gene expression in chickens divergently selected for intramuscular fat content. *British Poultry Science*, 54(2), 183-189.

Liu, Y., Qiu, N., & Ma, M. (2013). Comparative proteomic analysis of hen egg white proteins during early phase of embryonic development by combinatorial peptide ligand library and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight. *Poultry Science*, 92(7), 1897-1904.

Malek, M., & Lamont, S. J. (2004). Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a Salmonella enteritidis resource population. *Poultry Science*, 83(4), 544-549.

Mann, K., Gautron, J., Nys, Y., McKee, M. D., Bajari, T., Schneider, W. J., & Hincke, M. T. (2003). Disulfide-linked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white. *Matrix Biology*, 22(5), 397-407.

Mikrou, A., & Zarkadis, I. K. (2010). Cloning of the sixth complement component and, spatial and temporal expression profile of MAC structural and regulatory genes in chicken. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(5), 485-490.

Morgan, R. W., Sofer, L., Anderson, A. S., Bernberg, E. L., Cui, J., & Burnside, J. (2001). Induction of host gene expression following infection of chicken embryo fibroblasts with oncogenic Marek's disease virus. *Journal of Virology*, 75(1), 533-539.

Moriwaki, Y., Begum, N. A., Kobayashi, M., Matsumoto, M., Toyoshima, K., & Seya, T. (2001). Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF (PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 23065-23076.

Muhlhausler, B. S., Cook-Johnson, R., James, M., Miljkovic, D., Duthoit, E., & Gibson, R. (2010). Opposing effects of omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2010.

Myokai, F., Takashiba, S., Lebo, R., & Amar, S. (1999). A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor α gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4518-4523.

Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., & Marcel, Y. L. (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metabolism*, 13(6), 655-667.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389(6648), 300-305.

Qu, P., Du, H., Wilkes, D. S., & Yan, C. (2009). Critical roles of lysosomal acid lipase in T cell development and function. *The American Journal of Pathology*, 174(3), 944-956.

Ruzickova, J., Rossmeisl, M., Prazak, T., Flachs, P., Sponarova, J., Vecka, M., ... & Kopecky, J. (2004). Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids*, 39(12), 1177-1185.

Sato, K., Seol, H. S., & Kamada, T. (2010). Tissue distribution of lipase genes related to triglyceride metabolism in laying hens (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155(1), 62-66.

Schneider, W. J., Osanger, A., Waclawek, M., & Nimpf, J. (1998). Oocyte growth in the chicken: receptors and more. *Biological Chemistry*, 379(8-9), 965.

Shi, H., Wang, Q., Wang, Y., Leng, L., Zhang, Q., Shang, Z., & Li, H. (2010a). Adipocyte fatty acid-binding protein: an important gene related to lipid metabolism in chicken adipocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 157(4), 357-363.

Shi, H., Wang, Q., Zhang, Q., Leng, L., & Li, H. (2010b). Tissue expression characterization of chicken adipocyte fatty acid-binding protein and its expression difference between fat and lean birds in abdominal fat tissue. *Poultry Science*, 89(2), 197-202.

Summers, L. H., Cox, C. M., Kim, S., Salevsky, J. E., Siegel, P. B., & Dalloul, R. A. (2012). Immunological responses to *Clostridium perfringens* alpha-toxin in two genetically

divergent lines of chickens as influenced by major histocompatibility complex genotype. *Poultry Science*, 91(3), 592-603.

Sundaresan, N. R., Anish, D., Sastry, K. V. H., Saxena, V. K., Mohan, J., & Saxena, M. (2007). Differential expression of lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) in reproductive tissues during induced molting of white leghorn hens. *Animal Reproduction Science*, 102(3), 335-342.

Tan, N. S., Shaw, N. S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., ... & Noy, N. (2002). Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), 5114-5127.

Tan, S. M. (2012). The leucocyte beta2 (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Bioscience Reports*, 32(3), 241-269.

Valdivia, A. G., Martinez, A., Damian, F. J., Quezada, T., Ortiz, R., Martinez, C., ... & Reyes, J. L. (2001). Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B1 intoxication in broiler chickens. *Poultry Science*, 80(6), 727-734.

Wang, D., Wang, N., Li, N., & Li, H. (2009a). Identification of differentially expressed proteins in adipose tissue of divergently selected broilers. *Poultry Science*, 88(11), 2285-2292.

Wang, Q., Guan, T., Li, H., & Bernlohr, D. A. (2009b). A novel polymorphism in the chicken adipocyte fatty acid-binding protein gene (FABP4) that alters ligand-binding and correlates with fatness. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(3), 298-302.

Yan, C., Lian, X., Li, Y., Dai, Y., White, A., Qin, Y., ... & Du, H. (2006). Macrophage-Specific Expression of Human Lysosomal Acid Lipase Corrects Inflammation and Pathogenic Phenotypes in *lal*^{-/-} Mice. *The American Journal of Pathology*, 169(3), 916-926.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

1. Cambios en el tipo de grasa consumida provocan más modificaciones en el transcriptoma de la grasa abdominal que en el hígado o músculo esquelético del pollo de carne. En concreto, dietas ricas en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 provocan cambios claros en la grasa abdominal en comparación con dietas bajas en grasa o ricas en ácidos grasos saturados o poli-insaturados omega 6. Así, el tejido adiposo abdominal debería ser órgano de preferencia en el estudio del metabolismo lipídico en pollos de engorde.
2. Dietas ricas en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 comparadas con aquellas ricas en ácidos grasos saturados provocan diferencias en el transcriptoma de la grasa abdominal y del músculo esquelético similares en el número de genes diferencialmente expresados pero totalmente diferentes en el tipo de funciones afectadas. La grasa abdominal muestra, principalmente, cambios en vías de metabolización muy inespecíficas mientras que el músculo esquelético muestra cambios en genes implicados en la respuesta inmune.
3. Los genes FABP7, LIPA, GSTA3, CYP2C18 y en menor medida ITGB2 y LITAF, son de interés para el estudio del metabolismo lipídico en el pollo de carne. Por otra parte, los genes CLU, ITGB2, FASN, CYP2C18, PCK1, PPAR α y FABP4 se ven afectados por la edad en el pollo de carne y son de interés para futuros estudios de crecimiento en este animal.