

ESTUDIO DE ASOCIACION DEL EFECTO DEL GEN *FABP4* EN UN CRUCE ENTRE IBERICO Y LANDRACE

A. Mercadé¹, M. Pérez-Enciso^{1,3}, L. Varona², E. Alves⁴, J.L. Noguera², A. Sánchez¹, J.M. Folch¹

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ² Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, C/ Alcalde Rovira Roure 177, 25198, Lleida. ³ Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, C/ Lluis Companys 23, 08010, Barcelona. ⁴ Departamento de Mejora Animal SGIT-INIA, Ctra. De la Coruña km.7, Madrid, 28040, Spain

INTRODUCCIÓN

El gen *fatty acid binding protein 4 (FABP4)* codifica una proteína intracelular específica de los adipocitos que transporta ácidos grasos desde la membrana celular a los lugares de oxidación de éstos o hacia los lugares de síntesis de triglicéridos o fosfolípidos (Veerkamp et Maatman, 1995). En el intrón 1 se detectó un microsatélite con un polimorfismo asociado al contenido de grasa intramuscular y crecimiento en una población de Duroc (Gerbens et al, 1998). Esta asociación con grasa intramuscular no se encontró ni en Meishan (Gerbens et al, 2000) ni en una población de cerdos austríacos. Sin embargo, en esta última población se encontró una posible asociación con crecimiento (Nechtelberger et al, 2001) y en Meishan, con el grosor de grasa dorsal (Gerbens et al, 2000).

Previamente, hemos sugerido que existen al menos dos loci segregando en el SSC4, uno de los cuales se sitúa muy próximo al gen *FABP4* (Mercadé et al, 2005). El objetivo del presente trabajo es la identificación de polimorfismos en el gen *FABP4* mediante secuenciación, así como realizar un estudio de asociación con caracteres de crecimiento, calidad de la canal y de la carne en un cruce de Ibérico x Landrace.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Se ha analizado el pedigrí completo de un cruce entre la línea ibérica Guagyerbas y Landrace (Varona et al., 2002). Además de los 321 animales F₂, en este trabajo se han incluido 87 animales F₃ y 85 animales obtenidos por retrocruzamiento (RC).

Identificación de polimorfismos

A partir de la secuencia del gen *FABP4* porcino (GenBank Y16039) se diseñaron tres pares de cebadores para amplificar por PCR los cuatro exones y parte del promotor y de los intrones del gen. Las secuencias de los cebadores y los tamaños de los fragmentos amplificados se detallan en la Tabla 1.

Las condiciones de las PCR fueron 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 300 nm de cada cebador, 60 ng ADN genómico y 1.3 U *Expand High Fidelity PCR* (Roche Molecular Biochemicals) en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico consistía en 95 °C durante 3 min., seguido de 10 ciclos de 95 °C 30 s, 56 °C 1 min y 72 °C 2.5 min, seguido de 25 ciclos de 95 °C 30 s, 56 °C 1 min y 72 °C 2.5 min (aumentando 20 s la extensión a cada ciclo) y una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados mediante *BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) con los cebadores detallados en la Tabla 1. Las reacciones de secuenciación se analizaron en un equipo de electroforesis capilar ABI PRISM 3100 *Avant* (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias se realizó mediante el *software SeqScape™ v2.1* (Applied Biosystems).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación del ADN, secuenciación y pirosecuenciación

Cebadores	Secuencia	Tamaño
FABP4proF	5'-GCT CAG TTG AAT ACA TGG TGT AGA GAT T-3'	1499 pb
FABP4in1R	5'-GTT ACT GCT TAG TTT ATA TGC AAA AGG AAT-3'	
FABP4in2F	5'-AGA AGA GTT TTC CAT TTA AGT GAT TGG-3'	1303 pb
FABP4R2	5'-CAG ATC TAG AAG TCA GGG ATC TTT GG-3'	
FABP4F3	5'-TTG TGT ATG CTG TTG CTT TTG G-3'	1055 pb
FABP4R3	5'-AAA AAT CAT ATT CTA CTG GAA ACA AAG-3'	
FABP4seqF	5'-CTA AGA AGT TGT TTC TGA AAC C-3'	
FABP4seqR	5'-GGA GTA ACC AAT TAG GAA CAA-3'	
aFABPpyroFw	5'-biotina-TTC TAG ACC AAA GTC ACA ACT AAT GC -3'	
aFABPpyroRv	5'-TTC ATA TCA GTT CAC CTT TA-3'	

Genotipado por pirosecuenciación

Para genotipar el polimorfismo detectado en la posición 2634 en nuestra población de Ibérico x Landrace se puso a punto el método basado en la pirosecuenciación. Se amplificó por PCR un fragmento de 186 pb del intrón 1 mediante los cebadores aFABPpyroFw y FABP4in1R (Tabla 1). La PCR contenía 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 500 nm de cada cebador, 45 ng ADN y 0.6 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen). El perfil térmico fue 95 °C 3 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1.5 min y finalmente 72 °C 5 min. El fragmento amplificado fue purificado y secuenciado usando el cebador aFABPpyroRv (Tabla 1).

Análisis estadístico

En el modelo se incluyeron los efectos sexo, lote, edad (para peso) o peso de la canal (para el resto de caracteres) como covariables, el efecto genético infinitesimal, el genotipo del polimorfismo del gen *FABP4* y un QTL, que se ajustó cada cM a lo largo de todo el SSC4 (Zhao et al., 2003 y Varona et al., 2005). En otro modelo se ajustó sólo el QTL y, por último, también se realizó un análisis de asociación con los marcadores adyacentes a la inserción identificada (un microsatélite en el gen *FABP4* y el SW839). Se utilizó el programa Qxpak (Pérez-Enciso y Misztal, 2004) para realizar los análisis. En el modelo con el QTL y la inserción se testó el efecto del QTL manteniendo la inserción en el modelo. Este test nos permite averiguar si la inserción explica todo el efecto del QTL. De forma simétrica, se testó el efecto de la inserción manteniendo el QTL en el modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los machos y en siete hembras parentales del cruce Ibérico x Landrace se han secuenciado completamente los cuatro exones y el intrón 3 y, parcialmente, el promotor, los intrones 1, 2 y la región 3' flanqueante. Al comparar las secuencias obtenidas se han detectado un total de 22 posiciones polimórficas respecto a la secuencia de referencia (GenBank Y16039), localizadas en el promotor, intrón 1 y 3 y región 3' flanqueante. Cuatro polimorfismos difieren únicamente con la secuencia de referencia mientras que en los 18 restantes se encuentran diferencias entre los animales analizados (Tabla 2). Únicamente la inserción de una C en la posición 2634 es muy informativa ya que se encuentra en los 3 parentales Ibéricos y en sólo 7 cerdas Landrace. Los análisis estadísticos relativos al efecto de la inserción se indican en la Tabla 3. La inserción explica aparentemente todo el efecto del QTL para grasa, ya que el valor P del QTL no es significativo una vez que incluimos la inserción en el modelo. Al contrario, la inserción no está asociada al crecimiento (última fila en la Tabla 3). Finalmente, aunque la inserción es mucho más significativa que el QTL para longitud de canal y peso de las paletas, no podemos excluir categóricamente que exista un

gen adicional en el SSC4 para estos caracteres. Sin embargo, estos resultados refuerzan al gen *FABP4* como candidato posicional para el QTL de grasa y confirman la existencia de un segundo QTL, tal como se indica en los resultados descritos en Mercadé et al (2005), trabajo en el cual se estableció que los caracteres longitud de la canal y peso de las paletillas estaban afectados por dos loci. El primero se situaba muy próximo al gen *FABP4* y mostraba también un efecto pleiotrópico muy marcado para grasa. El segundo, situado entre los marcadores S0073 y S0214, también afectaría al peso vivo pero con un efecto menor.

Tabla 2. Polimorfismos detectados en el gen *FABP4*

Región	Posición	Ref	Pol	Región	Posición	Ref	Pol
Promotor	1381 ¹	T	-	Intrón 1	4789	T	G
	1412 ¹	A	G		5069	G	A
Intrón 1	2634	-	C		5000 ²	T	C
	4205	G	A		5005 ²	G	A
	4217	CAT	-	Intrón 3	6252	C	T
	4466	T	G		6367	C	A
	4555	T	C		6553	G	T
	4629 ¹	G	-		6611 ¹	C	T
	4750	A	C	6627	A	G	
	4782	T	C	3'UTR	6723 ²	R	R
4788	A	C	6845 ²		R	R	

¹: polimorfismos respecto a la secuencia de referencia (Y16039)

²: polimorfismos previamente descritos en la secuencia de referencia (Y16039)

Ref: referencia Y16039; Pol: polimorfismos detectados

Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis estadístico

Carácter	Modelo							
	QTL		QTL+Ins ¹			Asociación		
	Pos	P _{QTL}	P _{QTL}	P _{Ins}	P _{QTL+Ins}	P _{FABP4}	P _{Ins}	P _{Sw839}
G1	73	5x10 ⁻¹¹	0,04	3x10 ⁻⁴	1x10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁷	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁸
G2	70	5x10 ⁻⁸	0,19	6x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶
PP	71	5x10 ⁻⁹	0,02	1x10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁸	10 ⁻²	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
LG	71	1x10 ⁻⁸	0,05	1x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁸	10 ⁻³	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷
PV	93	7x10 ⁻⁴	6x10 ⁻³	0,24	2x10 ⁻³	0,3	0,07	10 ⁻²

G1: grasa cuello; G2: grasa última costilla; PP: peso paletas; LG: longitud canal; PV: peso vivo; Pos: posición en cM; Ins¹: inserción

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Nova Genética S.A. por su colaboración en el desarrollo del experimento. El presente trabajo fue financiado con el proyecto CICYT (AGF96-2510-C05)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Gerbens F et al. 1998. Mamm Genome 9, 1022-26
- Gerbens F et al. 2000. J Anim Sci 78, 552-9
- Mercadé A et al. 2005. Mamm Genome. Aceptado
- Nechtelberger D et al. 2001. J Anim Sci 79, 2798-804
- Pérez-Enciso M y Miszta I. 2004. Bioinformatics 20, 2792-8
- Varona L et al. 2002 Genet Res 80, 145-54
- Varona L et al. 2005 J. Anim. Breed. Genet. 122, 30-6
- Veerkamp JH y Maatman RG. 1995. Prog Lipid Res 34, 17-52
- Zhao HH et al. 2003 Mamm Genome 17, 472-82