

POLIMORFISMO Y ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DEL GEN DE LA ACETIL-CoA CARBOXILASA α (ACACA) PORCINA

Gallardo D.¹, Quintanilla R.², Ramírez O.¹, Prat-Cuffi J.M.³, Amills M.¹

¹Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra. ²Genètica i Millora Animal, IRTA-Lleida, 25198 Lleida. ³Laboratori d'Anàlisis Clíniques, Hospital de Palamós, Palamós.

E-mail: David.Gallardo@uab.es

INTRODUCCIÓN

La acetil-CoA carboxilasa α (ACACA) es un enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, constituyéndose en uno de los principales enzimas reguladores del proceso de formación de malonil-CoA. El malonil-CoA es utilizado como sustrato de la sintasa de ácidos grasos, enzima que cataliza la formación de los ácidos grasos de cadena larga (Mao *et al.*, 2003). El enzima ACACA se expresa de forma ubicua, observándose elevados niveles en tejidos lipogénicos como por ejemplo el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria en lactación. La expresión de la ACACA está regulada por factores relacionados con la edad (Scott *et al.*, 1981), la dieta (Gerfault *et al.*, 2000, Kouba *et al.*, 1998) y los niveles hormonales (Liu *et al.*, 1994), entre otros.

El gen ACACA porcino fue localizado en el cromosoma 12 por Calvo *et al.* (2000), aunque todavía no se ha publicado su secuencia ni se ha descrito la existencia de polimorfismos. La caracterización estructural del gen ACACA porcino constituirá un primer paso para comprender mejor la base molecular de los distintos factores que regulan su expresión, así como para determinar si existen mutaciones que afecten a la variabilidad de algún carácter de importancia económica en esta especie doméstica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y datos fenotípicos. El material animal utilizado pertenece a una línea comercial Duroc, a partir de la cual se generó una población experimental de 368 machos castrados, distribuidos en 5 familias de medio hermanos paternos. Para todos los individuos se midieron los niveles de lípidos plasmáticos a dos edades, 45 días y el día anterior al sacrificio (en torno a 190 días). Se analizaron de forma simultánea las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT) y de triglicéridos (TG) con un autoanalizador Technicon (Technicon Instruments, Tarrytown, NY). La concentración de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se determinó mediante la precipitación selectiva de lipoproteínas que contienen apo B. Los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se calcularon de acuerdo con la ecuación de Friedwald *et al.* (1972).

Extracción de DNA y secuenciación del gen ACACA. Se ha realizado la extracción de DNA de los 368 individuos G₁ y los 5 machos parentales de una población comercial Duroc mediante el protocolo descrito por Ramírez *et al.* (2003). Con la finalidad de secuenciar la región codificante del gen ACACA se amplificaron y secuenciaron 8 fragmentos solapados que abarcan aproximadamente 7,4 kb de la misma. Concretamente, se secuenció la región codificante del gen ACACA en 10 cerdos Duroc con niveles de colesterol altos (98-105 mg/dL, N = 5) y bajos (60-66 mg/dL). Además, también se analizó un individuo de cada una de las siguientes razas: Large White, Landrace, Meishan x Ibérico, Piétrain e Ibérico. Los oligonucleótidos se diseñaron empleando como molde el alineamiento de las secuencias ortólogas del gen ACACA en humano y ratón (ver Tabla 1). Se ha utilizado el programa Multalin para ensamblar las secuencias de los distintos fragmentos amplificados y construir una secuencia consenso.

Genotipaje de polimorfismos en las generaciones parental y G₁. La información generada a partir del análisis de las secuencias ACACA porcinas se ha utilizado para

detectar SNP que estuviesen segregando en la población Duroc objeto de estudio. Se han puesto a punto distintas técnicas para genotipar los 368 individuos más los 5 machos parentales para un total de 13 SNP. Se ha utilizado la técnica de Primer Extension Analysis para genotipar los SNP T542C, G1633A, C1878T, C1915T, G2023A, A2075G, C2213A, G2227T, G7060A y A7140T, mientras que para genotipar los SNP G1702T, T1703G y T1732C se ha utilizado la técnica de pirosecuenciación que posibilita el genotipado simultáneo de varios SNP localizados en un mismo exón y a corta distancia el uno del otro. Los protocolos de genotipaje se hallan descritos en Gallardo (2005).

Análisis de asociación con los niveles de lípidos plasmáticos. A partir de los genotipados disponibles para los animales de la población LIPGEN, se realizó un primer análisis de asociación de los polimorfismos del gen *ACACA* con las concentraciones de lípidos plasmáticos. Los modelos utilizados para el análisis fueron los siguientes:

$$y_{ijkl} = \mu + familia_i + granja_j + lote_k + \beta cov_{ijkl} + g_l + e_{ijkl} \quad (1)$$

$$y_{ijkl} = \mu + familia_i + granja_j + lote_k + \beta cov_{ijkl} + g_l(familia_i) + e_{ijkl} \quad (2)$$

donde:

y_{ijk} es el fenotipo analizado, en nuestro caso las concentraciones plasmáticas de CT, HDL, LDL y TG, a 45 y a 190 días de edad;

$familia_i$ es la familia de medio hermanos paternos a la que pertenece el individuo;

$granja_j$ y $lote_k$ son los efectos fijos granja de origen y lote de engorde. La granja de origen sólo se consideró para las medidas plasmáticas a 45 d de edad;

cov_{ijkl} es una covariable (edad para las medidas de HDL y LDL a 45 días y TG, y peso al sacrificio para las medidas CT, HDL y LDL a 190 d).

g_l es el efecto del genotipo para el polimorfismo analizado del gen *ACACA*.

Estos análisis se realizaron a dos niveles: (1) en el conjunto de la población y (2) dentro de familias de medio hermanos paternos para evaluar el posible desequilibrio de ligamiento dentro de familia. En todos los casos se estimaron y analizaron las diferencias entre las LSmeans de los distintos genotipos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuenciación de la región codificante del gen *ACACA*. Se ha obtenido una secuencia de aproximadamente 7,4 kb del cDNA *ACACA*, de los cuales 7.041 pb corresponden a la región codificante. La comparación de la secuencia del cDNA *ACACA* en los 15 individuos secuenciados ha permitido identificar 23 SNP sinónimos, de los cuales 13 están segregando en nuestra población Duroc. Veinte de los SNP son exónicos mientras que los tres restantes se hallan localizados en la región 3'UTR. Actualmente, se ha finalizado el genotipaje de los polimorfismos T542C, G1633A y T1732C en la población Duroc, mientras que el de los SNP C1878T, C1915T, G2023A, A2075G, C2213A, G2227T, G7060A y A7140T aun está en curso. Los SNP G1702T y T1703G no se han genotipado por no ser informativos en la generación parental.

Estudio de asociación entre los polimorfismos del gen *ACACA* y caracteres relacionados con el metabolismo lipídico. El análisis de asociación de los SNP 542, 1633 y 1732 ha demostrado la existencia de 3 haplotipos mayoritarios segregando en nuestra población: $T_{542}-G_{1633}-T_{1732}$, $T_{542}-A_{1633}-C_{1732}$ y $C_{542}-G_{1633}-T_{1732}$. El análisis realizado para estimar el efecto de los genotipos de los SNP 542, 1633 y 1732 sobre los caracteres CT, HDL, LDL y TG ha evidenciado la ausencia de efectos significativos a los 45 días de edad, en que los factores de origen ambiental tienen un efecto mucho más relevante sobre la variación de estos caracteres. En cambio, a los 190 días se obtuvieron diferencias significativas para CT y HDL asociadas al genotipo para los polimorfismos 1633 y 1732 en el conjunto de la población, resultados que fueron prácticamente idénticos para ambos SNP al existir un desequilibrio de ligamiento prácticamente total entre ellos. La Tabla 2 muestra las LSmeans para los distintos genotipos del SNP 1633. Estos resultados no siempre se mantuvieron en los análisis dentro de familia de medio-hermanos con el macho parental

heterocigoto (resultados no mostrados en las correspondientes tablas), posiblemente debido a la limitada potencia de los análisis.

La ACACA es un enzima limitante en la síntesis de lípidos, por lo que resulta más que esperable encontrar asociaciones con caracteres relacionados con el metabolismo lipídico. Nuestros resultados parecen sugerir, aunque no de modo concluyente, que la variabilidad genética del gen ACACA se halla asociada a la variación fenotípica de las concentraciones plasmáticas de CT y HDL. Sin embargo el hecho de que todos los SNP analizados sean sinónimos indicaría que la mutación causal se halla en desequilibrio de ligamiento con los mismos. Dicha mutación podría estar situada en alguna de las regiones del gen ACACA que aun no han sido secuenciadas (p.e. regiones promotoras, zonas intrónicas, regiones 5' o 3' UTR, etc.), o incluso en algún otro locus próximo. En este sentido prevemos que los futuros análisis considerando los haplotipos para varios polimorfismos del gen ACACA y otros marcadores próximos permitan arrojar más luz sobre estas cuestiones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado mediante la concesión del proyecto *Arquitectura genética de los componentes lipídicos de la carne porcina relacionados con la calidad y la salud humana* (AGL2002-04271-C03-03). Agradecemos a Selección Batallé su inestimable contribución al proyecto mediante la generación del material animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Calvo, J.H. *et al.* 2000. Cytogenet Cell Genet. 90:238-9.
- Friedwald, W.T. *et al.* 1972. Clin Chem. 18:499-508.
- Gallardo, D. 2005. Tesina de Máster. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Gerfault, V. *et al.* 2000. Reprod Nutr Dev. 40:103-12.
- Kouba, M. *et al.* 1998. Reprod Nutr Dev. 38:31-7.
- Liu, C.Y. *et al.* 1994. Domest Anim Endocrinol. 11:125-32.
- Mao, J. *et al.* 2003. Proc Natl Acad. Sci. USA. 100:7515-7520.
- Ramírez, O. *et al.* 2003. ITEA 24:447-449.
- Scott, R.A. *et al.* 1981. J Anim Sci. 52:505-11.

Tabla 1: Oligonucleótidos usados para la amplificación y secuenciación de la región codificante del gen ACACA.

Primer	Exón/Tamaño	Secuencia (5'→3')
ACC-0-FW	2 a 3	GGATATCTGCTCAGACAATAAGAATTATAAG
ACC-0-RV	(285-pb)	TCATGTGTAAGCCAAGCCA
ACC-1-FW	3 a 13	CTGGAGCTGAACCAGCACTC
ACC-1-RV	(1370-pb)	CCCATGGCAATCTGGAGCTG
ACC-2-FW	11 a 24	TGCTACTCCAGCAGTATTTGAACA
ACC-2-RV	(1779-pb)	ATCACCACAGCCTTCATGTG
ACC-3-FW	22 a 38	GTTTCCCAGCCAGCAGATTG
ACC-3-RV	(1604-pb)	AGTCAGTCCGGACATTTGTATTG
ACC-4-FW	37 a 46	GTGGGCACAGAAGTGACAGA
ACC-4-RV	(1398-pb)	GTTGTGCATGATCTGGATGC
ACC-5-FW	45 a 54	ACTGGGACAGAGAACCATCCA
ACC-5-RV	(1393-pb)	TCTTCTTGACCAGGTCCTCCA
ACC-6-FW	52 a 55	GGTTATTAACGACATCCTGGATTGGAA
ACC-6-RV	(329-pb)	CCTGGACCAAGCTGCGGAT
ACC-7-FW	55 a 3'UTR	CTTGGTCCAGGCCAA
ACC-7-RV	(417-pb)	TGTACCTTTCATTGCCTTC

Tabla 2: LSmeans (error estándar) de las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT), lipoproteínas de alta (HDL) y baja (LDL) densidad, y triglicéridos (TG) a 190 días de edad para los distintos genotipos del SNP 1633 del gen ACACA.

	CT	HDL	LDL	TG
GG N=136	128,43 ^A (2,50)	53,03 ^A (0,97)	64,72 (1,95)	52,33 (2,31)
AA N=34	116,33 ^B (4,75)	47,44 ^B (1,85)	60,03 (3,72)	45,13 (4,38)
GA N=126	126,19 ^A (2,37)	50,83 ^A (0,93)	65,27 (1,86)	50,58 (2,20)

(*) superíndices distintos indican diferencias significativas $P < 0.05$.