

VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA Y HAPLOTÍPICA DEL GEN *FABP5* PORCINO

Ana Ojeda¹, Jordi Estellé¹, Josep Maria Folch¹, Miguel Pérez-Enciso^{1,2}

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra.

² Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, C/ Lluís Companys 23, 08010, Barcelona.
E-mail: ana.ojeda@uab.es

INTRODUCCIÓN

El gen *fatty acid binding protein 5 (FABP5)*, también conocido como *Epidermal-FABP (E-FABP)* se expresa en la piel, tejido adiposo, glándula mamaria, riñón, cerebro, intestino, hígado y lengua. Su principal función, igual que el resto de FABPs, es facilitar el transporte de ácidos grasos. Este gen se sitúa en el cromosoma 4 porcino, dentro del intervalo de confianza del QTL *FAT1* (Andersson *et al.* 1994), y muy cercano al gen *FABP4*, a unas 194 kb en la especie humana (Estellé *et al.* 2006). Este QTL afecta al depósito de grasa dorsal y al crecimiento.

En un trabajo previo, se estudió la variabilidad y distribución haplotípica del gen *FABP4* porcino obteniendo unos resultados inesperados (Ojeda *et al.*, 2006). El nivel de polimorfismo detectado se correspondía a una diversidad nucleotídica de $\pi = 1,17\%$, muy superior a la descrita anteriormente en animales domésticos y aproximadamente 10 veces la descrita en la especie humana. Asimismo, el árbol *neighbor-joining* (NJ) obtenido a partir de las secuencias no mostraba ninguna relación entre el haplotipo y el origen geográfico de los animales. Se observó que razas muy distantes compartían haplotipos y que algunos de los animales con mayor heterocigosidad pertenecían a líneas muy consanguíneas (Guadyervas o *Tamworth*).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variabilidad nucleotídica y la estructura haplotípica del gen *FABP5* y compararla con la del *FABP4* para verificar si siguen una distribución similar o si, por el contrario, el *FABP5* se comporta de forma diferente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Se han secuenciado 14 cerdos de las razas: Vietnamita (VT104), Ibérico (IB114 de la estirpe Retinto e IB415 de la estirpe Guadyervas), Duroc (DU272), LargeWhite (LW284), Tamworth (TW372, una raza inglesa en peligro de extinción), Landrace (LD400), Fengjing (FG528) y Minzhu (MZ530) del USDA y originarios de China, Meishan (MS620) proveniente del INRA y 3 jabalíes (WB281, WB488 y WB511) de España, Japón y Francia respectivamente. Como *outgroup* se ha utilizado un Babirusa (BB280, *Babryrousa babyrussa*) del zoo de Madrid.

Identificación de polimorfismos

A partir de la secuencia del gen *FABP5* porcino (*GenBank* DQ523618, Estellé *et al.* 2006) se diseñaron cinco pares de cebadores para amplificar por PCR un fragmento de ~5,2 kb que incluye los cuatro exones, los tres intrones y parte del promotor.

Las condiciones de las PCR fueron 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 500 nM de cada cebador, 50 ng ADN genómico y 0.6 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystem) en un volumen final de 25 μ l. El perfil térmico consistía en 95 °C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C 0,5 min, 62 °C 1 min y 72 °C 1,5 min, y una extensión final de 72 °C durante 15min.

Los fragmentos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados mediante *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* en un secuenciador ABI PRISM

3730 (*Applied Biosystems*). El análisis de las secuencias e identificación de polimorfismos se realizó mediante el programa *SeqScape v2.5* (*Applied Biosystems*).

Análisis estadístico y genético

A partir de las secuencias se reconstruyeron las fases mediante el programa *Phase v2.1.1* (Li and Stephens 2003) usando las opciones por defecto, excepto que el programa corrió 5 veces y la última interacción fue 10 veces más larga, tal y como sugieren los autores. El índice de diversidad nucleotídica (π) fue estimado con *DnaSP v4.10* (Rozas *et al.* 2003). Se realizó un árbol filogenético NJ mediante el modelo Kimura de dos parámetros usando *Mega3* (Kumar *et al.* 2004). La tasa de recombinación escalada ($4 Ne r$) fue estimada usando técnicas de coalescencia con el programa *LDhat* (McVean *et al.* 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han detectado 36 posiciones polimórficas entre las distintas razas analizadas que incluyen seis *singletons*, dos indels y 28 SNPs (Fig 1. dcha.), lo que corresponde a un polimorfismo cada ~ 150 pb. Ocho se encontraron en el promotor, uno en la región 5' UTR, 15 en intrón uno, tres en intrón dos y nueve en intrón tres. Ninguno de los polimorfismos se situó en la región codificante. El índice de diversidad nucleotídica (π) fue 0.12%, diez veces inferior a la obtenida en el gen *FABP4* (Ojeda *et al.* 2006) pero similar a la descrita en humanos y otras especies domésticas.

Se observó una distribución haplotípica en dos clusters principales (llamados A y B en la Fig. 1 izda., por conveniencia), en el clúster A se encuentran tanto cerdos asiáticos como europeos, en cambio en el clúster B, predominan los cerdos asiáticos, excepto el Duroc. En el *FABP4*, también encontramos dos clústers pero sin relación entre los haplotipos y la distribución geográfica de los animales. El caso del Ibérico *Guadyerbas* (IB415), una línea muy grasa, negra y altamente consanguínea, es particularmente interesante debido a que resultó ser muy heterocigoto para el *FABP4* y, en cambio, es totalmente homocigoto para el *FABP5*.

La distancia promedio obtenida con el modelo Kimura de 2p entre babirusa y cerdo fue $0,022 \pm 0,002$. Usando un tiempo de divergencia estimado de 12 – 26 millones de años (Thompson *et al.* 1996), obtenemos una tasa de sustitución estimada de $\lambda = 0,022 / 2 / (12-26) / 10^6 \sim 4 - 9 \cdot 10^{-10} / \text{pb} / \text{año}$, aproximadamente, la mitad de la descrita en el gen *FABP4* (Ojeda *et al.* 2006). La estima del parámetro $\rho = 4Ne r$ obtenida para toda la región fue $\rho = 5,1$ o $1,1$ por kb, un 30% menos que la estima para el *FABP4* ($\rho = 1,5$). Esta diferencia puede ser debida a la diferente tasa de recombinación y/o de censo efectivo entre ambos genes.

En resumen, podemos concluir que las historias evolutivas y los patrones de diversidad nucleotídica y haplotípica de los genes *FABP4* y *FABP5* son muy distintas, a pesar de su proximidad física en el genoma y de pertenecer a la misma familia génica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las diversas personas e instituciones que nos han cedido muestras para este estudio: INIA (L. Silió y M.C. Rodríguez Valdovinos), zoo de Madrid (E. Martínez y C. Talavera), STAF Institute Japan (N. Okumura), USDA (G. Rohrer), Diputación de Huelva (M. Cumbreiras), Batallé (J. Reixach), INRA (JP Bidanel), Copaga e IRTA (JL Noguera), Deerpark pigs (R. Overend). Trabajo financiado por los proyectos AGL2004-00103 del MEC y acción especial del INIA (CPE03-010-C3). Ana Ojeda y Jordi Estellé disfrutaron de becas FPI y FPU, respectivamente, del MEC.

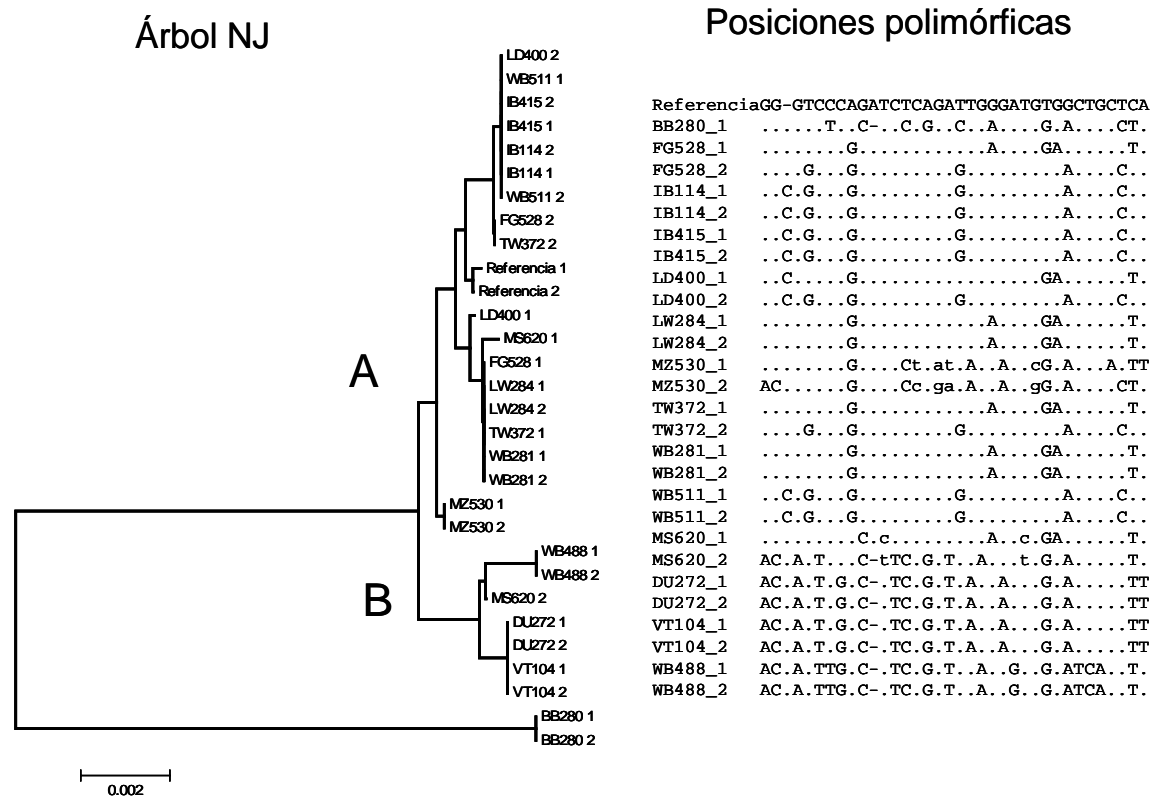


Fig 1. Izda., árbol NJ, el último número (1 o 2) indica el haplotipo de cada animal. Dcha: lista de polimorfismos encontrados. Una letra minúscula quiere decir que la fase se determinó con una probabilidad menor de 0.7.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson, L. *et al.* 1994. *Science* 263, 1771-1774
- Barrett, J. C. *et al.* 2005. *Bioinformatics* 21, 263-5
- Kumar, S. *et al.* 2004. *Brief Bioinform* 5, 150-63
- Estellé, J. *et al.* 2006. *Anim Genet.* 37(6), 589-91
- Li, N. *et al.* 2003. *Genetics* 165, 2213-33
- McVean, G. *et al.* 2002. *Genetics* 160, 1231-41
- Ojeda *et al.* 2006. *Genetics* 174(4), 2119-27
- Rozas *et al.* 2003. *Bioinformatics* 19, 2496-2497
- Thompsen, P. *et al.* 1996. *Cytogenet Cell Genet.* 73, 203-8