

ESTUDIO DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA CANTIDAD Y COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR DE LOS MÚSCULOS *LONGISSIMUS DORSI* Y *GLUTEUS MEDIUS* EN UNA POBLACIÓN DUROC

Solé, M.¹, Pena, R.¹, Amills, M.², Cánovas, A.¹, Gallardo, D.², Reixach, J.⁴, Díaz, I.³, Noguera, J.L.¹ y Quintanilla, R.¹

¹IRTA Genètica i Millora Animal (Lleida) marina.sole@irta.cat; ²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona; ³IRTA Tecnologia dels Aliments; ⁴Selección Batallé SA

INTRODUCCIÓN

La cantidad y composición de la grasa intramuscular (GIM) son caracteres determinantes de las características organolépticas y tecnológicas de la carne (Regueiro y Díaz, 1994). Este hecho, unido a la relación existente entre la composición grasa de la carne y la salud humana, ha despertado un creciente interés por estos caracteres. En este sentido el músculo *Longissimus dorsi*, caracterizado por un alto contenido en fibras de tipo IIB glucolíticas, ha sido el más ampliamente estudiado y utilizado como indicador en estudios de calidad de la carne en porcino. El músculo *Gluteus medius* presenta una composición fibrilar similar a la del músculo *Longissimus dorsi*, si bien algunos estudios en diversas razas de porcino han mostrado perfiles metabólicos diferentes entre ambos músculos (Essen-Gustavson y Fjelkner-Modig, 1985).

En el presente trabajo se aborda el estudio de los genes relacionados con el contenido y la composición de la grasa intramuscular de los músculos *Longissimus dorsi* (LD) y *Gluteus medius* (GM) en una población Duroc caracterizada por un alto contenido de grasa intramuscular mediante un análisis conjunto de QTL y de expresión génica diferencial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal, registros fenotípicos y genotipado de los individuos. El material animal procede de una población de 350 individuos castrados pertenecientes a una línea comercial Duroc y distribuidos en cinco familias de medio-hermanos paternos. Todos los individuos fueron genotipados para 110 microsatélites distribuidos por todo el genoma (Gallardo et al., 2008). Se tomaron muestras de los músculos LD y GM al sacrificio (190 d de edad, 122 kg de peso vivo). En ambos músculos se midió el porcentaje de GIM, el contenido en colesterol y la composición de ácidos grasos (C:12-C:22).

Análisis de QTL. El barrido genómico para la detección de QTL se realizó mediante la aproximación descrita por Knott et al. (1996) para el análisis de familias de medio hermanos. El modelo de análisis incluía los efectos lote o día de sacrificio y las covariadas espesor de grasa dorsal (para GIM) o GIM (para el porcentaje de ácidos grasos). Los niveles de significación a nivel genómico se establecieron mediante corrección de Bonferroni.

Experimento de microarrays. El diseño del experimento de microarrays se realizó seleccionando a los animales extremos (grupo Alto y grupo Bajo) para un índice derivado del primer componente principal que incluye diversos parámetros relacionados con el metabolismo lipídico (lípidos plasmáticos, nivel de engrasamiento y grasa intramuscular y perfil de ácidos grasos). De estos animales, se procesaron 70 muestras del músculo GM (35 por grupo) y 20 del músculo LD (10 por grupo). El RNA de las muestras se extrajo y purificó con el kit RiboPure™ (Ambion), realizando posteriormente una hibridación no competitiva con el chip *GeneChip Porcine Genome Array (Affymetrix)*. La corrección del *background* y la normalización de los datos se realizaron mediante el algoritmo gcRMA.

Análisis de los datos de expresión génica. El análisis de los datos de expresión se realizó mediante las herramientas BRB-Array Tools (Xu et al, 2008) y GEAMM (Casellas et al. 2007). En ambos casos se analizó la expresión diferencial entre músculos y entre grupos con alto y bajo nivel de metabolismo lipídico mediante un único análisis con toda la información disponible. Posteriormente se realizó un análisis ontológico para clasificar desde una perspectiva funcional los genes diferencialmente expresados, utilizando el paquete de herramientas bioinformáticas DAVID (Huang et al., 2009; en <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Finalmente se realizó una búsqueda de genes diferencialmente expresados en los intervalos

de confianza de los QTL detectados, utilizando la aplicación para el alineamiento de los elementos *Affymetrix* incluida en Pig QTL DataBase (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los QTL significativos a nivel genómico detectados para la cantidad y el perfil de ácidos grasos de la GIM de los músculos GM y LD. En general existe cierta consistencia con QTL detectados en otros estudios (e.g. Sánchez et al. 2007). No obstante cabe destacar la escasa correspondencia entre las asociaciones observadas en ambos músculos, resultado que sugiere diferencias en cuanto a la determinación genética de estos caracteres en LD y GM. Para el músculo GM se observan QTL relevantes para el %GIM en los cromosomas 3 y 7. El cromosoma 7 en particular parece desempeñar un papel importante en la variabilidad genética de la GIM del músculo GM mostrando, además de las asociaciones descritas, varios QTL significativos a nivel cromosómico (no descritos en el presente trabajo) para el perfil de ácidos grasos. Para el músculo LD por su parte, el cromosoma 6 y el cromosoma 12, este último con un importante efecto sobre la cantidad total de ácidos grasos saturados, son los que parecen tener mayor relevancia.

Los resultados obtenidos en el estudio de expresión diferencial de mRNA (Tabla 2) muestran un total de 292 genes (correspondientes a 350 sondas) diferencialmente expresados entre músculos, resultado que estaría en consonancia con la posición diferencial de los QTL descritos en los músculos analizados. Para todos estos genes el cociente entre las expresiones medias mostraba una tasa superior al 20% de sobre/infraexpresión en uno de los músculos, si bien el rango llega hasta el 800% (caso del gen HOXA10). En un 66% (196 genes) de los casos se trata de sondas sobreexpresadas en LD, si bien tan solo 23 de estas sondas (17 genes) superaron el 50% de sobreexpresión, mientras que 55 sondas (43 genes) superaron dicha tasa para la sobreexpresión en GM.

Entre los grupos de individuos con niveles extremos para diversos caracteres del metabolismo lipídico (Tabla 2) se obtuvo un número muy superior de genes diferencialmente expresados (579 sondas correspondientes a 459 genes), pero el rango para las tasas de sobre/infraexpresión fue considerablemente menor. De acuerdo con lo observado previamente por Cánovas et al. (2008) al analizar los niveles de expresión mRNA en GM, hubo un claro predominio de los genes sobreexpresados en el grupo de animales con valores elevados de parámetros relacionados con el metabolismo lipídico. Cabe destacar que tan solo 35 genes demostraron expresión diferencial simultáneamente para ambos efectos, músculo y grupo. Asimismo el estudio ontológico mostró diferencias funcionales entre ambos grupos de genes.

Por último el estudio de concordancia posicional entre las sondas diferencialmente expresadas entre grupos / músculos y los QTL detectados nos permitió elaborar una lista de genes candidatos (Tabla 3) que podrían presentar una asociación estructural y funcional con la cantidad y composición de la grasa intramuscular de los músculos LD y GM en porcino. De entre ellos cabe destacar el gen GPD1, relacionado con el incremento en la producción de triacilglicerol en el tejido adiposo de los humanos obesos, o los genes NPC1 y NPC2, que codifican para una proteína relacionada con la captación de colesterol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cánovas et al. 2008. 3rd Internat. Symposium on Animal Functional Genomics (Edimburgo)
- Casellas et al. 2008. Anim Genet 39:89
- Essen-Gustavson & Fjelkner-Modig 1985. Meat Sci 13:33
- Gallardo et al. 2008. Physiol Genom 35:199
- Huang et al. 2009. Nat Protoc. 4:44
- Knott et al. 1996. Theor Appl Genet 93:7180
- Regueiro & Díaz 1994. Irtacam
- Sanchez et al. 2007. BMC Genetics 8:55
- Xu et al. 2008. Bioinformatics 24:137.

Tabla 1. Principales QTL relacionados con la cantidad y composición de la grasa intramuscular (GIM) de los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*.

<i>gluteus medius</i>				<i>longissimus dorsi</i>			
SSC	Carácter	F-value	Posición	SSC	Carácter	F-value	Posición
3	%GIM	12.64*	15cM	3	%GIM	10.24+	53cM
3	%Vaccénico	12.95*	15cM	6	%Vaccénico	14.56*	95cM
5	%Mirístico	13.98*	94cM	6	Colesterol(mg/g)	16.57**	35cM
7	%GIM	16.48**	133cM	12	%SAT	13.31*	74cM
7	%Vaccénico	17.60**	81cM	14	%Esteárico	12.28*	85cM
18	%Palmítico	15.67**	39cM				
18	%SAT ^a	14.46*	40cM				

^a Porcentaje de ácidos grasos saturados

* p<0.05; **p<0.01 a nivel genómico

Tabla 2. Genes con expresión diferencial entre los dos músculos y los dos grupos con alto y bajo nivel de metabolismo lipídico

	Nº Sondas (Genes) ^A	Sobreexpresados grupo 1	Sobreexpresados grupo 2	Rango Cociente Expresiones
MÚSCULO	350 (292)	GM 119 (96)	LD 231 (196)	0.32-8.84
GRUPO	579 (459)	Alto 459 (376)	Bajo 120 (83)	0.43-2.76

^A Nº de Sondas (Genes) que cumplieron los requisitos p<0.001, FDR < 0.01 y FoldChange >1.2 o <0.8. (Resultados con BRB-array Tools)

Tabla 3. Genes con expresión diferencial entre grupos con alto y bajo metabolismo lipídico y concordancia posicional con los QTL detectados.

SSC (posición QTL)	Banda citogenética porcina	Banda citogenética Humana	Genes candidatos
3 (15cM)	chr.3 (0-33 cM)	chr.7 (63-102 cM)	GNAI2
3 (53cM)	chr.3 (33-76 cM)	chr.16 (0-31 cM); chr.2 (50-114 cM)	RRN3; IK
5 (94cM)	chr.5 (88-118 cM)	chr.12 (0-105 cM)	MRLC2 ^a GPDI MKRN1 ^a SP1 ^a TAF9
6 (95cM)	chr.6 (84-107 cM)	chr.1 (11-40 cM); chr.18 (0-40 cM)	OXCT1; NPC1 AQP4
6 (35cM)	chr.6 (0-53 cM)	chr.16 (56-89 cM)	SERF1A
7 (133cM)	chr.7 (100-137 cM)	chr.14 (72-92 cM)	NPC2
7 (81cM)	chr.7 (74-100 cM)	chr.15 (31-95 cM); chr.14 (18-73 cM)	TCF12 ^a IDH1; MYH10 ^a PRPF39
12 (74cM)	chr.12 (56-89 cM)	chr.17 (31-65 cM)	GALNT1 ^a COASY PKCNT1
14 (85cM)	chr.14 (80-101 cM)	chr.10 (118-130 cM)	TIAL1 ^a BAG3 LYRM2 ALDOC
18 (40cM)	chr.18 (27-50 cM)	chr.7 (25-120 cM)	GNAI2 COASY

^a El subíndice denota los genes diferencialmente expresados entre Músculos.

Agradecimientos: Este proyecto ha sido financiado por el MICINN (AGL2007-66707-C02-01 y GEN2003-20658-C05-05). Agradecemos a Selección Batallé su cooperación en la obtención del material animal y a D. Almuzara su apoyo técnico. M. Solé es beneficiaria de una beca FPI del MICINN.

STUDY OF GENES INVOLVED IN THE INTRAMUSCULAR FAT CONTENT AND COMPOSITION OF MUSCLES *LONGISSIMUS DORSI* AND *GLUTEUS MEDIUS* IN A DUROC POPULATION

ABSTRACT: The intramuscular fat (IMF) content and composition are key traits in organoleptic, technological and nutritional quality of meat. We have conducted a study of genes influencing these traits in pigs by two approaches: QTL and expression analyses. The animal material consisted on 350 barrows of a commercial Duroc line, distributed in 5 half-sib families. The percentage of IMF, cholesterol content and fatty acid composition were determined in *Longissimus dorsi* and *Gluteus medius* muscles. A gene expression analysis of individuals with extreme values for several parameters related with lipid metabolism and fat meat characteristics was carried out in these two muscles by RNA hybridization in the *GeneChip Porcine Genome Array (Affymetrix)*. All individuals were genotyped for 110 microsatellites distributed across the 18 autosomes. Several genome-wide significant QTL with effects on %IMF and several fatty acid profile have been detected at SSC 3, 6, 7, 12, 14 and 18. Moreover, we have detected 350 genes differentially expressed between the two analysed muscles, along with 579 genes differentially expressed in the two groups of animals with high and low levels of lipid metabolism. A list of potential candidate genes has been elaborated from genes differentially expressed and located in the confidence intervals of detected QTL.

Keywords: intramuscular fat, QTL, gene expression, candidate gene