

# IDENTIFICACIÓN DE UNA ASOCIACIÓN SIGNIFICATIVA ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA ADIPONECTINA (*ADIPOQ*) PORCINA Y LOS NIVELES SÉRICOS DE LDL

<sup>1</sup>Quintanilla, R., <sup>2</sup>Melo, C., <sup>1</sup>Castelló, A., <sup>2</sup>Zidi, A., <sup>3</sup>Gallardo, D., <sup>1</sup>Cánovas, A., <sup>3</sup>Jordana, J., <sup>4</sup>Díaz, I., <sup>1</sup>Pena, R.N., <sup>2,3</sup>Amills M.

<sup>1</sup>Genética i Millora Animal, IRTA, Lleida 25198; <sup>2</sup>Departament de Genètica Animal, Centre de Recerca Agrigenòmica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; <sup>3</sup>Departament Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; <sup>4</sup>IRTA, Centre de Tecnologia de la Carn, Monells 17121. (marcel.amills@uab.cat)

## INTRODUCCIÓN

Las concentraciones de lípidos séricos constituyen uno de los principales factores de riesgo en la susceptibilidad a las enfermedades de tipo coronario, considerándose que una ratio baja de lipoproteínas de alta densidad (HDL) vs lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un importante factor predisponente. La elevada similitud fisiológica entre humano y porcino ha impulsado la utilización de esta especie doméstica como modelo biomédico para investigar la arquitectura genética de las concentraciones de lípidos séricos. En este sentido, Gallardo et al. (2008) realizaron un barrido genómico para dichos caracteres en una población comercial Duroc y, entre otros hallazgos, identificaron un QTL para la concentración de LDL a 190 días en el cromosoma 13 (intervalo comprendido entre los marcadores *S0068-SW398*). El análisis del contenido génico de esta región permitió identificar el locus de la adiponectina (*ADIPOQ*) como un posible gen candidato. En humano, se ha demostrado que los niveles de *ADIPOQ* y LDL están correlacionados negativamente (Kantartzis et al. 2006), probablemente debido a que esta adipoproteína aumenta el catabolismo muscular de las lipoproteínas precursoras de las LDL (Qiao et al. 2008).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los niveles de LDL se midieron en cerdos Duroc a la edad de 190 días (N = 350). La metodología empleada así como el manejo productivo de dicha población han sido descritos por Gallardo et al. (2008). La amplificación de 2.37 kb del cDNA *ADIPOQ* se realizó mediante los cebadores indicados en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 0.5 μM de cada cebador, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) y 2 μl de reacción de retrotranscripción en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico fue distinto para cada uno de los fragmentos analizados: Fragmento 1: 94 °C-1 minuto, 64 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos; Fragmento 2: 94°C-1 minuto, 61°C-1 minuto, 72 °C-2 minutos; Fragmentos 3 y 4: 94 °C-1 minuto, 66 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos. Para el genotipado del polimorfismo del gen *ADIPOQ* se utilizó la técnica de pirosecuenciación, empleando un equipo PSQ HS 96 system (Qiagen). Para analizar el efecto del genotipo *ADIPOQ* sobre la concentración de LDL a 190 días, se empleó distintos modelos estadísticos con la finalidad de discriminar entre el efecto del gen *ADIPOQ* y el efecto del QTL para LDL a 190 días. Los modelos empleados en dicho análisis fueron los siguientes:

$$\begin{array}{ll} y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta \text{cov}_{ijkl} + e_{ijkl} & \text{Modelo 0} \\ y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta \text{cov}_{ijkl} + \text{gen}_k + e_{ijkl} & \text{Modelo G} \\ y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta \text{cov}_{ijkl} + \alpha p_{ijkl} + e_{ijkl} & \text{Modelo Q} \\ y_{ijkl} = \mu + b_i + d_{j(i)} + \beta \text{cov}_{ijkl} + \text{gen}_k + \alpha p_{ijkl} + e_{ijkl} & \text{Modelo GQ} \end{array}$$

Dónde:  $y_{ijk}$  son las observaciones fenotípicas (logaritmo de la concentración sérica de LDL a 190 días) del individuo  $k$  en los niveles  $i^{\text{th}}$  y  $j^{\text{th}}$  de los efectos fijos;  $b_i$  es el efecto fijo del lote  $i^{\text{th}}$  (4 niveles);  $d_{j(i)}$  es el efecto fijo de la fecha de extracción de sangre  $j^{\text{th}}$ , anidado con el lote de engorde  $i^{\text{th}}$  (2 fechas de extracción a 190 días por lote);  $\beta$  y  $\text{cov}_{ijk}$  son el coeficiente de

regresión y la covariable (espesor del tocino dorsal);  $gen_k$  es el efecto del genotipo  $k^{th}$  para el gen *ADIPOQ* (tres niveles);  $p_{ijk}$  es la probabilidad de que el individuo  $i$  haya heredado cierto alelo vía padre en la posición de máxima significación del QTL (72 cM en SSC13; Gallardo et al. 2008)

Tabla 1. Cebadores utilizados en la caracterización del gen *ADIPOQ* porcino

Fragmento	Nombre	Secuencia del cebador
PCR1	ADIPOQ_Fw1	5'- CTGTTGTTGGGAGCTGTTCT-3'
	ADIPOQ_Rv1	5'- TTGTCAGCATAGACCCCAT-3'
	ADIPOQ_Rvint1 <sup>1</sup>	5'-ATGCCCTGGGATACCCGC-3'
PCR2	ADIPOQ_Fw2	5'- AATGGGGTCTATGCTGACAA-3'
	ADIPOQ_Rv2	5'- TGGGCGTTCACTTAAGTCTC-3'
	ADIPOQ_Rvint2 <sup>1</sup>	5'-GAAGACCTCAGCCTGGTGG-3'
PCR3	ADIPOQ_Fw3	5'- CAGTCCTGAAGAAGGCACAT-3'
	ADIPOQ_Rv3	5'- TTCTCGGTCATCACAAGGTT-3'
PCR4	ADIPOQ_Fw4	5'- GCAAGCTTTCCTCACACACT-3'
	ADIPOQ_Rv4	5'- TCACTCAAGCTGTTGTCTCCT-3'

<sup>1</sup> Cebadores para la secuenciación de regiones internas del amplicón

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar el alineamiento de las distintas secuencias nucleotídicas del gen *ADIPOQ* porcino se halló un SNP c.\*1512G>T localizado en la región 3' UTR. Posteriormente, mediante la técnica de pirosecuenciación se procedió a genotipar dicho polimorfismo en la población experimental Duroc y se realizó un análisis de asociación con cuatro modelos distintos, cuyo resultado puede verse en la Tabla 2.

Tabla 2. Asociación entre el genotipo del locus *ADIPOQ* y la concentración de LDL

Contrastes	Estadístico F (g.l., grados de libertad)	P-valor nominal
Modelo Q vs modelo 0	8.09 (1 g.l.)	0.0059
Modelo G vs modelo 0	7.24 (3 g.l.)	0.0003
Modelo GQ vs modelo Q	3.28 (3 g.l.)	0.0260
Modelo GQ vs modelo G	2.65 (1 g.l.)	0.1081

Cabe destacar que el contraste del modelo que considera el QTL de SSC13 (modelo Q) vs el modelo que incluye el QTL SSC13 y el genotipo del locus *ADIPOQ* (modelo GQ) fue significativo ( $P = 0.0260$ ). Por el contrario, el contraste de los modelos G y GQ no fue significativo. Dicho de otro modo, el efecto significativo del gen *ADIPOQ* sobre la concentración sérica de LDL no desaparece cuando se incluye el QTL SSC13 en el modelo, y en cambio el efecto del QTL sí deja de ser significativo cuando se toma en consideración el genotipo *ADIPOQ*. Todo ello sugiere que existe una asociación genuina entre el genotipo *ADIPOQ* y la concentración sérica de LDL a 190 días, aunque ello no implique necesariamente la existencia de causalidad. Desde un punto de vista fisiológico, este resultado tiene mucho sentido puesto que existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de *ADIPOQ* y la concentración y el tamaño de las partículas LDL (Kantartzis et al. 2006, Lara-Castro et al. 2006). Las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL son los precursores de las LDL y su función consiste en proporcionar triglicéridos a los tejidos. Ha podido demostrarse que la hormona *ADIPOQ* aumenta el catabolismo de las VLDL a nivel muscular incrementando la activación de la lipoproteína lipasa o LPL (Qiao et al. 2008). Más concretamente, Qiao et al. (2008)

produjeron ratones transfectados con un vector adenoviral que expresaban niveles de ADIPOQ doce veces superiores a lo normal, y observaron una disminución del 40% de triglicéridos plasmáticos y ácidos grasos libres, así como un marcado incremento de la actividad y expresión de la LPL muscular y de la expresión de receptores de VLDL. Todo ello implica, necesariamente, una reducción de LDL circulantes.

Con la finalidad de comprender la base molecular de la asociación observada, se está procediendo a determinar si el polimorfismo de la región 3'UTR del locus *ADIPOQ* porcino afecta a los niveles de transcripción de dicho gen

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gallardo, D., Pena, R. N., Amills, M., Varona, L., Ramírez, O., Reixach, J., Díaz, I., Tibau, J., Soler, J., Prat-Cuffi, J. M., Noguera, J. L. & Quintanilla, R. 2008. Mapping of quantitative trait loci for cholesterol, LDL, HDL and triglyceride serum concentrations in pigs. *Physiol Genomics* 35: 199–209.
- Kantartzis, K., Rittig, K., Balletshofer, B., Machann, J., Schick, F., Porubska, K., Fritsche, A., Häring, H.U. & Stefan, N. 2006. The relationships of plasma adiponectin with a favorable lipid profile, decreased inflammation, and less ectopic fat accumulation depend on adiposity. *Clin. Chem.* 52: 1934-42.
- Lara-Castro, C., Luo, N., Wallace, P., Klein, R. L., Garvey, W.T. 2006. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55: 249-259.
- Qiao, L., Zou, C., van der Westhuyzen, D.R. & Shao, J. 2008. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes* 57: 1824-33.

**Agradecimientos:** Esta investigación ha sido financiada con los proyectos AGL2010-22208-C02 (Ministerio de Ciencia e Innovación) y CSD 2007-00036 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Programa Consolider Ingenio 2010). Nuestro agradecimiento a *Selección Batallé* S.A. por proporcionar el material animal y por su inestimable colaboración en el protocolo experimental.

## IDENTIFICATION OF A SIGNIFICANT ASSOCIATION BETWEEN THE VARIABILITY OF THE PIG ADIPONECTIN (*ADIPOQ*) GENE AND SERUM LDL LEVELS

**ABSTRACT:** By performing a genome scan for porcine serum lipid traits in a Duroc commercial population, we were able identify a significant QTL for low-density lipoprotein (LDL) concentration at 190 days on chromosome 13 (SSC13). The adiponectin (*ADIPOQ*) locus constitutes a potential candidate gene for this QTL, because the levels of this hormone are strongly correlated with LDL and triglyceride levels. Sequencing of 2.37 Kb of the pig *ADIPOQ* cDNA resulted in the identification of a c.\*1512G>T 3'UTR polymorphism. This mutation was genotyped in our Duroc resource population by using a pyrosequencing-based approach. Association analyses with distinct statistical models evidenced that part of the variation of LDL levels is explained by the *ADIPOQ* genotype. This finding matches very well with results obtained in human and model organisms showing that *ADIPOQ* is a major determinant of the catabolism of very-low density lipoproteins, the precursors of LDL, and that variability in the 3'UTR of the human *ADIPOQ* gene is strongly associated with adiponectin levels and body weight.

**Keywords:** adiponectin, low-density lipoproteins, pig