

## PERFIL DE EXPRESIÓN Y VARIABILIDAD DEL GEN *SOLUTE CARRIER FAMILY 27A4 (SLC27A4)* PORCINO

Zidi, A.<sup>1</sup>, Melo, C.<sup>1</sup>, Gallardo, D.<sup>2</sup>, Quintanilla R.<sup>3</sup>, Castelló A.<sup>1</sup>, Jordana, J.<sup>2</sup>, Díaz, I.<sup>4</sup>, Amills M.<sup>1</sup>, Pena, R. N.<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>Departament de Genètica Animal, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; <sup>2</sup>Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; <sup>3</sup>Genètica i Millora Animal, IRTA, Lleida 25198; <sup>4</sup>Funcionalitat i Nutrició, IRTA, Monells 17121; <sup>5</sup>Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida, Lleida 25198.

### RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo consisten en caracterizar (1) El perfil de expresión del gen *SLC27A4* porcino en distintos tejidos y (2) La variabilidad de este gen y su asociación con distintos caracteres vinculados al metabolismo lipídico en una población comercial Duroc. El análisis de expresión mediante PCR cuantitativa permitió determinar que el gen *SLC27A4* se transcribe de forma predominante en intestino e hígado, y a menores niveles en tejido adiposo, músculo y corazón. En este sentido, cabe destacar que estudios realizados en humano y ratón han permitido demostrar que *SLC27A4* es el principal transportador de ácidos grasos de cadena larga a nivel intestinal. Respecto al objetivo 2, la secuenciación parcial del gen *SLC27A4* en 15 cerdos Duroc permitió identificar un polimorfismo sinónimo *c.849C>T*. La realización de un análisis de asociación con caracteres lipídicos evidenció la existencia de una asociación sugestiva con el porcentaje de ácidos grasos saturados del músculo *gluteus medius*.

### INTRODUCCIÓN

Las proteínas transportadoras de ácidos grasos de la familia *Solute carrier Family 27A (SCL27A/FATP)* tienen un papel esencial en la absorción de ácidos grasos de cadena larga a nivel tisular. En humano, esta familia génica incluye seis proteínas distintas, altamente homólogas a nivel estructural aunque divergentes en cuanto a sus perfiles de expresión, lo cual sugiere la existencia de una cierta especificidad funcional (Stahl et al., 2001). Por ejemplo el gen *SCL27A1* presenta un nivel de expresión elevado en músculo y tejido adiposo (Schaffer y Lodish, 1994), mientras que el gen *SCL27A4* se expresa preferentemente en el intestino delgado (Stahl et al., 2001). Diferentes estudios han demostrado que la variabilidad de los genes *SCL27A* está asociada con la calidad de la carne y el espesor de la grasa dorsal porcina (Hua et al., 2011), así como con la producción de leche en vacuno (Lv et al., 2011). En el caso del gen *SCL27A4*, Xu et al. (2009) identificaron una asociación entre el genotipo del polimorfismo *g.1777G>A* y el peso al nacimiento, la ganancia media diaria, y el espesor de la grasa dorsal en cerdos Landrace. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la secuenciación parcial del gen *SCL27A4* con el objetivo de identificar polimorfismos y realizar un estudio de asociación con las concentraciones de lípidos séricos y el perfil de ácidos grasos de los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*. Asimismo, se ha caracterizado el perfil de expresión tisular de *SLC27A4*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Análisis de la expresión tisular del gen *SLC27A4***

Se extrajo RNA total de muestras de hígado, músculo diafragma, músculo *gluteus medius*, músculo *longissimus dorsi*, corazón, intestino y tejido adiposo mediante el reactivo Trizol (Sigma-Aldrich), según el protocolo facilitado por el fabricante. La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa, mientras que la pureza y la concentración fueron estimadas con un equipo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop). El RNA (1 ug) fue retrotranscrito con el kit RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido se diluyó en una proporción 1:30 con ddH<sub>2</sub>O y se almacenó a -40 °C. Las PCR cuantitativas se llevaron a cabo por triplicado en un aparato ABI-7500 (Applied Biosystems) en un volumen final de 5 µl que incluía 1x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM de cada cebador (5'-CCC AGC TCC TGG AGA AGG A y 5'-GCA GG TCT GTC TTC TGT AGC TTG A-3') y 3 µl de cDNA diluido. El perfil térmico fue de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 93 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Como referencia para normalizar los datos de expresión, se emplearon dos genes *housekeeping* (*RPL32* y *HPRT1*) de acuerdo a Canovas et al. (2010). La expresión génica se cuantificó y normalizó mediante el método  $\Delta\Delta C_t$  (Yuan et al. 2006).

### **Identificación de polimorfismos en el gen *SLC27A4***

Se extrajo RNA total del modo descrito en la sección anterior. La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando el kit ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El cDNA del gen *SLC27A4* fue amplificado a partir de muestras de 15 cerdos Duroc elegidos aleatoriamente. Los diferentes fragmentos amplificados fueron secuenciados mediante el kit BigDye Sequencing kit v.3.1 (Applied Biosystems), y las reacciones de secuenciación fueron analizadas mediante un equipo de electroforesis capilar ABI PRIM 3730 (Applied Biosystems). Para identificar posibles polimorfismos, las secuencias fueron alineadas y editadas utilizando el programa SeqScape (Applied Biosystem).

### **Genotipado del locus *SLC27A4* y realización de un análisis de asociación con caracteres lipídicos**

El polimorfismo *c.849C>T* del gen *SLC27A4* fue genotipado en 319 cerdos Duroc distribuidos en cinco familias de medio hermanos paternos (procedentes del apareamiento de cinco machos parentales y 400 madres). La concentración de los lípidos séricos (colesterol, LDL, HDL y triglicéridos) se midió a dos edades distintas (45 y 190 días) de acuerdo con Gallardo et al. (2009). El porcentaje y la composición de la grasa intramuscular fueron analizados en los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi* de acuerdo con Gallardo et al. (2009). El análisis de asociación se llevó a cabo con el procedimiento proc GLM del programa SAS (SAS 9.2, SAS Inst. Inc.). En el modelo estadístico se incluyeron como factores fijos el genotipo y el lote de engorde. La edad del animal, el peso vivo al sacrificio y el porcentaje de grasa intramuscular fueron incluidos en el modelo estadístico como covariables para analizar los lípidos séricos, el porcentaje y el perfil de los ácidos grasos de la grasa intramuscular, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Expresión tisular del gen *SLC27A4***

El análisis de expresión del gen *SLC27A4* porcino evidenció que se transcribe en todos los tejidos analizados (Figura 1). La expresión de este gen es particularmente importante a nivel del intestino. Ello concuerda con estudios realizados en humano y en ratón, en los cuales se demuestra que *SLC27A4* es el principal transportador de ácidos grasos de cadena larga a nivel de los enterocitos (Stahl et al., 2001). De este modo, se ha observado que la adición de oligonucleótidos *antisense SLC27A4* a cultivos primarios de enterocitos murinos implica una reducción del 50% en la absorción de ácido oleico (Stahl et al., 1999). Por otra parte, en humano también se ha descrito la expresión de *SLC27A4* en músculo, hígado y corazón (Stahl et al., 2001), lo cual coincide con los datos presentados en este trabajo.

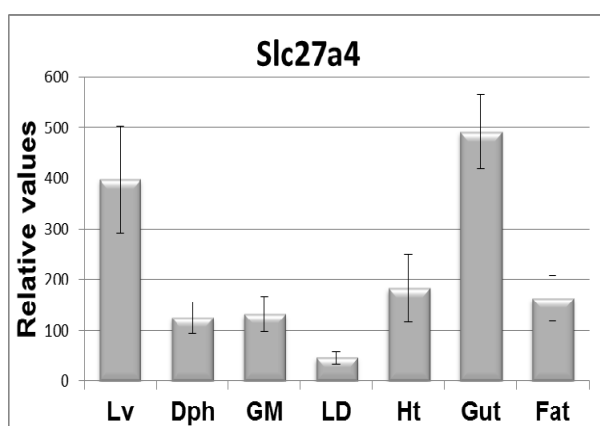


Figura 1. Perfil de expresión del mRNA *SLC27A4* porcino en hígado (Lv), músculo diafragma (Dph), músculo *gluteus medius* (GM), músculo *longissimus dorsi* (LD), corazón (Ht), intestino (Gut) y tejido adiposo (Fat).

### **Análisis de asociación entre el genotipo *SLC27A4* porcino y caracteres lipídicos**

Un total de 1.80 kb del gen *SLC27A4* porcino fueron amplificados y secuenciados. El alineamiento de las secuencias correspondientes a 15 individuos seleccionados al azar permitió identificar un polimorfismo sinónimo *c.849C>T*. El genotipado de 319 cerdos de la población experimental Duroc reveló que el genotipo TT (n = 3) es muy minoritario. En cuanto al análisis de asociación, no se observó un efecto significativo del genotipo *SLC27A4* sobre las concentraciones de lípidos séricos a 45 y 190 días (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de asociación entre el polimorfismo *c.849C>T* del gen *SLC27A4* porcino y las concentraciones de lípidos séricos a 45 y 190 días.

<b>Lípidos séricos a 45 días</b>			
<b>Carácter</b>	<b>CC (n = 264)</b>	<b>CT (n = 52)</b>	<b>P-value</b>
Colesterol	80.45	82.20	0.89
LDL	40.02	41.045	0.50
HDL	31.62	32.11	0.68
Triglicéridos	43.90	43.08	0.76
<b>Lípidos séricos a 190 días</b>			
<b>Carácter</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>P-value</b>
Colesterol	125.93	122.98	0.46
LDL	63.93	61.36	0.41
HDL	51.68	52.17	0.75
Triglicéridos	51.44	45.54	0.09

Tampoco se detectó ninguna asociación entre el genotipo *SLC27A4* y diversos caracteres lipídicos medidos en el músculo *longissimus dorsi* (Tabla 2). No obstante, se detectó una asociación significativa (sólo a nivel nominal) con el porcentaje de ácidos grasos saturados del músculo *gluteus medius* (Tabla 3). En este sentido, los cerdos heterocigotos CT presentaron un menor porcentaje de ácidos grasos saturados que los individuos homocigotos CC (*P*-value = 0.03; Tabla 3). Dicha asociación, sin embargo, resultó ser no-significativa después de aplicar la corrección de Bonferroni para tests múltiples, por lo que sólo puede considerarse como sugestiva.

Tabla 2. Resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo *c.849C>T* del gen *SLC27A4* porcino y el porcentaje y la composición de la grasa del músculo *longissimus dorsi*.

<b><i>Longissimus dorsi</i></b>			
<b>Carácter</b>	<b>CC (n = 264)</b>	<b>CT (n = 52)</b>	<b>P-value</b>
Grasa intramuscular	3.84	3.76	0.71
Ácido palmítico	23.39	23.04	0.07
Ácido esteárico	11.69	11.66	0.88
Ácido oleico	34.46	34.83	0.60
Ácido linoleico	14.59	14.50	0.88
Ácidos grasos saturados	36.98	36.56	0.18
Ácidos grasos monoinsaturados	20.23	20.25	0.98
Ácidos grasos poliinsaturados	42.78	43.18	0.60

Desde un punto de vista funcional, cabe destacar que Jia et al. (2007) demostraron que en fibroblastos la deficiencia de *SLC27A4* está significativamente asociada con la disminución del contenido de ácidos grasos saturados y, más específicamente, de ácido esteárico (C18:0). Este dato concuerda con el resultado de nuestro análisis de asociación, y aunque del mismo no quepa inferir la existencia de una relación causal sería de gran interés investigar el papel del gen *SLC27A4* porcino en la absorción de ácidos grasos a nivel muscular.

Tabla 3. Resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo *c.849C>T* del gen *SLC27A4* porcino y el porcentaje y la composición de la grasa del músculo *gluteus medius*.

<i>Gluteus medius</i>			
Carácter	CC (n = 264)	CT (n = 52)	P-value
Grasa intramuscular	5.16	4.84	0.27
Ácido palmítico	23.23	22.96	0.11
Ácido esteárico	11.20	10.92	0.08
Ácido oleico	35.04	34.17	0.17
Ácido linoleico	15.01	15.85	0.12
Ácidos grasos saturados	36.46 <sup>a</sup>	35.92 <sup>b</sup>	0.03
Ácidos grasos monoinsaturados	20.41	21.80	0.09
Ácidos grasos poliinsaturados	43.11	42.27	0.22

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado mediante los proyectos AGL2007-66707-C02 y AGL2010-22208-C02-02 (Ministerio de Ciencia e Innovación) y CSD 2007-00036 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Consolider Ingenio 2010 Program). Nuestro más sincero agradecimiento a Selección Batallé S.A por proporcionar el material animal y por su colaboración en el protocolo experimental.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Cánovas, A., Quintanilla, R., Amills, M., Pena, R.N. 2010. *BMC Genomics*, 11:372;
- Gallardo, D., Quintanilla, R., Varona, L., Díaz, I., Ramírez, O., Pena, R.N., Amills M. 2009. *Anim Genet* 40: 410-417;
- Hua, X., Zhang, L.F.,Cai, Z.W.,Jiang, X.L.,Xu, N.Y.,Zhang, J.Z. 2011. *Jiangsu J. Agric. Sci.* (DOI: CNKI:SUN:JSNB.0.2011-01-018);
- Jia, Z., Moulson, C.L., Pei, Z., Miner, J.H., Watkins, P.A. 2007. *J. Biol. Chem.* 282:20573-83;
- Lv, Y., Wei, C., Zhang, L., Lu, G., Liu, K., Du, L. 2011. *Anim Biotechnol.* 22: 1-6;
- Schaffer, J.E., Lodish, H.F. 1994. *Cell*:79: 427-436;
- Stahl, A., Hirsch, D.J., Gimeno, R.E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L.A., Lodish, H.F.1999. *Mol Cell.* 4:299-308;
- Stahl, A., Gimeno, R.E., Tartaglia, L.A., Lodish, H.F. 2001. *Trends Endocrinol Metab.* 12: 266-273;
- Xu, Z.Y., Xiong, Y.Z., Lei, M.G., Li, F.E., Zuo, B. 2009. *Mol. Biol. Rep.* 36: 1427-1432;
- Yuan, S. J., Reed, A., Chen, F., Stewart, C. N. 2006. *BMC Bioinformatics*, 7:85.