

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA FENOTIPOS LIPÍDICOS EN UNA POBLACIÓN COMERCIAL DUROC

Emilio Mármol-Sánchez^{1,*}, Raquel Quintanilla², Joan Tibau³, Tainã Figueiredo Cardoso^{1,4}, Marcel Amills¹

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193. ²Genética y Mejora Animal, IRTA, Torre Marimon, Caldes de Montbui, 08140. ³IRTA-Monells, Finca Camps i Armet s/n 17121, Monells, Spain. ⁴Fundación CAPES, Ministerio de Educación de Brasil, Brasilia - DF 70040-020, Brasil. *emilio.marmol@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

En un trabajo previo, Cardoso et al. (2017) demostraron que la ingesta de alimento tiene efectos sobre la expresión, a nivel muscular, de centenares de genes, entre los cuales se encuentran algunos encargados de regular los ritmos circadianos. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar el impacto de la variabilidad de los genes que, en el trabajo de Cardoso et al. (2017), presentaron expresión diferencial tras la ingesta de alimentos, sobre la variación de caracteres de interés productivo en porcino. También se trató de dilucidar si el polimorfismo de dichos genes tiene efectos sobre la expresión de los mismos en el hígado y en el músculo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 345 cerdos Duroc castrados fueron alimentados en condiciones de cría intensiva, y sacrificados cuando alcanzaron los 122 Kg de peso vivo aproximadamente, con una edad de entre 180 a 200 días. Se tomaron medidas fenotípicas para diversos caracteres productivos durante el ciclo de producción y tras el sacrificio, tal y como se detalla en Gallardo et al. (2009).

Basándonos en resultados descritos por Cardoso et al. (2017), se seleccionaron 9 genes candidatos relacionados con el metabolismo de lípidos y otras rutas metabólicas. La variabilidad de estos genes se caracterizó a partir de los datos de la secuenciación de los genomas de los 5 machos fundadores de la población Duroc (datos no publicados). En total, se seleccionaron 21 SNPs que mostraron un potencial efecto funcional (*high impact*, *missense*, *splice site regions*) de acuerdo a las predicciones realizadas con el paquete informático SnpEff (Cingolani et al., 2012), tomando el genoma porcino 10.2 como referencia. El genotipado de los SNPs se llevó a cabo mediante un equipo *QuantStudio™ 12K flex Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific).

Los análisis de asociación entre SNPs y caracteres fenotípicos, metabólicos y valores de expresión medidos con microarrays en músculo *Gluteus medius* e hígado, se llevaron a cabo con el paquete informático GEMMA (Zhou & Stephens, 2012), que emplea una aproximación mixta para considerar la estratificación poblacional y el parentesco, mediante un test exacto de significación. Los resultados obtenidos fueron corregidos mediante el método del *false-discovery rate* (Benjamini & Hochberg, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de asociación nos permitieron identificar asociaciones significativas entre los polimorfismos analizados y caracteres relacionados con el metabolismo lipídico (**Tabla 1**). Los niveles séricos de colesterol LDL obtenidos a aprox. 190 días de edad, estuvieron significativamente asociados al genotipo del SNP rs330779504, con efecto estimado *splice site*, localizado en el cromosoma 1 (269,36 Mb), en una región coincidente con el inicio del intrón 14 del gen de la Mitoguardina 2 (*MIGA2*). Se ha demostrado que ratones en los cuales se ha inactivado el gen *MIGA2*, presentan un peso menor y también una reducción en la acumulación de grasa (Podrini et al. 2015). Asimismo, se sabe que la disfunción mitocondrial suele venir acompañada de importantes alteraciones del metabolismo lipídico (Vamecq et al. 2012).

Por otra parte, se observó que el genotipo del SNP rs320439526, localizado en la región 5'-UTR del gen regulador circadiano del Criptocromo 2 (*CRY2*), está asociado al contenido de ácido esteárico (C18:0) del músculo *Longissimus dorsi*. En estudios previos, se ha demostrado la existencia de una relación estrecha entre el complejo regulador de los ciclos circadianos, uno de cuyos componentes es el gen *CRY2*, y el metabolismo de los ácidos grasos (Gooley et al., 2014) y los carbohidratos (Lamia et al., 2011).

También se analizó si los 21 SNPs seleccionados se hallan asociados a los niveles de expresión muscular y hepática de los genes que los contienen. Los resultados obtenidos (**Tabla 2**) permitieron determinar que los SNPs de los genes *MIGA2* (rs330779504) y *CRY2* (rs320439526) presentan asociaciones significativas con los niveles de los correspondientes ARN mensajeros en el músculo, aunque no en el hígado. Además, se pudo detectar la asociación entre el polimorfismo no-sinónimo rs335603631 del gen *NPAS2* y la expresión del propio gen en el tejido hepático, pero no en el músculo *Gluteus medius*. En este sentido, cabe destacar que el gen *NPAS2* ha sido descrito como uno de los reguladores circadianos relacionados con el control del metabolismo lipídico en el hígado (O'Neil et al., 2013; Wang & Suthat, 2016).

REFERENCIAS

Cardoso T.F. 2017. *BMC Gen.* 18(1):603 • Gallardo D. 2009. *Anim. Genet.* 40:410-7. • Cingolani P. 2012. *Fly* 6(2):80-92. • Zhou X. y Stephens M. 2012. *Nature* 44(7):821-824. • Benjamini Y. y Hochberg Y. 1995. *J. Roy. Stats. Soc.* 57:289-300. • Podrini C. 2015. *FASEB J.* 29(5):1676-87. • Vamecq J. 2012. *Curr. Drug. Metab.* 13(10):1388-400. • Gooley J.J. 2014. *J. Genet. Genom.* 41(5):231-250. • Lamia K.A. 2011. *Nature* 480(7378):552-556. • O'Neil D. 2013. *Mol. Genet. Met.* 110(3):10.1016/j.ymgme.2013.08.015. • Wang L. y Suthat L. 2016. *J. Invest. Med.* 64(7):1158-1161.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL2013-48742-C2-2-R concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). E. Mármol-Sánchez ha sido financiado con un contrato FPU (FPU15/01733) por el Ministerio de Educación Cultura y Deporte (MECD).

Tabla 1: Polimorfismos significativamente asociados a fenotipos lipídicos.

Gen	SNP	Tipo	Fenotipo	P-value	q-value	$\delta \pm SE$	A ₁	MAF
<i>MIGA2</i>	rs330779504 (1:269.360 Mb)	Splice site (G/A)	LDL ₂	7.92E-04	1.66E-02	7.04 (1.96)	A	0.236
<i>CRY2</i>	rs320439526 (2:16.620 Mb)	5'-UTR (G/A)	LD (C18:0)	8.49E-04	1.78E-02	0.39 (0.11)	A	0.353

¹q-value: q-value calculado mediante el método del *false-discovery rate*, δ : efecto alélico y error estándar (SE), A₁: alelo minoritario, MAF: frecuencia del alelo minoritario, LDL₂: concentración sérica de lipoproteínas de baja densidad a ~ 190 días, LD (C18:0): contenido de ácido esteárico en el músculo *Longissimus dorsi*.

Tabla 2: Polimorfismos significativamente asociados a valores de expresión de sondas de microarray.

Gen	SNP	Tipo	Sonda	Tejido	q-value	$\delta \pm SE$	A ₁	MAF
<i>MIGA2</i>	rs80832336 (1:269.359 Mb)	Splice site (C/T)	Ssc.19153.2.A1_at	GM	5.95E-03	-0.28 (0.09)	T	0.381
	rs330779504 (1:269.360 Mb)	Splice site (G/A)	Ssc.19153.2.A1_at	GM	1.30E-05	-0.53 (0.09)	A	0.236
	rs80832336 (1:269.359 Mb)	Splice site (C/T)	Ssc.19153.1.S1_at	GM	7.81E-03	-0.23 (0.07)	T	0.381
	rs330779504 (1:269.360 Mb)	Splice site (G/A)	Ssc.19153.1.S1_at	GM	4.41E-05	-0.39 (0.08)	A	0.236
<i>CRY2</i>	rs320439526 (2:16.620 Mb)	5'-UTR (G/A)	Ssc.26267.1.S1_at	GM	1.97E-02	-0.20 (0.09)	A	0.353
<i>NPAS2</i>	rs335603631 (3:53.334 Mb)	Missense (T/G)	Ssc.24441.2.S1_a_at	Hígado	2.53E-02	-0.14 (0.06)	G	0.241

¹q-value: q-value calculado mediante el método del *false-discovery rate*, δ : efecto alélico y error estándar (SE), A₁: alelo minoritario, MAF: frecuencia del alelo minoritario, GM: músculo esquelético *Gluteus medius*.

ASSOCIATION ANALYSIS OF CANDIDATE GENES FOR LIPID PHENOTYPES IN A COMMERCIAL DUROC PIG POPULATION

Abstract: We have performed an association study focused on different selected SNP variants and phenotypes with commercial relevance (*i.e.* fatness, fatty acid composition and meat quality), as well as on microarray expression data, in 345 genotyped commercial Duroc pigs. Variants were filtered among those showing potential functional effects and localizing to selected genes that showed differential expression in a previous study of differential muscle mRNA expression in response to food intake. Association analyses were carried out using the GEMMA software. Significant associations were detected between blood LDL cholesterol concentration and rs330779504 SNP located within the *MIGA2* gene, as well as for stearic acid composition in *Longissimus dorsi* and rs320439526 in the *CRY2* gene. These SNPs, as well as rs80832336 and rs335603631, were identified as affecting *MIGA2*, *CRY2* and *NPAS2* expression levels, respectively. Altogether, these data support the influence of circadian genes variation on fatty acid metabolism and lipid depot, which may provide new insights into the regulation of porcine lipids metabolism in skeletal muscle and liver.

Keywords: Association analysis, fatty acid, circadian clock, lipid metabolism