

EVALUACIÓN DEL GEN *FABP2* COMO GEN CANDIDATO PARA LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN PORCINO

Estellé, J. ¹, Mercadé, A. ¹, Pérez-Enciso, M. ^{1,2}, Pena, R.N. ³, Silió, L. ⁴, Sánchez, A. ¹, Folch, J.M. ¹

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. ³ Genètica i Millora Animal, IRTA-Lleida, Av Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida. ⁴ Dpto. Mejora Genética Animal SGIT-INIA, Ctra. De la Coruña Km. 7, 28040, Madrid.
E-mail: Jordi.Estelle@uab.es

INTRODUCCIÓN

La composición de los ácidos grasos es un factor muy importante para la calidad de la carne y de la grasa en porcino, ya que afecta a factores cruciales como son la ternura o el sabor de la carne. En el 2003, Clop *et al.* realizaron un barrido genómico de QTL para la composición de los ácidos grasos mediante un cruce F2 de cerdo Ibérico por Landrace (cruce IBCMAP) e identificaron QTL significativos en los cromosomas 4, 6, 8 10 y 12. El QTL del cromosoma 8 resultó significativo para el porcentaje de ácidos palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1[n-9]) y la longitud media de la cadena (ACL) y tenía además un efecto sugestivo para el porcentaje de ácido oleico (C18:1[n-9]).

El gen *Fatty acid binding protein 2, intestinal (FABP2)* se expresa mayoritariamente en el intestino delgado, donde participa en la absorción y transporte de los ácidos grasos de la dieta (Hauerland y Spener, 2004). De acuerdo con Jiang *et al.* (2002), este gen se localizaría dentro del intervalo de confianza del QTL del cromosoma 8 porcino, siendo por tanto un gen posicional y funcionalmente interesante para este QTL.

Los objetivos de este trabajo son evaluar el gen *FABP2* porcino como gen candidato para el QTL de ácidos grasos del cromosoma 8 y realizar un mapeo más fino de la localización del QTL mediante la inclusión de dos nuevos marcadores microsatélite en el genotipado de este cromosoma del cruce IBCMAP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tanto la generación del material IBCMAP como los caracteres de composición lipídica analizados están descritos en Pérez-Enciso *et al.* (2000) y Clop *et al.* (2003). En resumen, la población se formó a partir de tres machos Ibérico (línea Guadyrbas) y 31 hembras Landrace que generaron 79 individuos F1 y 369 animales F2. La composición de los ácidos grasos se midió en muestras de grasa dorsal mediante cromatografía de gases. Además, se calculó la longitud media de la cadena (ACL; descrito en Pamplona *et al.*, 1998).

Partiendo de la secuencia de un EST porcino (GenBank AJ241149) de secuencia homónima al gen *FABP2* humano, se diseñaron oligonucleótidos en los exones del gen *FABP2* para amplificar y secuenciar el gen en DNA genómico. Se fueron realizando diseños de oligonucleótidos y secuenciación de los amplicones obtenidos hasta conseguir la secuencia completa del gen *FABP2* (Tabla 1). Para la identificación de polimorfismos, se re-secuenció el gen *FABP2* porcino en los tres machos Ibérico y ocho de las hembras Landrace parentales del cruce IBCMAP.

El genotipado de la mutación *FABP2:g.197T>C* se realizó mediante pyrosecuenciación en un equipo PSQ HS 96 (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia). Además, se añadieron los genotipos para los microsatélites *S0069* y *S0144* al trabajo de Clop *et al.* (2003) para estimar mejor la posición de los QTL descritos anteriormente en este cromosoma. Los análisis de QTL y de asociación se realizaron mediante los siguientes modelos:

$$\begin{aligned} y_i &= \text{sexo}_i + \text{lote}_i + \beta c_i + P a_i a_{\text{QTL}} + u_i + e_i, & [1] \\ y_i &= \text{sexo}_i + \text{lote}_i + \beta c_i + \lambda_i g + u_i + e_i, & [2] \\ y_i &= \text{sexo}_i + \text{lote}_i + \beta c_i + P a_i a_{\text{QTL}} + \lambda_i g + u_i + e_i, & [3] \end{aligned}$$

donde y_i representa la medida fenotípica del individuo i ésimo, β el coeficiente de covariación de c_i (peso vivo), $P a_i$ es la probabilidad de ser homocigoto para alelos de origen Ibérico

menos la probabilidad de ser homocigoto para alelos de origen Landrace, a_{QTL} es el efecto aditivo del QTL, u_i el efecto genético infinitesimal y e_i el residuo. En los modelos [2] y [3] λ_i es una variable indicadora con valores 1 o -1 en función del alelo del polimorfismo *FABP2*:g.197T>C recibido y g es el efecto de cada alelo. No se incluyeron efectos de dominancia en el modelo porque no resultaron significativos. Los análisis de QTL se realizaron en cada cM y los P -valores nominales se calcularon mediante la aproximación de la χ^2 para el cociente de verosimilitudes. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa QxPAK (Pérez-Enciso y Misztal, 2004).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la secuenciación y el genotipado del gen *FABP2* porcino.

| Nombre | Secuencia | Uso ^a |
|-------------------------|---------------------------------------|------------------|
| FABP2F1 | 5' -CTGAATCAGCTGGAGACTATGGC-3' | 1,2 |
| OLIGO-dT-V ^b | 5' - (T) ₂₅ V-3' | 2 |
| FABP2INSE | 5' -TTCCTCATGTATGGTTCTTTTC-3' | 2 |
| FABP2R1 | 5' -TTCAGTTCCGTCTGCGAGG-3' | 1,2 |
| FABP2F2 | 5' -AGAGGAAACTTGCAGCTCAATGAC-3' | 1,2 |
| FABP2IN2R | 5' -CATGGAAAAGCTAAAAGAGC-3' | 2 |
| FABP2IN2F | 5' -GCATGATGGTTACCAGCAC-3' | 2 |
| FABP2R2 | 5' -CCCCGATAATTTCTCGGACAG-3' | 1,2 |
| FABP2F3 | 5' -TGTTGGAAAATTTCAACGAGTG-3' | 1,2 |
| FABP2R3 | 5' -TTCCATCTAATTTGTGTTCTGGG-3' | 1,2 |
| FABP2PROF3 | 5' -TGCTTCTCATGTTTTAATTCAGTTGAAT-3' | 1,2 |
| FABP2INTR1 | 5' -TTAGAAGGTGTTAGAGAGAGAAATGTCTG-3' | 1,2 |
| FABP2-PFW | 5' -GTGGCGGTAAGGATCAAGAAT-3' | 3 |
| FABP2-PRV-B | 5' -biotin-TTCAGAGAACAGCATGCAAGAGT-3' | 3 |
| FABP2-Pyro | 5' -ATGGGGGACAGTTCA-3' | 4 |

^a 1: Reacción de PCR; 2: reacción de secuenciación; 3: PCR para genotipar el polimorfismo *FABP2*:g.197T>C; 4: Reacción de pyrosecuenciación del polimorfismo *FABP2*:g.197T>C; ^b No se usó para re-secuenciar los individuos IIBM en la búsqueda de polimorfismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia del gen *FABP2* obtenida, de 3,7 Kb de longitud, concuerda con la secuencia depositada anteriormente en GenBank (DQ126268) pero existen numerosas diferencias nucleotídicas (ninguna se encuentra en los exones; resultados no mostrados). En contraste, sólo se encontraron tres polimorfismos en el intrón 1 al re-secuenciar los tres machos Ibéricos y ocho hembras Landrace de la población IIBM: *FABP2*:g.197T>C, *FABP2*:g.1283A>T y *FABP2*:g.1419G>A. Se escogió el polimorfismo *FABP2*:g.197T>C, localizado en el extremo 5' del intrón 1, para genotiparlo en la población IIBM y realizar el estudio de asociación con los caracteres de composición de ácidos grasos.

El mapa de ligamiento obtenido para el cromosoma 8 mediante el programa CRIMAP 2.4 fue (en cM): SW2410 (0.0) – SW905 (21.6) – SWR1101 (42.9) – S0017 (67.1) – S0069 (79.8) – S0225 (86.7) – *FABP2*:g.197T>C (90.7) – S0144 (95.2) – SW61 (111.5). La posición del gen *FABP2* se sitúa dentro del intervalo de confianza del QTL descrito por Clop *et al.* (2003). Los resultados de ajustar el modelo (1) al SSC8 se muestran en la Figura 1. La posición más verosímil para el QTL es 96 cM, que afecta principalmente al porcentaje de ácido palmitoleico (C16:1[n-9]). Se detectaron también QTL significativos afectando al ácido palmítico (C16:0) y ACL (Tabla 2). Además, se observaron QTL menos significativos para el porcentaje de los ácidos oleico (C18:1[n-9]), vaccenico (C18:1[n-7]) y eicosadienoico (C20:2[n-6]). Al añadir nuevos marcadores (*FABP2*:g.197T>C, S0069 y S0144), se refinó la posición del QTL para C16:1 al intervalo S0144 – SW61; según estos resultados, el gen *FABP2* quedaría de este intervalo. Se observó un perfil bimodal de los valores de significación de los QTL (Figura 1) que podría indicar la presencia de dos QTL; sin embargo, al testar un segundo QTL para C16:1 éste no resultó significativo (resultados no mostrados). La asociación del polimorfismo *FABP2*:g.197T>C con los caracteres estudiados se testó con

el modelo [2]. Tal y como se muestra en la Tabla 2, los *P*-valores fueron más altos que el efecto de los QTL (Modelo [1]), aunque en algunos casos se acercan a la significación (p.e. ACL). En los cruces de tipo F2 se crea un gran desequilibrio de ligamiento que puede sesgar las estimaciones del efecto de un gen candidato, ya que se puede confundir el efecto de un QTL cercano con el del gen candidato. Se usó un test de asociación asistido por marcadores (Zhao *et al.*, 2003), en el que se incluye el efecto de un QTL en el modelo al testar el efecto del gen candidato, para analizar el gen *FABP2* (Modelo [3]). Los resultados obtenidos mostraron que el efecto del QTL seguía siendo significativo al corregirlo por el polimorfismo del *FABP2*, mientras que el polimorfismo no lo era al incluir el QTL en el modelo (Tabla 2).

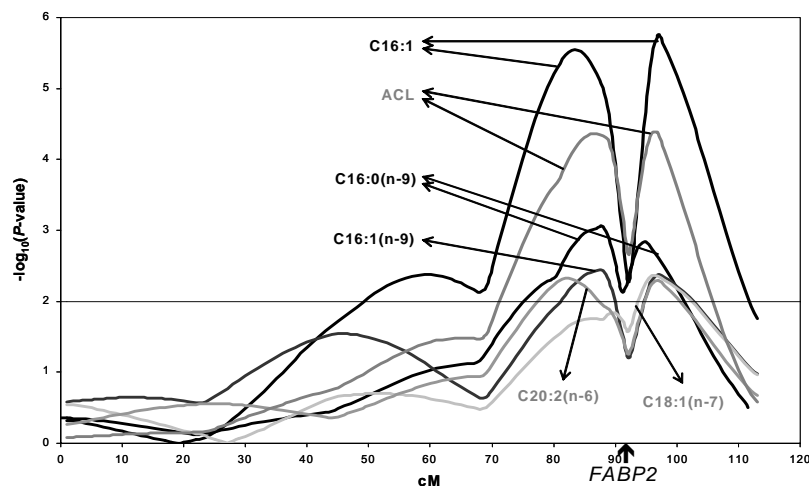


Figura 1. Perfiles del $-\log_{10}(P\text{-valor nominal})$ de los QTL identificados en el cromosoma 8 de la población F2 IBSMAP mediante el modelo [1]. La línea horizontal en el valor 2 corresponde a un valor de significación de 0,01.

Si bien no se puede descartar que una mutación en regiones reguladoras de la expresión del gen *FABP2* pueda estar involucrada en el QTL, el estudio de asociación indica que el polimorfismo analizado no parece ser el causal. No obstante, el refinamiento de la posición del QTL deberá facilitar la identificación de nuevos genes candidatos, interesantes desde el punto de vista posicional y funcional, y avanzar en la identificación del factor causal de este importante QTL.

Tabla 2. Resultados obtenidos al testar los efectos del QTL y la mutación *FABP2*:g.197T>C con los modelos [1], [2] y [3] de este trabajo.

| Carácter | QTL [1] | | | Asociación <i>FABP2</i> [2] | | QTL + Asociación [3] ^d | | | |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|-------|
| | Pos. ^a | <i>P</i> -valor | Efecto (SE) ^b | <i>P</i> -valor | Efecto (SE) ^c | Pos. ^e | QTL+FABP2 | QTL | FABP2 |
| C16:0 | 88 | 9×10^{-4} | 0.311 (0.092) | 0.02 | 0.199 (0.084) | 87 | 3×10^{-3} | 0.01 | 0.02 |
| C16:1(n-9) | 96 | 2×10^{-6} | 0.125 (0.026) | 0.08 | 0.044 (0.025) | 96 | 2×10^{-6} | 2×10^{-6} | 0.08 |
| C18:1 (n-9) | 86 | 4×10^{-3} | -0.335 (0.114) | 0.27 | -0.115 (0.105) | 96 | 0.01 | 8×10^{-3} | 0.29 |
| C18:1 (n-7) | 95 | 4×10^{-3} | 0.064 (0.022) | 0.14 | 0.031 (0.021) | 95 | 0.01 | 8×10^{-3} | 0.12 |
| C20:2 (n-6) | 81 | 5×10^{-3} | -0.038 (0.013) | 0.04 | -0.027 (0.012) | 96 | 6×10^{-3} | 0.02 | 0.03 |
| ACL | 95 | 4×10^{-5} | -1.133 (0.271) | 0.01 | -0.640 (0.247) | 96 | 8×10^{-5} | 4×10^{-4} | 0.01 |

^a Posiciones de los QTL (en cM); ^b Efecto Ibérico – Landrace; ^c Efecto T – C del polimorfismo *FABP2*:g.197T>C; ^d El modelo incluyó el QTL y el efecto *FABP2*-g.412T>C (cada uno de los efectos se testó omitiéndolo del modelo nulo); ^e Posiciones del QTL estimadas al testar el efecto del QTL corregido por el efecto del polimorfismo *FABP2*:g.197T>C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clop *et al.* 2003. *Mammalian Genome* 14:650-656.
- Jiang *et al.* 2002. *Genome* 45:147-156.
- Haunerland y Spener. 2004. *Progress in Lipid Research* 43:328-349.
- Pamplona *et al.* 1998. *Journal of Lipid Research* 39:1989-1994.
- Pérez-Enciso *et al.* 2000. *Journal of Animal Science* 78:2525-2531.
- Pérez-Enciso y Misztal. 2004. *Bioinformatics* 20: 2792-2798.
- Zhao *et al.* 2003. *Mammalian Genome* 14:472-482.

Trabajo financiado por la acción especial INIA CPE03-010-C3 y el proyecto AGF99-0284-CO2-02 del MEC. J. Estellé disfruta una beca FPU del MEC.