

ESTUDIO DEL GEN DEL RECEPTOR DE PARTÍCULAS LDL PORCINO Y SU ASOCIACIÓN CON NIVELES DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

PENA, R.N.¹, CANOVAS, A.¹, NOGUERA, J.L.¹, DÍAZ, I.², VARONA, L.¹, QUINTANILLA, R.¹
IRTA, ¹Genética i Millora Animal. IRTA-Lleida. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida; ²Tecnologia dels Aliments. IRTA-Monells. 17121, Monells, 17121 Monells (Spain),

romi.pena@irta.es

INTRODUCCIÓN

La cantidad de colesterol de un organismo se regula por el equilibrio entre el colesterol absorbido a través de la dieta y la excreción del colesterol sobrante en forma de sales biliares (Kruit *et al.*, 2006). Desde el intestino, el colesterol absorbido en la dieta se transporta al resto de los tejidos en quilomicrones. En el hígado, los quilomicrones sobrantes son combinados con la apolipoproteína Apo-B100, dando lugar a lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas partículas LDL son particularmente ricas en ésteres de colesterol y son las principales responsables del transporte de este lípido a los órganos diana. Los receptores de las partículas LDL (LDLR) reconocen y unen las apolipoproteínas Apo-B100. La unión del ligando con su receptor desencadena la entrada del complejo, que es estabilizado mediante la fusión con vesículas ricas en clatrina. Una vez liberados el colesterol y otros lípidos transportados por las partículas LDL, los receptores son reciclados y reconducidos a la membrana citoplasmática.

El gen del LDLR ha estado previamente secuenciado y caracterizado en porcino. Una variante recesiva ha sido asociada a hipercolesterolemia espontánea (Grunwald *et al.*, 1999). Con el objetivo de caracterizar genes relacionados con el transporte del colesterol en porcino hemos identificado nuevas variantes alélicas para este gen y estudiado el efecto de los genotipos de este gen sobre los niveles plasmáticos de colesterol, lipoproteínas y triglicéridos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Los animales utilizados en este estudio provienen del cruce de cinco machos Duroc (*Batallé Selección*) con 400 hembras de la misma raza, seleccionando un hijo de cada cerda. Así se obtuvo una población de 385 cerdos castrados distribuidos en cinco familias de medios hermanos. Estos animales fueron controlados en el Centro de Control Porcino (CCP) de IRTA-Monells desde la fase de transición hasta el final del engorde.

Datos fenotípicos

Se extrajeron dos muestras de sangre de cada animal: una en los días posteriores a su entrada en el CCP (45 días) y otra el día antes del sacrificio (190 días, aproximadamente). Para ambas muestras se midieron las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT), colesterol-LDL (LDL), colesterol-HDL (HDL) y triglicéridos (TG).

Amplificación de las regiones codificantes

Se diseñaron juegos de *primers* para amplificar la región codificante del gen LDLR a partir de muestras de ARN de hígado porcino. Se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción a partir de 0.5-1µg de ARN total, con 1mM de dNTP, 1xTampón de reacción, 1µM de primer Oligo(dT) y 50U de enzima MuMLV (*NEB*) durante 1h a 37°C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador PTC100 (*MJ Research*) en un volumen de 25 µl con tampón x1, 200mM dNTP, 2.0mM MgCl₂, 400nM de cada primer, 1U de *Taq* polimerasa (*ECOGEN SL*) y 0.5µl de cDNA. El perfil de temperaturas utilizado incluía un primer paso de desnaturalización a 95°Cx5', seguido de 35 ciclos de 95°Cx20", 58°Cx20" y 72°Cx30", terminando con una extensión final de 72°Cx5'.

Identificación de polimorfismos y genotipado

La secuenciación se llevó cabo directamente sobre el producto amplificado mediante el *BigDye Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems)*. Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa ClustalW para facilitar la identificación de polimorfismos.

LDLR_C1653T: para su genotipado se diseñó un protocolo de PCR-RFLP utilizando el enzima *Hin1I* que permitía diferenciar los alelos T de los C.

LDLR_C1661T: este polimorfismo fue genotipado mediante un protocolo de discriminación alélica por PCR cuantitativa a tiempo real. Se diseñaron primers y sondas TaqMan específicas para cada alelo, permitiendo la identificación de los animales TT, CC y CT.

Análisis estadístico

Con el fin de asegurar la normalidad de los datos en todos los casos, se trabajó sobre la transformación logarítmica de las concentraciones plasmáticas de lípidos. Estos datos se modelizaron considerando los efectos de sustitución de los polimorfismos analizados tanto vía macho (en cada familia de hermanos paternos) y vía hembra (a nivel poblacional). Así el modelo de análisis, que se analizó mediante inferencia bayesiana, fue el siguiente:

$$y = \mathbf{Xb} + \mathbf{T}_S \lambda_S + \mathbf{T}_D \lambda_D + e$$

donde **y** es el vector de observaciones fenotípicas; **b** es el vector de efectos sistemáticos, incluyendo el efecto familia, la granja de origen, el lote de engorde y la covariable edad (para HDL1, LDL1 y TG) o peso vivo (para TC2, HDL2, LDL2); **X** es la matriz de incidencia de los efectos sistemáticos; λ_S es el vector de efectos de sustitución vía macho; λ_D es el efecto de sustitución vía hembra; **T_S** y **T_D** son las matrices de incidencia aleatorias que relacionan los efectos de sustitución con los fenotipos, y **e** es el vector de efectos residuales.

Se asumió la normalidad de los datos, y distribuciones *a priori* uniformes y acotadas para **b**, λ_S , λ_D y σ_e^2 . La distribución *a priori* de **T_S** y **T_D** fueron densidades discretas definidas a partir de la información de los SNPs, de la frecuencia génica poblacional (**p**), $f(\mathbf{T}_S, \mathbf{T}_D | \mathbf{G}, \mathbf{p})$, donde **G** es la matriz de genotipos para el SNP. La distribución *a priori* de la **p** se asumió uniforme entre 0 y 1.

A partir de la verosimilitud y las distribuciones *a priori* se desarrolló la distribución posterior conjunta de los parámetros desconocidos del modelo, y posteriormente se desarrollaron las distribuciones condicionales posteriores para la implementación del muestreo de *Gibbs* (Gelfand y Smith, 1990). Las distribuciones posteriores marginales se obtuvieron a partir de 20000 iteraciones *Gibbs*, después de descartar las 1.000 primeras.

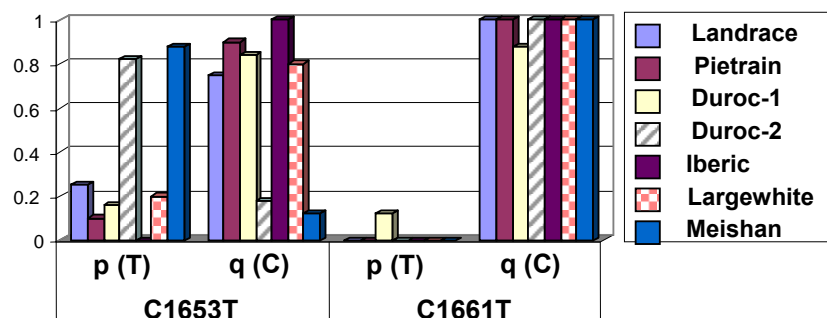
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de polimorfismos

El alineamiento de las secuencias obtenidas permitió la identificación de tres nuevos polimorfismos tipo SNP situados en los exones 10 (LDLR_C1086T) y 13 (LDLR_C1653T y LDLR_C1661T). Los dos primeros polimorfismos son silenciosos, mientras que el tercero implica un cambio de residuo de serina a leucina que afecta el dominio extracelular del receptor LDL. En cambio el polimorfismo identificado previamente por Grunwald *et al.* (1999) no fue detectado en ninguna de las muestras secuenciadas.

FRECUENCIAS GÉNICAS EN RAZAS PORCINAS

Figura 1. Distribución de las frecuencias génicas para los nuevos alelos del gen LDLR porcino. Duroc-1: población duroc utilizada en el estudio de asociación; Duroc-2: población duroc no relacionada con la anterior.



Se analizó el efecto de sustitución de los alelos (λ) para los dos polimorfismos genotipados mediante el modelo expuesto en Material y Métodos. Los estadísticos relativos a las distribuciones posteriores obtenidas para los efectos de sustitución de los SNPs C1653T y C1661T se muestran en la Tabla 1. En general, las asociaciones encontradas fueron bastante consistentes entre edades pero no se mantuvieron en todas las familias.

Así, el alelo **C** del polimorfismo sinónimo **C1653T** afectó negativamente los niveles de CT y HDL en ambas edades de la familia del macho 90 y a nivel poblacional. Además, en las muestras tomadas a 45d, se observó un efecto sobre las concentraciones plasmáticas de LDL y TG. En cuanto a la mutación no sinónima **C1661T**, el efecto más claro para el alelo **C** se mantuvo sobre la ratio HDL/LDL y los niveles de colesterol total en la familia del macho 35 y vía hembras.

Queda pendiente estudiar el efecto conjunto de estos polimorfismos mediante un análisis por haplotipos.

Tabla 1. Efecto de sustitución del alelo C (λ) para los nuevos polimorfismos del gen LDLR porcino en machos (S) y vía hembras (D). **Mean**, Media del efecto de sustitución; **HDI_95%**, intervalo de densidad máxima al 95%; **D_{max} ≠ 0**, probabilidad que la media sea distinta de 0; **I_{max}95%** y **I_{min}95%** valor máximo y mínimo de distribución del 95% de las probabilidades.

	carácter	λ	Mean	HDI_95%	D _{max} ≠ 0	I _{max} 95%	I _{min} 95%
C1653T	CT1	S90	-0.0742	-0.17, 0.02	0.94	-0.15	0.01
	CT1	D	-0.0553	-0.14, 0.02	0.92	-0.12	0.01
	HDL1	S90	-0.0786	-0.17, 0.02	0.95	-0.06	0.00
	HDL1	D	-0.0608	-0.14, 0.02	0.94	-0.13	0.01
	LDL1	S90	-0.1272	-0.24, -0.01	0.98	-0.23	-0.03
	LDL1	D	-0.0922	-0.19, 0.00	0.97	-0.17	-0.03
	TG1	S90	0.1306	-0.01, 0.28	0.96	0.01	0.25
	TG1	D	0.1133	0.00, 0.22	0.97	0.02	0.21
	CT2	S90	-0.0784	-0.16, 0.01	0.97	-0.15	-0.01
	CT2	D	-0.0498	-0.12, 0.02	0.93	-0.10	0.01
	HDL2	S90	-0.0733	-0.17, 0.02	0.94	-0.15	0.01
	LDL2	S90	-0.1239	-0.25, 0.00	0.97	-0.23	0.02
	LDL2	D	-0.0996	-0.20, 0.00	0.98	-0.18	-0.02
	HDL2/LDL2	D	0.0903	-0.03, 0.19	0.95	0.00	0.18
C1661T	CT1	S35	0.0685	-0.03, 0.17	0.90	-0.02	0.16
	CT1	D	0.0735	-0.02, 0.17	0.94	-0.01	0.15
	HDL1	S35	-0.1148	-0.22, 0.00	0.98	-0.21	-0.02
	LDL1	D	0.0892	-0.03, 0.20	0.93	-0.01	0.19
	HDL1/LDL1	S41	-0.1360	-0.35, 0.06	0.91	-0.31	0.03
	HDL1/LDL1	S35	-0.0842	-0.20, 0.03	0.92	-0.18	0.01
	CT2	D	0.0487	-0.03, 0.13	0.90	-0.01	0.11
	LDL2	S35	0.1147	-0.02, 0.25	0.95	0.00	0.23
	LDL2	D	0.0961	-0.03, 0.21	0.95	0.00	0.20
	HDL2/LDL2	S35	-0.1144	-0.25, 0.04	0.94	-0.24	0.01
HDL2/LDL2	D	-0.1003	-0.22, 0.03	0.94	-0.21	0.01	

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia MEC AGL2002-04271-C03-03. RN Pena fue beneficiaria de una ayuda de contratación INIA. Agradecemos al Grupo Batallé su colaboración en la generación del material animal.

REFERENCIAS

- Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. World J Gastroenterol. 2006;12(40):6429-39.
- Garuti R, Jones C, Li WP, Michaely P, Herz J, Gerard RD, Cohen JC, Hobbs HH. J Biol Chem. 2005;280(49):40996-1004.
- Gelfand y Smith. 1990. J. Am. Stat. Assoc. 85: 398-409.
- Grunwald KA, Schueler K, Uelmen PJ, Lipton BA, Kaiser M, Buhman K, Attie AD. J Lipid Res. 1999;40(3):475-85.