

## ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN DE LA ACETIL-CoA CARBOXILASA Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN UN CRUCE ENTRE CERDOS IBÉRICOS Y LANDRACE

Alves, E. <sup>1</sup>, Barragán, C. <sup>1</sup>, Fernández, A.I. <sup>1</sup>, Fernández, A. <sup>1</sup>, Estellé, J. <sup>2</sup>, Quintanilla R. <sup>3</sup>, Rodríguez, C. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid. <sup>2</sup>Dpto. Ciencia Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, UAB, 08193, Bellaterra. <sup>3</sup>Dpto. Genética y Mejora Animal, IRTA, Lleida

E-mail: [esalves@inia.es](mailto:esalves@inia.es)

### INTRODUCCIÓN

El enzima acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$  (ACC- $\alpha$ ) desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los ácidos grasos, catalizando la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA que, a su vez, actúa bien como intermediario en la síntesis *de novo* de los ácidos grasos de cadena larga, bien como sustrato de los enzimas de elongación acil-CoA. El gen ACACA, responsable de la síntesis de este enzima, se localiza en el cromosoma 12 porcino (Calvo *et al.*, 2000), en una región en la que se ha detectado un QTL significativo para la composición en ácidos grasos (Muñoz, 2005). El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de polimorfismos presentes en dicho gen y el estudio de su asociación con caracteres de composición de ácidos grasos en los animales F2 del cruce Ibérico x Landrace.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Secuenciación del gen ACACA:** La extracción del RNA total se hizo a partir de muestras de hígado de dos cerdos Ibéricos (línea Guadyervas) y ocho Landrace, utilizando Tri Reagent (Sigma Aldrich Chemie, Germany), y posteriormente se llevó a cabo la retrotranscripción con hexámeros aleatorios y Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies). A partir del alineamiento de las secuencias del gen ACACA disponibles para humano, ratón y bovino, se diseñaron 16 parejas de cebadores (Tabla 1) para amplificar fragmentos solapados que abarcan la región codificante del gen en su casi totalidad (6945 pb). Las reacciones se realizaron en volúmenes de 25  $\mu$ l, con tampón de PCR 1X, concentración de MgCl<sub>2</sub> específica de cada pareja de oligonucleótidos (Tabla 1), 200  $\mu$ M de dNTPs, 0,5  $\mu$ M de cada cebador, 0,5 U de Tth (Biotools) y 2  $\mu$ l de cDNA. El perfil térmico utilizado fue 94° - 5 min, seguido de 40 ciclos de 94° - 30 seg, temperatura de hibridación, específica de cada pareja de cebadores (Tabla 1) - 30 seg, 72° - 45 seg y una extensión final a 72° - 10 min. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en un secuenciador automático (ABI 3730) empleando el kit Big Dye Terminador v3.1 (Applied Biosystems).

**Genotipado de SNPs:** El polimorfismo C/T detectado en la posición 5634 (codón 1878) del exón 46 de este gen (referido a la secuencia humana ENSG00000132142) se genotipó mediante un protocolo PCR-RFLP *Msp* I. Para ello se diseñó una pareja de cebadores ACAex46F 5'-GTGTACACCTCCAATAACCAG-3' y ACAex46R 5'-GTAAGACAGCCAGTGCAGGACAGT-3' que permite la amplificación de un fragmento de 120 pb. El patrón de restricción del alelo C corresponde a una sola banda de 120 bases mientras el del alelo T presenta dos bandas de 73 y 47 bases, respectivamente. Se genotiparon 33 animales F0, 70 F1 y 418 F2 del cruce experimental Ibérico X Landrace (Clop *et al.*, 2003) con registros para la composición en ácidos grasos.

**Análisis estadístico:** Para la construcción del mapa de ligamiento se ha incorporado el genotipo del SNP c.5634C>T como marcador a la información previa (Fernández *et al.*, 2006) y se ha utilizado la opción "build" del programa informático CRI-MAP versión 2.4 (Lander y Green, 1987).

Para los análisis de detección de QTLs y de asociación asistida por marcadores se utilizaron respectivamente los siguientes modelos estadísticos:

$$y_i = \text{sexo}_i + \text{lote}_i + \beta \text{cov}_i + a c_{ai} + d c_{di} + u_i + e_i \quad (1)$$

$$y_i = \text{sexo}_i + \text{lote}_i + \beta \text{cov}_i + a c_{ai} + d c_{di} + g \lambda_i + u_i + e_i \quad (2)$$

donde  $y_i$  es el porcentaje de un ácido graso en la grasa dorsal del animal  $i$ ,  $cov_i$  es la medida de profundidad de grasa dorsal entre la 3ª y 4ª costillas utilizada como covariable y  $\beta$  el coeficiente de regresión correspondiente,  $a$  y  $d$  son los efectos aditivo y dominante del QTL mientras que  $c_{ai} = Pr(QQ) - Pr(qq)$  y  $c_{di} = Pr(Qq)$ , siendo  $Pr(QQ)$ ,  $Pr(Qq)$  y  $Pr(qq)$  las probabilidades de ser homocigoto para el alelo de origen Ibérico, heterocigoto o homocigoto para el alelo Landrace, respectivamente. En el modelo 2,  $g$  es el efecto de sustitución del polimorfismo analizado del gen *ACACA*, siendo  $\lambda_j$  el número de copias del alelo  $C$ . La significación estadística nominal de los efectos se calculó comparando los correspondientes modelos completo y reducido mediante la aproximación  $\chi^2$  al cociente de verosimilitudes (LRT). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa QxPak (Pérez Enciso y Misztal, 2004). Para los resultados de detección de QTL se calcularon los umbrales de significación cromosómicos al 0.1, 1 y 5% (Nezer *et al.*, 2002).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA y secuenciación.

Cebadores	Secuencia (5' →3')	Tª Hibridación	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Tamaño
ACA1F	TTCATAATAGTTCTGTGTCT	51	1,5	514
ACA1R	CATTTGCATAGTTGTTGTTGTTT			
ACA2F	CAGTGAAATGCATGCGGTCTATCC	56	1,5	505
ACA2R	AGCCCATCATCCACATCTTTCCACA			
ACA3F	CCCAGGAGCTATATGAAAAAGGTT	55	2,0	539
ACA3R	CTGTGCTGCGGGGAGATTGAC			
ACA4F2	CAGGATGGCAGCTTCTACTTTC	53	1,5	584
ACA4R2	GCCCGTACTTTTTCTGCTAT			
ACA5F	GTTTGGTCACTGCTTTTCTTG	52	2,0	472
ACA5R	TCCACCGTCACTCAGCCGATGTA			
ACA6F	GTCCCCGAACCTCCTACG	50	2,5	572
ACA6R	TCACCCTGCTGCTAAAGAA			
ACA7F	GCCACGGATCCAGAGCACA	56	2,5	470
ACA7R	GCCGCAGCAGTCCATCA			
ACA8F	TGTCAGTTTCCCAGCCAGCAGATT	55	1,5	622
ACA8R	TGTGATAGAAGAAGTTTGGTAGGA			
ACA9F	TTCGCCATAACCAAGTAGAGT	53	2,0	543
ACA9R	CATAAAGAGACGTGTGACCT			
AC10BF	GGATGGGCGGAATGGTCTCTT	59	2,0	652
AC10BR	AGCCGTTCCCCTTCATTCTGTAG			
ACA11F	TGTTGCTGCAATCATCAGAC	55	2,0	743
ACA11R	CCGGACTTTTAAAGGGACATTTT			
ACA21F	GGAGACAAACAGGGACCATTACAT	56	2,0	536
ACA21R	TCTACCCAGGCCACGTGAAACATA			
ACA22F	ACCCAGGAGGATGTGCTATTTCT	58	2,5	568
ACA22R	GGTGACCCCGTTGTTGTGC			
ACA23F	CATTGGGATTGGGGCTTACCT	60	2,5	569
ACA23R	CCTGCTGGATTATCTTGGCTTCA			
ACA24F	CCCGTGGGAGTAGTTGCCGTAA	62	2,0	721
ACA24R	GCCGCCTCAGCCGCCAGTA			
ACA25F	AGTTCCTCCTCCCCATCTACCAT	57	2,5	524
ACA25R	CTACGTTGAGGGCGAGTCCAT			

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El alineamiento de las secuencias de la región codificante permitió la detección de 15 SNPs en los exones 42, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 54 y 55, todos ellos sinónimos. En el SNP genotipado (c.5634C>T), el alelo c.5634C está fijado en los parentales Ibéricos, mientras que su frecuencia en la línea Landrace es 0.43 y 0.69 en los animales F2. El mapa de ligamiento del cromosoma 12 mostró un tamaño de 111,7 cM y el gen *ACACA* se localizó en la posición 75.6 cM (*FASN*-2.1-S0143-29.5-*GH*-2.7-SW1307-16.3-SW874-7.7-*GIP*-10.8-

SWR1802-ACACA-20.0-S0106-16.2-SWR1021). Los análisis de detección de QTLs confirmaron la presencia en este cromosoma de tres QTLs: QTL1) alrededor de la posición 10 cM afectando al porcentaje de ácido mirístico (C14:0), QTL2) entre 20 y 30 cM afectando al porcentaje de los ácidos palmítico (C16:0), linolénico (C18:3 n-3) y gadoleico (C20:1 n-9) y QTL3) en la posición 76 cM, entre los marcadores SW874 y SWR1802, altamente significativo para el ácido palmitoleico (C16:1 n-9) y muy significativo para los ácidos esteárico (C18:0) y vaccénico (C18:1 n-7). En este caso el alelo Ibérico incrementaría el contenido de los dos ácidos grasos monoinsaturados, reduciendo el porcentaje de esteárico. La localización del pico máximo del QTL3 coincide con la posición establecida para el gen ACACA (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de los efectos del QTL3 y del polimorfismo ACACA:c.5634C>T sobre diversos ácidos grasos, utilizando los modelos 1 y 2.

Carácter	Mod.	cM	LRT <sup>†</sup>	QTL		LRT	SNP	
				a (SE)	d (SE)		P	g <sub>ACA</sub> (SE)
C16:1(n-9)	1	73	19.82	0.10 (0.03)	-0.13 (0.04)			
	2	71	10.40	0.06 (0.04)	-0.12 (0.04)	13.26	0.27x10 <sup>-3</sup>	0.12 (0.03)
C18:0	1	76	11.89	-0.35 (0.10)	-			
	2	75	2.91	-0.25 (0.15)	-	8.88	0.29x10 <sup>-2</sup>	-0.31 (0.10)
C18:1(n-7)	1	76	12.81	0.09 (0.03)	-			
	2	0	4.37	0.05 (0.02)	-	11.60	0.66x10 <sup>-3</sup>	0.09 (0.03)

<sup>†</sup> Umbrales de significación cromosómicos al 0.1, 1 y 5%: 18.95, 14.33 y 11.07 (2 g.l.) y 15.63, 11.30 y 8.31 (1 g.l.)

El empleo del test de asociación asistido por marcadores (modelo 2), que incluye los efectos del QTL y del gen candidato, con el objetivo de reducir la proporción de falsos positivos debidos al posible desequilibrio de ligamiento entre ambos (Zhao *et al.*, 2003). Los resultados se muestran en la tabla 2. Se observan efectos significativos del polimorfismo sobre los ácidos palmitoleico, esteárico y vaccénico, mientras que no se detectan los efectos significativos del QTL3 que previamente habían sido localizados con el modelo 1. Estos resultados apoyan la implicación del gen ACACA en la variabilidad de caracteres de composición en ácidos grasos: el alelo c.5634C aumenta el porcentaje de los ácidos palmitoleico y vaccénico, disminuyendo el del ácido esteárico. Sin embargo tanto la sustitución analizada como las restantes mutaciones detectadas resultaron sinónimas, por lo que no podemos proponer ningún QTN. Como tareas inmediatas, se ha iniciado la búsqueda de polimorfismos en las regiones 5'UTR, 3'UTR y promotoras. Por otro lado no puede descartarse la posibilidad de que la mutación causal se localice en una región intrónica o en algún otro gen en desequilibrio de ligamiento.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por INIA (CPE03-010-C03). Amanda Fernández tiene una beca predoctoral INIA. Jordi Estellé tiene una beca FPU del MEC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Calvo *et al.* 2000. *Cytogenet Cell Genet* 90, 238-239.
- Clop *et al.* 2003. *Mamm Genome* 14, 650-656.
- Fernández *et al.* 2006. XIII Reunión Nacional de Mejora Genética Animal, Gijón.
- Lander y Green. 1987. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2363-2367.
- Muñoz. 2005 Tesis doctoral, UCM, Madrid.
- Nezer *et al.* 2002. *Genet Sel Evol* 34, 371-387.
- Pérez-Enciso y Misztal. 2004. *Bioinformatics* 20, 2792-2798.
- Zhao *et al.* 2003. *Mamm Genome* 14, 472-482.