

## CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\delta$* Y *PPAR $\gamma$* EN CERDOS IBÉRICOS

Benítez, R., Muñoz, G., Fernández, A., Barragán, C., Núñez, Y., Rodríguez, M.C., Silió, L. y Óvilo, C.

Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, 28040 Madrid

E-mail: rmbenitez@inia.es

### INTRODUCCIÓN

Los peroxisomas son orgánulos citoplasmáticos que contienen enzimas que intervienen en la respiración y el metabolismo lipídico. La proliferación de estos peroxisomas esta mediada por unos receptores específicos llamados PPARs pertenecientes a una superfamilia de receptores de hormonas nucleares. Esta familia está formada por tres genes (alfa, beta/delta y gamma) muy relacionados entre sí y que intervienen en la regulación de la homeostasis, la proliferación celular y la respuesta inmune (Bassaganya-Riera et al., 2005). Los tres están estrechamente relacionados con la regulación de la cantidad de grasa y con la obesidad por lo que son genes candidato biológicos para la deposición grasa en especies ganaderas. Además *PPAR $\alpha$*  (SSC5), *PPAR $\delta$*  (SSC7) y *PPAR $\gamma$*  (SSC13) son candidatos posicionales para QTL detectados en diferentes poblaciones porcinas (Hu et al., 2005). En estudios previos se ha encontrado asociación de polimorfismos en estos genes con caracteres de interés. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados necesitan validar si las asociaciones observadas están presentes en otras poblaciones porcinas. Por otra parte, hasta el momento no se ha identificado ninguna variante funcional. En cerdo ibérico no hay estudios previos de caracterización ni de asociación.

Con estos antecedentes el objetivo de este estudio ha sido detectar polimorfismos en el cDNA de estos tres genes y realizar estudios de asociación de las variantes detectadas con caracteres fenotípicos y con la transcripción de genes involucrados en el metabolismo lipídico en cerdo ibérico.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales, registros fenotípicos y genotipado:** Se secuenció la región codificante completa de los genes *PPAR $\alpha$*  (1603 pb NM\_001044526.1), *PPAR $\delta$*  (1647 pb NM\_214152.1) y *PPAR $\gamma$*  (2099 pb NM\_214379.1) amplificada a partir de diferentes tejidos de ocho cerdos ibéricos de la estirpe Torbiscal. Para los estudios de asociación y expresión génica se utilizaron también animales Torbiscal de los que se dispone de genealogía completa y registros de rendimiento de la canal (porcentajes de los jamones, lomos y paletas), composición de lomo y jamón (grasa intramuscular, proteína y humedad) y perfil de ácidos grasos en grasa dorsal.

Para el genotipado de los polimorfismos se extrajo ADN genómico de muestras de sangre de 337 animales Torbiscal. El genotipado se llevó a cabo utilizando diferentes técnicas (secuenciación Sanger, pirosecuenciación y análisis de fragmentos).

**Análisis de expresión:** Se analizó la expresión del gen *PPAR $\gamma$*  y de seis genes relacionados con el metabolismo lipídico (*SCD*, *ELOVL6*, *FASN*, *ACACA*, *ME1* y *FABP5*) en 27 cerdos ibéricos de la estirpe Torbiscal, genotipados para la inserción encontrada en el gen *PPAR $\gamma$* . Se cuantificó la expresión de estos genes candidato mediante qPCR en biopsias de tejido adiposo del jamón obtenidas a 45 kg de peso vivo y muestras de tejido adiposo, músculo e hígado obtenidas al sacrificio a 110 kg.

**Análisis estadístico:** El efecto del SNP sobre el fenotipo se estimó utilizando los softwares REML/VCE6.0 y PEST mediante un modelo animal que incluyó como efecto fijo la paridera y como covariables el efecto aditivo y dominante del SNP y el peso de la canal. Para los análisis de asociación del SNP con los datos normalizados de expresión génica se realizaron pruebas ANOVA seguidas de un test de Tukey.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Polimorfismos detectados y frecuencias alélicas:** Se identificaron tres SNPs en el gen *PPAR $\alpha$*  (c.80A>G, c.176C>T y c.530G>A), una inserción en el gen *PPAR $\gamma$*  (c.1611\_12insA) y ningún polimorfismo en el gen *PPAR $\delta$* . Los tres SNPs del gen *PPAR $\alpha$*  son sinónimos, los dos primeros localizados en el exón 4 (cosegregando) y el último en el exón 6. La frecuencia

del haplotipo c.80G/c.176T fue 0,46 y la del alelo c.530A fue 0,24. Debido a la mayor informatividad del haplotipo c.80G/c.176T fue seleccionado para su genotipado y posterior análisis de asociación. La frecuencia del haplotipo c.80G/c.176T en la población fue 0,66. En cuanto a la inserción del gen *PPAR $\gamma$* , la frecuencia del alelo con inserción fue 0,84.

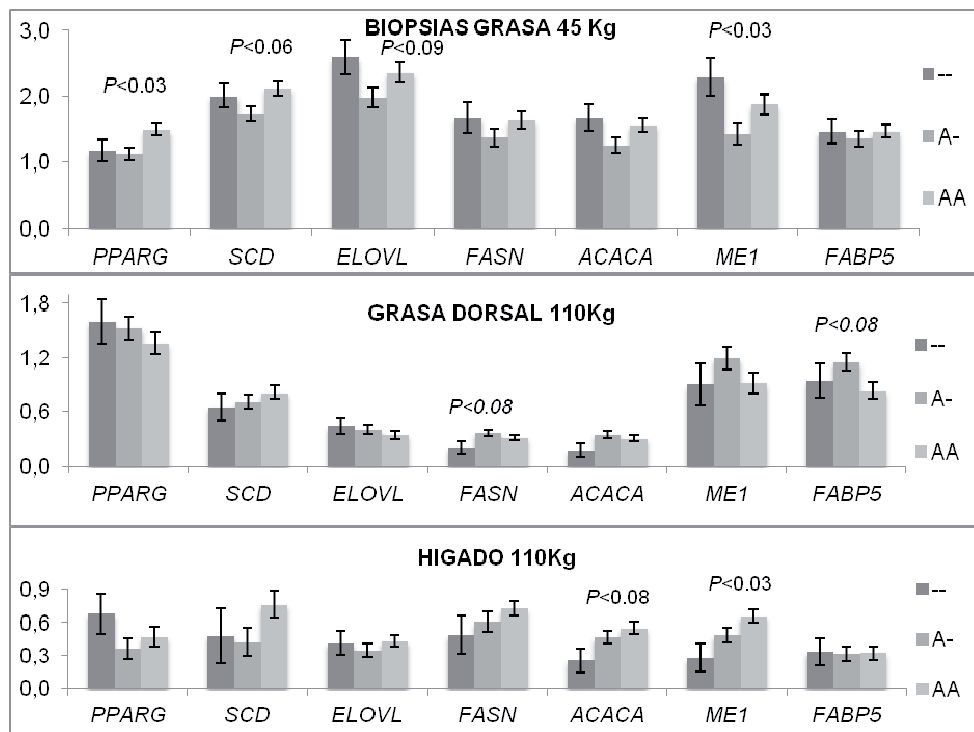
**Análisis de asociación de los polimorfismos detectados con los caracteres de interés:** Para el polimorfismo del gen *PPAR $\alpha$*  no se encontró ninguna asociación significativa con los caracteres de rendimiento y calidad de la carne. Sí se detectaron efectos aditivos de la inserción del gen *PPAR $\gamma$*  (Tabla 1) sobre el porcentaje de humedad de jamón ( $p < 0,013$ ) y su porcentaje de grasa intramuscular ( $p < 0,023$ ). Además, se observó un efecto sugestivo de este polimorfismo sobre el porcentaje de jamón respecto al peso de la canal ( $p < 0,067$ ). El alelo con la inserción, mayoritario en la población ibérica Torbiscal, estaría asociado con un mayor porcentaje de grasa, un mayor rendimiento y menor contenido de agua en el jamón.

**Tabla 1.** Resultados de asociación del polimorfismo c.1611\_12insA del gen *PPAR $\gamma$*  en Torbiscal

Caracteres	N	Media (SD)	Efectos <i>PPAR<math>\gamma</math></i>		
			a $\pm$ SE	LR	P <i>PPAR<math>\gamma</math></i>
<i>Rendimiento canal</i>					
% lomo	329	2,97 (0,31)	0,01 $\pm$ 0,03	0,20	0,654
% jamones	337	16,95 (0,82)	-0,13 $\pm$ 0,07	3,34	0,067
% paletas	337	11,35 (0,60)	0,04 $\pm$ 0,05	0,69	0,405
<i>Composición músculo l.dorsi (lomo)</i>					
Grasa intramuscular, %	256	7,77 (2,31)	-0,20 $\pm$ 0,28	0,51	0,474
Proteína, %	256	20,75 (0,69)	-0,01 $\pm$ 0,10	0,01	0,902
Humedad, %	256	70,97 (1,70)	0,17 $\pm$ 0,21	0,65	0,420
<i>Composición músculo Gracillis (jamón)</i>					
Grasa intramuscular, %	194	5,87 (2,14)	-0,77 $\pm$ 0,33	5,15	0,023
Proteína, %	194	22,21 (1,10)	0,24 $\pm$ 0,18	1,68	0,194
Humedad, %	194	70,26 (2,07)	0,71 $\pm$ 0,28	6,20	0,013
<i>Ácidos grasos</i>					
C16:0, %	336	21,34 (1,33)	-0,03 $\pm$ 0,10	0,18	0,671
C18:0, %	336	10,74 (1,09)	0,01 $\pm$ 0,08	0,01	0,898
C18:1, %	336	51,44 (2,21)	0,08 $\pm$ 0,16	0,29	0,589
C18:2, %	336	10,48 (1,11)	0,07 $\pm$ 0,07	1,04	0,307

**Análisis de asociación del polimorfismo del gen *PPAR $\gamma$*  con la expresión génica:** El gen *PPAR $\gamma$*  codifica un factor de transcripción que regula la expresión de enzimas lipogénicas y adipogénicas. La localización del polimorfismo encontrado en este gen en la región 3'UTR sugiere una posible implicación en la estabilidad del ARNm y/o en su regulación postranscripcional. Por ello se analizaron los efectos de la inserción detectada en este gen, sobre su propia expresión y sobre la expresión de varios de sus genes diana relacionados con el metabolismo lipídico, en distintos tejidos. En las muestras de músculo no se encontró ningún efecto del polimorfismo sobre la expresión de los genes candidato analizados. Por el contrario, en las muestras de tejido adiposo y en hígado, la inserción del gen *PPAR $\gamma$*  estuvo significativamente asociada con la expresión de algunos de los genes estudiados. Los resultados se muestran en la Figura 1 e indican una influencia variable del genotipo sobre la expresión dependiendo del tejido y muestreo.

Los resultados indican el efecto positivo sobre la calidad y el rendimiento del jamón del alelo con inserción en el gen *PPAR $\gamma$*  en la población estudiada y sugieren un mecanismo de acción del polimorfismo relacionado con su influencia sobre la expresión de genes de importancia decisiva en los fenómenos de adipogénesis y lipogénesis. El polimorfismo podría tener utilidad en selección en poblaciones cruzadas de cerdo ibérico en caso de confirmarse las asociaciones encontradas.



**Figura 1.** Asociación del polimorfismo del gen *PPAR $\gamma$*  con la expresión génica de los genes candidato en tejidos adiposo y hepático

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bassaganya-Riera J, Guri A, King J, Hontecillas R. Food Science. 2005;1:179–187.
- Hu Z-L, Dracheva S, Jang W, Maglott D, Bastiaansen J, Rothschild M, Reecy J. Mammalian Genome 2005, 16(10):792.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por los proyectos RTA2007-00075-00-00, CAM-S2009/AGR-1704, y RZ2012-00006-00-00. Agradecemos la colaboración del personal del CIA 'Dehesón del Encinar' (Oropesa, Toledo).

#### STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF POLYMORPHISMS IN *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\delta$* AND *PPAR $\gamma$* GENES IN IBERIAN PIGS

**ABSTRACT:** PPARs are candidate genes for fat deposition. We studied the CDS of *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\delta$*  and *PPAR $\gamma$*  genes in Iberian pigs and performed an association study of the polymorphisms found with productive traits. A novel insertion located in 3'UTR of *PPAR $\gamma$*  gene was associated with the fat and water content of ham muscle and showed a suggestive association with ham yield. The functional involvement of this polymorphism was explored analyzing the genotype effects on the expression of *PPAR $\gamma$*  and several downstream genes related to lipogenesis in different tissues. Results show some significant effects of the *PPAR $\gamma$*  insertion on candidate gene expression in adipose and hepatic tissues. The allele with favourable effect on quality and yield traits shows a high frequency in the Torbiscal population studied and should be a potential marker for selection in crossbred populations.

**Keywords:** *PPAR* gene, pig, SNP, fat deposition, gene expression, intramuscular fat