POLIMORFISMO DEL GEN *VASCULAR-CELL ADHESION MOLECULE* (*VCAM1*) PORCINO

Oscar Ramirez[1], Marta Blanch[1], Marcel Amills[1], José Luis Noguera[2], Armand Sánchez[1]

[1] Unitat de Ciència Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Bellaterra 08193, Spain.
[2] Area de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, Lleida 25198, Spain

INTRODUCCIÓN

El gen *vascular cell-adhesion molecule 1* (*VCAM1*) codifica una glicoproteína transmembranal (VCAM1) que participa en la arteriogénesis y se expresa a nivel endotelial (Cybulsky *et al.* 2001). Asimismo, la molécula VCAM1 facilita la adhesión de los linfocitos y los monocitos a la pared vascular (Osborn et al. 1989; Rice & Bevilacqua 1989) y juega un papel esencial en la formación de la placenta y el cordón umbilical (Gurtner *et al.* 1995). La disrupción de gen *VCAM1* murino por recombinación homóloga ha demostrado que en los individuos *knockout* no se produce la fusión del corion con el alantoides entre los días 8-9 de gestación, dando lugar a una elevada tasa de mortalidad embrionaria (Gurtner *et al.* 1995, Kwee *et al.* 1995). Asimismo, la deleción del gen *VCAM1* provoca hemorragias pericárdicas y abortos debido a su importante papel en la formación de los vasos sanguíneos coronarios y epicárdicos (Yang *et al.* 1995).
En humano, el gen *VCAM1* es de copia única, posee 9 exones y tiene un tamaño de 25 Kb (Cybulsky *et al.*1991). Se han descrito 2 isoformas de la proteína debido al *splicing* alternativo del exón 5 (Cybulsky et al.1991). En porcino, el gen *VCAM1* ha sido mapeado en el cromosoma 4 y se ha descrito la existencia de polimorfismo genético (Helm *et al.* 1994, Tuggle *et al.* 1997). Igualmente, se ha secuenciado el cDNA completo que posee un tamaño de 2494 pb y posee una identidad nucleotídica del 84% con su ortólogo humano (Tsang *et al.* 1994). En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de variantes alélicas del gen *VCAM1* en un cruce Ibérico x Meishan con la finalidad de realizar un estudio de asociación entre dichas variantes y caracteres relacionados con la supervivencia embrionaria y otros parámetros reproductivos.

MATERIAL Y METODOS

Amplificación del cDNA VCAM1 porcino
Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de útero y ovario correspondientes a 10 individuos de las razas Pietrain, Large White, Landrace, Vietnamita, Meishan, Ibérica e Ibérico x Meishan. El RNA se purificó mediante congelación de las muestras en nitrógeno líquido y pulverización y homogenización con un politrón. El tejido homogenizado se resuspendió en *Trizol reagent* (Gibco BRL, Life Technologies) y el RNA se extrajo según las indicaciones del fabricante. La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit *ThermoScript RT-PCR System kit* (Invitrogen S.A.). Los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación fueron VCAM-F 5'- CCG AGG AAT ATC GTC GTG AT-3', VCAM-Rw; 5'-ACT CCC TCG CAC ACG TAA AT -3'. Ambos oligonucleótidos fueron diseñados mediante el *software* Primer 3 empleando como molde la secuencia *VCAM1* porcina (GenBank número de acceso L43124). Las condiciones de la reacción de PCR fueron 1.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTPs, 0.5 µM de cada *primer*, 2-3 µl de reacción de transcripción

reversa y 0.75 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico fue de 94 °C-1 min, 61 °C-2 min, 72 °C-3 min durante 35 ciclos.

Secuenciación del producto amplificado e identificación de polimorfismos
Los productos amplificados fueron purificados con el Concert™ Rapid PCR Purification System (GIBCO BRL) y se realizó secuenciación directa de los mismos mediante el ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (version 3.1). Las reacciones de secuenciación se analizaron en un aparato de electroforesis capilar ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa Multalin (Corpet 1988) con la finalidad de identificar posiciones polimórficas.

Genotipado de polimorfismos
Para llevar a cabo el genotipado de los dos polimorfismos encontrados en las posiciones 305 y 647, se puso a punto un método de diagnóstico basado en la aproximación de *primer-extension analysis* en formato múltiplex. Se amplificó un fragmento que incluía los exones 3 y 4 mediante los oligonucleótidos VCAMG-F 5'-CAA AAT GAT TGC GCA GAT TG-3' y VCAMGRw 5'-TAC TGA GGG CTG ACC ATC AA-3'. La composición de la reacción de PCR fue 1.5mM $MgCl_2$, 100 µM dNTP, 0.5 µM de cada oligonucleótido y 0.75 U de Taq DNA polimerasa en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico consistió en 1 ciclo a 94 °C-1.5 min seguido de 35 ciclos a 94 °C-1.5 min, 65 °C-2 min y 72 °C-2.5 min y un ciclo final de extensión a 72 °C-20 min. El producto amplificado fue purificado mediante el kit *ExoSAP-IT* (Amersham Biosciences Europe GmbH) y las dos mutaciones se genotiparon mediante el kit *SnaPshot™ ddNTP Primer Extension* (Applied Biosystems). La secuencia de los oligonucleótidos usados en la reacción de extensión fueron: VCAM1 5'- ATA TAT AGC ACA GTC TCC TGC GGG AA - 3' (mutación A/T_{305}) y VCAM2 5' – ATG AAG AGT TTG GAA TTT ACC TTT ACT CCT AC-3' (mutación C/T_{647}).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se amplificó un fragmento de 840 pb del cDNA *VCAM1* porcino que fue secuenciado en diez individuos de distintas razas porcinas. Mediante el alineamiento de dichas secuencias se encontraron dos nuevos polimorfismos en las posiciones 305 (A/T) y 647 (C/T) (considerando la posición 1 como el primer nucleótido del codón de inicio). Dichas posiciones corresponden a los exones 3 y 4 respectivamente. El polimorfismo A/T_{305} comporta una sustitución aminoacídica Asn/Lys en la posición 102 y por tanto implica la sustitución de un aminoácido neutro por otro cargado positivamente. El polimorfismo C/T no esta asociado a ningún cambio aminoacídico. Las frecuencias alélicas de ambos polimorfismos se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen *VCAM1* en distintas razas porcinas.

RAZAS	A305T		C647T		N
	A	T	C	T	
Meishan	0,00	1,00	0,09	0,91	17
Ibérico	0,00	1,00	1,00	0,00	7
Large White	0,40	0,60	1,00	0,00	10
Pietrain	0,73	0,27	0,93	0,07	13
Landrace	0,04	0,96	0,92	0,08	12

Dado que la molécula VCAM1 se expresa en las primeras fases del desarrollo placentario y umbilical, siendo necesaria para la formación de conexiones vasculares entre el embrión y las membranas extraembrionarias, resultaría de gran interés

realizar un estudio de asociación entre el polimorfismo del gen *VCAM1* porcino y distintos caracteres reproductivos (supervivencia embrionaria, capacidad maternal y prolificidad). Con dicha finalidad, se ha puesto a punto un método de genotipado que permitirá analizar 424 individuos F_0, F_1 y F_2 generados a partir de un cruce Ibérico x Meishan. Estas dos razas parentales, se hayan muy diferenciadas genéticamente y presentan diferencias fenotípicas muy notables en cuanto a los caracteres considerados, lo cual permitirá una elevada potencia en la detección de asociaciones. Hasta el momento se han genotipado los individuos parentales para ambos polimorfismos y sólo se ha detectado la presencia del polimorfismo C/T_{647}. Igualmente, se ha comprobado que los alelos C y T están prácticamente fijados en los parentales ibéricos y Meishan, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Corpet F. 1988. Nucleic Acids Res. 16: 10881-90.
2. Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, Sultan P, Eddy R, Byers M, Shows T, Gimbrone MA and Collins T. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7859-7863.
3. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW and Milstone DS. 2001. J. Clin. Invest. 107: 1255-1262
4. Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI. 1995. Genes Dev. 9: 1-14.
5. Helm JM, Schmitz CB, Tuggle CK and Rothschild MF.1994. J Anim Sci 72(10): 2764.
6. Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck CA, Labor MA. 1995. Development 121: 489-503.
7. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G and Lobb R. 1989. Cell 59: 1203-1211.
8. Rice GE and Bevilacqua MP. 1989. Science 246: 1303-246.
9. Tsang YT, Haskard DO and Robinson MK. 1994. Biochem Biophys Res Commun 15;201(2): 805-12.
10. Tuggle CK, Yu TP, Sun HS, Wang L and Rothschild MF. 1997. J Anim Sci 75(8): 2286.
11. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. 1995. Development 121: 549-60.

Gracias a CIA "El Dehesón del Encinar", COPAGA, INRA y Nova Genètica por ceder las muestras de sangre y tejidos utilizadas en este estudio. El presente trabajo fue financiado con el proyecto CYCIT AGL2000-1229-C03.