IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN GANADO CAPRINO

Zidi, A.[1], Jordana, J.[1], Carrizosa, J.[2], Gallardo, D.[1], Urrutia, B.[2] y Amills, M.[1]
[1]Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra; [2]Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Estación Sericícola. La Alberca, Murcia.
E-mail de contacto. Ali.Zidi@uab.cat

INTRODUCCIÓN

La grasa de la leche está compuesta fundamentalmente de triglicéridos y constituye un aporte fundamental de energía a la vez que posee una gran influencia sobre las propiedades físicas y tecnológicas de la leche y sus derivados (Arnould y Soyeurt, 2009). El contenido y composición de la grasa de la leche suele ser bastante variable puesto que los factores de tipo genético y ambiental (sobre todo nutricionales) tienen un gran efecto sobre el mismo (Bauman et al., 2006, Soyeurt et al., 2006). Un porcentaje muy significativo de la grasa de la leche está constituido por ácidos grasos saturados (65-70%), característica que, desde un punto de vista nutricional se considera desfavorable dado que está asociada a un mayor riesgo de sufrir aterosclerosis, obesidad y enfermedades coronarias (Arnould y Soyeurt, 2009). Por otra parte, la composición de la grasa de la leche tiene efectos sobre las propiedades organolépticas del queso (en cuanto a aroma y sabor) y de la mantequilla (Arnould y Soyeurt, 2009). Estas consideraciones ponen de manifiesto el interés de seleccionar los caracteres vinculados al contenido y la composición de la grasa con la finalidad de mejorar las características nutricionales y tecnológicas de la leche. El hecho de que, por lo general, dichos caracteres tengan heredabilidades moderadas (entre 0.2-0.4) es un factor favorable en cuanto a implementar esquemas de selección. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, la existencia de correlaciones desfavorables entre estos caracteres p.e. el aumento de ácidos grasos insaturados conlleva una disminución del contenido graso de la leche (Arnould y Soyeurt 2009).
En bovino, se ha identificado diversos polimorfismos con efectos significativos sobre el contenido y la composición de la grasa de la leche. Por ejemplo, se ha observado que una sustitución no sinónima (K232A) en el gen *DGAT1* está asociada a variaciones en el porcentaje de grasa y en la proporción de ácidos grasos insaturados vs saturados (Arnould y Soyeurt, 2009). Dicho conocimiento tiene una aplicación práctica en cuanto a la implementación de esquemas de selección asistida por marcadores. En ganado caprino, por el contrario, el número de polimorfismos caracterizados hasta la fecha es relativamente bajo y ninguno parece tener un efecto causal. En el presente trabajo, se ha procedido a caracterizar la variabilidad genética de cinco loci relacionados con el metabolismo lipídico en una población de cabras de la raza Murciano-Granadina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los genes analizados en el presente estudio codifican la *estearoil-CoA desaturasa (SCD)*, el *enzima málico 1 (ME1)*, la *lipasa sensible a hormonas (LIPE)*, el *antígeno CD36 o translocasa de ácidos grasos (CD36)* y el *receptor de la prolactina (PRLR)*. Se realizaron extracciones de RNA a partir de muestras de hígado y de glándula mamaria utilizando el kit RiboPure Kit (Ambion). La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit Thermoscript RT-PCR System Kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación para cada uno de los genes no se detallan en esta sección pero pueden solicitarse al autor responsable del trabajo (Ali.Zidi@uab.cat). Los productos amplificados fueron secuenciados mediante el kit de secuenciación BigDye Terminador v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730 DNA Analyser (Applied

Biosystems). Con la finalidad de identificar posibles posiciones polimórficas, las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa Multalin (Corpet, 1988).
Una población de 400 cabras de la raza Murciano-Granadina fueron genotipadas para los distintos polimorfismos nucleotídicos (SNP) caracterizados en el presente trabajo, ya fuera mediante la tecnología Sequenom hME (Centro Nacional de Genotipado, CEGEN) o bien con el kit SnaPshot ddNTP Primer Extension kit (Applied Biosystems)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha procedido a secuenciar parcialmente los genes *SCD*, *ME1*, *LIPE*, *CD36* y *PRLR* en 8 individuos de las razas Murciana Granadina y Malagueña. Las secuencias obtenidas presentaron una elevada similitud nucleotídica (92-96%) con los genes ortólogos humanos. La comparación de secuencias en distintos individuos mediante el programa Multalin permitió identificar 20 posiciones polimórficas que se detallan en la Tabla 1

Tabla 1. *Polimorfismo de diversos genes del metabolismo lipídico en ganado caprino*

Gen	Sustitución	Frecuencia,%	Posición	Región	Naturaleza
SCD	C-T	35 (alelo C)	928	codificante	sinónimo
	Del TGT [1]	71.15 (Del TGT)	3180	3'UTR	-
	A-G	71 (Alelo G)	4780	3'UTR	-
ME1	C-T	71 (Alelo C)	600	codificante	sinónimo
	A-G	90 (Alelo G)	784	codificante	sinónimo
	C-T	No genotipado	1044	codificante	sinónimo
	A-G	90 (Alelo G)	1317	codificante	sinónimo
LIPE	C-T-A	81 (Alelo C)	1507	codificante	sinónimo
	C-T	78 (Alelo C)	1738	codificante	sinónimo
	G-T	97 (Alelo G)	2342	codificante	cambio A-S
CD36-21[2]	A-G	58 (Alelo A)	589	codificante	cambio N-D
	C-T	75 (Alelo C)	1755	3'UTR	-
	T-C	91 (Alelo T)	2037	3'UTR	-
	T-A	90 (Alelo T)	2043	3'UTR	-
CD36-4 [2]	C-T	No genotipado	473	codificante	sinónimo
	C-A	52 (Alelo C)	571	codificante	sinónimo
PRLR	C-T	94 (Alelo C)	263	codificante	sinónimo
	A-G	84 (Alelo G)	1256	codificante	sinónimo
	A-G	84 (Alelo G)	1326	codificante	cambio R-G
	C-T	94 (Alelo C)	1480	codificante	Cambio T-I

[1] Previamente descrita por Bernard et al. (2001) en la raza francesa Alpina.
[2] El gen *CD36* está duplicado tanto en caprino como en bovino, especie en la cual se ha determinado la existencia de dos copias localizadas en los cromosomas 4 y 21.

Cabe destacar, que al amplificar la región codificante del gen *CD36* se observó la existencia de dos secuencias distintas con una similitud nucleotídica de 88%. La búsqueda de genes ortólogos en bovino demostró la existencia de dos loci distintos: uno situado en el cromosoma 4 bovino (cuyo ortólogo humano se halla en el cromosoma 7q11.2-qter, Clavo et al., 1995) y otro cuya localización coincide con el cromosoma 21 bovino (Berguland et al., 1996, Karall-Albrecht et al., 2000) y carece de ortólogo en humano. Todo ello indica que el gen *CD36* ha sufrido una duplicación cuya existencia precede a la radiación de bovinos y caprinos (20 MYR). Por otra parte, también cabe destacar la detección de *splicing* alternativo en el gen *PRLR*, con dos isoformas larga (codifica una proteína de 466 aminoácidos) y corta

(272 aminoácidos). La existencia de este fenómeno de *splicing* alternativo del gen *PRLR* ya había sido descrita por Bignon et al. (1997) en ovino y otros rumiantes. En la isoforma corta, se observa la existencia de una inserción de 39 pb contigua, en posición 5', al exón 10 y portadora de dos codones *stop* sucesivos, por lo que da lugar a una proteína de menor tamaño. Actualmente, se está procediendo a realizar análisis de asociación entre los distintos polimorfismos identificados y caracteres relacionados con el contenido y composición de la grasa en una población de cabras de raza Murciano-Granadina

Agradecimientos: Este trabajo de investigación se ha financiado en el contexto del proyecto CICYT AGL2007-66161-C02-02 concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Alí Zidi ha sido beneficiario de una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación (AECI) y, posteriormente, de otra del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• Arnould & Soyert, 2009.J. Appl. Genet. 50: 29-39. • Bauman et al., 2006. J. Dairy Sci. 89: 1235-1243. • Berguland et al., 1996, Biochim. Biophys. Acta 1309: 63-68. • Bernard et al., 2001. Gene 281: 53-61. • Bignon et al., 1997. J. Mol. Endocrinol. 19: 109-120. • Clavo et al., 1995. Genomics 25: 100-106. • Karall-Albrecht et al., 2000. Mamm. Genome 11: 320-325. • Soyeurt et al., 2006. J. Dairy Sci. 89: 4858-4865.

POLYMORPHISM OF FIVE LIPID METABOLISM GENES IN GOATS

ABSTRACT: Milk fat is an important factor influencing the nutritional and technological quality of dairy animal products. The existence of moderate heritabilities (from 0.2 to 0.4) for milk fat percentage and fatty acids profile evidences the segregation of allelic variants with important additive effects on lipid metabolism traits. In this work, we have characterized the polymorphism of five functional candidate genes, with different roles on lipid synthesis, transport and degradation, in a Murciano-Granadina goat population. Genes under study were *stearoyl-CoA desaturase (SCD)*, *malic enzyme 1 (ME1)*, *hormone-sensitive lipase (LIPE)*, *antigen CD36 (CD36)* and *prolactin receptor (PRLR)*. Partial sequencing of these loci revealed the existence of 20 polymorphisms that have been genotyped in the Murciano-Granadina goat population in order to perform an association analysis with milk fat percentage and composition traits. Moreover, our data evidence that the *CD36* gene is duplicated in goats as well as the existence of alternative splicing in the caprine *PRLR* gene
Keywords: *Goat, milk fat, single nucleotide polymorphism, fatty acid profile.*