# ANÁLISIS DEL GEN DE LA LEPTINA E INTERACCIÓN CON SU RECEPTOR: ASOCIACIÓN CON CARACTERES PRODUCTIVOS EN CERDO.

Pérez-Montarelo, D., López, M.A., Fernández, A., Folch, J.M., Pena, R., Óvilo, C., Rodríguez, C. y Fernández, A.I.
Dept. Mejora Genética Animal, INIA, Ctra de la Coruña km 7.5, 28040 Madrid, España.
E-mail: dafne.perez@inia.es

## INTRODUCCIÓN

La leptina es una hormona polipeptídica, producida y secretada casi exclusivamente por los adipocitos, que regula la ingesta de alimentos, influenciando el crecimiento, el peso y la composición corporal a través de mecanismos tanto fisiológicos como endocrinos (Barb et al., 2001). En cerdos, la leptina es en una proteína de 167 aminoácidos codificada por el gen *leptin* (*LEP*). El gen *LEP* se localiza en el cromosoma SSC18 y está constituido por dos intrones y tres exones, repartiéndose la región codificante entre los exones 2 y 3 (Bidwell et al., 1997). Estudios previos han mostrado resultados controvertidos respecto a la asociación de polimorfismos del gen *LEP* con caracteres productivos y reproductivos en cerdo (Jiang y Gibson, 1999; Kennes et al., 2001; Pérez-Montarelo et al., 2010). El efecto de esta hormona se debe en gran parte a la interacción con su receptor específico, denominado receptor de leptina (LEPR), que es el encargado de transmitir la señalización desencadenada por esta hormona (Thomas, 2004). Recientes trabajos han confirmado el efecto del SNP *LEPR* c.1987C>T sobre crecimiento y deposición grasa en diversas razas porcinas (Óvilo et al., 2010). En el presente estudio se ha analizado la secuencia del gen *LEP* en el material del cruce experimental Ibérico x Landrace con el objetivo de identificar polimorfismos asociados a caracteres productivos y estudiar su interacción con el polimorfismo c.1987C>T del gen *LEPR*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales utilizados para la secuenciación del gen *LEP* y para la búsqueda de polimorfismos han sido los parentales del cruce experimental Ibérico x Landrace (IBMAP), cinco hembras Landrace y tres machos Ibéricos. Muestras de ADN de sangre de estos animales fueron extraídas mediante un protocolo estándar fenol: cloroformo. La secuenciación de este gen se ha llevado a cabo utilizando 9 parejas de primers, que han permitido amplificar la práctica totalidad del gen. El genotipado de los polimorfismos identificados se ha realizado en 482 individuos del cruce (parentales, F1 y F2) mediante pirosecuenciación. Los caracteres de crecimiento registrados en la generación F2 del cruce fueron el peso (Kg) más próximo a los 100kg (P100kg), el más próximo a una edad media de 150 días (P150d) y el de la canal (PCanal).

El análisis de asociación se llevó a cabo con el programa QxPak (Pérez-Enciso y Misztal, 2004) utilizando un modelo animal donde, además de los efectos poligénicos aleatorios, se incluyeron como efectos fijos el sexo y el lote, los efectos aditivo, dominante de los SNPs de ambos genes y su interacción y la edad de sacrificio como covariable. Adicionalmente, se ha mapeado el gen *LEP* utilizando el programa CRIMAP, haciendo uso de la información de genotipado de tres microsatélites (*S0120*, *SW787* y *SW1023*) y uno de los SNPs identificados en el gen.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación de las secuencias del gen *LEP* en ocho parentales del cruce Ibérico x Landrace ha permitido identificar un total de 35 SNPs y cuatro indels, de los que no habían sido identificados previamente 33 SNPs y las cuatro indels. La mayoría de los polimorfismos se localizan en regiones intrónicas excepto el SNP29 que se encuentra en el tercer exón del gen (Figura 1).

Se seleccionaron para su genotipado en los animales del cruce IBMAP aquellos polimorfismos que parecían más informativos, que además representaban tres grupos de SNPs ligados, estos fueron el SNP 7 C>T (*LEP*7), SNP10 A>G (*LEP*10) y SNP44 C>T (*LEP*44). Sin embargo, no se ha podido analizar el *LEP*44 debido a problemas técnicos de genotipado. El protocolo del *LEP*7 permitió el genotipado simultáneo de los SNPs *LEP*6 y

*LEP7*, apareciendo ambos totalmente ligados en la población. Las frecuencias en la F2 para los SNPs genotipados fueron 0.41 para el alelo *LEP7*C y 0.12 para el alelo *LEP*10A.

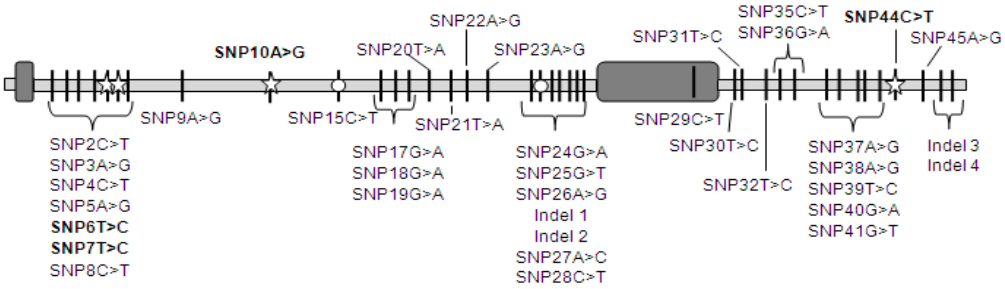



***Figura 1.*** *Esquema del fragmento del gen LEP porcino secuenciado. En gris oscuro se representan los exones 2 y 3, en gris claro los intrones, los círculos representan polimorfismos anteriormente descritos y las estrellas marcan los polimorfismos seleccionados para su genotipado.*

Los análisis de asociación llevados a cabo no han permitido detectar asociación del polimorfismo *LEP*10 con ninguno de los caracteres analizados. Sin embargo, si se han encontrado asociaciones significativas del SNP *LEP7* con los caracteres de crecimiento analizados (Tabla 1). Los efectos detectados fueron aditivos, de forma que el alelo T del SNP *LEP7*, fijado en Ibérico, tendría un efecto negativo sobre el peso próximo a 100 kg y sobre el peso de la canal, con magnitudes superiores a 2,2 y 1,7 kg, respectivamente. La interacción de los efectos aditivos de *LEP7* y *LEPR c.*1987C>T no resultó significativa para ninguno de los tres caracteres de crecimiento.

***Tabla 1****. Resultados del análisis de asociación de los polimorfismos LEPR c.1987C>T, LEP7 y de su interacción con el peso próximo a una edad media de 150 días (P150d) , peso más próximo a 100 kg (P100kg) y peso de la canal (PCanal).*

| Caracter | *Media (SD)* | $a_{LEPR}$ (SE) | *P* | $a_{LEP}$ (SE) | *P* | *axa* (SE) | *P* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P150d | 86,10 (11,12) | -2,33 (1,02) | 0,022 | -1,75 (0,95) | 0,066 | -1,18 (1,40) | 0,392 |
| P100kg | 100,62 (12,93) | -3,01 (0,84) | $4{,}1\times10^{-4}$ | -2,26 (0,84) | 0,007 | -1,05 (1,13) | 0,349 |
| PCanal | 74,67 (10,05) | -2,01 (0,67) | 0,003 | -1,74 (0,67) | 0,009 | 0,42 (0,89) | 0,632 |

En un análisis complementario, se compararon los efectos sobre crecimiento de las combinaciones de los genotipos para los dos SNPs *LEPR c.*1987C>T y *LEP7*. Los resultados de este análisis confirman de forma más gráfica, el efecto significativo y puramente aditivo de ambos polimorfismos sobre estos caracteres (Figura 2). Los animales portadores en homocigosis de los alelos T para ambos polimorfismos muestran un efecto mayor sobre P100kg y PCanal que los individuos heterocigotos, y éstos a su vez un efecto mayor que los homocigotos para los alelos alternativos.
Por otro lado, el análisis del efecto del polimorfismo *LEP7* y de su interacción con *LEPR* c.1987C>T sobre caracteres de conformación y deposición grasa también muestran asociaciones significativas, más complejas de interpretar (dominancia y/o epistasia) que están siendo evaluadas a partir de un número más amplio de animales genotipados.

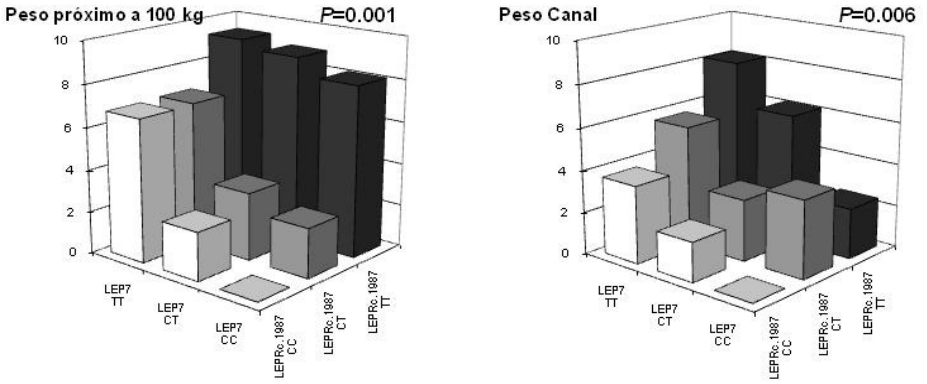



***Figura 2:*** *Efecto sobre el peso más próximo a 100kg y el peso de la canal de los genotipos para los polimorfismos LEP7 y LEPR c.1987C>T en animales IBMAP.*

En estudios previos sobre este material animal no se había detectado ningún QTL en el cromosoma SSC18, donde se ha confirmado la localización del gen *LEP* mediante mapeo de ligamiento (*SW120* (0 cM) – *SW787* (13,7 cM) – *LEP* (21,2 cM) – *S01023* (37,4 cM)). Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran efectos significativos del gen *LEP* sobre los caracteres analizados y más aún, parece existir una interacción con el gen *LEPR* con efectos relevantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Barb, C.R., Hausman, G.J. & Houseckнecht K.L. 2001. Domest. Anim. Endocrinol. 21: 297-317. • Bidwell, C.A., Ji, S., Frank, G.R., Cornelius, S.G, Willis G.M. & Spurlock, M.E. 1997. Anim. Biotechnol 8: 191-206. • Jiang, Z-H. & Gibson J.P. 1999. Mamm. Gen. 10: 191-193. • Kennes, Y.M., Murphy, B.D., Pothier, F. & Palin M-F. 2001. Anim. Genet. 32: 215-218. • Ovilo, C., Fernández A., Fernández, A.I., Folch, J.M., Varona, L., Benítez, R., Nuñez, Y., Rodríguez, M.C. & Silió, L. 2010. Mamm Gen. 21: 583-591. • Pérez-Enciso, M. & Misztal, I. Bioinform. 20: 2792-2798. • Pérez-Montarelo et al. 2010. XV Reunión Nacional de Mejora Genética Animal., Vigo 16-18 Junio. • Thomas, T. 2004. Curr. Opin Pharmaco.l 4:2 95-300.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el proyecto MICINN AGL2008-04818-C03. Dafne Pérez-Montarelo disfruta de una beca FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2009-025417).

## LEPTIN GENE ANALYSIS AND INTERACTION WITH ITS RECEPTOR: ASSOCIATION WITH PRODUCTIVE TRAITS IN PIG

**ABSTACT:** Leptin, the product of the *LEP* gene, is a hormone that interacts with the leptin receptor (LEPR) and that acts as a signal of satiety affecting feed intake, energetic balance and body composition. The aim of this study was the analysis of *LEP* sequence variability and the polymorphism associations with growth traits in the experimental cross Iberian x Landrace (IBMAP). Moreover, interaction of *LEP* and *LEPR* was also investigated. The sequencing of the *LEP* gene in the parental generation of the IBMAP material revealed 35 SNPs and 4 indels, mostly located in intronic regions. Three SNPs (*LEP7*, *LEP*10 and *LEP*44) were selected for the analyses. The results showed significant additive effects for *LEP7* SNP on the traits: weight near to 100kg and carcass weight. In addition, significant additive effects of the genotypes of both *LEP7* and *LEPR*c.1987C>T were also investigated. Finally, complex effects of *LEP7* and the interaction *LEP-LEPR* on other productive traits are under study.

**Keywords:** leptin, productive traits, leptin receptor, pig