ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *IGF2* PORCINO Y SU EFECTO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN DIFERENTES FONDOS GENÉTICOS.

Criado-Mesas[1,2], L., Revilla[1,2], M., Paludo[1,2], E., Crespo-Piazuelo[1,2], D., Castelló[1,2], A., Fernández[3], A.I., Ballester[4], M. y Folch[1,2], J.M.
[1]Plant and Animal Genomics, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra, España. [2]Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, España. [3]Departamento de Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, España. [4]IRTA, Genètica i Millora Animal, Torre Marimon, 08140 Caldes de Montbui, Spain.
lourdes.criado@cragenomica.es

INTRODUCCIÓN

El gen *insulin-like growth factor 2 (IGF2)* promueve el crecimiento y juega un papel importante en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células en diferentes tejidos, y se encuentra involucrado en procesos como la miogénesis y la tumorigénesis (Aslan et al., 2012).

En porcino, el polimorfismo g.3072G>A, localizado en el intrón 3 del gen *IGF2,* ha sido descrito en diferentes razas como la mutación causal de un QTL del cromosoma 2 porcino (SSC2) que incrementa la masa muscular y disminuye el espesor de la grasa dorsal, sin afectar la calidad de la carne (Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999; Van Laere et al., 2003; Estellé et al., 2005). El modo de herencia que mejor explica estos fenotipos es el de *imprinting* materno, es decir, expresión del alelo paterno (Van Laere et al., 2003). Se sabe que la expresión del gen *IGF2* está asociada al porcentaje de grasa intramuscular (Aslan et al., 2012), pero no se ha estudiado cómo afecta la mutación a la composición de ácidos grasos en grasa dorsal y músculo. Además, se han encontrado diferencias en la expresión de este gen en el músculo porcino en función del genotipo del SNPg.3072G>A, pero no en grasa dorsal ni en hígado (Gardan et al., 2008; Van Laere et al., 2003), lo que sugiere una regulación de la expresión del gen *IGF2* porcino específica de tejido.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la regulación de la expresión del gen *IGF2* porcino y su efecto sobre caracteres de interés productivo, el presente trabajo analiza la expresión del gen y los efectos sobre la composición de ácidos grasos en músculo y grasa dorsal de animales con diferentes fondos genéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y genotipado: El material animal utilizado proviene de tres retrocruces experimentales diferentes: BC1_LD (F1 (machos Ibéricos Guadyerbas X hembras Landrace) X hembras Landrace), BC1_DU (F1 (machos Ibéricos Torbiscal X hembras Duroc) X hembras Duroc) y BC1_PI (F1 (machos Ibéricos Torbiscal X hembras Pietrain) X hembras Pietrain).

Para los estudios de expresión en músculo *(Longissimus dorsi*) se han utilizado 114 animales del BC1_LD (Puig-Oliveras et al., 2016), 126 del BC1_DU y 124 del BC1_PI; mientras que para el análisis de expresión en grasa dorsal se han utilizado 49 cerdos del BC1_LD, 44 del BC1_DU y 51 del BC1_PI. Las muestras de músculo y grasa fueron recogidas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80ºC hasta su utilización.

Los animales del BC1_LD y BC1_PI fueron genotipados con el *PorcineSNP60K BeadChip (Illumina)* y los animales del BC1_DU con el *GeneChip Porcine Genome Array (Affymetrix)*. Un total de 34.316 SNPs fueron utilizados en los estudios de asociación, después de la selección de los SNPs comunes a los dos chips, el filtrado de los que presentaban una frecuencia del alelo minoritario (MAF) inferior al 5% y de los que tenían genotipos faltantes en más del 5% de los animales. En esta selección de SNPs se incluyó el polimorfismo del intrón 3 g.3072G>A que fue genotipado mediante pirosecuenciación (Van Laere et al., 2003). También se determinó la composición de ácidos grasos en grasa subcutánea e intramuscular mediante cromatografía de gases.

Expresión génica: Se extrajo el ARN total de las muestras de músculo y de grasa dorsal con el kit *RiboPure™ (Ambion).* El ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific)* y se convirtió a ADNc utilizando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).* Los niveles de expresión génica de *IGF2*

y de dos genes de referencia, *ACTB* y *TBP*, fueron medidos en músculo con el chip *Dynamic Array 48.48 (Fluidigm)* en una plataforma *BioMark (Fluidigm).* En cambio, los niveles de expresión de estos genes en grasa dorsal fueron medidos en un *QuantStudio™ 12K flex Real-Time PCRSystem (ThermoFisher Scientific).* Ambos datos de expresión se normalizaron utilizando los genes de referencia y se analizaron con el programa *DAG Expression* (Ballester et al., 2013) y el software de *ThermoFisher Scientific*, respectivamente. La normalidad de los datos se comprobó mediante el test *Shapiro-Wilk* de R (http://R-project.org).

GWAS: Los estudios de asociación genómicos entre los valores de expresión del gen *IGF2* y los genotipos de los SNPs *(eGWAS)* se realizaron mediante las funciones *polygenic* y *mmscore* del paquete *GenABEL* de R (Karssen et al., 2016), siguiendo el modelo lineal mixto:

$y = Xb + Sa + Zu + e$,

dónde: y es el vector de fenotipos; b es el vector de efectos fijos que incluye el sexo (2 niveles), el retrocruce (3 niveles) y el lote (17 niveles); a es el efecto aditivo de sustitución alélica del SNP, u es el vector de efectos genéticos aditivos que se distribuye como $N(0, G\sigma_\alpha^2)$ dónde G es la matriz de parentesco calculada a partir de los SNPs con la función *ibs* de *GenABEL* y σ_α^2 es la varianza genética aditiva; X y Z son matrices de incidencia y S es un vector de incidencia; e es el vector de residuos.

Para la asociación *(GWAS)* con la composición de ácidos grasos se ha utilizado el mismo modelo añadiendo el peso de la canal como covariable.

Análisis del *imprinting*: Se ha deducido el alelo paterno de 337 animales a partir de los genotipos de los progenitores. Para el estudio de un modelo de *imprinting* del gen *IGF2* sobre la expresión del gen en ambos tejidos se utilizó un modelo lineal (*lm*) en R, ajustando para sexo y lote como efectos fijos y comparando un modelo con *imprinting* con un modelo aditivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un *GWAS* para la composición de ácidos grasos en músculo (*Longissimus dorsi*) y grasa dorsal en 433 y 443 animales, respectivamente, de tres retrocruces experimentales y los genotipos de 34.316 SNPs distribuidos por todos los cromosomas no se observó ninguna asociación significativa (FDR<0.05) entre el genotipo g.3072G>A del gen *IGF2* y la composición de ácidos grasos en músculo. Sin embargo, g.3072G>A fue el SNP del SSC2 que mostró la asociación más significativa para la composición en grasa dorsal de los ácidos grasos heptadecanoico (C17:0; p-valor=$8{,}93\times10^{-7}$; a=0,03), oléico (C18:1(n-9); p-valor=$2{,}20\times10^{-7}$; a=0,74), linoleico (C18:2(n-6); p-valor=$1{,}65\times10^{-9}$; a=1,11), α-linoleico (C18:3(n-3); p-valor=$1{,}56\times10^{-7}$; a=0,05) y araquidónico (C20:4(n-6), p-valor=$2{,}42\times10^{-7}$; a=0,02), así como para la ratio MUFA/PUFA (p-valor=$4{,}27\times10^{-10}$; a=0,24).

La expresión de *IGF2* en ambos tejidos fue diferente según el sexo, siendo en músculo mayor para hembras, y en grasa para machos. Por otra parte, los resultados de expresión del gen para cada retrocruce mostraron diferencias significativas entre ellos, siendo mayor para el BC1_DU en los dos tejidos estudiados.

En un análisis *eGWAS* con los mismos SNPs y los valores de expresión del gen *IGF2* en el músculo de 364 animales de tres retrocruces experimentales, se observó una región del SSC2 (0-18 Mb) asociada con la expresión del gen (Figura 1). El gen *IGF2* se localiza en esta región y el SNP g.3072G>A del intrón 3 fue el que presentó una mayor significación (p-valor=$1{,}30\times10^{-23}$; a=0,98). Estos resultados concuerdan con un *eGWAS* realizado anteriormente por nuestro grupo en la población BC1_LD (Puig-Oliveras et al., 2016).

Se analizó bajo un modelo de *imprinting* el efecto del polimorfismo del gen *IGF2* sobre la expresión del mismo gen en músculo de 337 animales y en grasa dorsal de 143 animales. Tanto para músculo como para grasa dorsal se observó que los animales con genotipo AA del gen *IGF2* presentan una mayor expresión del propio gen, en comparación con el genotipo GG (p-valor<2×10^{-16} en músculo y p-valor=$3{,}34\times10^{-9}$ en grasa dorsal). Además, los animales que habían heredado el alelo paterno A tenían una mayor expresión del gen *IGF2* en comparación con los animales que habían heredado el alelo paterno G (p-valor<2×10^{-16} en músculo y p-valor=$6{,}37\times10^{-10}$ en grasa dorsal).

La variación del ARNm de *IGF2* en músculo y grasa dorsal, la fuerte asociación del genotipo g.3072G>A del gen *IGF2* sobre la composición de ácidos grasos en la grasa dorsal y el

efecto del *imprinting* sobre la expresión del gen en ambos tejidos sugiere que el polimorfismo del gen *IGF2* juega un papel importante en la determinación de la composición de ácidos grasos en grasa dorsal y en la regulación de la expresión del gen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Aslan, O. 2012. Mol. Bio. Rep. 39:4101–4110 • Ballester, M. 2013. PLoS One 8: e80385 • Estellé, J. 2005. J. Anim. Sci. 83:2723–2728 • Gardan, D. 2008. Dom. Anim. Endoc. 34: 45-53 • Jeon, J.T. 1999. Nat. Genet. 21:157-8 • Karseen, L. 2016. F100Research. 5:194. • Nezer, C. 1999. Nat. Genet. 21: 155-6 • Puig-Oliveras A. 2016. Sci. Rep. 6:31803 • Van Laere, A. 2003. Nature. 425:832-6

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto MINECO AGL2014-56369-C2. El material animal fue generado en el marco del proyecto INIA CPE03-010-C3 con la colaboración de investigadores del INIA, IRTA y UAB. L. Criado está financiada con una beca FPI del MINECO. M. Revilla y D. Crespo están financiados con una beca FI-DGR de la Generalitat de Catalunya. M. Ballester está financiada con un contrato Ramón y Cajal del MINECO. E. Paludo está financiada por una beca del *Programa de Ciencia sin Fronteras* del CNPQ (Brasil), Modalidad *Doctorado Sandwich extranjero* – SWE.

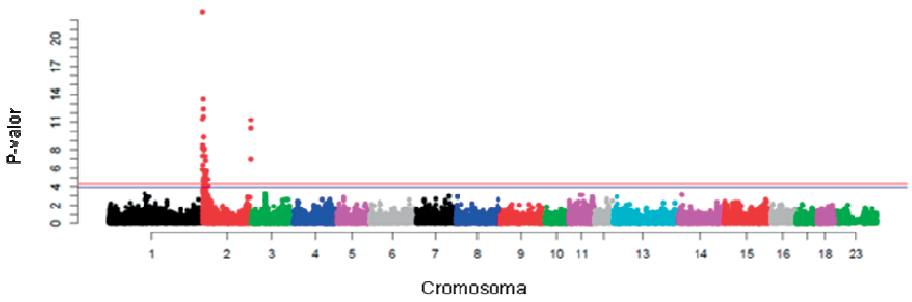


***Figura 1**. eGWAS de expresión de IGF2 en músculo. Línea azul P-valor<0,05; línea roja P-valor<0,01. Posición de los SNPs basada en el Sscrofa10.2. El cromosoma 23 corresponde al cromosoma sexual X.*

ANALYSIS OF PORCINE *IGF2* GENE EXPRESSION AND ITS EFFECT ON FATTY ACID COMPOSITION IN DIFFERENT GENETIC BACKGROUNDS

ABSTRACT: The objective of this work was to study the regulation process of pig *IGF2* gene expression and its effect on fatty acid composition in muscle and backfat in different genetic backgrounds. In a GWAS with 34,316 SNPs and fatty acid composition in muscle and backfat, the *IGF2* g.3072G>A polymorphism was the most significant SNP on SSC2 for backfat heptadecanoic (C17:0; p-value=$8.93x10^{-7}$), oleic (C18:1(n-9); p-value=$2.20x10^{-7}$), linoleic (C18:2(n-6); p-value=$1.65x10^{-9}$), α-linoleic (C18:3(n-3); p-value=$1.56x10^{-7}$), and arachidonic fatty acids (C20:4(n-6); p-value=$2.42x10^{-7}$) and the MUFA/PUFA ratio (p-value=$4.27x10^{-10}$). However, no significant associations were found between the *IGF2* SNP and muscle fatty acid composition. A SSC2 (0-18Mb) region was associated with the muscle *IGF2* mRNA expression in an eGWAS performed with 337 animals. The *IGF2* gene was located in this genomic interval and the g.3072G>A was the most significant SNP. Both, in muscle and backfat, animals with AA genotype showed a higher *IGF2* expression than GG animals. Furthermore, in an imprinting analysis, pigs inheriting the A allele from their father had a higher gene expression in muscle and backfat. Our results suggest that *IGF2* g.3072G>A polymorphism plays an important role in the determination of fatty acid composition in adipose tissue and in the regulation of *IGF2* gene expression.

Keywords*:* *IGF2*, backfat, eGWAS, imprinting