



UAB



INIA

IRTA

Master

**MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN**



**ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS
RELACIONADOS CON EL
METABOLISMO LIPÍDICO
EN UNA POBLACIÓN COMERCIAL DUROC**

CAROLA TRINIDAD MELO ROJAS

Dpto de Ciencia Animal y de los Alimentos
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
2009

AGRADECIMIENTOS

Toda buena dádiva que recibes viene de mi. Santiago 1.17

Con profunda gratitud a mi director de tesis Dr. Marcel Amills, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo de investigación, gracias por la confianza depositada en mi persona, por su paciencia para conmigo y todas las enseñanzas impartidas a lo largo de este tiempo a su cargo. La entrega que le pone a cada trabajo realizado es un ejemplo que he de seguir toda mi vida.

A Alí, quien supo guiarme en el fascinante mundo de la genética molecular, gracias por los consejos, por haber empleado tu tiempo en enseñarme las técnicas de laboratorio.

A todos los miembros de la Unidad de Genética, quienes me hicieron sentir como en familia. Gracias Dra. Ana Castelló por sus consejos, Dra. Ana Mercadé por su paciencia, Dra. Ainhoa Ferrando por ser una bellísima persona, Dra. Ana Ojeda por irradiar alegría, Dr. Armand Sánchez, Dr. Miguel Pérez Enciso, Dr. Sebastián Ramos, Dr Josep Maria Folch, Dras. Olga Francino y Laura Altet por brindarme su amistad, a Carla por su gran sentido del humor, a Irene con sus ocurrencias, Queen con sus locuras, Natalia por su apoyo moral, Cecilia por su amistad, John por su aliento, Henry, Xavi, Ingrid, Oriol, Abid, Rebeca, Griselda, Betlem, Maria del Mar, Elisenda y Maribel. A mis excelentes profesores de Máster por enseñarme la entrega que le ponen a cada proyecto, en especial al Dr. Baselga porque en él veo una persona que ama lo que hace y Dra. Toñi por su dulzura.

A los grandes amigos que he conocido en España (Alexei, Guo, Yan Bing, Robert, Deivis, Ruben y David) por haber compartido conmigo grandes momentos. A mis amigas Bety Fani, Maria Elena, Carmencita, Adriana, Ivonne, Cynthia, por su apoyo, los bailes y sobre todo por hacerme sentir como en casita. A mis amigos en Perú (Olsen, Eloy, Elisban, Edwin, Ramón, Flor, Carmen, Milagros) que aunque lejos, siempre están en mi mente.

A mis compañeros de Máster (Richard, Jorge, Andrés, Coskun, Mohamed, Mahmud Javier, Raquel) por todos los momentos buenos y malos que hemos pasado juntos, por soportarme, sobre todo a Yuli (mi hermano del alma) por haberme dado el hombro y haberme demostrado qué significa la amistad.

En especial a Papá lindo, por haberme dado tantas bendiciones que creo no merecerlas y a veces no valorarlas.

A mis padres Máximo (Como tu nombre lo dice papito, eres lo máximo, mi ejemplo, mi fuerza) y Zenaida (mi linda Heydi, eres amor y fe vivencial), mis hermanitas Roselin y Paolita y mi hermanito Max.

A Gabriel mi ángel, que desde el cielo me guía, no se cuanto falte para verte nuevamente, por eso me porto bien.

Al Instituto Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la beca otorgada para desarrollar el Master, contribuyendo grandemente a mi formación como profesional. Especialmente a Antonio del Valle por haberme apoyado y alentado cuando ni yo creía en mi, mil gracias.

A todos los que por descuido he podido olvidar y que son parte importante en mi formación, gracias.

Este trabajo de investigación se ha realizado en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona bajo la dirección del Dr. Marcel Amills Eras.

RESUMEN

Este trabajo de investigación forma parte del proyecto *Mapeo e identificación de genes implicados en el metabolismo lipídico en porcino, la calidad de la carne y la calidad del jamón curado* (AGL2007-66707-C02-02), cuya finalidad consiste en determinar la arquitectura genética de diversos caracteres relacionados con el metabolismo lipídico, en particular aquellos vinculados al metabolismo del colesterol, lipoproteínas séricas (LDL y HDL) y triglicéridos (TG). De forma específica, nuestro estudio aborda la descripción estructural de los genes candidatos de la apolipoproteína D (*APOD*), *low density lipoprotein receptor-related protein 12* (*LRP12*) y *Tribbles 1* (*TRIB1*) porcinos, la identificación de polimorfismos mediante la secuenciación de distintos individuos y la realización de estudios de caracteres relacionados con el metabolismo lipídico en una población comercial Duroc. Cabe destacar que la posición de estos tres genes coincide con la de *quantitative trait loci* para las concentraciones séricas de triglicéridos (cromosoma 4: *TRIB1* y *LRP12*) y HDL y LDL (cromosoma 13: *APOD*). De acuerdo a este plan de trabajo, se ha procedido a secuenciar la región codificante del gen *APOD* en 8 individuos pertenecientes a la raza Duroc. La secuencia obtenida posee 794 pares de bases (pb) y codifica una proteína de 190 aminoácidos, sin embargo no se ha hallado ningún polimorfismo. Asimismo, se ha secuenciado 2.3 kb del gen *TRIB1* que incluyen el 64% de la región codificante (836 pb) y parte de la región 3' UTR. Aunque no se han encontrado polimorfismos en la región codificante, a nivel de la región 3' UTR se ha identificado un indel de 2 pb. Finalmente, se ha secuenciado 2.9 kb del gen *LRP12*, caracterizándose el 100% de la región codificante, que da lugar a una proteína de 859 aminoácidos. A nivel estructural, se ha detectado cinco dominios *LDL-receptor class A*, ricos en cisteínas y típicos de los receptores de LDL. Por otra parte, se ha identificado cuatro polimorfismos nucleotídicos (SNP) sinónimos C507T, C762T, A771G y A1101G. Se ha realizado un análisis de asociación preliminar entre los SNP771 y 1101 y diversos caracteres relacionados con el metabolismo lipídico en una población comercial Duroc. Se ha encontrado asociaciones significativas entre el genotipo *LRP12* y las concentraciones séricas de LDL (SNP771), HDL y triglicéridos (SNP1101), así como con el espesor del tocino dorsal (ambos SNP). También se ha hallado asociaciones significativas entre el genotipo *LRP12* y el porcentaje y la composición de la grasa intramuscular en los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*.

RESUMÉ

Ce travail de recherche fait partie du projet *Cartographie et identification des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique chez les porcins, la qualité de la viande et la qualité jambon cru* (AGL2007-66707-C02-02), dont sa finalité consiste à déterminer l'architecture génétique des divers caractères en relation avec le métabolisme lipidique, en particulier ceux qui sont liés au métabolisme de cholestérol, lipoprotéine sérique (LDL et HDL), et triglycérides (TG). Spécifiquement, notre travail aborde la description structurelle des gènes candidats l'Apolipoprotéine D (*APOD*), *Low density lipoprotein receptor-related protein 12* (*LRP12*) y Tribbles 1 (*TRIB1*) porcine, l'identification des polymorphismes à travers le séquençage des individus distincts et l'analyse d'association avec les caractères du métabolisme lipidique en population porcine commerciale Duroc. La localisation de ces 3 gènes coïncide avec celle du QTL pour la concentration sanguine des triglycérides (chromosome 4 :*TRIB1* et *LRP12*), HDL, et LDL (chromosome 13 :*APOD*). La région codante du gène *APOD* a été séquencée en huit porcins Duroc. La séquence obtenue a une longueur de 794 pb et code pour une protéine de 190 acides aminés, mais aucun polymorphisme n'a été identifié. Encore, on a séquencé 2.3 kb (dont 836 pb correspondent à la région codante) du gène *TRIB1*. Et de même, aucun polymorphisme n'a été identifié dans la région codante, mais un indel de 2pb a été déterminé dans la région 3'UTR. Finalement, on a séquencé 2.9 kb du gène *LRP12* correspondant à 100% de la séquence codante. Au niveau structurel, cinq récepteurs LDL de classe A ont été identifiés. D'autre part, on a identifié quatre polymorphismes nucléotidiques (SNP) synonymes : C507T, C762T, A771G et A1101G. Une association significative a été identifiée entre le génotype de *LRP12* et la concentration sanguine du LDL (SNP771), HDL et les triglycérides (SNP1101), ainsi que l'épaisseur du lard dorsal (les deux SNP). En outre, une association significative entre le génotype de *LRP12* et le pourcentage de la graisse intramusculaire et la composition des muscles *gluteus medius* et *longissimus dorsi*.

SUMMARY

This study forms part of the project *Mapping and identification of genes involved in lipid metabolism and meat and ham quality in pigs* (AGL2007-66707-C02-02), which is mainly devoted to investigate the genetic architecture of fatness related traits, with special emphasis on those related with cholesterol, lipoprotein and triglyceride metabolism. Specifically, this work undertakes the structural characterization of the porcine apolipoprotein D (*APOD*), low density lipoprotein receptor-related protein 12 (*LRP12*) and Tribbles 1 (*TRIB1*) genes, the identification of polymorphisms by sequencing several individuals and the performance of association analyses with lipid metabolism traits in a Duroc commercial population. The location of these three genes coincides with previously identified quantitative trait loci for serum concentrations of triglycerides (chromosome 4: *TRIB1* and *LRP12*), HDL and LDL (chromosome 13: *APOD*). The coding region of the *APOD* gene has been sequenced in eight Duroc pigs. The resulting sequence was 794 bp long and encoded a 190 amino acid protein, but unfortunately we have not found any polymorphism. Moreover, we have sequenced 2.3 kb (836 bp correspond to the coding region) of the *TRIB1* gene. Although we have not found any polymorphism in the coding region, we have detected a 2 bp-indel in the 3'UTR. Finally, we have sequenced 2.9 kb of the *LRP12* gene which encompass 100% of the coding region. At a structural level, we have found five LDL receptor class A domains which are typical of LDL receptors. On the other hand, we have identified four single nucleotide polymorphisms (SNP) that happened to be synonymous: C507T, C762T, A771G and A1101G. We have made a preliminar association analysis between SNP771 and 1101 and several traits related with lipid metabolism in a Duroc commercial population. Significant associations have been found between *LRP12* genotype and serum concentrations of LDL (SNP771), HDL and triglycerides (SNP1101), as well as backfat thickness (both SNP). Besides, we have found significant associations between *LRP12* genotype and intramuscular fat percentage and composition in the *gluteus medius* and *longissimus dorsi* muscles.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción a la Producción Porcina	1
1.2. Caracteres de interés productivo relacionados con el metabolismo de lípidos en cerdos	3
1.2.1. Valor nutritivo de la carne porcina	3
1.2.2. Calidad de la carne	4
1.3. Metabolismo de las lipoproteínas	5
1.4. Mejora genética del porcino para caracteres relacionados con el engrasamiento y la calidad de la carne	9
1.5. Identificación de quantitative trait loci (QTL) en especies domésticas. Aspectos generales	13
1.6. Detección de QTL relacionados con caracteres de interés productivo en el ganado porcino	15
1.7. Genes candidatos	22
1.7.1. Apolipoproteína D (APOD)	27
1.7.2. El gen tribbles 1, Drosophila homolog (<i>TRIB1</i>)	27
1.7.3. Low density lipoprotein receptor-related protein 12 (LRP12)	28

2. OBJETIVOS 31

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material animal y caracteres fenotípicos	32
3.2. Caracterización molecular de genes candidatos para los QTL de los cromosomas 4 y 13	35
3.2.1. Extracción de RNA a partir de tejido muscular	35
3.2.2. Síntesis de DNA complementario	36
3.2.3. Optimización de las reacciones de amplificación	36
3.2.4. Protocolo de amplificación del gen de la apolipoproteína D (<i>APOD</i>) porcina	37
3.2.5. Protocolo de amplificación del gen Tribbles 1 (<i>TRIB1</i>) Porcino	37
3.2.6. Protocolo de amplificación del gen de la	

lipoprotein receptor-related protein 12 (<i>LRP12</i>) porcina	38
3.2.7. Protocolo de secuenciación del producto amplificado y análisis <i>in silico</i> de secuencias	39
3.2.8. Genotipado del gen <i>LRP12</i> porcino	40
3.2.9. Análisis preliminar de asociación con los fenotipos Estudiados	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Caracterización molecular del gen <i>APOD</i> porcino	43
4.2. Caracterización molecular del gen <i>TRIB1</i> porcino	46
4.3. Caracterización molecular y análisis de asociación del gen <i>LRP12</i> porcino	47
4.2.1. Búsqueda de polimorfismos en la región codificante del gen <i>LRP12</i>	50
4.2.2. Estudio de asociación entre el polimorfismo del gen <i>LRP12</i> porcino y caracteres lipídicos	53
5. CONCLUSIONES	59
6. BIBLIOGRAFÍA	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la Producción Porcina

Evidencias arqueológicas y genéticas indican que el cerdo (*Sus Scrofa*) fue domesticado, aproximadamente hace 9000 años, en múltiples localizaciones que incluyen el Creciente Fértil, Europa y el Lejano Oriente (Larson et al. 2005, Holden et al. 2006, Chen et al. 2007). Ello podría deberse fundamentalmente a las excelentes características de la carne porcina, así como al hecho de evitar los daños que los jabalíes ocasionaban a las cosechas (Taverner et al. 1996). Una vez domesticado, y de manera gradual, el cerdo fue seleccionado de acuerdo a sus características físicas (fundamentalmente el color de la capa) así como a partir de otros rasgos de interés productivo (docilidad, rusticidad, fertilidad etc.). La formación de las distintas razas porcinas tuvo lugar, principalmente, durante el siglo XIX y se localizó, fundamentalmente, en Inglaterra, Estados Unidos y China (Jones 1998). A título de ejemplo, la raza Large White fue reconocida en Inglaterra como tal en el año 1868, (Jones 1998).

Por mucho tiempo el cerdo fue consumido no sólo por su carne, sino también por su grasa debido a que ésta constituye una importante fuente de energía (Jones 1998). Sin embargo, y de forma reciente, el gusto del consumidor se ha decantado por carnes más magras debido a que éstas son más saludables (Taverner et al. 1996). La selección artificial a favor de disminuir la cantidad de grasa ha empeorado notablemente la calidad de la carne debido a una reducción de la infiltración de grasa y la palatabilidad (Tibau 1992). En este sentido, debe notarse que en el cerdo la mayor parte de la grasa es subcutánea (70%), mientras que dicha proporción es mucho menor en vacuno (36%) y ovino (46%) (Taverner et al. 1996). Debe destacarse que la carne de cerdo puede ser preservada en forma de embutidos y salazón, lo cual fue muy importante en épocas pasadas donde el consumo de carne era limitado o escaso, sobre todo en épocas de otoño e invierno (Taverner et al. 1996)

El cerdo está distribuido en una amplia variedad de territorios, con la única excepción de aquellos países en los que su carne no se consume por motivos religiosos. La Figura 1.1 basada en el Global Livestock Production and Health Atlas (GLiPHA: <http://www.fao.org/ag/aga/glipha>, FAO) indica la distribución mundial del censo porcino. España con más de 23 millones de cerdos, es el segundo productor en La Unión Europea (MAPA) y quinto a nivel mundial.

Dentro de España, y en cuanto a comunidades autónomas, Cataluña tiene la mayor población porcina (6.64 millones) seguida de Aragón (5.43 millones) y Castilla

León (3.65 millones), consolidándose como la mayor productora de carne de cerdo en España y ubicada entre las seis primeras regiones productoras de carne porcina de la Unión Europea (*Departament d' Agricultura, Alimentació y Acció Rural*).

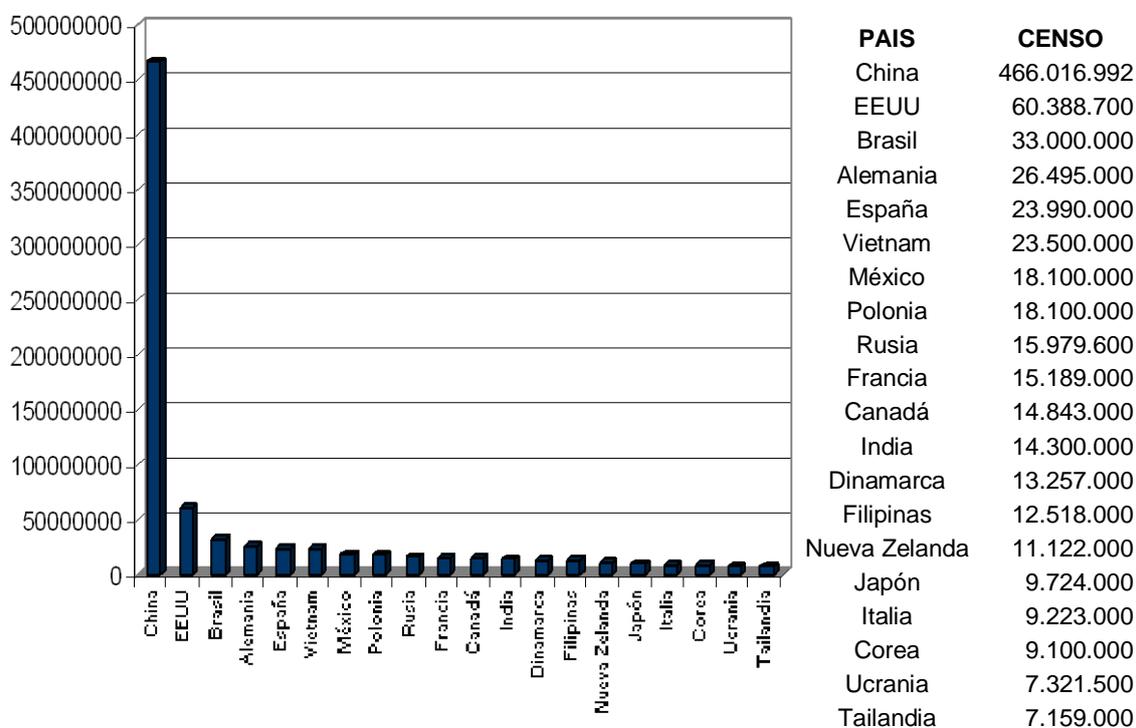


Figura 1.1 Distribución del censo porcino entre los veinte primeros productores mundiales en el año 2004. (*Global Livestock Production and Health Atlas, 2004, FAO*)

De todas las especies cárnicas, el porcino es una de las que mayor importancia tiene a nivel mundial, siendo la carne roja más consumida (36%), según la FAO (*Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2008*). La carne porcina también tiene una gran relevancia a nivel europeo, estimándose que su consumo seguirá en aumento por ser una de las favoritas de los consumidores (Figura 1.2), con una previsión de un 1.7% de crecimiento anual hasta el año 2016, según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (*OCDE, 2007*)

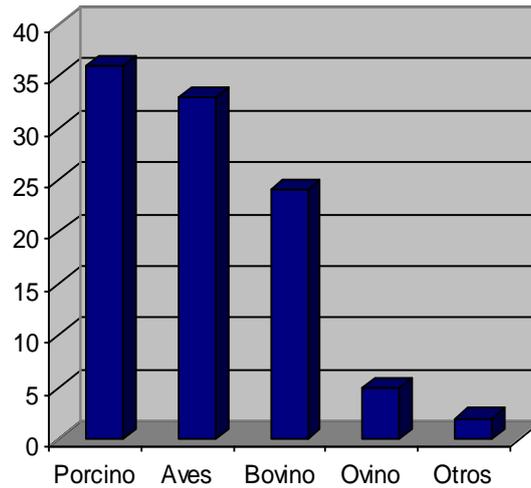


Figura 1.2 Consumo mundial de carne (%), siendo la carne porcina la más consumida, seguida de la aviar y la carne vacuna. Fuente: FAO

Pese a todo lo explicado anteriormente, diversos factores como los precios fluctuantes del pienso, la fuerte competencia que existe en el sector porcino, la actual crisis económica, y enfermedades importantes como la nueva gripe porcina hacen que la rentabilidad de las explotaciones porcinas sea bastante inestable.

1.2 Caracteres de interés productivo relacionados con el metabolismo de lípidos en cerdos

1.2.1 Valor nutritivo de la carne porcina

La carne de cerdo proporciona una gran variedad de nutrientes como proteínas, hierro y vitamina B, incluyendo tiamina, riboflavina y niacina (Taverner et al. 1996). Se ha debatido ampliamente el potencial impacto del consumo de carne de cerdo sobre la salud humana, asociándose éste a un aumento de la ingesta de grasa total, ácidos grasos saturados y colesterol, factores que aumentan el riesgo de sufrir aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Taverner et al. 1996). Tal como se ha comentado anteriormente, uno de los principales objetivos de selección del ganado porcino ha consistido en reducir paulatinamente el contenido de grasa de la canal (Wood 1993). En la Tabla 1.1 puede observarse la variación experimentada por una serie de parámetros relacionados con el engrasamiento durante el período 1975-1990.

Tabla 1.1 Cambios en la composición de la canal de cerdos en el Reino Unido (peso: 63 Kg.). Fuente: Wood (1993)

Carácter	1975	1990
Espesor de grasa dorsal (mm)	18	12
Grasa separable (%)	31	20
Ácidos grasos saturados (%)	42.6	40.2
Ácidos grasos poliinsaturados (%)	9.7	13.2

Esta disminución del engrasamiento trajo como consecuencia la pérdida de calidad de la carne, así como la disminución de la prolificidad y el apetito de los animales (Toro y Silió 1992, Fernández et al. 1999). Por ello en la actualidad caracteres como el porcentaje y la composición de la grasa intramuscular han recibido gran atención con el fin de obtener un producto de calidad (Wood 2008).

1.2.2 Calidad de la carne

La calidad de la carne es un concepto que no tiene una definición única y que depende de cuál sea su destino comercial. Para la carne fresca, atributos como el color, la cantidad de grasa, la ternura, jugosidad y sabor son esenciales en cuanto a su aceptabilidad por el consumidor (Tibau 1992). Para la carne procesada, la atención se centra en factores como el pH, la capacidad de retención de agua, estabilidad oxidativa y ausencia de sabores anómalos (Tibau 1992). La importancia de cada uno de estos parámetros también dependerá de si el destino final del producto elaborado es para cocidos o curados (Coma y Piquer 1999)

La grasa es un componente importante de los productos de la carne procesada porque afecta a la calidad de la misma (Tibau 2004). Un contenido elevado de grasa se asocia tradicionalmente a un mayor sabor y jugosidad (Wood 2008). La calidad de la grasa está ligada a la composición de la ración utilizada al final del engorde (Wood 2008). El acelerado crecimiento de algunas líneas genéticas no permite el depósito de un mínimo de grasa intramuscular antes del sacrificio, lo que puede afectar de forma determinante a la calidad sensorial y organoléptica de la carne. Si bien un elevado porcentaje de magro es deseable, el veteado es importante tanto para la industria de fabricación de productos curados como para el consumidor. (Tibau 2004).

La composición de la grasa también es importante desde un punto de vista tecnológico dado que los ácidos grasos insaturados, especialmente aquellos con más de dos dobles enlaces, se oxidan fácilmente y pueden dar lugar a un enranciamiento

de la carne y a un empeoramiento del color (Wood 2008). Esta propensión a la oxidación es importante en el desarrollo del aroma/sabor (en inglés: flavor, término que engloba ambos conceptos) durante el cocinado (Jiménez 2007). Por otra parte, la composición de la grasa también es importante desde el punto de vista de la salud humana ya que una carne más rica en ácidos grasos poliinsaturados y con un menor porcentaje de ácidos grasos saturados se considera que es más saludable en cuanto a la susceptibilidad a sufrir enfermedades coronarias (Wood 2008)

1.3 Metabolismo de las lipoproteínas

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares que transportan lípidos hidrofóbicos (principalmente triglicéridos, colesterol y vitaminas liposolubles), a través del sistema circulatorio para que puedan ser empleados por los distintos tejidos corporales (Frayn 1998). Las lipoproteínas juegan un papel importante en la vehiculación del colesterol dietético, los ácidos grasos de cadena larga y las vitaminas liposolubles (Kathiresan y Arder 2008). Asimismo participan en el transporte de triglicéridos, de colesterol y de vitaminas liposolubles del hígado hacia los tejidos periféricos, así como en el transporte reverso del colesterol desde los tejidos hacia el hígado (Kathiresan y Arder 2008).

Las lipoproteínas contienen un núcleo de lípidos hidrofóbicos (triglicéridos y ésteres de colesterol) rodeados por lípidos hidrofílicos (fosfolípidos y colesterol no esterificado) y apolipoproteínas (Frayn 1998). Las lipoproteínas plasmáticas se dividen en cinco clases de acuerdo a su densidad relativa (Ganong 2006): quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Cada una de estas clases abarca una serie de partículas que varían levemente en cuanto a densidad, tamaño, migración durante la electroforesis y composición proteica. La densidad de una lipoproteína viene determinada por la proporción relativa de lípidos (Ganong 2006). La HDL es la lipoproteína más pequeña y la más densa, mientras que los quilomicrones y las VLDL son lipoproteínas mayores y menos densas (Tabla 1.2). La mayoría de los triglicéridos plasmáticos son transportados en el contexto de quilomicrones y VLDL. En cambio, la mayor parte del colesterol se vehicula como ésteres del colesterol en LDL y HDL. Niveles altos de LDL en plasma están asociados a enfermedades ateroscleróticas, denominándose comúnmente como “colesterol malo” (Biggesrstaff y Wooten 2004).

Tabla 1.2 Características de las principales clases de lipoproteínas (según Ganong 2006)

Lipoproteína	Tamaño (nm)	Composición					Origen
		Prot	Col	EC	TG	Fosf	
Quilomicrones	75 a 1000	2	2	3	90	3	Intestino
Remanente de quilomicrones	30 a 80	--	--	--	--	--	Capilares
VLDL	30 a 80	8	4	16	55	17	Hígado e intestino
IDL	25 a 40	10	5	25	40	20	VDL
LDL	20	20	7	46	6	21	IDL
HDL	7.5 a 10	50	4	16	5	25	Hígado e intestino

Acrónimos usados: VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; Prot, proteínas; Col, colesterol libre; EC, ésteres de colesterol; TG, triglicéridos; Fosf, fosfolípidos.

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas y más densas y están compuestas por una elevada proporción de proteínas. Las HDL tienen como función principal el transporte reverso de colesterol desde los tejidos hasta el hígado para su excreción, y por lo general se considera que valores elevados del cociente HDL/LDL están asociados a un menor riesgo de sufrir aterosclerosis y enfermedades coronarias (Kathiresan y Arder 2008). En el cerdo, las LDL son especialmente abundantes durante la etapa fetal, mientras que en el lechón predominan más las HDL (Chapman y Forgez 1985). Ello probablemente se deba a los altos niveles de lipólisis de TG exógenos que acompañan a la ingestión de la leche (Chapman y Forgez 1985). En lo referente al sexo, las hembras poseen niveles más elevados de LDL, HDL y colesterol que los machos (Kist et al. 1999).

Las apolipoproteínas constituyen una parte esencial del complejo lipoproteico y entre otras funciones actúan como ligandos para los receptores celulares del colesterol. (Ye y Kwiterovich 2000; Saito et al. 2004). Existen cinco clases principales de apolipoproteínas: APOA (1,2 4 y 5), APOB (48 y 100), APOD, APOE y APOH.

Tal como se explicará a continuación, existen dos vías principales para la obtención de ácidos grasos y colesterol por parte de los tejidos.

- **Vía endógena del metabolismo de las lipoproteínas**

La vía endógena (Figura 1.3) se refiere a la secreción hepática de los triglicéridos y colesterol que se han unido a la apolipoproteína B-100, dando lugar a las partículas VLDL (Kathiresan y Arder 2008). Las partículas de VLDL se asemejan a los

quilomicrones y para que se las considere maduras deben adquirir las apolipoproteínas C2 y E de las partículas HDL (Ye 2000). Al igual que los quilomicrones, los triglicéridos de VLDL son hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL) que es activada por la APOC2, liberándose glicerol y ácidos grasos. Éstos últimos son reabsorbidos a nivel tisular, especialmente por los tejidos adiposo y muscular (Kathiresan y Arder 2008). A las partículas hidrolizadas de VLDL se las denomina remanente de VLDL o lipoproteínas de densidad media (IDLs). Éstas, por acción de la APOE, interaccionan con los receptores IDLs que se encuentran en el hígado, donde se produce una reabsorción hepática de dichas partículas o su hidrólisis por parte de la lipasa hepática (Charlton-Menys y Durrington 2008). El hígado elimina aproximadamente un 40 a 60% de IDL por endocitosis (Kathiresan y Arder 2008). La hidrólisis de las IDL libera glicerol y ácidos grasos, generando remanentes de IDL, que pasan a denominarse LDL. Las LDL contienen una alta concentración de colesterol. Las partículas de LDL son absorbidas por el hígado o tejidos periféricos mediante receptores específicos (Frayn 1998).

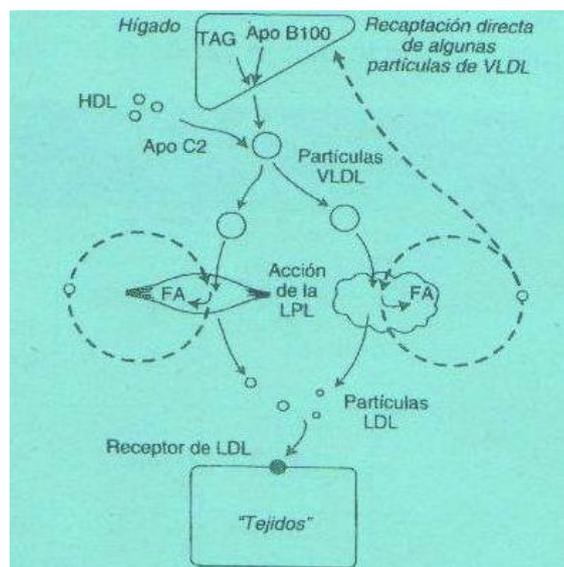


Figura 1.3. Vía endógena del metabolismo de las lipoproteínas. Esta vía transporta lípidos almacenados en el hígado a los tejidos periféricos y, en última instancia, de nuevo al hígado.

La principal función de las HDL consiste en captar el exceso de colesterol de los tejidos y transportarlo de nuevo al hígado (Kathiresan y Arder 2008), donde puede ser excretado a través de la bilis (transporte reverso de colesterol).

- **Vía exógena del metabolismo de las lipoproteínas**

La vía exógena del metabolismo de las lipoproteínas implica la absorción y transporte de los lípidos de la dieta por parte de las células epiteliales del intestino delgado (Frayn 1998), siendo hidrolizados en el lumen intestinal y emulsificados con los ácidos biliares para formar micelas (Figura 1.4). El colesterol, los ácidos grasos y las vitaminas liposolubles son absorbidas en el intestino delgado proximal (Frayn 1998). El colesterol y el retinol son esterificados, mediante la adición de un ácido graso en el enterocito, para formar los ésteres de colesterol y de retinol, respectivamente (Frayn 1998). Los ácidos grasos de cadena larga (más de 12 carbonos) son incorporados en los triglicéridos, uniéndose con la APOB-48, ésteres de colesterol, ésteres de retinol, fosfolípidos y colesterol, para formar los quilomicrones (Kathiresan y Arder 2008). La función principal de los quilomicrones es la de transportar lípidos exógenos hasta el hígado, tejido adiposo y tejido muscular esquelético y cardíaco. Desde el intestino, los quilomicrones son vehiculados a través del sistema linfático hasta ingresar en la circulación sistémica, donde son procesados por los tejidos antes de llegar al hígado. En este proceso, las partículas de HDL ceden APOC2 y APOE a los quilomicrones aún inmaduros, dando lugar a los quilomicrones maduros (Ye 2000). A medida que los quilomicrones circulan por los tejidos, especialmente tejido adiposo y muscular esquelético, tiene lugar la hidrólisis de los triglicéridos. Por la acción de la APOC2, los quilomicrones maduros activan la LPL, enzima que se encuentra en el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos, dando lugar a moléculas de glicerol, ácidos grasos libres y remanentes de quilomicrones (Ye 2000). Los remanentes de quilomicrones son rápidamente eliminados de la circulación por el hígado, gracias a la interacción de la APOE, presente en la superficie de la partícula de quilomicron, con receptores de remanente de quilomicron localizados principalmente en los hepatocitos (Ye 2000; Kathiresan y Arder 2008).

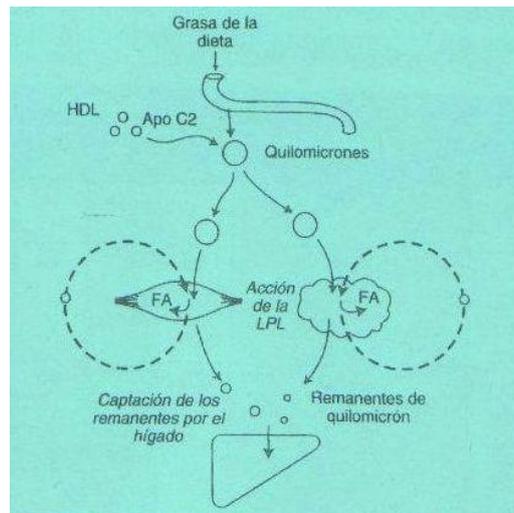


Figura 1.4. Vía exógena del metabolismo de las lipoproteínas. Esta vía transporta lípidos dietéticos del intestino a los tejidos periféricos y en última instancia al hígado. (Kathiresan y Arder 2009).

1.4 Mejora genética del porcino para caracteres relacionados con el engrasamiento y la calidad de la carne

La mejora genética del ganado porcino se basa en el aprovechamiento de la variabilidad existente entre y dentro de razas y líneas, mediante la aplicación de distintos métodos de cruzamiento y selección para caracteres productivos cuya naturaleza depende de factores de tipo económico y genético (Tibau 1992). Con ello, se persigue generar un cambio genético que sea favorable desde una perspectiva económica y productiva (Tibau 1992). Los objetivos de selección han ido cambiando a lo largo del tiempo en función de la demanda de los consumidores (Tibau 1992). Durante los años 80 se centraban en caracteres de conformación de la canal, principalmente en el porcentaje de magro, mientras que posteriormente han cobrado importancia los objetivos relacionados con la calidad de la carne (Tibau 1992). Tal como se ha mencionado anteriormente, la selección a favor de incrementar el porcentaje de magro ha conllevado una reducción de la grasa intramuscular, causando un paulatino deterioro de la terneza, aroma y sabor de la carne y una disminución de la consistencia de la grasa debido al mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados (Tibau 1992).

La heredabilidad (h^2) se define como la proporción de la variación fenotípica de un carácter atribuible a la variación genética aditiva. De este modo, caracteres con heredabilidades altas serán más fáciles de mejorar por selección (Falconer y MacKay, 1996). De forma general (Tabla 1.3), los caracteres reproductivos tienen h^2 bajas, los

productivos (crecimiento o índice de conversión) moderadas y los de calidad de la canal (longitud de la canal, depósito de grasa dorsal o porcentaje de magro) moderadas-altas. Finalmente, los caracteres de calidad de la carne (pH, color, % grasa intramuscular o composición de ácidos grasos) presentan h^2 moderadas-bajas, excepto el porcentaje de grasa intramuscular y algunos ácidos grasos que poseen valores relativamente elevados (Cameron, 1990; Tibau, 1992; Webb et al. 1998)

Un grupo de caracteres que se ha estudiado de forma somera en el ganado porcino es la concentración de lípidos séricos. Pond et al. (1986) han descrito una heredabilidad de 0.45 para los niveles plasmáticos de colesterol en cerdos a los 154 días de edad. Por otra parte, Young et al. (1993) han estimado la heredabilidad realizada para este mismo parámetro empleando dos líneas divergentes y calcularon que oscila entre 0.31-0.33. Más recientemente, en un trabajo aún no publicado, Casellas et al. (2009), han descrito las heredabilidades de las concentraciones séricas de colesterol, HDL, LDL y triglicéridos en la población Duroc objeto del presente estudio (Tabla 1.4). En general, los valores obtenidos fueron moderados e iban de 0.268 (LDL a 45 días de edad) a 0.472 (HDL a 45 días). En el mismo trabajo, Casellas et al. (2009) describieron las heredabilidades de múltiples ácidos grasos presentes en la grasa intramuscular, observando valores que en general oscilaban entre 0.4 y 0.5. Dichos valores son bastante coincidentes con los descritos en otras publicaciones (p.e. Fernández et al. 2003).

Tabla 1.3. Heredabilidades de caracteres de interés productivo en el ganado porcino.

Fuente: Tibau y Font (2004); Clutter et al. (1998); Sellier (1998.)

Carácter	Heredabilidad
Prolificidad	0.05 a 0.1
Destetados	0.04 a 0.07
Crecimiento	0.3 a 0.4
Edad a 100 kg	0.1 a 0.3
Índice de conversión	0.25 a 0.35
Rendimiento de la canal	0.2 a 0.25
Porcentaje de magro	0.55 a 0.65
Peso del jamón	0.5 a 0.6
Peso del lomo	0.5 a 0.6
Grasa intramuscular	0.5
Acidez de la carne	0.3
Longitud de canal	0.55-60
Espesor de la grasa dorsal	0.12-0.74
Porcentaje de magro	0.48-0.54
Terneza (determinación instrumental)	0.17-0.46
Terneza (panel sensorial)	0.18-0.70
Jugosidad	0.00-0.28
Aroma y sabor (<i>Flavour</i>)	0.01-0.16
Luminosidad de la carne (L*)	0.15-0.57
Firmeza de la grasa dorsal	0.43
Grasa dorsal -% agua	0.27-0.59
Grasa dorsal -% lípidos	0.26
Grasa dorsal -% ácido esteárico (C18:0)	0.42-0.57
Grasa dorsal -% ácido linoleico (C18:2)	0.47-0.67

Tabla 1.4. Concentraciones y heredabilidades de lípidos séricos en cerdos de raza Duroc a 45 y 90 días de edad. Fuente: Casellas et al. (2009).

Carácter ¹	h ²
COL45	0.380
HDL45	0.472
LDL45	0.268
TG45	0.424
COL190	0.372
HDL190	0.446
LDL190	0.358
TG190	0.335

¹ COL: colesterol, HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad, TG: triglicéridos.

En la Tabla 1.5, y a modo de ejemplo, se muestran las heredabilidades y correlaciones genéticas de diversos caracteres productivos en una población Duroc perteneciente a la empresa Selección Batallé. Puede observarse que el porcentaje de grasa intramuscular, un carácter que desde el punto de vista de calidad de la carne interesa incrementar, está correlacionado positivamente con el espesor del tocino dorsal. Dicha correlación es desfavorable puesto que las canales más magras en principio tienen un mayor valor económico.

Tabla 1.5. Estimación de parámetros genéticos para la ganancia media diaria (GMD), espesor de grasa dorsal (GD), porcentaje de grasa intramuscular (GRIN) y % de jamón en una población Duroc. En la diagonal se muestran las heredabilidades mientras que en la parte superior de la tabla se indican las correlaciones genéticas entre caracteres.

Carácter	GMD	GD	GRIN	% jamón
GMD	0.431 ± 0.035	0.488 ± 0.042	0.414 ± 0.054	-0.047 ± 0.030
GD	-	0.102 ± 0.020	0.928 ± 0.045	-0.713 ± 0.030
GRIN	-		0.495 ± 0.037	-0.454 ± 0.044
% jamón	-		-	0.474 ± 0.041

1.5 Identificación de quantitative trait loci (QTL) en especies domésticas. Aspectos generales.

El concepto de QTL se refiere a una región del genoma que contiene uno o varios polimorfismos con un efecto significativo sobre una parte importante de la variación observada en un carácter cuantitativo (Falconer y Mackay, 1996). La identificación de QTL es una etapa fundamental en el proceso de localización de mutaciones causales que puedan ser empleadas posteriormente como fuente de información genética en los programas de selección. La selección asistida por genes (Dekkers 2004) puede ser especialmente útil en aquellos caracteres que tengan una baja heredabilidad (p.e. caracteres reproductivos), que sean difíciles o caros de medir (p.e. índice de conversión), o que sólo puedan medirse en un sexo (p.e. producción de leche). En el ganado porcino, los experimentos de identificación de QTL se realizaron inicialmente en poblaciones F_2 producto del cruzamiento de razas divergentes (Rothschild et al. 2007). De manera más reciente, se ha abordado el análisis de poblaciones comerciales demostrando que un número significativo de los QTL detectados en cruces divergentes segregan en las mismas (Evans et al. 2003, Vidal et al. 2005). La aproximación estadística más comúnmente empleada para la detección de QTL se basa en el método de cartografiado por intervalos descrito por Lander y Botstein (1989), aproximación que permite estimar de forma separada el efecto y la localización de un QTL. Dicha metodología se basa en la comparación de las probabilidades de dos modelos (H_0 : sin QTL, H_1 : con QTL) estimadas mediante el método de la máxima verosimilitud por lo que, desde un punto de vista computacional, resulta compleja. Un avance significativo fue la implementación de un método basado en la regresión (*regression interval mapping*) que computacionalmente resulta más sencillo y que ofrece buenas aproximaciones al método basado en la máxima verosimilitud (Haley y Knott 1992).

El primer QTL identificado en porcino fue un locus mayor para el depósito de grasa en el cromosoma 4 (Andersson et al. 1994) y hasta la fecha han sido reportados 2400 QTLs en la base de datos porcina *Pig QTL Database* (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>). El diseño experimental más habitual en la identificación de QTL implica, tal como se ha mencionado anteriormente, el cruzamiento de dos razas divergentes para el carácter que se pretende estudiar y la generación de una población F_1 . Dicha población F_1 luego puede retrocruzarse con una de las razas parentales (diseño retrocruzamiento o *backcross*) o bien puede entrecruzarse dando lugar a una población F_2 (Georges 2007). Este último diseño, aunque es más complejo que el retrocruzamiento, es el más empleado dada su gran

polivalencia (Georges 2007). En general se asume que en cada una de las poblaciones parentales se han fijado los alelos alternativos del QTL, por lo que los individuos F_1 serán todos heterocigotos Qq y en la generación F_2 estarán presentes los tres genotipos QQ, Qq y qq. Un problema asociado a este tipo de diseño experimental es que básicamente detecta los polimorfismos responsables de las variaciones fenotípicas entre razas, mientras que los programas de selección fundamentalmente se hallan centrados en modificar la variación genética dentro de razas. En este sentido, resulta particularmente importante la búsqueda de QTL en poblaciones comerciales “puras”, tarea que suele realizarse mediante el análisis de múltiples familias de medios hermanos (Knott 2005). Esta aproximación, sin embargo, también tiene inconvenientes. Por ejemplo, un individuo parental únicamente es informativo si posee un genotipo heterocigoto tanto para el marcador analizado como para el QTL (Knott 2005). Además un QTL puede segregarse en ciertas familias y no en otras, o puede hallarse en distintas fases de desequilibrio de ligamiento con los distintos alelos de los marcadores analizados (Knott 2005). Todo ello hace que a menudo los resultados obtenidos adolezcan de una aparente falta de consistencia, efecto que se exagera cuando el tamaño poblacional es bajo (Knott 2005).

Una vez que ha sido identificado un QTL, el siguiente paso es el refinamiento de la posición del mismo mediante el uso de marcadores localizados en el correspondiente intervalo de confianza (Georges 2007). Tradicionalmente se han empleado marcadores de tipo microsatélite con esta finalidad, aunque la reciente caracterización de millares de polimorfismos nucleotídicos sencillos (SNP) en el ganado porcino y la puesta a punto de metodologías de genotipado a gran escala ha hecho que los SNP sean actualmente los marcadores de elección. En este sentido, cabe destacar la optimización de un chip de SNP porcinos de alta densidad (50K, es decir 50.000 SNP distribuidos en el genoma porcino) fruto de la colaboración entre la empresa Illumina y el International Porcine SNP Chip Consortium (<http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/212751.html>). Dicho panel de SNP fue generado mediante la secuenciación, con la metodología Solexa (Fox et al. 2009), de individuos de distintas razas porcinas (Duroc, Landrace, Large White, poblaciones chinas etc.). A pesar de estos avances, la identificación de las mutaciones causales subyacentes a los QTL es un proceso extraordinariamente complejo y costoso, tanto en las especies domésticas como en los organismos modelo (Georges 2007).

1.6. Detección de QTL relacionados con caracteres de interés productivo en el ganado porcino

El número de QTL identificados en el ganado porcino es muy elevado, siendo una de las especies domésticas más caracterizadas en este aspecto. En la Tabla 1.6 puede observarse el número de QTL encontrados para diversos caracteres de interés productivo. Resulta evidente que los caracteres vinculados al engrasamiento han sido profusamente estudiados (Tablas 1.6 y 1.7), aunque cabe destacar que el número de trabajos que abordan el análisis de la composición de la grasa (Clop et al. 2003, Sánchez et al. 2007, Muñoz et al. 2007, Guo et al. 2009) y de las concentraciones de lípidos séricos es relativamente reducido (Gallardo et al. 2008, Chen et al. 2009)

Tabla 1.6. Número de QTL caracterizados para distintos caracteres de interés productivo en porcino. Fuente: PigQTLdb (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>)

Carácter	Número de QTL
Anatómicos	719
Engrasamiento	544
Crecimiento	295
Textura de la carne	138
Color de la carne	131
pH carne	117
Composición de la grasa	72
Sabor/aroma ("flavor")	53
Conductividad	51
Órganos reproductivos	47
Consumo de alimento	33
Tamaño de camada	31
Química	29
Comportamiento	22
Capacidad inmune	22
Índice de conversión	12
Olor	12
Caracteres reproductivos	12
Conformación	11
Resist. a enfermedades	7
Endocrino	4

Tal como se ha comentado anteriormente, el primer trabajo de detección de QTL en ganado porcino fue el realizado por Andersson et al. (1994) en un cruce de cerdo Large White por jabalí. En dicho trabajo se identificó un QTL para engrasamiento en el

cromosoma 4 porcino (QTL FAT1) que posteriormente fue confirmado en múltiples estudios. De este modo, Knott et al. (1998) determinaron la existencia de dos QTL localizados en SSC4 con importantes efectos sobre el espesor de la grasa dorsal (64 cM) y abdominal (68 cM). Asimismo, Pérez Enciso et al. (2000) describieron la segregación del QTL FAT1 en un cruce de cerdos Ibéricos y Landrace. Posteriormente, Mercadé et al. (2005) refinaron la posición de los QTL del cromosoma 4 porcino en la población Ibérico x Landrace mediante el genotipado de microsatélites adicionales, experimento que condujo a la confirmación de la existencia del QTL FAT1 en la posición 70 cM (aproximadamente) y de otro QTL adicional, en la posición 95 cM, que principalmente afecta al crecimiento. Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha identificado la mutación causal responsable de la existencia del QTL FAT1.

Los dos caracteres para los que se ha descrito un mayor número de QTL son el espesor del tocino dorsal (Tabla 1.7) y la tasa de crecimiento (74 QTL, <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary>). Dichos QTL por lo general presentan una amplia distribución en el genoma porcino. A modo de ejemplo, la Figura 1.5 indica la posición de QTL que afectan al espesor del tocino dorsal. Puede observarse que los cromosomas SSC3, SSC4, SSC6, SSC7 y SSC9 son los que presentan un mayor número de QTL y que únicamente los cromosomas SSC16 y SSC17 no presentan ningún QTL para este carácter. Ello concuerda con la naturaleza poligénica de este fenotipo. El número de QTL descritos para el porcentaje de grasa intramuscular, un carácter de gran importancia debido a que afecta a la jugosidad y palatabilidad de la carne (Davoli y Braglia 2007), es notablemente menor (Tabla 1.7), estando principalmente “concentrados” en SSC6 y SSC7 (Pig QTL Database)

Tabla 1.7. QTL descritos para distintos caracteres relacionados con el engrasamiento en cerdo. Fuente: PigQTLdb (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>)

Carácter	QTL encontrados
Espesor de la grasa dorsal (ETD)	105
Porcentaje de magro	47
ETD a nivel de la décima costilla	39
Contenido de grasa intramuscular	33
Peso de la grasa dorsal	27
ETD en la última costilla	25

Aunque el número de QTL identificados en cerdo es elevado, sólo en algunos casos se ha identificado la mutación causal subyacente (Mote et al. 2006). En este sentido cabe destacar una mutación intrónica en el gen *Insulin-like growth factor-2 (IGF2)* relacionada con el crecimiento muscular (Van Laere et al. 2003), y dos mutaciones aminoacídicas en los genes del receptor de la rianodina 1 (Fujii et al. 1991) y del gen *Protein Kinase AMP-activated gamma 3* (Milan et al. 2000) que básicamente afectan a la calidad de carne.

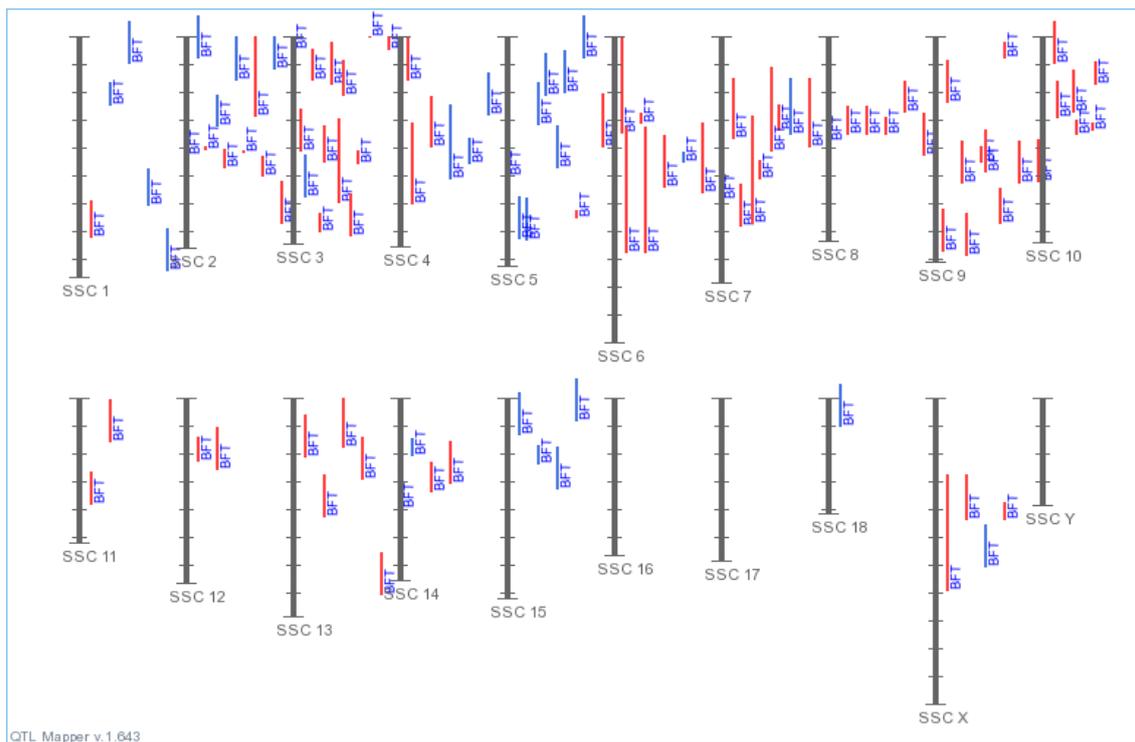


Figura 1.5. Localización de QTL con efectos sobre el espesor del tocino dorsal (Pig QTL Database)

Dado que una revisión exhaustiva de los QTL relacionados con el metabolismo lipídico en porcino cae fuera de los objetivos de la presente Introducción, a continuación pasará a describirse los QTL lipídicos hallados en la población Duroc objeto de estudio. Por el momento, se ha realizado un barrido genómico para lípidos séricos (Tabla 1.8) y para porcentaje y composición de la grasa intramuscular (Tabla 1.9A y 1.9B). En cuanto a los caracteres tradicionalmente evaluados en ganado porcino (crecimiento, espesor del tocino dorsal, calidad de la carne etc.) el análisis estadístico de los datos aun está pendiente de realizarse.

El barrido genómico para lípidos séricos realizado por Gallardo et al. (2008) demostró la existencia de un QTL para triglicéridos en SSC4 altamente significativo (Tabla 1.8). También se detectó la existencia de QTL significativos a nivel

cromosómico en SSC3, SSC9, SSC12 y SSC13. Cabe destacar que se observó una notable correspondencia posicional entre los QTL de lípidos séricos detectados en cerdo y en humano (Gallardo et al. 2008), y que la mayor parte de QTL detectados en la población Duroc sólo segregaban en ciertas familias. Este trabajo resulta novedoso puesto que la arquitectura genética de este tipo de caracteres ha sido muy poco estudiada en porcino. En este sentido cabe destacar el trabajo de Hasler-Rapacz et al. (1998), que demostró que una sustitución aminoacídica en el receptor de las LDL es causa de hipercolesterolemia familiar en porcino. Ello es muy relevante, desde una perspectiva de salud humana, ya que las lesiones aterocleróticas observadas en cerdos con hipercolesterolemia familiar son muy similares a las observadas en humano (Hasler-Rapacz et al. 1995). Más recientemente, Chen et al. (2009) han detectado la existencia de QTL altamente significativos para lípidos séricos en SSC2 y SSC8.

Tabla 1.8. Barrido genómico (análisis intrafamiliar) para lípidos séricos en cerdos Duroc a los 190 días de edad (Gallardo et al. 2008)

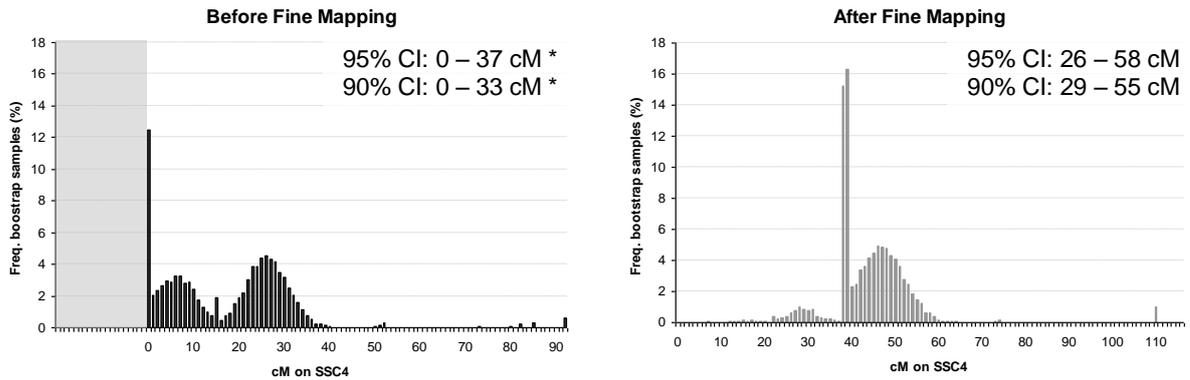
SSC [§]	Carácter	Posición (cM)	Familia	F-ratio [†]	Efecto medio (SD, mg/dL)
1	HDL	8	3	9.00+	-0.173(0.058)
3	CT	72	5	11.12++	-0.189(0.057)
3	LDL	68 74	4 5	7.62+ 11.99++	0.190(0.069) -0.296(0.085)
3	HDL/LDL	58 78	4 5	7.75+ 8.00+	-0.268(0.096) 0.249(0.088)
3	TG	83	1	12.27++	-0.420 (0.120)
4	TG	23	2	19.15**	0.434(0.099)
9	CT	99	1	9.89+	0.265(0.084)
9	HDL	53	1	8.33+	0.321(0.111)
12	HDL	23	1	7.61+	0.397(0.144)
12	HDL/LDL	0	1	11.21++	0.366(0.109)
13	CT	72	3	7.95+	-0.178(0.063)
13	LDL	74	3	8.09+	-0.293(0.103)
13	TG	5	1	10.65++	0.364(0.112)

[§] Cromosoma porcino; [†] + $P < 0.05$ y ++ $P < 0.01$ a nivel cromosómico, * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ a nivel genómico.

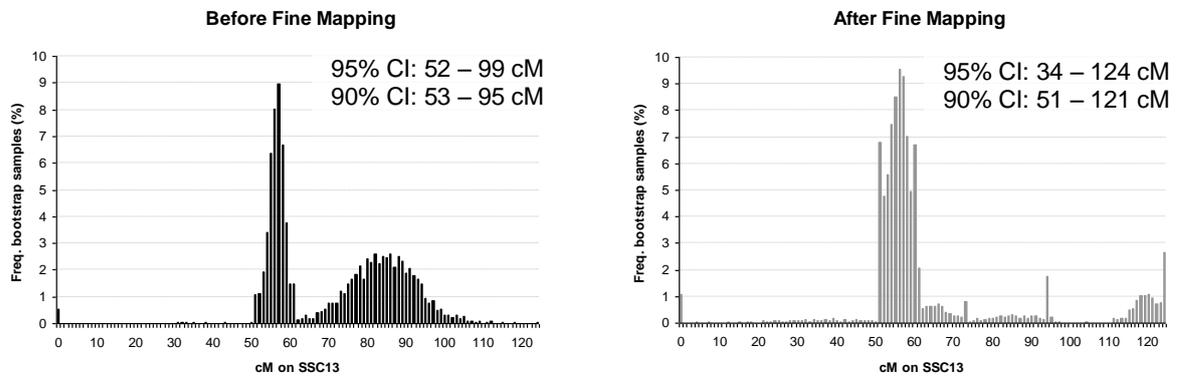
Una vez, realizado el barrido genómico para lípidos séricos se planteó la necesidad de refinar la posición de los QTL más significativos para elaborar una lista

de genes candidatos. El grupo de la Universidad Autónoma de Barcelona abordó el refinamiento de los QTL localizados en SSC4 y SSC13 mediante el genotipado de 8 microsatélites adicionales en la población Duroc. Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 1.6. Puede observarse que, desafortunadamente, los intervalos de confianza de los QTL apenas se redujeron e incluso en algún caso aumentaron. Este resultado tan paradójico puede atribuirse al hecho de que aumentar el número de marcadores genotipados tiene un efecto menor sobre la reducción del intervalo de confianza de un QTL, mientras que el tamaño poblacional parece tener un efecto mucho más marcado sobre este parámetro (Darvasi y Soller 1997). Por otra parte, en la población Duroc se ha cartografiado diversos QTL para el porcentaje y la composición de la grasa intramuscular (Tablas 1.9A y 1.9B, manuscrito en preparación). Resulta remarcable la falta de concordancia posicional entre los QTL detectados para estos caracteres en los músculos *gluteus medius* y *longissimus dorsi*, lo cual sugeriría que los mecanismos que gobiernan el almacenamiento de lípidos en estos dos músculos son, hasta cierto punto, distintos. Se ha detectado un QTL muy significativo para grasa intramuscular en SSC7 que coincide con los descritos en trabajos previos (p.e. en Sánchez et al. 2007). También resulta de interés destacar el QTL significativo a nivel genómico para colesterol muscular (SSC6), puesto que este carácter ha sido muy poco estudiado en porcino pero podría ser de gran interés para obtener una carne más saludable.

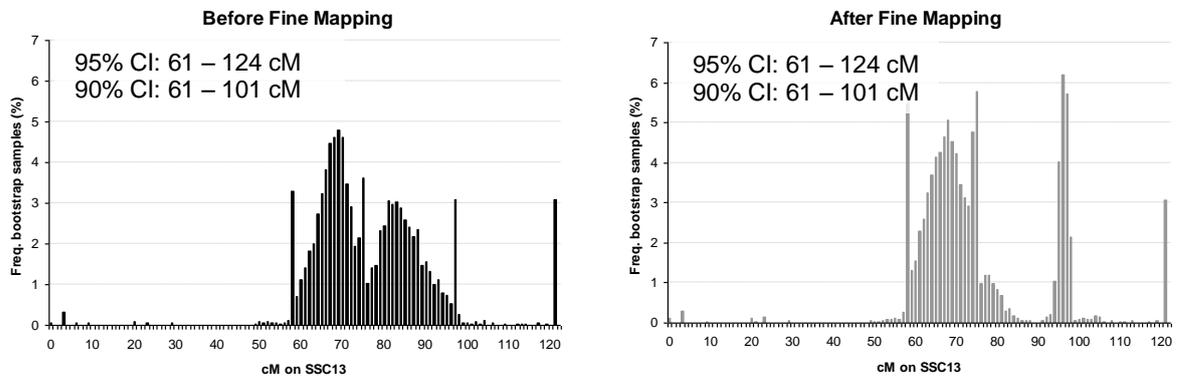
QTL for TG190 (SSC 4)



QTL for HDL45 (SSC13)



QTL for LDL190 (SSC13)



* Position 0 cM in the first map corresponds to position 23 cM in the map after fine mapping

Figura 1.6. Intervalo de confianza de los QTL para lípidos séricos (ver Tabla 1.8) antes y después de la realización de un cartografiado fino.

Tabla 1.9A. Barrido genómico (análisis intra-familiar) para el porcentaje de grasa intramuscular (IMF), colesterol muscular y composición de ácidos grasos en la población Duroc objeto de estudio (músculo *gluteus medius*).

SSC	Carácter ¹	Familia	Posición	F-ratio ²	Signif. (P)	Efecto medio (% , SD)
1	IMF _{covLW}	4	63cM	10.10+	0.0022	-1.553 (0.489)
3	IMF _{covLW}	3	28cM	12.90*	0.0006	2.035 (0.567)
	IMF _{covBFT}	3	15cM	12.64*	0.0007	1.721 (0.484)
	Vaccénico	2	15cM	12.95*	0.0005	0.207 (0.058)
5	Mirístico	4	94cM	13.98*	0.0004	0.346 (0.092)
6	IMF _{covBFT}	1	92cM	11.70+	0.0014	2.653 (0.776)
7	IMF _{covLW}	1	133cM	16.11**	0.0002	-2.750 (0.685)
	IMF _{covBFT}	1	133cM	16.48**	0.0002	-2.798 (0.689)
	Vaccénico	3	81cM	17.60**	0.0001	0.250 (0.060)
13	Esteárico	5	73cM	11.82+	0.0011	-0.758 (0.220)
18	Palmítico	3	39cM	15.67**	0.0002	0.912 (0.230)
	SFA	3	40cM	14.46*	0.0004	1.302 (0.342)

¹ Covariables peso (LW) y espesor del tocino dorsal (BFT)

²* $P < 0.05$ a nivel genómico; ** $P < 0.01$ a nivel genómico; + $P < 0.01$ a nivel cromosómico.

Tabla 1.9B. Barrido genómico (análisis intra-familiar) para el porcentaje de grasa intramuscular (IMF), colesterol muscular y composición de ácidos grasos en la población Duroc objeto de estudio (músculo *longissimus dorsi*).

SSC	Carácter ¹	Familia	Posición	F-ratio ²	Signif. (P)	Efecto medio (% , SD)
1	IMF _{covLW}	4	66 cM	13.31*	0.0005	-1.025 (0.281)
3	IMF _{covLW}	2	33 cM	11.57+	0.0010	-1.123 (0.330)
	IMF _{covBFT}	2	53 cM	10.24+	0.0019	-1.149 (0.359)
	IMF _{covBFT}	5	85cM	10.73+	0.0018	-1.227 (0.374)
6	Colesterol	2	35cM	16.57**	0.0001	14.063 (3.455)
	Vaccénico	2	95cM	14.56*	0.0003	-0.275 (0.072)
7	Vaccénico	2	75cM	11.19+	0.0012	0.230 (0.069)
11	Colesterol	5	71cM	11.25+	0.0014	-10.020 (2.987)
12	SFA	4	74cM	13.31*	0.0005	-1.534 (0.421)
13	Esteárico	5	56cM	11.76+	0.0011	-1.028 (0.300)
14	Colesterol	4	40cM	11.42+	0.0012	13.095 (3.874)
	Vaccénico	2	68cM	11.24+	0.0012	0.410 (0.122)
	Esteárico	5	85cM	12.28*	0.0009	-1.110 (0.317)
16	Mirístico	1	18cM	11.24+	0.0017	0.185 (0.055)
	Mirístico	3	43cM	11.48+	0.0012	-0.178 (0.053)

¹ Covariables peso (LW) y espesor del tocino dorsal (BFT)

²* $P < 0.05$ a nivel genómico; ** $P < 0.01$ a nivel genómico; + $P < 0.01$ a nivel cromosómico.

1.7 Genes candidatos

El fin último de los estudios de QTL es identificar las mutaciones causales que explican su segregación en las poblaciones objeto de estudio (Georges 2007). Una estrategia posible para alcanzar esta finalidad consiste en caracterizar el polimorfismo de los genes candidatos que se hallen en el intervalo de confianza de los QTL

detectados y realizar análisis de asociación y funcionales (Georges 2007). Según Ron y Weller (2007) un gen para ser considerado como candidato a contener la mutación causal debe cumplir una serie de condiciones:

- El gen debe tener una función fisiológica relacionada con el fenotipo de interés. Asimismo, debe existir evidencias funcionales previas, p.e. experimentos con ratones *knockout*, que indiquen que el gen verdaderamente tiene un efecto detectable sobre el fenotipo bajo estudio.
- El gen debe estar preferentemente expresado en órganos o tejidos relacionados con el carácter que se pretende analizar.
- El gen debe estar contenido en el intervalo de confianza del QTL.

Atendiendo a estos aspectos, los genes candidatos pueden ser funcionales, posicionales o bien pertenecer a ambas categorías a la vez. Los polimorfismos con efectos fenotípicos pueden, a su vez, ser de tipos muy distintos. En principio puede distinguirse a aquellos que afectan a la estructura proteica y que, por ejemplo, implican un cambio de aminoácido (ya sea conservativo o no-conservativo) o bien aquellos que inactivan la función proteica provocando la aparición de un codón prematuro de la traducción. Otros polimorfismos, en cambio, pueden afectar la expresión génica pudiendo estar localizados a nivel de promotor, intrones o región 3'UTR (Georges 2007). Atendiendo al tipo de polimorfismos, también pueden considerarse diversas categorías. Los más abundantes consisten en mutaciones puntuales (Ibeagha-Awemu et al. 2008), es decir la sustitución de una base por otra, y reciben el nombre de SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Otros tipos de polimorfismos serían los indels (inserciones/delecciones), los microsatélites, las inserciones de retrotransposones, las variaciones en el número de copias (*copy number variation* o CNV) y las reordenaciones cromosómicas (Ibeagha-Awemu et al. 2008). En la Tabla 1.10 se detallan distintos polimorfismos que presentan asociaciones significativas con caracteres de interés productivo en ganado porcino (información basada en el trabajo de Ibeagha-Awemu et al. 2008). Desde luego, dicha descripción no pretende ser exhaustiva.

Tabla 1.10. Polimorfismos que presentan asociaciones significativas con caracteres de interés productivo en el ganado porcino (basado en Ibeagha-Awemu et al. 2008).

Gen (acrónimo)	Variante	Carácter	Referencia
<i>ACACA</i>	c.5634T>C c.6681G>T	Composición ácidos grasos	Muñoz et al. (2007) Gallardo et al. (2009)
<i>CA3</i>	c.1156 A>G	Color y pH de la carne	Wimmers et al. (2007)
<i>CAST</i>	Arg249Lys Ser638Arg	Textura y jugosidad de la carne	Ciobanu et al. (2004)
<i>CCKAR</i>	g.179 A>G	Consumo de pienso	Houston et al. (2008)
<i>CLPS</i>	Ddel RFLP	Calidad de la carne y la canal	Jankowiak et al. (2005)
<i>IGF2</i>	g.3072 G>A	Crecimiento muscular	Van Laere et al. (2003)
<i>FABP4</i>	Microsatélite intrónico Indel intrón 1	Porcentaje de grasa intramuscular Espesor del tocino dorsal	Gerbens et al. (1998) Mercadé et al. (2006)
<i>FABP5</i>	g.3000 G>T	Espesor del tocino dorsal	Estellé et al. (2006)
<i>GIP</i>	c.77A>G (Asp26Gly) c. 394A>C (Met132Leu)	Composición ácidos grasos	Muñoz et al. (2007)
<i>LEP</i>	c.3469 C>T	Crecimiento y engrasamiento	Urban et al. (2002)
<i>LEPR</i>	c. 2002 C>T (Leu663Phe)	Espesor del tocino dorsal	Muñoz et al. (2009)
<i>MC4R</i>	Asp298Asn	Crecimiento, engrasamiento, consumo de pienso	Kim et al. (2000) Jokubka et al. (2006)
<i>MYPN</i>	c. 318 T>C	Porcentaje de magro	Wimmers et al. (2007)
<i>PRKAG3</i>	R200Q	Glucógeno muscular	Milan et al. (2000)
<i>RYR1</i>	c. 1843C>T (Arg61Cys)	Porcentaje de magro Calidad de la carne	Fujii et al. (1991)
<i>TTN</i>	c.137 C>T	Color de la carne, pH, conductividad	Wimmers et al. (2007)

Un hito importante en la caracterización a gran escala de la variabilidad genética porcina lo constituirá, sin lugar a dudas, la secuenciación del genoma de esta especie, tarea que todavía está en curso. Ello permitiría conocer el contenido génico de las regiones que contienen QTL (por el momento se realizan extrapolaciones de humano a porcino) y asimismo resultaría clave en la identificación de un gran número de polimorfismos (Chen et al. 2007). En este sentido cabe destacar el proyecto de secuenciación Chino-Danés (Wernersson et al. 2005), que generó millones de secuencias de individuos de distintas razas (Duroc, Erhualian, Hampshire, Landrace y Yorkshire) permitiendo identificar múltiples SNP. La caracterización de millones de polimorfismos en especies domésticas y la puesta a punto de métodos de genotipado a gran escala permite, por primera vez, considerar a la selección genómica como una alternativa realista (o al menos como una fuente complementaria de información) a la selección tradicional basada en la estimación del valor mejorante mediante técnicas BLUP. La estrategia de la selección genómica está basada en la estimación del valor mejorante genómico de un individuo que, a su vez, integra los efectos alélicos de millares de SNP distribuidos uniformemente en su genoma (Hayes et al. 2009). Un aspecto crítico consiste, evidentemente, en calcular dichos efectos alélicos, tarea que suele realizarse en una población de referencia (Hayes et al. 2009). La selección genómica presenta una ventaja importante respecto a la tradicional puesto que el genotipo del marcador se puede determinar justo al nacimiento del animal, sin tener que esperar a disponer de los registros fenotípicos del mismo o de sus descendientes, lo cual acorta el intervalo generacional (Haley y Visscher 1998). Por otro lado, este método es especialmente útil en aquellos caracteres en los que el progreso genético es complicado de obtener por métodos tradicionales debido a que poseen una baja heredabilidad, son caros de medir o bien a que sólo son medibles en un sexo, después del sacrificio del animal o cuando el animal tiene una edad avanzada. En estos caracteres se puede conseguir un incremento de la respuesta del 38-64% respecto a los métodos de selección tradicionales (Meuwissen y Goddard, 1996). Finalmente, el uso de BLUP y MAS conjuntamente permiten un beneficio genético adicional de más del 50% (Rothschild y Plastow, 1999; Paszek et al. 1999). Para una revisión muy completa sobre las ventajas e inconvenientes de la selección genómica puede consultarse el excelente artículo de Hayes et al. (2009). Por el momento, este tipo de aproximación se halla en un estado relativamente preliminar en el ganado porcino, aunque ya se dispone de herramientas para realizar genotipados a gran escala en esta especie, lo cual permite aventurar que se realizarán avances importantes en los próximos años (Ramos et al. 2009).

Tal como se ha comentado anteriormente, el barrido genómico para lípidos séricos en una población comercial Duroc permitió identificar dos QTL de interés localizados en los cromosomas 4 y 13. Posteriormente, Gallardo et al. (2009) abordaron el refinamiento de la posición de ambos QTL y elaboraron una lista de posibles genes candidatos (Tabla 1.11). En la presente tesis se ha abordado el análisis de los genes de la apolipoproteína D (*APOD*), *low density lipoprotein receptor-related protein 12 (LRP12)* y *tribbles 1 (TRIB1)* por lo que a continuación pasarán a describirse con más detalle.

Tabla 1.11. Lista de genes candidatos localizados en los intervalos de confianza de los QTL de los cromosomas 4 (niveles de triglicéridos séricos a los 190 días de edad) y 13 (HDL y LDL a los 45 y 190 días de edad, respectivamente). Fuente: Gallardo et al. (2008).

QTL	Gen candidato	Posición (humano)	Referencia
TG 190 días (SSC4)	Fatty acid binding protein 4 (<i>FABP4</i>)	8q21	Prinsen et al. 1997
	Fatty acid binding protein 5 (<i>FABP5</i>)	8q21	Szczerbal et al. 2007
	Low density lipoprotein receptor-related protein 12 (<i>LRP12</i>)	8q22.2-q23.1	Wang et al. 2007
	2,4-dienoyl-CoA reductase 1 (<i>DECR1</i>)	8q21.3	Amills et al. 2005
	Tribbles homolog 1 (<i>TRIB1</i>)	8q24	Kathiresan et al. 2008
HDL 45 días (SSC13)	Apolipoprotein D (<i>APOD</i>)	3q26.2-qter	Desai et al. 2002 Imperatore et al. 2000
	UDP-Gal:beta-GlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase (<i>B4GALT4</i>)	3q13	Willer et al. 2008
	Phospholipase A1 member A (<i>PLA1A</i>)	3q13.13-q13.2	Wang et al. 2002
	Adiponectin (<i>ADIPOQ</i>)	3q27	Berthier et al. 2005
LDL 190 días (SSC13)	Lipase, member I (<i>LIP1</i>)	21q11.2	Wen et al. 2003

1.7.1 Apolipoproteína D (*APOD*)

La apolipoproteína D (*APOD*) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las lipocalinas, las cuales están especializadas en el transporte de pequeñas moléculas hidrófobas (Drayna et al., 1986; Peitsch and Boguski, 1990). La *APOD* es un heterodímero de 29 Kda, de expresión ubicua, siendo ésta particularmente alta en el bazo, los testículos y el cerebro (Rassart et al. 2000). Inicialmente fue clasificada como un componente de las lipoproteínas de alta densidad (Mc Conathy et al., 1973) que participan en el transporte de colesterol. Existen evidencias, sin embargo, de que la *APOD* podría ser una proteína multiligando y multifuncional, importante en la fisiología celular y de función variable según el lugar de síntesis. Aparte del colesterol, se ha propuesto que la *APOD* podría unirse a la bilirrubina, esteroides y ácido araquidónico (Rassart et al. 2000). A nivel sistémico y en asociación con la lecitina colesterol acetiltransferasa (*LCAT*), la *APOD* forma un complejo que actúa de forma activa retirando colesterol de los tejidos periféricos y transportándolo hasta el hígado para su catabolismo (Glomset et al. 1973). En este sentido, el colesterol de los tejidos periféricos es transferido a las partículas HDL, esterificado mediante la acción del enzima *LCAT* e incorporado en el núcleo de la HDL (Rassart et al. 2000). En la especie humana el gen *APOD* ha sido secuenciado en su totalidad y mapeado en el cromosoma 3q26.2qter (Strausberg et al. 2002). Dicho gen posee cinco exones y codifica una proteína de 189 aminoácidos (Ensembl). En el gen *APOD* humano se han detectado tres sustituciones no sinónimas que presentan asociaciones con distintos parámetros relacionados con el metabolismo lipídico (Desai et al. 2002). En el caso del porcino, se ha publicado distintas secuencias parciales del gen *APOD* aunque hasta la fecha no se ha identificado ningún polimorfismo. Recientemente se ha descrito una expresión diferencial de este gen en cerdos tratados con clenbuterol respecto a los individuos control (Zhang et al. 2007).

1.7.2 El gen Tribbles 1, *Drosophila* homolog (*TRIB1*)

El gen *TRIB1* pertenece a la familia génica Tribbles, que codifica una serie de moléculas con distintas funciones biológicas. En *Drosophila*, las moléculas Tribbles regulan distintos estadios del desarrollo embrionario (Hegedus et al. 2006). En mamíferos, se ha descrito la existencia de tres moléculas Tribbles (*TRIB1*, *TRIB2* y *TRIB3*), que juegan un importante papel en distintas rutas de señalización reguladas por proteinquinas activadas por mitógenos (*MAPK*) (Hegedus et al. 2006). El gen *TRIB1* humano se encuentra localizado en el cromosoma 8q24.13 (Wilkin et al. 1997,

Hegedus et al. 2006), posee tres exones y codifica una proteína de 372 aminoácidos (base de datos Ensembl). La secuencia y el polimorfismo del gen *TRIB1* porcino no se ha descrito hasta la fecha. En general, las moléculas Tribbles regulan la actividad de distintas quinasas de MAPK, es decir de proteínas que fosforilan a las MAPK (MAPKK). El gen *TRIB1* humano está sobre-expresado en arterias con lesiones ateroscleróticas (Sung et al. 2007). La principal evidencia de que este gen podría estar implicado en el metabolismo lipídico procede de la realización de estudios de asociación en los que un SNP localizado en el gen *TRIB1* presenta fuertes asociaciones con la concentración de triglicéridos y efectos significativos sobre las concentraciones de LDL y HDL (Kathiresan et al. 2008, Willer et al. 2008). El alelo minoritario G del citado SNP está asociado a mayores niveles de HDL y a una reducción del colesterol y LDL (Kathiresan et al. 2008). Por otra parte, se sabe que la molécula *TRIB3* estimula la inactivación de la enzima acetil-coenzima A carboxilasa α a nivel del tejido adiposo como consecuencia del ayuno (Qi et al. 2006). Ratones transgénicos que sobre-expresan el gen *TRIB3* muestran un menor engrasamiento que los individuos control cuando se les suministra una dieta rica en grasas (Qi et al. 2006) probablemente debido a que tienen una mayor tasa de β -oxidación de ácidos grasos y un incremento del gasto energético.

1.7.3 Low density lipoprotein receptor-related protein 12 (*LRP12*)

La molécula *LRP12* (también llamada ST7) es un miembro de la familia de proteínas relacionadas con los receptores de moléculas LDL (*LRP*, Figura 1.7) (Blacklow et al. 2007). El gen *LRP12* fue caracterizado por primera vez por Qing et al. (1999), quienes determinaron que está localizado en el cromosoma humano 8q22 y que codifica una proteína de 859 aminoácidos. La región codificante está constituida por cuatro exones (Ensembl). Prácticamente no se sabe nada acerca de la función de la molécula *LRP12* (ni siquiera en organismos modelo), aunque existen evidencias de que podría estar implicada en fenómenos de endocitosis y transducción de señales (Battle et al. 2003). En porcino, se ha descrito una secuencia de 4 kb correspondiente al gen *LRP12* que procede de un análisis automatizado del genoma porcino mediante el programa Gnomon (un programa de predicción génica).

Por lo general, se asume que los miembros de la familia *LRP* tienen múltiples funciones biológicas (Takayama et al. 2005). Por ejemplo, la molécula *LRP1* participa junto con el receptor de LDL en la captación de remanentes de quilomicron ricos en colesterol (Takayama et al. 2005) tal como se indica en la Figura 1.8, sin embargo se ha descrito hasta 30 tipos de ligandos distintos para *LRP1* que incluyen proteinasas

(p.e. serinoproteinasas y metaloproteinasas), complejos inhibidores de proteinasas (p.e. inhibidores de serinoproteinasas), factores de coagulación y toxinas bacterianas (Herz y Strickland 2001). Paradójicamente, la deficiencia, a nivel hepático, de LRP1 está asociada a una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos y a una mayor susceptibilidad a sufrir aterosclerosis (Espirito Santo et al. 2004).

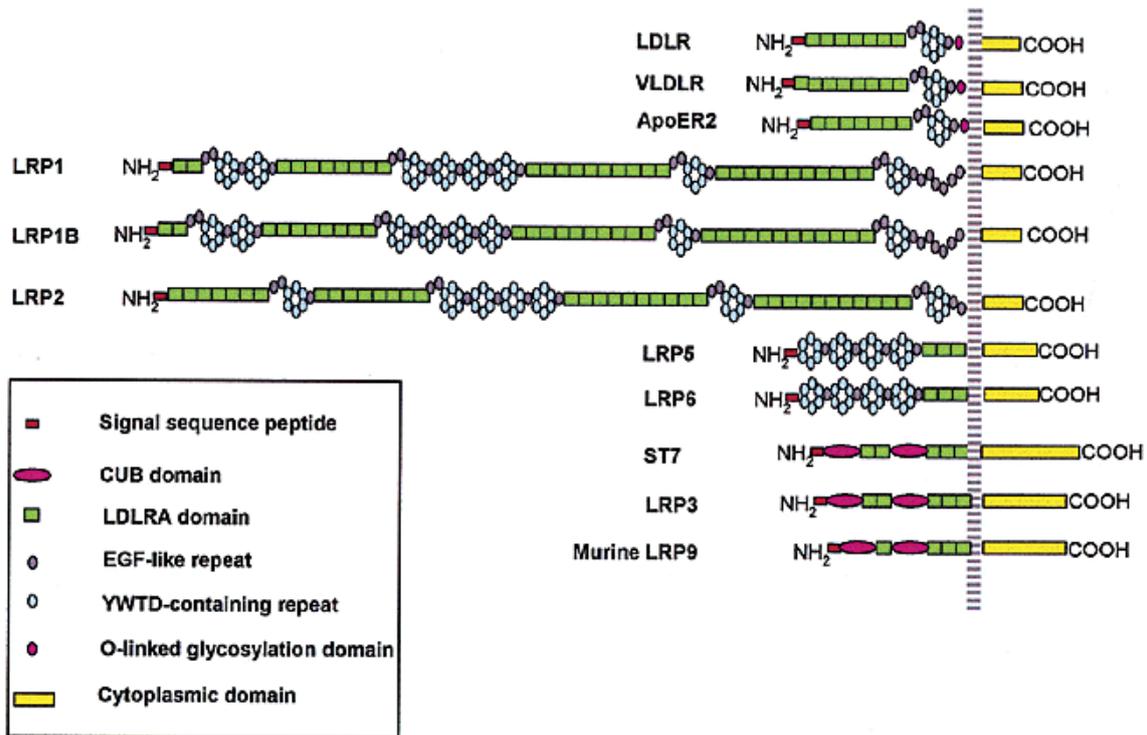


Figura 1.7. La familia LRP está formada por un conjunto de moléculas que comparten distintos dominios estructurales y están implicadas en fenómenos de endocitosis y transducción de señales. La molécula indicada como ST7 en realidad corresponde a LRP12.

Hofmann y colaboradores (2007) produjeron ratones en los que el gen *LRP1* se hallaba inactivado a nivel del tejido adiposo y observaron que dichos ratones presentaban un retraso en la eliminación post-prandial de lípidos, un menor peso y engrasamiento, una mayor resistencia a la obesidad inducida por la dieta y un elevado gasto energético. En este sentido, Hofman y colaboradores concluyeron que LRP1 ejerce un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética del adipocito.

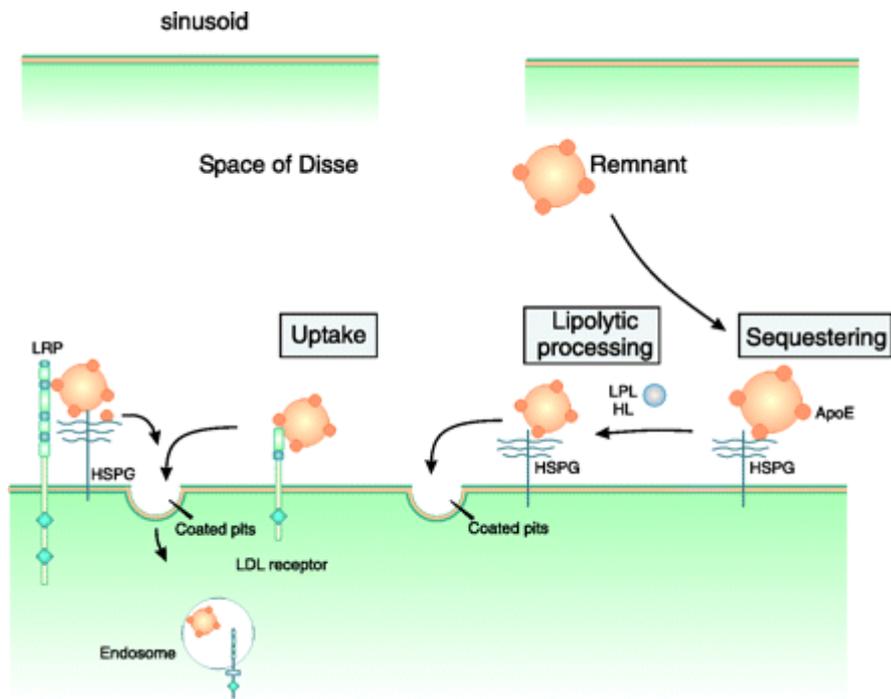


Figura 1.8. Modelo propuesto para explicar el papel de LRP1 en el metabolismo de los remanentes de quilomicron (Lillis et al. 2008). Dichos remanentes son inicialmente captados, a nivel hepático, por la asociación de la apolipoproteína E (que forma parte de los remanentes) con heparan-sulfato proteoglicanos (HSPG). Los citados remanentes son posteriormente procesados a través de la acción de la lipoproteína lipasa y la lipasa hepática. La internalización de los remanentes de quilomicrones por los hepatocitos se halla mediada por los heparan-sulfato proteoglicanos, el receptor de LDL o bien complejos formados por LRP1 y heparan-sulfato proteoglicanos.

En cuanto al gen *LRP2*, se sabe que codifica un receptor que, de forma similar a LRP1, posee la capacidad de unirse a múltiples ligandos como p.e LDL, VLDL, apolipoproteínas H y J, vitaminas A, B12, D y esteroides (May et al. 2009). Otros miembros relevantes de esta familia son LRP5 y LRP6 que forman parte de la ruta de señalización WNT, la cual juega un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Jin 2008). De este modo, ratones deficientes en LRP5 alimentados con una dieta alta en grasas presentan una elevación de los niveles de colesterol plasmático (Jin 2008). En definitiva, los distintos miembros de la familia LRP tienen efectos a nivel del metabolismo lipídico aunque los mismos se producen a través de diferentes mecanismos relacionados con la endocitosis y la transducción de señales.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo forma parte del proyecto *Mapeo e identificación de genes implicados en el metabolismo lipídico en porcino, la calidad de carne y la calidad de jamón curado* (AGL2007-66707-C02-02), cuya finalidad general consiste en analizar la arquitectura genética de diversos caracteres de interés productivo en una población comercial Duroc. El aspecto más relevante de este trabajo consiste precisamente en el análisis genético de diversos parámetros bioquímicos vinculados con el metabolismo de lípidos. Así, los objetivos específicos son los siguientes:

1. Caracterizar la secuencia y la variabilidad genética de tres genes candidatos (apolipoproteína D, low-density lipoprotein receptor-related 12 protein y tribbles 1) cuya posición coincide con dos quantitative trait loci para la concentración de triglicéridos a los 190 días (SSC4: *LRP12* y *TRIB1*) y para las concentraciones de HDL y LDL a 45 y 190 días, respectivamente (SSC13: *APOD*) .
2. Para aquellos genes que resulten ser polimórficos, se plantea la realización de análisis de asociación con caracteres vinculados a las concentraciones séricas de lípidos y el porcentaje y la composición de la grasa intramuscular en una población comercial de cerdos Duroc.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material animal y caracteres fenotípicos

El material animal empleado en el presente experimento ha sido proporcionado por la empresa Selección Batallé S.A., y consiste en una población comercial de cerdos de la raza Duroc (Gallardo, *et al.* 2008). La generación parental G_0 está constituida por 5 machos y aproximadamente 400 hembras, mientras que la generación G_1 incluye 350 machos castrados (Figura 3.1)

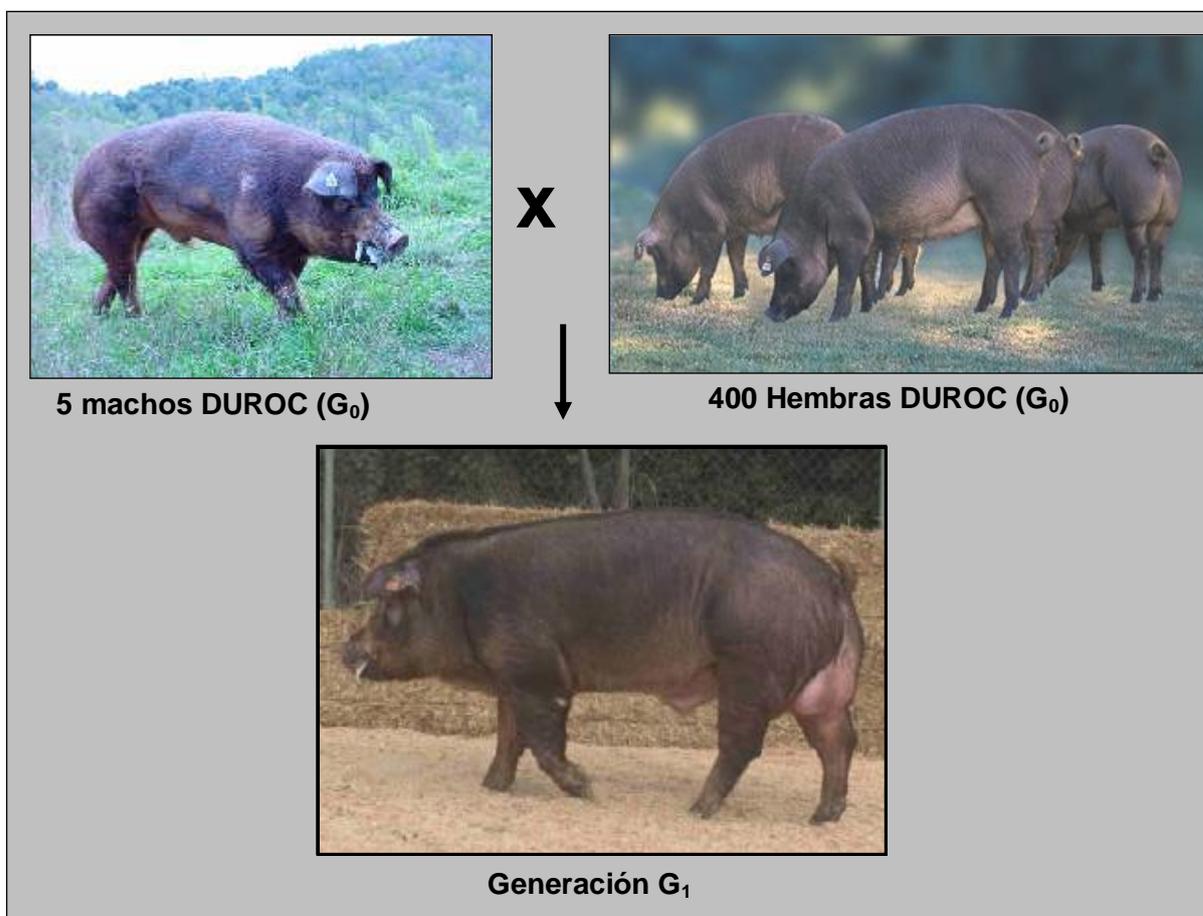


Figura 3.1 Representación esquemática de la generación del material animal. La generación G_1 incluye 350 machos castrados controlados en CCP-IRTA. Dichos individuos se distribuyen en 5 familias de medios hermanos a excepción de 45 cerdos que son hermanos completos.

Este diseño experimental que involucra el análisis de 5 familias de medios hermanos paternos y que, a su vez, son descendientes de un número muy elevado de

hembras se asemeja mucho al que tradicionalmente se lleva a cabo en los experimentos de detección de QTL en bovino lechero (Georges et al. 1995). Los machos heterocigotos para un QTL dan lugar a una descendencia con medias fenotípicas diferentes dependiendo del alelo paterno (Q o q) que hayan recibido, y la comparación de los haplotipos de los mismos para los marcadores asociados al carácter estudiado permite realizar un cartografiado preciso del QTL.

La raza Duroc tiene su origen en el este de Estados Unidos, desde donde se ha expandido a lo largo del mundo. Una característica de dicha raza es que existe una considerable variedad de capas, pudiendo ir desde un tono oro, casi amarillo muy ligero, a un rojo muy oscuro que se acerca a la caoba (Jones 1998). Esta raza se utiliza como base para actuar como macho finalizador en los programas de hibridación de razas precoces e ibérica (Jones 1998). Destaca por la buena calidad de su carne, debido a la elevada infiltración grasa de la misma, conservando unos ajustados índices de conversión. Es una raza con una perfecta adaptación a todos los medios, alta prolificidad, buena producción cárnica, y excelente respuesta a las exigencias de la producción intensiva. (Jones 1998).

El núcleo genético Duroc de la empresa Batallé está seleccionado fundamentalmente para la ganancia media diaria (peso relativo: 5%), el espesor del tocino dorsal (15%), el porcentaje de grasa intramuscular (20%), nacidos vivos (45%) y número de tetinas (15%). Hembras Duroc se cruzan con machos Landrace obteniendo individuos híbridos que son cruzados de nuevo para obtener el producto final destinado a matadero (<http://www.batalle.com/html/1a1.htm>).

El manejo de la población comercial Duroc empleada en el presente trabajo fue el siguiente: después del destete (3 a 4 semanas de edad) los cerdos fueron transferidos a la estación experimental IRTA-CCP y mantenidos en condiciones estándar. El peso y el espesor del tocino dorsal fueron medidos regularmente durante el periodo de cebo. Durante la primera etapa de cebo (90 kg de peso vivo, 150 días de edad) los cerdos fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar con la siguiente composición: 18% proteína, 3.8% fibra, 7.0% grasa, 1.0% lisina and 0.3% metionina. Durante los 30-40 días previos al sacrificio, los cerdos fueron alimentados *ad libitum* con una dieta ligeramente distinta: 15.9% proteína, 4.5% fibra, 5.2% grasa, 0.7% lisina y 0.2% metionina. El aporte energético de dichas dietas fue de 2450 y 2375 kcal/kg, respectivamente.

Se obtuvo muestras de sangre de los cerdos Duroc a la edad de 45 y 190 días aproximadamente. Se midieron las concentraciones séricas de colesterol, LDL, HDL y triglicéridos. La metodología empleada está ampliamente descrita en Gallardo et al. (2008). Con posterioridad al sacrificio (edad: 190 días aprox., peso vivo: 122 kg) se

procedió a medir las siguientes variables: peso de la canal, porcentaje de magro (medido con un equipo de ultrasonidos AutoFOM), espesor del tocino dorsal entre las costillas 3ª y 4ª, peso del jamón, y espesor de la grasa del jamón. Se tomaron muestras de 200 g de los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* para determinar distintas variables, en el Centro de Tecnología de la Carne, CTC-IRTA) relacionadas con la calidad de la carne y el porcentaje y la composición de los lípidos musculares. La metodología empleada está descrita en Gallardo et al. (2009). En las Tablas 3.1 y 3.2 se describen los registros fenotípicos obtenidos para distintos caracteres relacionados con el metabolismo lipídico en la población Duroc.

Tabla 3.1. Registros fenotípicos relacionados con el porcentaje y la composición de los lípidos musculares en la población comercial Duroc objeto de estudio (N = 321).

Carácter	Acrónimo	<i>Longissimus dorsi</i>		<i>Gluteus Medius</i>	
		Media	SD	Media	SD
(%) Grasa intramuscular	IMF	3.84	0.08	5.17	0.11
CHOL ¹ contenido (mg/g)	CHOLmusc	58.60	0.52	64.65	0.61
(%) Mirístico	C14:0	1.36	0.02	1.38	0.01
(%) Palmítico	C16:0	23.42	0.09	23.25	0.07
(%) Palmitoleico	C16:1	2.95	0.03	0.29	0.001
(%) Esteárico	C18:0	11.68	0.07	11.19	0.06
(%) Oleico	C18:1(n-9)	34.61	0.29	34.85	0.25
(%) Vaccénico	C18:1(n-7)	4.30	0.02	4.07	0.02
(%) Linoleico	C18:2	14.44	0.29	15.11	0.23
(%) Araquidónico	C20:4	3.62	0.10	3.25	0.09
(%) Omega 6	n-6	19.13	0.40	19.51	0.33
(%) Omega 3	n-3	0.92	0.02	1.11	0.02

CHOL: contenido de colesterol muscular

Tabla 3.2. Concentraciones de lípidos séricos en la población comercial Duroc objeto de estudio a la edad de 45 y 190 días (Gallardo et al. 2008).

Carácter	Media \pm SD (en mg/dL)	
	45 días (N = 333)	190 días (N = 335)
Colesterol	77.46 \pm 13.27	125.81 \pm 26.77
HDL	30.60 \pm 6.73	51.95 \pm 10.34
LDL	38.19 \pm 8.99	63.42 \pm 20.70
Triglicéridos	43.25 \pm 16.43	50.04 \pm 20.21

3.2. Caracterización molecular de genes candidatos para los QTL de los cromosomas 4 y 13

3.2.1 Extracción de RNA a partir de tejido muscular

Las extracciones de RNA se realizaron a partir de muestras de músculo estriado esquelético. Las muestras, mantenidas a -80 °C, se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero. A continuación se añadió el reactivo Trizol Reagent (Gibco BRL, Life Technologies) y se homogenizaron las muestras con un politrón. Posteriormente, se añadió cloroformo en una proporción de 200 μ l por ml de reactivo Trizol, se mezclaron ambos componentes con un vórtex y se mantuvo la extracción durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se sometió a centrifugación a 4 °C y 12.000 r.p.m. durante 15 minutos para conseguir la separación de las tres fases: fase orgánica que contiene las proteínas, interfase donde está contenido el ADN y la fase acuosa donde permanece el ARN. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml donde se añadió isopropanol, para la precipitación del ARN, en la proporción de 500 μ l por ml de reactivo. La reacción de precipitación se mantuvo toda la noche a -20 °C. Transcurrido ese periodo de tiempo, la mezcla se centrifugó a 4 °C y 12.000 r.p.m. durante 10 minutos, formándose un precipitado blanco de ARN en el fondo del tubo. Se eliminó el sobrenadante y el ARN se lavó con etanol frío al 75%, en la proporción de 1 ml por ml de reactivo utilizado. Se incubó dicha mezcla durante 4 h a -20 °C. A continuación se sometió a una centrifugación a 4 °C y 12000 r.p.m durante 5 minutos, se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet de RNA durante 5 minutos. Dicho pellet se rehidrató con 50 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Para medir la concentración y pureza del RNA se empleó un espectrofotómetro NANODROP ND-1000 (NanoDrop), tomando las medidas de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La relación de las medidas de A260/A280, indica la pureza de los ácidos nucleicos extraídos, considerándose que un cociente que oscila entre 1,8 y 2.0 denota un alto grado de pureza.

3.2.2. Síntesis de DNA complementario

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo mediante transcripción reversa (RT) con el kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen). Como molde se empleó 1-2 µg de RNA, combinándose con 1 µl oligo dT a 50 µM y 2 µl de una mezcla de nucleótidos (dNTP mix) a 10 mM, ajustando el volumen final a 12 µl con agua tratada con DEPC. Se realizó una incubación de dicha mezcla a 65 °C durante 15 minutos. Posteriormente se añadió: 4 µl de 5X cDNA Síntesis Buffer, 1 µl de ditiotritol 0.1 M, 1 µl de Rnasa out™ a 40 U/µl, 1 µl de agua tratada con DEPC y 1 µl de transcriptasa reversa ThermoScript™RT a 15 unidades /µl. La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un termociclador a 50 °C durante 60 minutos. Finalmente, la reacción RT se incubó a 85 °C durante 5 minutos. Se añadió 1 µl de RNAsa H y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. La reacción de síntesis se almacenó a -20 °C.

3.2.3. Optimización de las reacciones de amplificación

El diseño de los cebadores se llevó a cabo mediante el programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystem) empleando, en los casos en que no existiera una secuencia porcina, alineamientos de secuencias de distintos mamíferos para identificar regiones altamente conservadas. Las reacciones de PCR se pusieron a punto en un aparato de gradiente PTC-200 (MJ Research). Las PCR contenían 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de cada nucleótido (dNTP), 0.5 µM de cada cebador, 0.25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) y 2 µl de cDNA, en un volumen final de 25 µl. El perfil térmico fue de 94 °C durante 5 minutos, para la desnaturalización del cDNA molde, y 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, temperatura de hibridación durante otro minuto y, finalmente, una etapa de extensión de 72 °C durante 2 minutos. Finalmente se llevó a cabo una reacción de extensión final a 72 °C durante 10 minutos,

Todas las reacciones de amplificación se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa a distintas concentraciones (1.5-2.5%) en tampón TAE (*TRIS* 40 mM, *EDTA* 1 mM, pH7.7 y acetato), con voltajes de 100 a 120 voltios. La tinción de

ácidos nucleicos se hizo con el colorante *SYBR Green*, empleándose un transiluminador para la visualización de los mismos.

Tras la amplificación de las bandas esperadas se realizó la purificación de las mismas con el preparado comercial QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN). En el caso de la amplificación de más de una banda, se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), aislando y recortando la banda esperada del gel de agarosa con el uso de un transiluminador.

3.2.4. Protocolo de amplificación del gen de la apolipoproteína D (*APOD*) porcina

Los cebadores usados en la amplificación y secuenciación del gen *APOD* porcino se presentan en la Tabla 3.2. Para la reacción de amplificación se diseñaron los cebadores a partir de distintas regiones altamente conservadas en diversas especies de mamíferos (Bovino, GenBank [BC109863](#); humano, [BC007402](#); macaco [AB072021](#)). Además se diseñó un cebador “reverse” interno basándose en la secuencia porcina parcial obtenida con los cebadores *APOD-Fw* y *APOD-Rv* con el objeto de secuenciar toda la región codificante del gen *APOD*.

Tabla 3.2. Cebadores utilizados en la caracterización del gen *APOD* porcino.

Nombre	Secuencia Cebador
<i>APOD-Fw</i>	5'- TCT CCA GCC ACC CAG CCC-3'
<i>APOD-Rv</i>	5'- CAG CAG GTC AGC AGC AAG TTT ATT-3'
<i>APODRv_intern</i>	5'- TTT AGT GAG TAG TTG GCT TGG ATG-3'

Las condiciones de PCR fueron: 1 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0.2 μM de cada cebador, 1 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) y 2 μl de reacción RT en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico fue de 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 61 °C y 2 minutos a 72 °C. Finalmente se llevó a cabo una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

3.2.5. Protocolo de amplificación del gen Tribbles 1 (*TRIB1*) porcino

Los cebadores utilizados para la amplificación de la región codificante del gen *TRIB1* se presentan en la Tabla 3.3. Los cebadores fueron diseñados a partir de regiones conservadas de los genes ortólogos de humano (Ensembl;

[ENST00000311922](#)), bovino (GenBank: [BC147945](#)) y macaco (Ensembl; [ENSMUT0000030618](#)).

Las condiciones de amplificación fueron de 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.5 μM de cada cebador, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Ecogen) y 2 μl de reacción RT en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico fue distinto para cada uno de los fragmentos analizados:

- Fragmento 1: 94 °C-1 minuto, 60 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos.
- Fragmentos 2A, 2B, 4 y 5: 94 °C-1 minuto, 64 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos.
- Fragmento 3: 94 °C-1 minuto, 61 °C-1 minuto, 72 °C-2 minutos.

Tabla 3.3. Cebadores utilizados en la caracterización del gen *TRIB1* porcino

Nombre	Secuencia cebador
TRIB1_Fw1	5'- AACAAATAGCGGCGGCTGC-3'
TRIB1_Rv1	5'- ATTTTGTCTGGTAGTGTTTAATGGG-3'
TRIB1_Fw2A	5'- ATCGCCGACTACCTGCTG-3'
TRIB1_Rv2A	5'- TGGGGTCTGAGTCATGGAA-3'
TRIB1_Fw2B	5'- CTCGGGGGTGATGCTCTACA-3'
TRIB1_Rv2B	5'- AAGGGCCTGTCCATCTTTAG-3'
TRIB1_Fw3	5'- AGAGTACCAGGAGGACAGTGACATTA-3'
TRIB1_Rv3	5'- ACGTTCGGCTGGTAAGTG-3'
TRIB1_Fw4	5'- GGGCCAATAAACCTGCCATCTT-3'
TRIB1_Rv4	5'- GGGGCTTGCTATTTCACTCCAGA-3'
TRIB1_Fw5	5'- CAAGACCATCTCAGGGTGGA-3'
TRIB1_Rv5	5'- GCCTGTTTTTGTGCCATTTCT-3'

3.2.6. Protocolo de amplificación del gen low density lipoprotein receptor-related protein 12 (*LRP12*) porcina

Los cebadores usados en la amplificación y secuenciación del gen *LRP12* porcino se presentan en la Tabla 3.4. Para la reacción de amplificación se diseñaron los cebadores a partir de las regiones conservadas de los genes ortólogos de bovino ([ENSBTAT0000015304](#)), humano ([ENST00000276654](#)) y perro ([ENSCAFT00-000001048](#)), descritos en Ensembl: <http://www.ensembl.org/index.html>.

Tabla 3.4. Cebadores utilizados en la caracterización del gen *LRP12* porcino

Nombre	Secuencia Cebador
LRP12_Fw1	5'- CTC CTC CTC TCT CCC TCC ATC-3'
LRP12_Rv1	5'- ACA TAA TCA CCA TAA CCA GTA CCA TC-3'
LRP12_Fw2	5'- TTC TCC CAA TTA TCC AGA CTT TTA T-3'
LRP12_Rv2	5'- GGT GGA ATT AAA CCC TGA GC-3'
LRP12_Fw3	5'- GCT TTA TTC TCT GAG AAT GTT TGA A-3'
LRP12_Rv3	5'- GGT CTG GAG CAG TCA TTC AC-3'
LRP12_Fw4	5'- TGG GTA CGT TTT ACA TTA GGG C-3'
LRP12_Rv4	5'- GTT ACA AGA TGT ACT GGC AAA AGC-3'

Las condiciones de amplificación fueron 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.5 μM de cada cebador, 0.625 U de DNA polimerasa Taq Gold (Applied Biosystems) y 2 μl de reacción RT en un volumen final de 25 μl. La región amplificada del gen *LRP12* abarcó desde los exones 1 al 7.

El perfil térmico varió dependiendo de la región amplificada:

- Fragmento 1: 94 °C-30 segundos, 64°C-1 minuto, 72 °C-1.5 minutos.
- Fragmento 2: 94 °C-30 segundos, 59 °C-1 minuto, 72 °C-1.5 minutos.
- Fragmentos 3 y 4: 94 °C-30 segundos, 61 °C-1 minuto, 72 °C-1.5 minutos.

3.2.7. Protocolo de secuenciación del producto amplificado y análisis *in silico* de secuencias

Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La precipitación de las reacciones de secuenciación se hizo mediante una bomba al vacío en placas de Millipore de 96 pocillos (Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit) para eliminar restos de reactivos. Los productos de amplificación se analizaron en un aparato de electroforesis capilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems).

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de los fragmentos analizados, se procedió a la edición de las secuencias mediante el programa SeqScape v2.6 y al alineamiento de las mismas con el programa Multalin (Corpet, 1988). Dicha aproximación permitió identificar posiciones polimórficas. También se realizó la

búsqueda de dominios funcionales evaluando las secuencias aminoacídicas mediante el programa ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>)

3.2.8. Genotipado del gen *LRP12* porcino

El genotipado de los polimorfismos detectados en el gen *LRP12* porcino se realizó mediante la técnica de *primer-extension analysis* en la población comercial de la raza Duroc objeto de estudio. Esta técnica se basa en el uso de un cebador específico adyacente a la mutación causal. Se realiza una reacción de extensión con 4 dideoxinucleótidos marcados con distintos fluorocromos (Makridakis y Reichardt, 2001). Dependiendo del dideoxinucleótido, incorporado, se observará un pico con una u otra fluorescencia tal como se indica en las Figuras 3.2 y 3.3

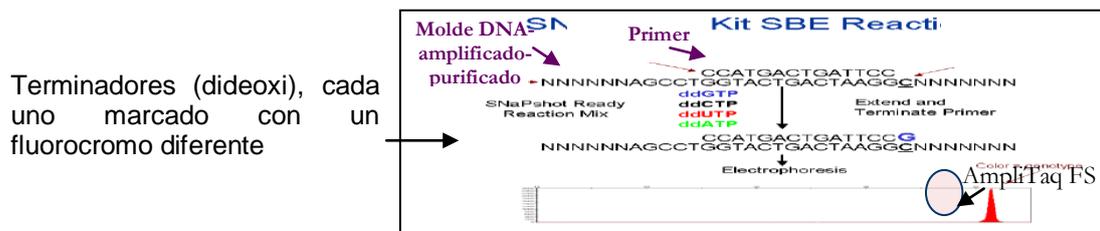


Figura 3.2. Reacción de primer extension análisis: se observa la incorporación de una T, que en el electroferograma se visualizará como un pico de color rojo

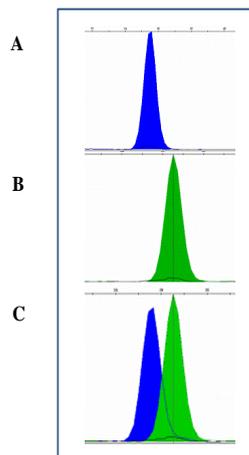


Figura 3.3. Electroferograma correspondiente a una reacción de *primer-extension analysis*. (A) Genotipo GG, (B) Genotipo AA, (C) Genotipo AG.

Los cebadores empleados en la amplificación (Fw: *forward*, RV: *reverse*) y genotipado (INT) de las regiones polimórficas se detallan en la Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Cebadores utilizados para el genotipado de los polimorfismos SNP771 (Ex4) y SNP1101 (Ex5) del gen *LRP12* porcino.

Nombre	Secuencia Cebador
LRP12_Ex4_Fw1	5'-GTGTCTGTCCCGGTTTACCAA -3'
LRP12_Ex4_RV1	5'- AATACTTTAACCACTGCCACACG-3'
LRP12_Ex4_INT1	5'- GACTGACTGACTCCACTGCCACACGT-3'
LRP12_Ex5_Fw1	5'- ATGCTGCCCGGGATTTAAT-3'
LRP12_Ex5_RV1	5'- CCATTTGGGCAATGCCAATAC-3'
LRP12_Ex5_INT1	5'- GACTGACTGACTCCGGGGATTTAATGC-3'

3.2.9. Análisis de asociación preliminar con los fenotipos estudiados

El análisis preliminar de asociación entre los genotipos para los polimorfismos detectados y los fenotipos de interés se realizó en el Àrea de Genètica i Millora del IRTA de Lleida considerando el siguiente modelo lineal:

$$y_{ijk} = \mu + l_i + \beta cov_{ijk} + g_j + e_{ijk}$$

donde:

y_{ijk} es el fenotipo del animal j (perteneciente al lote i y con el genotipo j) para los distintos caracteres analizados (concentración sérica de colesterol, lipoproteínas y triglicéridos; distintas medidas de espesor de la grasa subcutánea; contenido y perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular)

l_i es el efecto del lote de engorde i (4 niveles);

cov_{ijk} es el efecto de una covariable que varió en función del carácter analizado: grasa dorsal, peso vivo o edad para la concentración sérica de lípidos y el contenido en grasa intramuscular, y porcentaje de grasa intramuscular para el perfil de ácidos grasos en músculo;

β es el correspondiente coeficiente de regresión sobre la covariable;

g_j es el efecto del genotipo para cada uno de los polimorfismos sobre el fenotipo analizado (tres niveles: los dos homocigotos y heterocigotos);

e_{ijk} es el efecto residual del modelo.

Las soluciones de los distintos efectos considerados en el modelo se obtuvieron por mínimos cuadrados generalizados, y la asociación entre los fenotipos y los polimorfismos detectados se testó mediante la comparación entre las medias mínimo-cuadráticas (LSmeans) para los tres genotipos. El análisis estadístico se ha realizado utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización molecular del gen *APOD* porcino.

Se amplificó un fragmento de 794 pb correspondiente a la totalidad del cDNA del gen *APOD* porcino (Figura 4.1), que fue secuenciado en 8 individuos con genotipos alternativos (4 han recibido el alelo Q del padre, y los otros 4 han recibido el q) para el QTL HDL45 del cromosoma 13. El alineamiento de dichas secuencias mediante el programa Multalin permitió obtener una secuencia consenso que fue comparada mediante el programa BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con las secuencias de genes ortólogos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Identidad nucleotídica entre secuencias ortólogas de mamíferos y el gen *APOD* porcino.

Especie	Nº de acceso	Identidad nucleotídica (%)
<i>Sus scrofa</i>	XM_001926063	98
<i>Cervus elaphus</i>	DQ239921	93
<i>Bos taurus</i>	NM_001076301	92
<i>Homo sapiens</i>	NM_001647	85

El análisis de la secuencia aminoacídica mediante el programa Scan Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>) reveló la existencia de un dominio funcional lipocalina (Figura 4.1). Este dominio es característico de proteínas transportadoras de pequeñas moléculas hidrofóbicas como esteroides, retinoides y lípidos (Flower et al. 1993). Al hacer la comparación de la secuencia aminoacídica *APOD* porcina con las secuencias ortólogas de otras especies mediante el programa BlastP se observó que las secuencias con una mayor similitud correspondían a las de *Cervus elaphus* (ABB77207, 97% de similitud), *Bos taurus* (NP_001069769, 97%) y *Equus caballus* (XP_001500887, 96%). Las secuencias de *Rattus norvegicus* (EDM11470, 88%) y *Homo sapiens* (NP_001638, 89%) poseían una similitud bastante menor, lo cual es esperable ya que se trata de especies más alejadas desde un punto de vista filogenético. A la luz de estos datos, resulta hasta cierto punto sorprendente que la secuencia porcina publicada en julio de 2008 (XP_001926098) sólo poseyera una similitud del 93% con la descrita en el presente trabajo. Ello probablemente se deba a que la secuencia aminoacídica XP_001926098 se ha obtenido a partir de una secuencia genómica, que puede tener una mayor o menor calidad, mediante el

software de predicción génica Gnomon. En nuestro caso, la secuencia LRP12 obtenida es fruto del alineamiento de múltiples secuencias individuales por lo cual resulta muy fiable.

70

MVPTLLLLPALAGLLGVAEGQAFHLGKCPNPPVQENFDVNKYLGRWYEIEKIPVSFEKGSQIANYSLKE

140

NGNIKVINKELRADGTVNQIEGEATPDNITEPAKLGVKFFWLMPASAPYWVVLATDYENYALVYSCTTIIWL

190

FHLDHVWILGRNPYLPPETVTVTYLKDILTSNDIDIEKMTITDQVNCPEYLQ

Figura 4.1. Secuencia aminoacídica del gen *APOD* porcino, el dominio funcional lipocalina se indica con un recuadro negro. La cruz indica un residuo glicina altamente conservado en la familia de las lipocalinas.

Las lipocalinas son proteínas transportadoras de moléculas hidrófobas y tienen un rango de funciones muy variado (Flower et al. 2000). Asimismo, el nivel de similitud global entre las lipocalinas es, por lo general, muy bajo, a veces incluso inferior al 20%, sin embargo comparten determinados motivos estructurales como el que se indica en las Figuras 4.1 y 4.2 (Flower et al. 2000). Cabe destacar la existencia de un residuo glicina altamente conservado en lipocalinas tan distintas como la lactoglobulina bovina, la avidina de pollo y la proteína Blc de *E. coli* (Flower et al. 2000).

Sus-APOD	NFDVNKYLGRWYEI
Homo-APOD	NFDVNKYLGRWYEI
Pan-APOD	NFDVNKYLGRWYEI
Cervus-APOD	NFDVNKYLGRWYEI
Bos-APOD	NFDVNKYLGRWYEI
Mus-APOD	NFDVKKYLGRWYEI
Salmonella-BLC	NFDAKRYLGTWYEI
Anoplopoma-APOD	DFNLQQYQGKWEI

Figura 4.2. Alineamiento del dominio lipocalina de la proteína *APOD* de cerdo (*Sus scrofa*), humano (*Homo sapiens*), vaca (*Bos taurus*), ratón (*Mus musculus*), chimpancé (*Pan troglodytes*), ciervo (*Cervus elaphus*) y bacalao negro (*Anoplopoma fimbria*), y de la lipoproteína Blc putativa de *Salmonella typhimurium*.

En humano se ha descrito cuatro isoformas del gen *APOD* (APOD-001, -003, -004 y -005), tal como puede verse en la Figura 4.3 (para una descripción detallada de las mismas consultar la base de datos Ensembl). De éstas, la isoforma APOD-003 no da lugar a una proteína funcional ya que se produce un desplazamiento del marco de

lectura. La isoforma que presenta una mayor similitud (al menos en cuanto a longitud) respecto a la secuencia *APOD* porcina (apod-pig) es APOD-001.

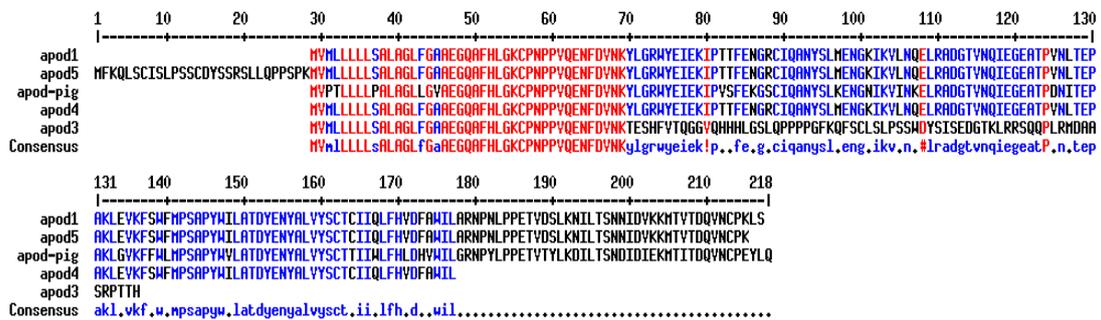


Figura 4.3. Alineamiento de la secuencia *APOD* porcina y las cuatro isoformas *APOD* descritas en la especie humana

Al proceder con el alineamiento de las secuencias obtenidas en los 8 cerdos Duroc no se encontraron posiciones polimórficas. Ello probablemente se deba a que, en general, la región codificante de los genes posee una menor diversidad que otras regiones como p.e. los intrones o la zona 3'UTR. A modo de ejemplo, Ojeda et al. (2006) encontraron 134 SNP en el gen *FABP4* porcino de los cuales sólo uno era exónico. No debe descartarse, por tanto, que existan SNP en regiones aun no secuenciadas. En este sentido, se ha realizado experimentos para intentar amplificar la región promotora, pero de momento, los protocolos de amplificación no han funcionado. Ello se debe, probablemente, a que la región promotora suele estar muy poco conservada entre especies lo cual dificulta en gran manera el diseño de cebadores. Sería muy interesante analizar la diversidad genética de la región promotora puesto que Zhang et al. (2007) encontraron una expresión diferencial del gen *APOD* en cerdos tratados con clenbuterol respecto a los controles. Do Carmo et al. (2009) también encontraron que ratones transgénicos con sobre-expresión de *APOD* humana presentaban alteraciones en el metabolismo lipídico y resistencia a la insulina. Cabe destacar que en el caso de humano la variabilidad del gen *APOD* es mayor a la observada en porcino, ya que se ha identificado 4 mutaciones no sinónimas (S15F, M76V, S115L y T178K) y 2 sinónimas (Ensembl database).

4.2. Caracterización molecular del gen *TRIB1* porcino.

Se amplificó un fragmento de 2256 pb, correspondiente a parte de la región codificante del gen *TRIB1* (75%) así como un fragmento de la región 3' UTR, mediante cuatro pares de cebadores. Este fragmento fue secuenciado en 8 individuos con genotipos alternativos (reciben los alelos Q o q del padre, tal como se ha explicado anteriormente) para el QTL de concentración de triglicéridos localizado en el cromosoma 4. El alineamiento de dichas secuencias con el programa Multalin permitió obtener una secuencia consenso que fue comparada mediante el programa BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con las secuencias de genes ortólogos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Identidad nucleotídica entre secuencias ortólogas de mamíferos y el gen *TRIB1* porcino.

Especie	Nº de acceso	Identidad nucleotídica (%)
<i>Sus scrofa</i>	AK240605	100
<i>Equus caballus</i>	XM_001497655.2	93
<i>Bos taurus</i>	NM_001101105.1	93
<i>Homo sapiens</i>	NM_025195.2	91
<i>Mus musculus</i>	NM_144549.4	88

El análisis de la secuencia aminoacídica mediante el programa Scan Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>) reveló la existencia de un dominio funcional protein quinasa (Figura 4.4). La familia de las protein quinasas es muy extensa aunque todos sus miembros poseen un dominio catalítico común en el que pueden distinguirse dos motivos estructurales: un motivo N-terminal rico en glicinas próximas a un residuo lisina con la capacidad de unirse al ATP, y otro motivo, en el centro del dominio catalítico, que contiene un residuo aspartato importante en el proceso de catálisis.

LLPLAEREHVSRALCIHTGRELRCKVFPIKHYQDKIRPYIQLPSHRNITGIVEVILGETKAYVFFERDFG
 236
DMHSYVRSRKRLREEEAARLFKQIVSAVAHCHQSAIVLGDDLKLKRFVVFSTEERTQLRLESLEDTHIIKGE
 306
DDALSDKHGCPAYVSPEILNNTGTYSKAAADVWSLGVMLYLLVGRYPFHSDPSALFSKIRRGQFCIPD
 373
HISPKARCLIRSLRREPSERLTAPEILLHPWFQSVLEPGYVDPEIGTSDQIVPEYQEDSDISSFFC

Figura 4.4. Secuencia aminoacídica parcial de la proteína *TRIB1* porcina. El residuo aspartato que forma parte del centro catalítico se indica con un recuadro gris

Al proceder con el alineamiento de las secuencias obtenidas en los 8 individuos analizados no se encontraron posiciones polimórficas en la región codificante de este gen. Sin embargo, de forma reciente, se ha hallado una inserción de dos nucleótidos en la región 3' UTR. Dicho polimorfismo, una vez confirmada su existencia, será analizado posteriormente para determinar si posee o no relación con caracteres vinculados al metabolismo de lípidos. Como se ha indicado el gen *TRIB1* humano posee efectos significativos sobre las concentraciones de HDL, LDL y triglicéridos tal como se ha demostrado en diversos estudios de asociación a nivel genómico (Kathiresan et al. 2008, Willer et al. 2008).

4.3. Caracterización molecular y análisis de asociación del gen *LRP12* porcino.

Se amplificó un fragmento de 2937 pb correspondiente a la totalidad de la región codificante del gen *LRP12* porcino, utilizando para ello cuatro pares de cebadores. Este fragmento fue secuenciado en ocho individuos de la raza Duroc. El alineamiento de dichas secuencias mediante el programa Multalin permitió obtener una secuencia consenso que fue comparada con las secuencias de genes ortólogos de otras especies mediante el programa BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), presentando una identidad nucleotídica del 96% y 92% con las especies humana y murina (Tabla 4.3)

Tabla 4.3 Identidad nucleotídica entre secuencias ortólogas de mamíferos y el gen *LRP12* porcino.

Especie	Nº de acceso	Identidad nucleotídica (%)
<i>Sus scrofa</i>	XM_001927276	99
<i>Homo sapiens</i>	ENSG00000147650	96
<i>Macaca mulatta</i>	XP_001086530.1	96
<i>Equus caballus</i>	XP_001494737.1	96
<i>Mus musculus</i>	ENSMUST00000022916	92

La secuencia aminoacídica *LRP12* porcina fue analizada mediante el programa Scan Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>). Cabe destacar que se detectaron cinco dominios *LDL-receptor class A*, ricos en cisteínas y típicos de los receptores de LDL (Figura 4.5).

70
MACRWSTKESPRWRSALFLLFLAGVYNGALAEHSENVHISGVSTACGETPEQIRAPSGIITSPGWPSEY

140
PAKINCSWFIRANPGEIITISFQDFDIQGSRRCNLDWLTIEYKNIESYRACGSTIPPPYISSQDHWIR

210
FHSDDISSRKGFRLAYFSGKSEEP **NCACDQFRCNGKCVPAAWKCNNMDECGDSSDEEICA** KEANPPTSA

280
SFQ **PCAYNQFQCLSRFTKVYTCLPESLKCDGNIDCLDLGDEIDCD** VPTCGQWLKYFYGTFNPNYPDFYP

350
PGSNCTWLIDTGDHRKVILRFTDFKLDGTGYGDYVKIYDGLEENPHKLLRVLTAFDSHAPLTVVSSGQI

419
RVHFCADKVNAARGFNATYQVDG **FCLPWEIPCGGNWGCYTEQQRCDCGYWHCPNGRDEINCT** **MCQKEEFP**

488
CSRNGVCYPRSDRCNYQNHCPNGSDEKNE **FCQPGNFHCKNNRCVFESWVCDSQDDCGDGSDEENCEP** VI

558
VPTRVITAAVIGSLICGLLLVIALGCTCKLYSLRMFERRSFETQLSRVEAELLRREAPPSYGQLIAQGLI

628
PPVEDFPVCSPNQASVLENLRLAVRSQLGFTSIRLPMAGRSSNIWNRI FNFARSRHSGSLALVSADGDEV

698
VPSQSTSREPERNHTHRSLF SVESDDTD TENERRDSAGASGGVAAPLPQKVPPTTAVEATVGASGSSSAQ

768
STRGGHTDAGRDTVNAEPPSVSPARHQLT SALS RMTQGLRWVRF TLGRSSSVSQNSPLRQLDNGVSGRE

838
EDDDVEMLI PVSEGASDFDVSDCSRPLLDLASDQGQGRQPYSATNPGVVRPGSRDGPCERC GIVHTAQIP

859
DTCLEATLKNETSDDEALLLC

Figura 4.5. Secuencia aminoacídica del gen *LRP12* porcino, observándose los 2 dominios CUB (subrayados) y los 5 dominios *LDL-receptor class A* (recuadros negros). El péptido señal se halla doblemente subrayado.

Los dominios CUB (abreviatura de complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1) son motivos estructurales de unos 110 aminoácidos habitualmente presentes en proteínas de membrana o extracelulares (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR000859>). Las proteínas con dominios CUB ejercen un amplio rango de funciones: activación del complemento, reparación tisular, angiogénesis, señalización celular etc. (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR000859>). En cuanto al dominio LDL-receptor class A, se caracteriza por poseer 6 residuos Cys, que forman puentes

disulfuro, y un clúster muy conservado de aminoácidos con carga negativa que juega un papel esencial en la unión a ligandos con carga positiva (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR002172>). Numerosas mutaciones asociadas a hipercolesterolemia en la especie humana residen en los dominios LDL-receptor class A, lo cual da idea de su gran importancia (May et al. 2007).

En la especie humana se han descrito 2 isoformas del gen *LRP12* (Ensembl): una isoforma “larga” (LRP12-201) y otra “corta” (LRP12-202), que carece de 19 aminoácidos (posiciones 27 a 45, respecto a LRP12-201). La secuencia LRP12 obtenida en el presente trabajo corresponde a la isoforma “larga” del gen *LRP12* humano. La realización de un análisis BlastP permitió identificar la secuencia porcina XP_001927311 que poseía una similitud del 99% con la secuencia *LRP12* caracterizada en el presente trabajo. A nivel proteico ambas secuencias diferían en la tercera posición aminoacídica: Arg en el caso de XP_001927311 y Cys en nuestra secuencia. Ello podría constituir un polimorfismo o bien un error de secuenciación. La secuencia LRP12 humana, equina y bovina también presentaron una elevada similitud (98%) respecto a la presentada en este trabajo indicando que se trata de una proteína muy conservada a nivel evolutivo.

4.3.1 Búsqueda de polimorfismos en la región codificante del gen *LRP12*

Al realizar el alineamiento de las ocho secuencias obtenidas del gen *LRP12* porcino se hallaron cuatro SNP sinónimos: C507T, C762T, A771G y A1101G (posiciones del cDNA *LRP12*, siendo la posición 1 la de inicio de transcripción). Los SNP encontrados se hallan en el exón 5. Estos niveles de variación son inferiores a los observados en la especie humana, probablemente debido a diferencias en el número de individuos secuenciados. Más concretamente, en humano se ha identificado tres mutaciones no-sinónimas (D217Y, S694G y T716P) y cinco sinónimas (Ensembl database). Los SNP identificados en el presente trabajo se han caracterizado en una población porcina bastante consanguínea, por lo que es de esperar que la secuenciación de un mayor número de individuos de otras razas porcinas permita descubrir polimorfismos adicionales. El principal objetivo del presente trabajo consistía en identificar las mutaciones causales subyacentes a los distintos QTL identificados. Por este motivo, se procedió a desarrollar métodos basados en la técnica de *primer extension analysis* para genotipar dos de los cuatro polimorfismos encontrados en la población Duroc (los SNP C507T y C762T no fueron analizados debido a problemas técnicos). En las Figuras 4.6 y 4.7 se observan los tres posibles genotipos para los polimorfismos SNP771 y SNP1101.

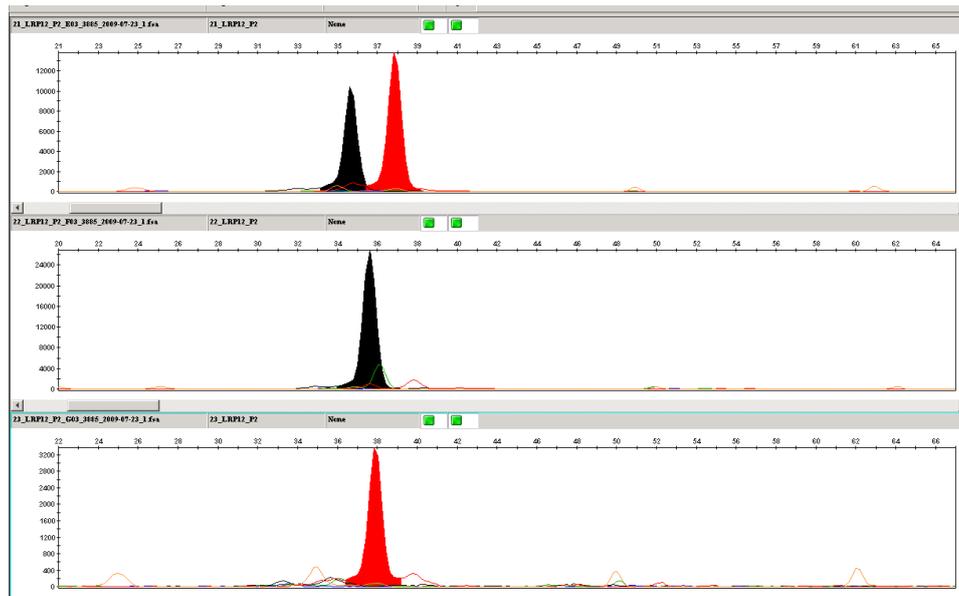


Figura 4.6. Electroferogramas del SNP A771G procesados mediante el Software Gene Mapper (en este caso se ha empleado un primer de extensión *reverse*). Carril superior: AG, carril intermedio: GG, carril inferior: AA.

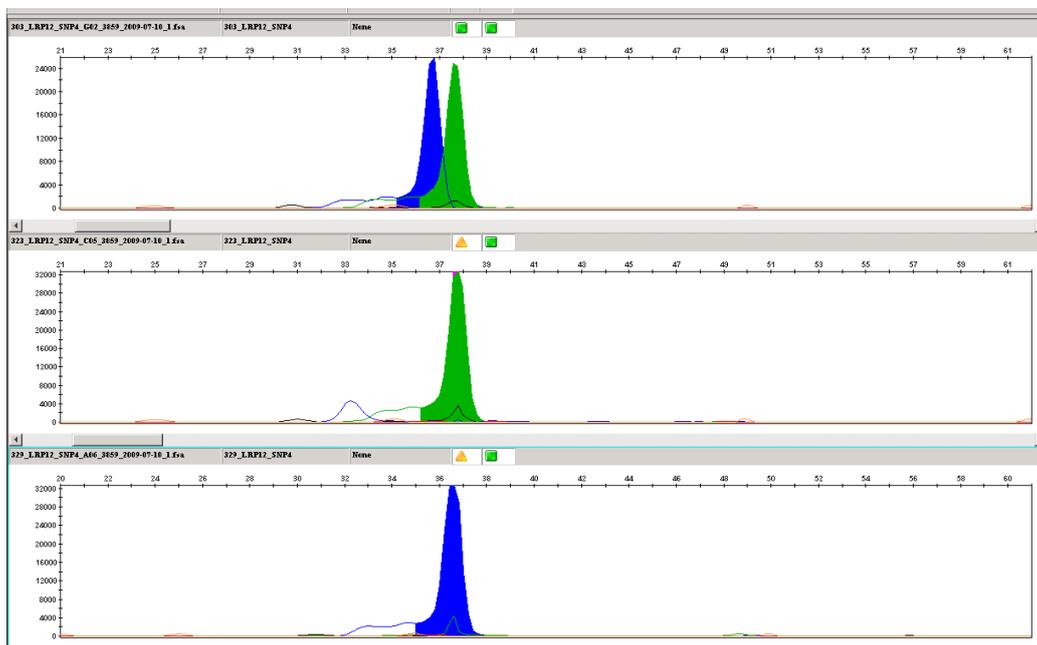


Figura 4.7. Electroferogramas del SNP A1101G procesados mediante el Software Gene Mapper (en este caso se ha empleado un primer de extensión *forward*). Carril superior: AG, carril intermedio: AA, carril inferior: GG.

Las frecuencias genotípicas obtenidas para los SNP A771G y A1101G se muestran en la Tabla 4.4, indicándose las frecuencias absolutas por familias y las

frecuencias relativas en la población total. Debe indicarse que algunos de los genotipados fallaron por lo que se dispone de datos de 312 y 318 individuos para los SNP771 y SNP1101, respectivamente. En cuanto al SNP771, se aprecia que la frecuencia del alelo G es relativamente baja, lo cual es problemático si se pretende realizar análisis de asociación ya que el genotipo GG se halla infra-representado en la población, lo cual dificulta la estimación de medias fenotípicas fiables para dicho genotipo en relación a los distintos caracteres estudiados. En el caso del SNP1101, el alelo minoritario es el A, aunque la frecuencia del genotipo AA (15%) no es extremadamente baja y dicho alelo segrega en cuatro de las cinco familias. En este sentido, puede observarse que las frecuencias genotípicas varían entre familias, hecho que bien puede deberse al efecto del genotipo del padre. Por ejemplo, para el SNP771 se observa la ausencia de individuos GG en las familias 3, 4 y 5, situación bastante desfavorable desde el punto de vista de la realización de análisis de asociación. Las frecuencias alélicas desequilibradas de estos SNP pueden deberse a distintos factores como la selección, la deriva genética y muy posiblemente la consanguinidad, que en esta línea comercial parece ser considerable. Una indicación de este hecho viene ejemplificada por la dificultad que implicó encontrar microsatélites polimórficos con los cuales realizar un barrido genómico para caracteres lipídicos en la población Duroc (Gallardo et al. 2008).

Tabla 4.4. Frecuencias genotípicas de los SNP A771G y A1101G del gen *LRP12* porcino

SNP	Genotipo	Fam. 1	Fam. 2	Fam. 3	Fam. 4	Fam. 5	Total
SNP771	AA	0	17	51	39	12	0.381
	AG	45	46	29	29	25	0.558
	GG	12	7	0	0	0	0.061
SNP1101	AA	0	10	19	14	6	0.154
	AG	22	40	31	35	24	0.478
	GG	36	21	32	21	7	0.368

4.3.2. Estudio de asociación entre el polimorfismo del gen *LRP12* porcino y caracteres lipídicos

En primer lugar, cabe destacar que los análisis de asociación realizados son muy preliminares y que simplemente se han llevado a cabo para obtener una primera perspectiva general. Queda pendiente, por tanto, la realización de análisis más complejos y definitivos. Las asociaciones que se discutirán a continuación, por tanto, deben entenderse como provisionales a la espera de obtener resultados más fiables y concluyentes. Otro aspecto que cabe resaltar es que en adelante se definirán como significativas aquellas asociaciones con un P -value < 0.05 , ésto es sin haber realizado una corrección para múltiples tests, aspecto que aun está pendiente de llevarse a cabo.

En cuanto a los lípidos séricos, se observó la existencia de una asociación significativa entre el genotipo SNP1101 y la concentración sérica de triglicéridos (Tabla 4.5). Ello es esperable dado que el gen *LRP12* está ubicado en una región que contiene un QTL para dicho carácter. En este sentido, sería aconsejable analizar los datos mediante un modelo estadístico que permitiera deslindar el efecto del gen *LRP12* del efecto del QTL con la finalidad de observar si la asociación se mantiene o no. Curiosamente, el SNP771 no presenta ninguna asociación con la concentración de triglicéridos y en cambio sí se observa una relación con la concentración de LDL (Tabla 4.5), carácter para el cual no se ha identificado ningún QTL en esta región. Finalmente, cabe destacar que el genotipo SNP1101 está asociado a la concentración de HDL (Tabla 4.5). Aunque la función precisa de *LRP12* no se conoce con exactitud, se sabe que los distintos miembros de la familia LRP juegan un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas. Por ejemplo, los quilomicrones, partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos, son hidrolizados a nivel tisular por la lipoproteína lipasa dando lugar a los remanentes de quilomicrón, que son especialmente ricos en ésteres de colesterol (Lillis et al. 2008). Dichos remanentes son captados, a nivel hepático, por *LRP1* (y otros receptores) a través de la unión con la apolipoproteína E. De forma similar, *LRP2* es un receptor que puede unirse a múltiples ligandos entre los cuales cabe destacar las partículas VLDL y LDL (May et al. 2009), por lo que cualquier mutación que afecte a la funcionalidad de esta molécula puede tener efectos pleiotrópicos. Sería interesante conocer mejor la función y los ligandos de *LRP12* para interpretar las asociaciones observadas. Los polimorfismos identificados en el gen *LRP12* porcino son sinónimos por lo que, en principio, no cabe esperar que tengan efectos causales. En cualquier caso, lo más probable que es que las asociaciones

observadas se deban a que los SNP analizados se hallan en desequilibrio de ligamiento con la mutación causal.

Tabla 4.5 Análisis de asociación entre el genotipo *LRP12* porcino y concentraciones de lípidos séricos en un población comercial de cerdos Duroc a los 190 días de edad.

Carácter (mg/dL)	SNP771			SNP1101		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Colesterol	124.26	126.52	125.21	129.08	126.06	123.28
HDL	52.71	51.17	52.05	54.75^A	51.89^B	50.46^B
LDL	61.11^a	65.31^b	62.65^{ab}	65.09	63.73	62.60
Triglicéridos	51.18	50.10	52.20	45.33^a	51.62^b	51.07^{ab}

Medias con letras distintas son significativamente diferentes. Letras minúsculas, $P < 0.01$; letras mayúsculas, $P < 0.05$.

El análisis de asociación con caracteres de engrasamiento (Tabla 4.6) también reveló una asociación consistente (en cuanto a que se observó para ambos SNP) con el espesor del tocino dorsal *in vivo*. Este hecho tampoco resulta sorprendente ya que en la región del cromosoma 4 que contiene el gen *LRP12* se ha descrito, en diversas poblaciones porcinas, la segregación de QTL con importantes efectos sobre el depósito de lípidos (Andersson et al. 1994, Marklund et al. 1999, Pérez-Enciso et al. 2000). Desafortunadamente, aun no se ha realizado un barrido genómico para caracteres de engrasamiento en la población Duroc. No obstante, la existencia de un QTL con efectos marcados sobre la concentración sérica de triglicéridos sugiere que esta región puede estar asociada a la variación fenotípica de caracteres relacionados con el engrasamiento. En ratón, se ha comprobado que el gen *LRP5* juega un papel esencial en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Jin 2008). Asimismo, se ha demostrado que el polimorfismo del gen *LRP5* humano está asociado al desarrollo de obesidad y diabetes de tipo I (Jin 2008). Más concretamente, se genotiparon 27 SNP distribuidos uniformemente en el gen *LRP5* humano en un total de 1873 individuos para los que se disponía de registros de índice de masa corporal (Guo et al. 2006). Dos SNP intrónicos mostraron una fuerte asociación con este carácter (Guo et al. 2006), posiblemente debido al relevante papel de *LRP5* en la ruta de señalización Wnt.

Tabla 4.6. Análisis de asociación entre el genotipo *LRP12* porcino y caracteres de engrasamiento en una población comercial Duroc.

Carácter	SNP771			SNP1101		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
MEC x Modelo lote						
Espesor grasa dorsal in vivo (mm)	24.26 ^A	23.54 ^{AB}	21.74 ^B	25.15 ^A	23.49 ^{AB}	23.37 ^B
Esp. grasa dorsal 3 ^a -4 ^a costilla (mm)	38.26	37.27	36.14	39.06	37.51	37.13
Prof. de lomo 3 ^a -4 ^a costilla (mm)	42.48	43.29	42.56	44.26	42.76	42.47
Espesor grasa jamón (mm)	26.18	25.50	24.94	25.74	25.98	25.33
% Magro	40.51	41.04	41.25	41.54	40.49	41.09
MEC x modelo lote+ Peso vivo						
Espesor grasa dorsal in vivo (mm)	23.94 ^A	23.59 ^{AB}	22.08 ^B	24.41	23.48	23.52
Esp. grasa dorsal 3 ^a -4 ^a costilla (mm)	37.94	37.32	36.47	38.32	37.49	37.28
Prof. de lomo 3 ^a -4 ^a costilla (mm)	42.21	43.26	42.90	43.71	42.74	42.49
Espesor grasa jamón (mm)	26.06	25.55	25.08	25.44	25.97	25.43
% Magro	40.55	40.98	41.22	41.66	40.48	40.99

Medias con letras distintas son significativamente diferentes. Letras mayúsculas, $P < 0.05$; letras minúsculas, $P < 0.01$.

Finalmente, cabe destacar que se ha encontrado asociaciones entre el genotipo *LRP12* y diversos caracteres ligados al porcentaje y a la composición de la grasa intramuscular (Tablas 4.7 y 4.8). Este resultado es reseñable puesto que en el barrido genómico para caracteres relacionados con el porcentaje y composición de la grasa intramuscular no se observa ningún QTL localizado en el cromosoma 4 porcino (resultados no publicados). Por lo general, se observa una baja concordancia en cuanto a los resultados obtenidos para cada SNP, así como para ambos músculos. El SNP771 tiene efectos significativos sobre el contenido de vaccénico así como de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y la ratio omega 6/omega 3 en el músculo *longissimus dorsi*. En cambio, en el músculo *gluteus medius* presenta asociaciones con el porcentaje de grasa intramuscular, así como con el contenido de los ácidos grasos palmítico y esteárico, ácidos grasos saturados y la ratio omega 6/omega 3. El denominador común, por lo que respecta a estos dos músculos, es que el SNP771 está asociado al porcentaje de ácidos grasos saturados y a la ratio omega6/omega 3. Respecto al SNP1101 la situación es parecida: en el músculo *longissimus dorsi* se observan asociaciones con el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y en el

músculo *gluteus medius* con el porcentaje de vaccénico, palmitoleico y ácidos grasos saturados. En resumen, la asociación más consistente es la que se observa entre el genotipo *LRP12* y el porcentaje de ácidos grasos saturados.

Tabla 4.7. Análisis de asociación entre el SNP771 del gen *LRP12* porcino y caracteres relacionados con la composición de grasa en músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* en una población comercial Duroc.

Carácter (%)	Músculo <i>Longissimus</i>			Músculo <i>Gluteus medius</i>		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
GIM	3.78	3.89	3.58	5.31^A	5.02^{AB}	4.38^B
Mirístico	1.37	1.33	1.32	1.39	1.37	1.40
Palmitico	23.48	23.26	23.14	23.45^A	23.05^B	23.02^{AB}
Palmitoleico	2.92	2.98	3.01	2.80	2.84	2.87
Esteárico	11.85	11.63	11.48	11.39^A	11.07^B	10.82^B
Oléico	34.04	34.93	34.48	34.52	35.13	34.22
Vaccénico	4.24^A	4.34^B	4.27^{AB}	4.05	4.10	4.02
Linoleico	14.84	14.31	14.89	15.22	15.08	15.95
Araquidónico	3.70	3.59	3.73	3.19	3.25	3.57
SFA	37.24^a	36.79^b	36.51^{ab}	36.87^A	36.14^B	35.94^B
PUFA	20.54	19.88	20.63	20.62	20.61	21.76
MUFA	42.24^a	43.33^b	42.86^{ab}	42.51	43.25	42.30
PUFA/MUFA	0.53	0.50	0.50	0.51	0.50	0.53
Omega 6	19.62	18.96	19.71	19.52	19.49	20.71
Omega 3	0.92	0.92	0.92	1.10	1.12	1.05
Omega 6/Omega 3	21.32^a	20.45^b	21.41^{ab}	18.14^A	17.72^{AB}	19.55^B

GIM: Porcentaje de grasa intramuscular.

SFA: Ácidos grasos saturados

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

Medias con letras distintas son significativamente diferentes. Mayúsculas, $P < 0.05$;

letras minúsculas, $P < 0.01$.

Tabla 4.8. Análisis de asociación entre el SNP1101 del gen *LRP12* porcino y caracteres relacionados con la composición de grasa en músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* en una población comercial Duroc.

Carácter (%)	Músculo <i>Longissimus</i>			Músculo <i>Gluteus medius</i>		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
GIM	3.72	3.89	3.80	4.87	5.16	5.12
Mirístico	1.37	1.34	1.33	1.41	1.36	1.39
Palmítico	23.49	23.31	23.29	23.56	23.10	23.18
Palmitoleico	2.99	2.97	2.92	2.89^A	2.82^B	2.82^B
Esteárico	11.54	11.67	11.78	11.14	11.15	11.21
Oléico	33.59	34.82	34.55	34.42	34.96	35.07
Vaccénico	4.23	4.32	4.30	4.09^a	4.10^a	4.03^b
Linoleico	15.38	14.34	14.57	15.33	15.09	15.10
Araquidónico	3.81	3.62	3.63	3.21	3.29	3.15
SFA	36.94	36.88	36.97	36.75^a	36.26^b	36.44^{ab}
PUFA	21.24	19.94	20.19	20.74	20.67	20.46
MUFA	41.82^a	43.19^b	42.84^b	42.50	43.06	43.10
PUFA/MUFA	0.55	0.50	0.51	0.51	0.51	0.50
Omega 6	20.28	19.02	19.28	19.65	19.53	19.39
Omega 3	0.97	0.92	0.91	1.09	1.14	1.06
Omega6/Omega3	21.14	20.61	20.98	18.17	17.61	18.32

GIM: Porcentaje de grasa intramuscular

SFA: Ácidos grasos saturados

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

Medias con letras distintas son significativamente diferentes. Letras mayúsculas, $P < 0.05$; letras minúsculas, $P < 0.01$.

Tal como se ha comentado, la concordancia de efectos entre ambos músculos es relativamente baja. Cuando se ha realizado un barrido genómico para la composición de ácidos grasos se ha observado el mismo fenómeno, es decir la localización de los QTL para composición y porcentaje de la grasa intramuscular tiene un bajo nivel de coincidencia cuando se comparan los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* (Tablas 1.9A y 1.9B, ver págs. 21-22). Ello posiblemente se deba a que la “penetrancia” de los QTL tenga relación con los niveles de expresión génica, la cuál es bastante distinta en ambos músculos tal como se ha evidenciado de forma reciente mediante el análisis de microarrays (resultados no publicados). Este

fenómeno es relevante desde el punto de vista de la selección porcina porque implica que un determinado polimorfismo puede tener efectos distintos dependiendo del músculo se que tome en consideración. Incluso sería posible que un SNP con efectos deseables en un determinado músculo tuviera efectos negativos en otro. Ello se ve complicado por el hecho de que lo que resulta deseable desde un punto de vista tecnológico (disminuir los ácidos grasos poliinsaturados puesto que están asociados a fenómenos de enranciamiento y oxidación) es indeseable desde una perspectiva de salud humana (una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados disminuye el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares).

Aun quedan distintas tareas pendientes para concluir el trabajo iniciado en la presente tesis de máster. En primer lugar, convendría secuenciar las regiones promotoras y UTR de los tres genes (*APOD*, *TRIB1* y *LRP12*) con la finalidad de identificar polimorfismos reguladores que puedan tener un efecto sobre la tasa transcripcional. Este experimento está en curso para el gen *APOD*, dado que no se ha hallado ningún SNP a nivel de región codificante. Para el gen *TRIB1* se ha encontrado un posible polimorfismo a nivel de la región 3'UTR que está pendiente de confirmación. Caso de ser un polimorfismo real, podría emplearse como marcador para realizar estudios de asociación con los distintos caracteres registrados. Finalmente, aun debe realizarse un análisis de asociación definitivo para el gen *LRP12* con el objeto de comprobar cuántas de las asociaciones detectadas en el análisis preliminar se mantienen como significativas. Probablemente, después de hacer la corrección para tests múltiples algunas de las asociaciones que actualmente aparecen como significativas pasen a ser sugestivas o simplemente desaparezcan. De hecho, ninguno de los polimorfismos identificados hasta la fecha parece causal. Por otra parte, está en marcha el genotipado y análisis de 50.000 SNP en la población Duroc objeto de estudio. La información proporcionada a través de esta aproximación probablemente contribuiría a refinar la posición de los QTL SSC4 y SSC13, reduciendo el intervalo de confianza de los mismos y facilitando los futuros trabajos de caracterización y análisis de posibles genes candidatos.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha secuenciado 0.79 kb del gen *APOD* porcino incluyendo la totalidad de la región codificante. Se observó que dicha secuencia, al ser traducida y analizada con el programa ScanProsite, contenía un dominio funcional lipocalina característico de proteínas transportadoras de pequeñas moléculas hidrofóbicas.
2. No se detectaron polimorfismos en la región estudiada del gen *APOD*, por lo que la búsqueda de una posible mutación causal se ha dirigido a la región promotora de este gen.
3. Se obtuvo la secuencia parcial del gen *TRIB1* porcino, secuenciándose 2,2 kb del DNA complementario. Dicha secuencia presenta una elevada similitud nucleotídica (88-93%) con las secuencias ortólogas de otras especies. El análisis de la secuencia aminoacídica con el programa Scan Prosite reveló la existencia de un dominio funcional protein quinasa, el cual juega un papel importante en la activación de distintas rutas de señalización.
4. No se detectaron polimorfismos en la región codificante del gen *TRIB1*. Sin embargo datos de secuenciación preliminares indican la existencia una inserción de dos nucleótidos en la región 3' UTR.
5. Se secuenció 2.93 kb del gen *LRP12* porcino, correspondiente a la totalidad de la región codificante. El análisis de la secuencia aminoacídica de dicho gen con el programa ScanProsite, permitió detectar cinco dominios LDL-*receptor class A*, típico de receptores LDL.
6. Se detectaron cuatro polimorfismos nucleotídicos sinónimos C507T, C762T, A771G y A1101G en la región codificante del gen *LRP12*. Se ha puesto a punto una metodología basada en la técnica de *primer extension analysis* para genotipar los polimorfismos SNP A771G y A1101G en una población comercial Duroc.
7. Un análisis de asociación preliminar de los SNP771 y 1101 permitió detectar la existencia de asociaciones significativas entre el genotipo del SNP771 y el contenido de vaccénico, así como de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y la ratio omega 6/omega 3 en músculo *longissimus dorsi*, y el contenido de los

ácidos grasos palmítico y esteárico, ácidos grasos saturados y la ratio omega 6/omega 3 en el músculo *gluteus medius*. El genotipo SNP1101 presentó asociaciones con el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en músculo *longissimus dorsi* y el porcentaje de vaccénico, palmitoleico y ácidos grasos saturados en músculo *gluteus medius*. Dichas asociaciones están pendientes de ser confirmadas mediante un análisis estadístico más refinado.

6. BIBLIOGRAFÍA

Amills M, Vidal O, Varona L, Tomas A, Gil M, Sánchez A, Noguera JL. 2005. Polymorphism of the pig 2,4-dienoyl CoA reductase 1 gene (DECR1) and its association with carcass and meat quality traits. *J Anim Sci.* 83:493-498.

Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johanson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja I, Fredholm M, Hansson I. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science.* 263:1771-1774.

Battle MA, Maher VM, McCormick JJ. 2003. ST7 is a novel low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) with a cytoplasmic tail that interacts with proteins related to signal transduction pathways. *Biochemistry.* 42:7270-82.

Berthier MT, Houde A, Côté M, Paradis AM, Mauriège P, Bergeron J, Gaudet D, Després JP, Vohl MC. 2005. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. *J Lipid Res.* 46:237-244.

Biggerstaff KD, Wooten JS. 2004. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Adv Physiol Educ.* 28:105-106.

Blacklow SC. 2007. Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. *Curr Opin Struct Biol.* 17:419-426.

Cameron ND. 1990. Genetic and phenotypic parameters for carcass traits, meat and eating quality traits in pigs. *Livest Prod Sci.* 26:119-135.

Casellas J, Noguera JL, Reixach J, Díaz I, Amills M. y Quintanilla R. 2009. Bayes factor analyses of heritability for serum and muscle lipid traits in Duroc pigs. *J Anim Sci* (enviado).

Chapman MJ, Forjez P. 1985. Lipid transport systems: some recent aspects in swine, cattle and trout during development. *Reprod Nutr Dev.* 25:217-226.

Charlton-Menys V, Durrington PN. 2008. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol.* 93:27-42.

Chen K, Baxter T, Muir WM, Groenen MA, Schook LB. 2007. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). *Int J Biol Sci.* 3:153-65

Chen R, Ren J, Li W, Huang X, Yan X, Yang B, Zhao Y, Guo Y, Mao H, Huang L. 2009. A genome-wide scan for quantitative trait loci affecting serum glucose and lipids in a White Duroc x Erhualian intercross F(2) population. *Mamm Genome* . 386-392.

Ciobanu DC, Bastiaansen JWM, Lonergan SM, Thomsen H, Dekkers JCM, Plastow GS, Rothschild MF. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Animal Sci.* 82:2829-2839.

Clop A, Ovíllo C, Pérez-Enciso M, Cercos A, Tomas A, Fernández A, Coll A, Folch JM, Barragan C, Díaz I, Oliver MA, Varona L, Silió L, Sánchez A, Noguera JL. 2003. Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig. *Mamm Genome.* 14:650-6.

Clutter A C, Brascamp EW. 1998. The genetics of the Pig. Ed Rothschild M. F and A. Ruvinsky. CAB International, New York. 427–462

Coma J y Piquer J. 1999. Calidad de carne en porcino: Efecto de la nutrición. XV Curso de especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 197-222.

Corpet F.1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nuc Acid Res.* 16:10881-10890.

Darvasi A, Soller M. 1997. A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet.* 27:125-32.

Davoli R, Braglia S. 2007. Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6:313-21.

Dekkers JCM. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82:E313-E328

Desai PP, Bunker CH, Ukoli FA, Kamboh MI. 2002. Genetic variation in the apolipoprotein D gene among African blacks and its significance in lipid metabolism. *Atherosclerosis*. 163:329-338

Do Carmo S, Fournier D, Mounier C, Rassart E. 2009. Human apolipoprotein D overexpression in transgenic mice induces insulin resistance and alters lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296:E802–E811.

Drayna D, Fielding C, McLean J, Baer B, Castro G, Chen E, Comstock L, Henzel W, Kohr W, Rhee L, Wion K, Lawn R. 1986 Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem*. 261:16535-16539.

Espirito Santo SM, Pires NM, Boesten LS, Gerritsen G, Bovenschen N, van Dijk KW, Jukema JW, Princen HM, Bensadoun A, Li WP, Herz J, Havekes LM, van Vlijmen BJ. Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. *Blood*. 103:3777-3782.

Estellé J, Pérez-Enciso M, Mercadé A, Varona L, Alves E, Sánchez A, Folch JM. 2006. Characterization of the porcine FABP5 gene and its association with the FAT1 QTL in an Iberian by Landrace cross. *Anim Genet*. 37:589-591.

Evans GJ, Giuffra E, Sanchez A, Kerje S, Davalos G, Vidal O, Illán S, Noguera JL, Varona L, Velander I, Southwood OI, de Koning DJ, Haley CS, Plastow GS, Andersson L. 2003. Identification of quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics*. 164:621-7.

Falconer DS, MacKay TFC. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edition. Ed. Harlow Longman.

Fernández-Llario O, Carranza J, Mateos-Quesada P. 1999. Sex allocation in a polygynous mammal with large litters: the wild boar. *Anim Behav*. 58:1079-1084.

Fernández A, de Pedro E, Núñez N, Silió L, García-Casco J, Rodríguez C. 2003. Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in Iberian pigs. *Meat Sci*. 64:405-410.

Flower DR. 2000. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1482:327-336.

Flower DR, North AC, Attwood TK. 1993. Relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci*. 2:753-761.

Fox S, Filichkin S, Mockler TC. 2009. Applications of ultra-high-throughput sequencing. methods. *Mol Biol*. 553:79-108.

Frayn N. 1998. *Metabolismo de las lipoproteínas. Regulación del metabolismo (una perspectiva humana)*. Ediciones Omega.

Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253:448-451.

Gallardo D, Pena RM, Amills M, Varona L, Ramírez O, Reixach J, Díaz I, Tibau J, Soler J, Prat-Cuffi JM, Noguera JL, Quintanilla R. 2008. Mapping of quantitative trait loci for cholesterol, LDL, HDL and triglyceride serum concentrations in pigs. *Physiol Genom*. 35:199-209.

Gallardo D, Quintanilla R, Varona L, Díaz I, Ramírez O, Pena RN, Amills M. 2009. Polymorphism of the pig acetyl-coenzyme A carboxylase alpha gene is associated with fatty acid composition in a Duroc commercial line. *Anim Genet*. 40:410-417.

Ganong WF. 2006. *Fisiología médica*, 20ª edición. Editorial Manual Moderno.

Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE, Hoeschele I. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*. 139:907-20.

Georges M. 2007. Mapping, fine mapping and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 8:131-162.

Gerbens F, Verburg FJ, Van Moerkerk HT, Engel B, Buist W, Veerkamp JH, te Pas MF. 2001. Association of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *J Anim Sci.* 79:347-354.

Glomset JA, Norum KR. 1973. The metabolic role of lecithin-cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Adv Lipid Res.* 11:1-65.

Guo YF, Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Guo Y, Wang W, Yang TL, Recker RR, Deng HW. 2006. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with obesity phenotypes in a large family-based association study. *J Med Genet.* 43:798-803

Guo T, Ren J, Yang K, Ma J, Zhang Z, Huang L. 2009. Quantitative trait loci for fatty acid composition in longissimus dorsi and abdominal fat: results from a White Duroc x Erhualian intercross F2 population. *Anim Genet.* 40:185-191

Haley CS, Knott SA. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity.* 69:315-324.

Haley CS, Visscher PM. 1998. Strategies to utilize marker-quantitative trait loci associations. *J Dairy Sci.* 2:85-97.

Hasler-Rapacz J, Prescott MF, Von Linden-Reed J, Rapacz JM Jr, Hu Z, Rapacz J. 1995. Elevated concentrations of plasma lipids and apolipoproteins B, C-III, and E are associated with the progression of coronary artery disease in familial hypercholesterolemic swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15:583-92.

Hasler-Rapacz J, Ellegren H, Fridolfsson AK, Kirkpatrick B, Kirk S, Andersson L, Rapacz J. 1998. Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine. *Am J Med Genet.* 76:379-86.

Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J Dairy Sci.* 92:433-43.

Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth. 2006. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulator function. *Cell Signal.* 19:238-250.

Herz J, Strickland DK. 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 108:779-784.

Hofmann SM, Zhou L, Perez-Tilve D, Greer T, Grant E, Wancata L, Thomas A, Pfluger PT, Basford JE, Gilham D, Herz J, Tschöp MH, Hui DY. 2007. Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 117:3271-3282.

Houston RD, Rance KA, Sutcliffe E, Archibald AL, Haley CS. 2008. The cholecystinin type A receptor g.179A>G polymorphism affects feeding rate. *Anim Genet.* 39:187-188.

Ibeagha-Awemu EM, Kgwatalala P, Zhao X. 2008. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pigs. *Mamm Genome.* 19:591-617.

Imperatore G, Knowler WC, Pettitt DJ, Kobes S, Fuller JH, Bennett PH, Hanson RL. 2000. A locus influencing total serum cholesterol on chromosome 19p: results from an autosomal genomic scan of serum lipid concentrations in Pima Indians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2651-2656.

Jankowiak H. 2005. The effect of colipase gene (*CLPS*) polymorphism on selected carcass traits in Polish Large White and Polish Large White × Polish Landrace fatteners. *Folia Biol.* 53:91-94.

Jiménez MG. 2007. Características de la canal y calidad de la carne, composición mineral y lipídica del cerdo Chato Murciano y su cruce con Ibérico. Efecto del sistema de manejo. Universidad de Murcia. Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Tesis Doctoral.

Jin T. 2008. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia.* 51:1771-1780.

Jokubka R, Maak S, Kerziene S, Swalve HH. 2006. Association of a melanocortin 4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs. *J Anim Breed Genet.* 123:17-22.

Jones GF. 1998. Genetic aspects of domestication, common breeds and their origin, in *The genetics of the Pig*. Ed Ruvinsky A and Rothschild MF. CAB International, Oxon, UK. 17–50

Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burtt NP, Rieder MJ, Cooper GM, Roos C, Voight BF, Havulinna AS, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai ES, Ordovas JM, Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler DM, Melander MO. 2008. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet.* 40:189-197.

Kathiresan S, Rader DJ. 2009. Lipoprotein disorders, in *Genomic and personalized medicine*, Vol.1. Ed Huntington F. Willard and Geoffrey S. Ginsburg. Durham, NC, USA. 634-651.

Kim KS, Larsen NJ, Short T, Plastow G, Rothschild MF. 2000. A missense variant of porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth and feed intake traits. *Mamm Genome.* 11:131-135

Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill LA, Qvarnstrom EE, Dower SA. 2004. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 279:42703-42708.

Kist WB, Thomas TR, Korner KE, Laughlin MH. 1999. Effects of aerobic training and gender on HDL-C and LDL-C subfractions in Yucatan miniature swine. *J Exerc Phys.* 2:7-15.

Knott SA, Marklund L, Haley CS, Andersson K, Davies W, Ellegren H, Fredholm M, Hansson I, Hoyheim B, Lundström K, Moller M, Andersson L. 1998. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics.* 149:1069-80.

Knott SA. 2005. Regression-based quantitative trait loci mapping: robust, efficient and effective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:1435-1442.

Lander ES, Botstein D. 1989. Mapping mendelian factor underlying quantitative traits using RFLP linkage map. *Genetics*. 121:185-199.

Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*. 307:1618-1621.

Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. 2008. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*. 88:887-918.

Makridakis NM, Reichardt JK. 2001. Multiplex automated primer extension analysis: simultaneous genotyping of several polymorphisms. *Biotechniques*. 31:1374-80.

Marklund L, Nyström PE, Stern S, Andersson-Eklund L, Andersson L. 1999. Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity*. 82:134-141.

May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. 2009. The LDL receptor-related protein (LRP) family: An old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med*. 39:219-228.

McConathy, WJ; Alaupovic P. 1973. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett*. 37:178-182.

Mercadé A, Estellé J, Noguera JL, Folch JM, Varona L, Silió L, Sanchez A, Pérez-Enciso M. 2005. On growth, fatness, and form: a further look at porcine chromosome 4 in an Iberian x Landrace cross. *Mamm Genome*. 16:374-382.

Meuwissen TH, Goddard ME. 1996. The use of marker-quantitative trait loci associations. *J Dairy Sci*. 81:85-97.

Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Lannuccelli N, Rask L, Ronne H, Lundström K, Reinsch N, Gellin J, Kalm E, Roy PL,

Chardon P, Andersson L. 2000. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*. 19:1248-51.

Mote BE, Rothschild MF. 2006. SNP detection and linkage mapping for pig genes involved in growth. *Anim Genet*. 37:295-6

Muñoz G, Alves E, Fernández A, Ovilo C, Barragán C, Estellé J, Quintanilla R, Folch JM, Silió L, Rodríguez MC, Fernández AI. 2007. QTL detection on porcine chromosome 12 for fatty-acid composition and association analyses of the fatty acid synthase, gastric inhibitory polypeptide and acetyl-coenzyme A carboxylase alpha genes. *Anim Genet*. 38:639-646.

Muñoz G, Ovilo C, Silió L, Tomás A, Noguera JL, Rodríguez MC. 2009. Single- and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits. *J Anim Sci*. 87:459-468.

Ojeda A, Rozas J, Folch JM, Pérez-Enciso M. 2006. Unexpected High Polymorphism at the FABP4 Gene Unveils a Complex History for Pig Populations. *Genetics*. 174:2119-2127.

Paszek AA, Wilkie PJ, Flickinger GH, Rohrer GA, Alexander LJ, Beattie CW, Schook LB. 1999. Interval mapping of growth in divergent swine cross. *Mamm Genome*. 10:117-122.

Peitsch MC, Boguski MS. 1989. Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol*. 2:197-206.

Pérez-Enciso M, Clop A, Noguera JL, Ovilo C, Coll A, Folch JM, Babot D, Estany J, Oliver MA, Díaz I, Sánchez A. 2000. A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross. *J Anim Sci*. 78:2525-2531.

Pond WG, Mersmann HJ, Young LD. 1986. Heritability of plasma cholesterol and triglyceride concentrations in swine. *Proc Soc Exp Biol Med*. 182:221-224.

Prinsen CF, de Bruijn DR, Merkx GS, Veerkamp JH. 1997. Assignment of the human adipocyte fatty acid-binding protein gene (FABP4) to chromosome 8q21 using somatic cell hybrid and fluorescence in situ hybridization techniques. *Genomics*. 15:207-209.

Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, Screatton R, Goebel N, Niessen S, Macleod IX, Liew CW, Kulkarni RN, Bain J, Newgard C, Nelson M, Evans RM, Yates J, Montminy M. 2006. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science*. 312:1763-1766.

Qing J, Wei D, Maher VM y McCormick JJ. 1999. Cloning and characterization of a novel gene encoding a putative transmembrane protein with altered expression in some human transformed and tumor-derived cell lines. *Oncogene*. 18:335-342.

Ramos AM, Crooijmans RP, Affara NA, Amaral AJ, Archibald AL, Beever JE, Bendixen C, Churcher C, Clark R, Dehais P, Hansen MS, Hedegaard J, Hu ZL, Kerstens HH, Law AS, Megens HJ, Milan D, Nonneman DJ, Rohrer GA, Rothschild MF, Smith TP, Schnabel RD, Van Tassell CP, Taylor JF, Wiedmann RT, Schook LB, Groenen MA. 2009. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS One*. 2009. 5:6524-6537.

Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, Milne R. 2000. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta*. 1482:185-98.

Ron M, Weller JI. 2007. From QTL to QTN identification in livestock – winning by points rather than knock –out: a review. *Animal Genetics*. 38:429-439.

Rothschild MF, Plastow GS. 1999. Advances in pig genomics and industry applications. *AgBiotechNet*. 10:1-8.

Rothschild MF, Hu ZL, Jiang Z. 2007. Advances in QTL mapping in pigs. *Int J Biol Sci*. 3:192-197.

Saito H, Lund-Katz S, Phillips MC. 2004. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog Lipid Res*. 43:350-380.

Sanchez MP, Iannuccelli N, Basso B, Bidanel JP, Billon Y, Gandemer G, Gilbert H, Larzul C, Legault C, Riquet J, Milan D, Le Roy P. 2007. Identification of QTL with effects on intramuscular fat content and fatty acid composition in a Duroc x Large White cross. *BMC Genet.* 8:55.

Sellier P. 1998. Genetics of meat and carcass traits. Ed Rothschild MF, Ruvinsky A. CAB International, New York. pp 463-510.

Strausberg RL, Feingdol EA, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:16899-16903.

Sung HY, Guan H, Czibula A, King AR, Eder K, Heath E, Suvarna SK, Dower SK, Wilson AG, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E. 2007. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J Biol Chem.* 22:18379-18387.

Szczerbal I, Chmurzynska A, Switonski M. 2007. Cytogenetic mapping of eight genes encoding fatty acid binding proteins (FABPs) in the pig genome. *Cytogenet Genome Res.* 118:63-6.

Takayama Y, May P, Anderson RG, Herz J. 2005. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta). *J Biol Chem.* 6:18504-18510.

Taverner MR and Dunkin AC. 1996. *World Animal Science. C: Production system-approach*,10. Pig Production. Ed Elsevier. 1:1-12

Tibau J. 1992. Mejora genética de los caracteres productivos en el ganado porcino. *Porci.* 7:11-21.

Tibau J y Font. 2004. *La Genética y la Producción Porcina. Suis N°4.* 52-61

Toro MA, Silió L. 1992. La mejora de la selección porcina. *Porcí* 7:69-78.

Urban T, Kuciel J, Mikolasova R. 2002. Polymorphism of genes encoding for ryanodine receptor, growth hormone, leptin and MYC protooncogene protein and meat production in Duroc pigs. *J Anim Sci* 47: 411-417.

Van Laere AS, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L. 2003. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in pig. *Nature*. 425:832-836.

Vidal O, Noguera JL, Amills M, Varona L, Gil M, Jiménez N, Dávalos G, Folch JM, Sánchez A. 2005. Identification of carcass and meat quality quantitative trait loci in a Landrace pig population selected for growth and leanness. *J Anim Sci*. 83:293-300.

Wang J, Wen XY, Stewart AK, Hegele RA. 2002. Polymorphisms in the gene encoding phosphatidylserine-specific phospholipase A1 *PSPLA1*. *J Hum Genet*. 47:611-613.

Wang HB, Li H, Wang QG, Zhang XY, Wang SZ, Wang YX, Wang XP. 2007. Profiling of chicken adipose tissue gene expression by genome array. *BMC Genomics*. 8:193.

Webb AJ. 1998. Objectives and strategies in pig Improvement: An applied perspective. *J Dairy Sci*. 81:36-46

Wen XY, Hegele RA, Wang J, Wang DY, Cheung J, Wilson M, Yahyapour M, Bai Y, Zhuang L, Skaug J, Young TK, Connelly PW, Koop BF, Tsui L, Stewart AK. 2003. Identification of a novel lipase gene mutated in *lpld* mice with hypertriglyceridemia and associated with dyslipidemia in humans. *Hum Mol Gen*. 12:1131-1143.

Wernersson R, Schierup MH, Jørgensen FG, Gorodkin J, Panitz F, Staerfeldt HH, Christensen OF, Mailund T, Hornshøj H, Klein A, Wang J, Liu B, Hu S, Dong W, Li W, Wong GK, Yu J, Wang J, Bendixen C, Fredholm M, Brunak S, Yang H, Bolund L. 2005. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 6:70.

Wilkin F, Suarez-Huerta N, Robaye B. 1997. Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *Eur. J. Biochem*. 248:660-668.

Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift AJ, Morken MA, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott LJ, Scheet PA, Sundvall J, Watanabe RM, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner AR, Collins R, Bergman RN, Uda M, Tuomiletho J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop GM, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke KL, Abecasis GR. 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 40:161-169.

Wimmers K, Murani E, Te Pas MF, Chang KC, Davoli R, Merks JW, Henne H, Muraniová M, da Costa N, Harlizius B, Schellander K, Böll I, Braglia S, de Wit AA, Cagnazzo M, Fontanesi L, Prins D, Ponsuksili S. 2007. Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. *Anim Genet.* 38:474-84.

Wood JD. 1993. The Healthy Choice – how pork has moved from fatness to fitness. *Pig Internat.* 23:7-9.

Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI, and Whittington FM. 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 78:343-358.

Ye SQ, Kwiterovich PO. 2000. Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol. *Am J Clin Nutr.* 72:1275-1284.

Young LD, Pond WG, Mersmann HJ. 1993. Direct and correlated responses to divergent selection for serum cholesterol concentration on day 56 in swine. *J Anim Sci.* 71:1742-1753.

Zhang J, He Q, Liu QY, Guo W, Deng XM, Zhang WW, Hu XX, Li N. 2007. Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated with/without clenbuterol. *BMC Genomics.* 8:433-445.