

Estudio de QTL y expresión génica

para caracteres relacionados con
la calidad de la carne en porcino

MARINA SOLÉ BERGA
SEPTIEMBRE, 2009

Este trabajo de Máster se ha realizado en el grupo
IRTA - Genètica i Millora Animal (Lleida)
Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

Bajo la dirección de la Dra Raquel Quintanilla Aguado

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer muy atentamente a todas las personas que han colaborado en la realización de este trabajo por el esfuerzo y tiempo empleado. Este ha sido mi primer trabajo científico y estoy muy contenta por el resultado final y por todo el apoyo recibido.

Antes que nada, quería agradecer a todo el equipo del grupo de Genética y Mejora Animal del IRTA de Lleida por darme la posibilidad de colaborar durante este año en el departamento y hacer posible que a día de hoy pueda presentar este trabajo. En especial, a Raquel Quintanilla por haber dedicado tantas horas de su trabajo a la tesina, a veces demasiadas quizás pero le agradezco muchísimo su esfuerzo ya que no ha sido fácil para mí y, a veces la experiencia me ha faltado.

Al resto del equipo también me gustaría darles las gracias, por su colaboración tanto en el laboratorio como en las dudas que me hayan podido surgir y que me han ayudado a resolver.

También me gustaría agradecer la colaboración, al equipo del departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la UAB, grupo también participante en el proyecto coordinado en el que se enmarca esta tesina y, a la empresa Selección Batallé por la aportación del material animal utilizado en el trabajo.

Y, finalmente a mi familia por apoyarme durante todo este tiempo y por darme fuerzas en los momentos en que lo he necesitado.

MUCHISÍMAS GRACIAS A TODOS!!!!

RESUMEN

La Tesina de Máster que aquí se presenta se enmarca dentro del proyecto LIPGENCAL (AGL2007-66707-C02-01), que lleva por título “*Mapeo e identificación de genes implicados en el metabolismo lipídico en porcino, la calidad de la carne y la calidad del jamón curado*”. Dentro de este contexto, el presente trabajo se ha centrado en el ámbito de la genómica estructural y funcional para el estudio de la arquitectura genética de caracteres relacionados con la cantidad y composición de la grasa muscular de dos músculos: *gluteus medius* (GM) y *longissimus dorsi* (LD). Con este fin se han abordado distintos estudios relacionados con el análisis de QTL, análisis de expresión génica diferencial, análisis ontológico de genes diferencialmente expresados, e identificación de genes candidatos funcionales y/o posicionales en base a los resultados anteriores. Para ello se dispone de una población experimental de unos 350 individuos pertenecientes a una línea comercial de la raza Duroc distribuidos en cinco familias de medio-hermanos paternos.

El análisis de QTL en la población de medio-hermanos se realizó para los caracteres porcentaje de grasa intramuscular (GIM), concentración de colesterol en músculo, y los porcentajes de ácidos grasos mayoritarios (oleico, palmítico, linoleico, esteárico, vacénico, palmitoleico, araquidónico y mirístico) e índices relacionados (porcentajes de saturados, poli/monoinsaturados, omega-3 y omega-6) de ambos músculos GM y LD. Para ello se dispuso de los genotipos de todos los individuos y los machos parentales para 110 microsatélites repartidos en los 18 autosomas. Este análisis permitió identificar diversos QTL significativos a nivel genómico para GIM (GM: SSC3, SSC7; LD: SSC1, SSC3), la composición en diversos ácidos grasos o índices relacionados (GM: SSC3, SSC5, SSC7, SSC18; LD: SSC6, SSC12, SSC14), y la concentración de colesterol en músculo (LD: SSC6, SSC11), además de un total de 22 y 27 QTL significativos a nivel cromosómico para GM y LD, respectivamente. Los más significativos fueron los QTL obtenidos en el SSC7 (81 y 133 cM) para el contenido en ácido vacénico y para la GIM del GM, y en el SSC6 (35 cM) para contenido de colesterol del músculo LD. Cabe destacar también el QTL descrito en SSC11 afectando el contenido en colesterol de ambos músculos, por ser éste un carácter escasamente estudiado hasta la fecha. Se han detectado varias regiones con efecto pleiotrópico sobre dos o más de los caracteres estudiados en varios cromosomas (*e.g.* SSC7, SSC12, SSC14). Además estos resultados han puesto de manifiesto una importante falta de concordancia posicional entre los QTL detectados para los músculos GM y LD, sugiriendo diferencias en el determinismo genético de caracteres relacionados con la cantidad y composición de la GIM entre los músculos.

El estudio de expresión génica se realizó sobre muestras de los músculos GM y LD, y para dos grupos de individuos (grupos Alto y Bajo) con fenotipos extremos para un conjunto de parámetros relacionados con el metabolismo lipídico (lípidos plasmáticos, nivel de engrasamiento, GIM y perfil de ácidos grasos) seleccionados mediante un análisis de componentes principales. La medición de los niveles de expresión se realizó mediante una hibridación no competitiva con el chip *GeneChip Porcine Genome Array (Affymetrix)*. Se procesaron 68 muestras del músculo GM (34 por grupo) y 19 del músculo LD (10 y 9 por grupo) y se analizó la expresión diferencial respecto a los factores músculo y grupo mediante el programa BRB-Array Tools. Seguidamente se realizó un análisis ontológico para clasificar desde una perspectiva funcional los genes diferencialmente expresados, utilizando el paquete de herramientas bioinformáticas DAVID.

Los resultados del estudio de expresión nos han permitido detectar importantes diferencias a nivel transcriptómico entre los músculos GM y LD. Concretamente, se identificaron 350 sondas diferencialmente expresadas (correspondientes a 292 genes) entre los dos músculos. Las mayores diferencias de expresión entre los músculos se observaron en los genes sobreexpresados en el músculo GM, y particularmente en un grupo de genes pertenecientes a la familia *HOX* implicados en múltiples funciones, entre la cuales destacamos el papel del *HOXA10* sobre la diferenciación de células musculares. El análisis ontológico de los genes diferencialmente expresados mostró que las diferencias a nivel transcriptómico entre estos músculos vienen determinadas principalmente por genes implicados en el desarrollo, la regulación y la funcionalidad del músculo.

En el análisis de la expresión génica diferencial entre los dos grupos de individuos con niveles extremos de parámetros lipídicos se detectó un mayor número de diferencias en niveles de expresión: 579 sondas diferencialmente expresadas, correspondientes a 459 genes. De éstos, el 82% correspondía a genes sobreexpresados en los individuos del grupo Alto, indicando que los animales con un mayor nivel de engrasamiento, lípidos plasmáticos y deposición de GIM tendrían una sobreactividad transcripcional respecto a un importante número de genes. El conjunto de genes diferencialmente expresados se clasificaron mayoritariamente dentro de un grupo de categorías GO biológicas relacionadas directamente con el metabolismo lipídico. Entre los genes sobreexpresados en el grupo Alto destacamos el gen *LIPE* u *Hormone-sensitive lipase*, si bien este gen no mapea en ninguna de las regiones con QTL detectados.

Finalmente se elaboró una lista de genes candidatos funcionales y posicionales a partir de los genes diferencialmente expresados que mapeaban en la posición de los QTL más significativos. En función de su naturaleza, hemos seleccionado como genes candidatos de interés para la realización de futuros estudios tres de los genes identificados: el gen *GPD1* (*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1*), relacionado con el incremento en la producción de triacilglicerol en el tejido adiposo de los humanos obesos, y los genes *NPC1* y *NPC2* (*Niemann-Pick disease*), que codifican por proteínas relacionadas con la captación de colesterol.

ÍNDICE

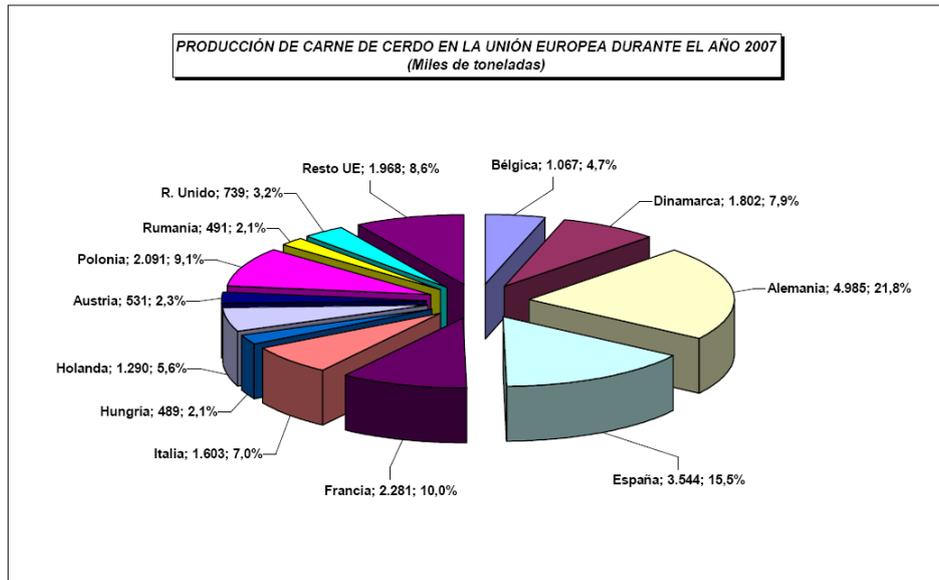
INTRODUCCIÓN	1
1.- Interés de la especie porcina	1
1.1	Int
erés de la producción porcina: algunos datos económicos	1
1.2 Domesticación de la especie porcina	2
1.3 La Mejora Genética en producción porcina	3
1.4 La Selección y la incorporación de información genómica	4
1.5 Detección de QTL en porcino	5
1.5.1 Diseños para la detección de QTL	7
2.- Calidad del producto y metabolismo lipídico	8
2.1 Calidad de la carne y contenido de grasa intramuscular	8
2.2 Calidad de la carne y composición de la grasa intramuscular	8
2.3 Proceso de síntesis de los ácidos grasos y el colesterol: enzimas implicados	10
3.- Interés de la raza Duroc dentro de este contexto	12
4.- Estudio de la arquitectura genética de los caracteres relacionados con la cantidad y la composición de la grasa muscular	14
4.1 Parámetros genéticos	14
4.2 Estudios de QTL y Genes candidatos	15
4.2.1 Identificación de QTL	15
4.2.2 Estudio de genes candidatos	16
5.- Estudios de expresión mediante microarrays	19
5.1 Diseño experimental	20
5.2 Estudios de expresión	22
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	31
Variables relacionadas con la cantidad y composición de la grasa intramuscular en los músculos <i>longissimus dorsi</i> y <i>gluteus medius</i>	31

Identificación de QTL para grasa intramuscular, contenido de colesterol y composición de ácidos grasos en los músculos <i>longissimus dorsi</i> y <i>gluteus medius</i>	32
Estudio de expresión diferencial entre los músculos <i>longissimus dorsi</i> y <i>gluteus medius</i> y entre los grupos con niveles alto y bajo de parámetros lipídicos	39
Estudio ontológico de los genes diferencialmente expresados entre los músculos <i>longissimus dorsi</i> y <i>gluteus medius</i> y entre los grupos con niveles alto y bajo de parámetros lipídicos	45
Identificación de genes candidatos funcionales y posicionales para la cantidad y composición de la grasa intramuscular	49
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58

1.- Interés de la especie porcina

1.1 Interés de la producción porcina: algunos datos económicos

El sector porcino es el primer sector de la ganadería de nuestro país, con una producción anual que supone más de 4000 millones de euros al año (MAPA, 2007), lo que le sitúa como el segundo productor de la Unión Europea detrás de Alemania (figura I.1). España es además el segundo país con más censo de ganado porcino, censo que ha sufrido un notable incremento a lo largo de los últimos años (ver figura I.2).



Fuentes: EUROSTAT y Estadísticas del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino.
Elaboración: S.G. Mercados Exteriores y Producciones Porcina, Avícola y Otras.

Figura I.1 Datos de Producción de carne de cerdo en la Unión Europea durante el año 2007 (MAPA; <http://www.mapa.es/>)

Todas estas cifras reflejan sin asomo de dudas la gran importancia económica del sector porcino en nuestro país. Además, debemos destacar el papel de Calatüña dentro del sector porcino, ya que es la comunidad autónoma con más censo de ganado porcino y más producción de carne (MAPA, 2007). En este contexto, la mejora genética del sector porcino para todos aquellos caracteres con importancia económica se dibuja como un ámbito de gran interés.

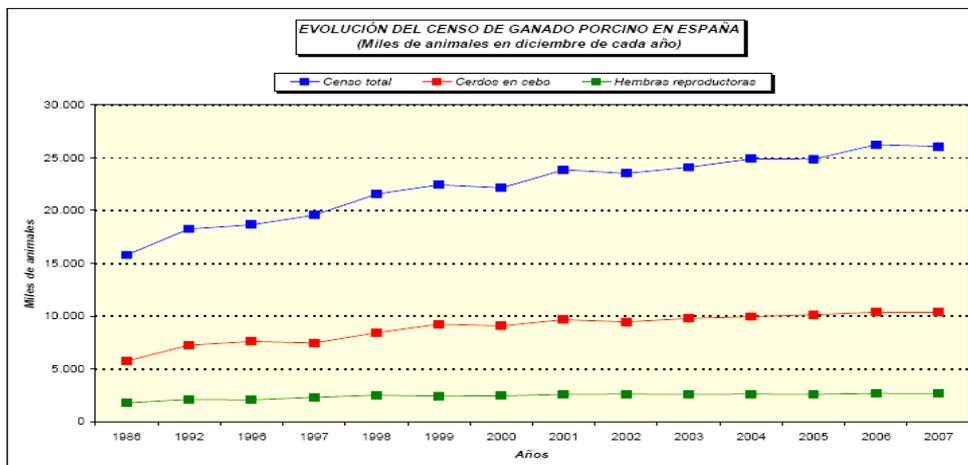


Figura I.2 Evolución del censo de ganado porcino en España (MAPA; <http://www.mapa.es/>)

1.2 Domesticación de la especie porcina

Según la definición que Darwin propone en el libro “The Variation of Animals and Plants Under Domestication”, la domesticación es el proceso de adaptación genética de un organismo biológicamente salvaje para satisfacer mejor las necesidades de los seres humanos. En este sentido, diversos autores consideran que la razón principal para la domesticación del cerdo fue disponer de una fuente proteica de alimento, si bien Jones (1998) apunta que las características organolépticas únicas que posee la carne porcina podrían haber tenido más peso que su valor nutritivo.

La domesticación de la especie porcina tuvo lugar según diversos autores hacia el 7000 a.C., existiendo indicios de cerdos domesticados (*Sus Scrofa domesticus*) a partir de su ancestro salvaje en múltiples regiones del mundo. Cabe destacar que, desde los inicios de la domesticación hasta la actualidad, el cerdo sigue siendo una fuente importante de alimento en muchas civilizaciones de todo el mundo (Kefei *et al.*, 2007; Rothschild *et al.*, 1998).

Los análisis filogenéticos como el presentado en la figura I.3 permiten mostrar la historia y evolución del cerdo doméstico. De este modo, en la figura I.3 pueden observarse los distintos sucesos de domesticación que han ido sucediendo de manera independiente (Kefei *et al.*, 2007). Debemos resaltar de esta figura la aparición de poblaciones de suidos mucho más próximas al ancestro común de las que aún existen ejemplares, como el caso del Pecari en la zona de Nuevo Méjico o el Babirusa en Indonesia.

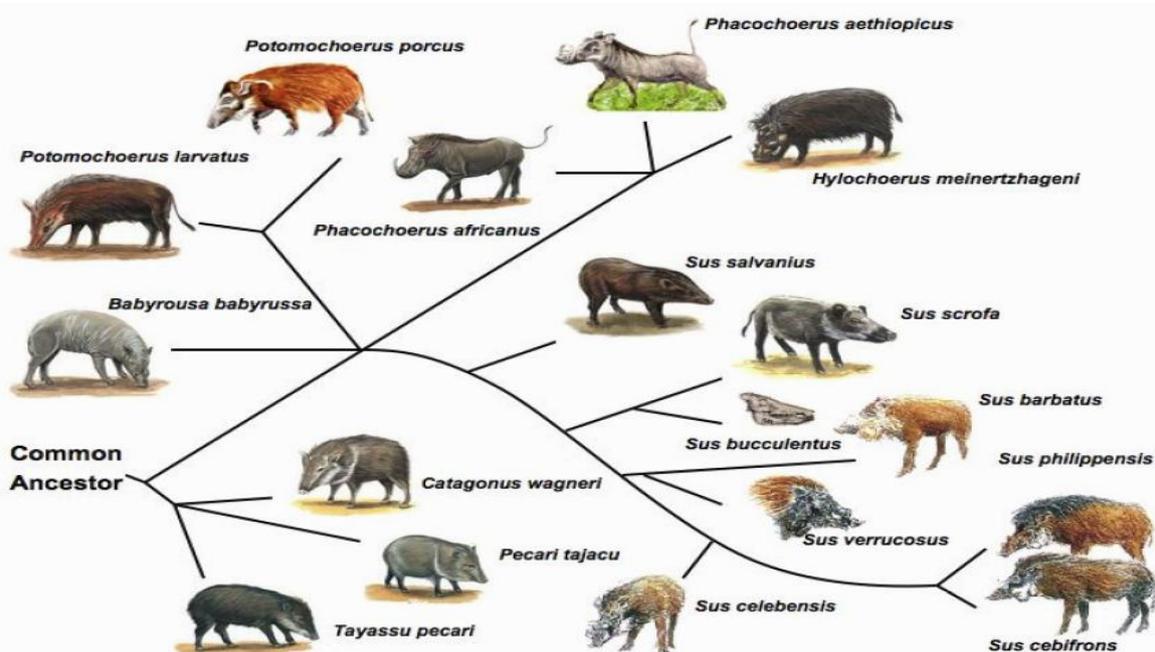


Figura I.3 Diversidad y relaciones filogenéticas. Fuentes: Randi *et al.* (1996); Groves *et al.* (1997); Fokkinga (2004); Robins *et al.* (2006). Adaptación de los dibujos a partir de la página de “Animal Diversity” (<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/>; Kefei *et al.*, 2007).

La intervención humana, junto con diversos fenómenos naturales y los cambios en las condiciones ambientales acaecidos durante estos siglos de domesticación, han sido los principales responsables de la generación de la variabilidad genética intraespecífica. Entre otros aspectos, parece que la domesticación determinó particularmente cambios en la

estructura morfológica, entre otros una disminución en el tamaño esquelético (Jones, 1998). La intervención humana y la mejora después de la domesticación ha dado lugar además a notables cambios en la producción, la composición bioquímica y otros caracteres (Kefei *et al.*, 2007). Durante el reciente milenio, interacciones entre el ambiente y la selección humana han encaminado el desarrollo de las distintas razas (Kefei *et al.*, 2007).

1.3 La Mejora Genética en producción porcina

Tal y como se ha venido comentando en el apartado anterior, y a diferencia de otras especies donde existe una raza claramente superior al resto (*e.g.* la Frisona en vacuno de leche), en la especie porcina existe una enorme variabilidad entre razas o líneas para un gran conjunto de caracteres con incidencia en la productividad final. Esta circunstancia ha determinado que la optimización de la productividad final pase por la combinación en un esquema de cruzamientos de diversas razas o líneas con aptitudes complementarias. Ello se traduce en que la mejora genética en la especie porcina utilice dos importantes “herramientas” para la obtención de progreso genético: la selección y el cruzamiento, permitiendo este último aprovechar los fenómenos de complementariedad y heterosis.

Para llegar a alcanzar las metas que se proponen los mejoradores, el diseño de la estructura de selección y difusión genética consiste en una organización piramidal compuesta por 3 estratos (figura I.4), donde pueden intervenir de 2 a 4 razas o líneas distintas (esquemas de cruzamientos a 2, 3 o 4 vías). Es en el primero de estos estratos, en los “núcleos de selección”, donde se centran los esfuerzos de la selección genética de animales mejorados, con el objetivo de mantener y aumentar el nivel genético de las líneas de animales en pureza. En el segundo estrato, al que llamamos “multiplicador”, tienen lugar cruzamientos entre distintas líneas puras seleccionadas en el núcleo que se complementan para aumentar la calidad de los animales resultantes. En el último estrato, llamado “productor”, encontramos los animales destinados al consumo humano (Tibau, 2004).

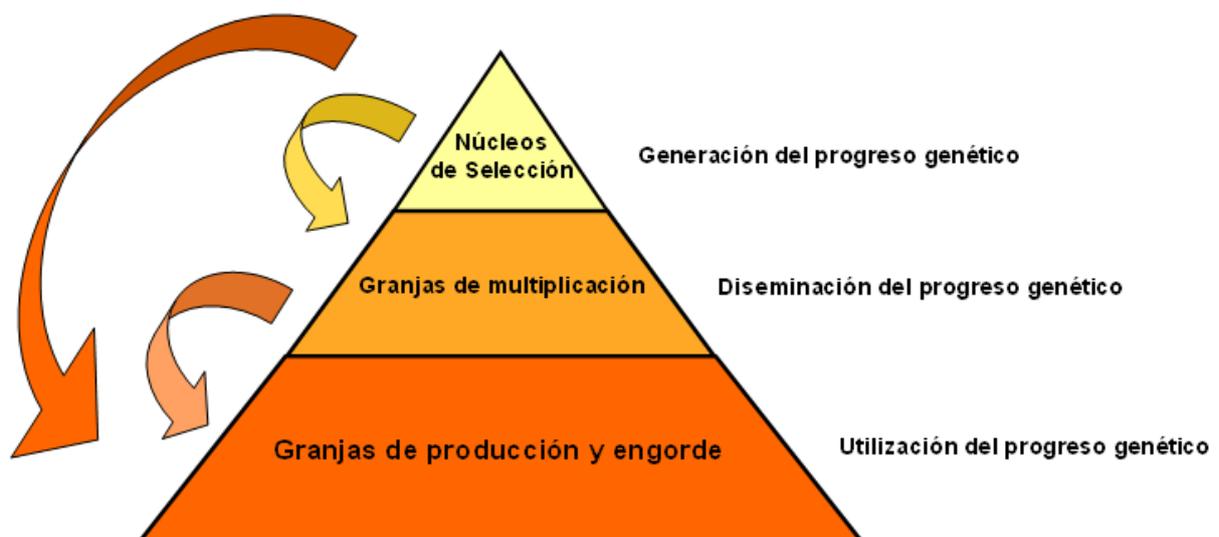


Figura I.4 Estructura de la difusión del progreso genético adaptada de Tibau, 2004.

De este modo, tal y como describen Blasco y Gou (1992), el esquema de producción porcina tradicional está basado en la generación de híbridos comerciales a partir del cruzamiento de machos de elevada aptitud cárnica con hembras de buena aptitud maternal, donde los objetivos de selección difieren notablemente entre líneas: mientras las líneas maternas se

seleccionan dando mayor énfasis a los caracteres relacionados con la aptitud maternal y la prolificidad, en las líneas paternas tienen más peso en los objetivos de selección los caracteres de conformación y calidad de la canal. En este sentido, encontramos varios ejemplos de cruzamientos utilizados frecuentemente como el cruce Landrace x Large White para producir la hembra híbrida, cruzada con un macho finalizador como el Landrace tipo Belga (“Blanco Belga”). No obstante en los últimos años, con el creciente interés en aspectos relacionados con la calidad de producto, se ha ido introduciendo cada vez más el uso de razas con mejores características de calidad de carne. Este sería el caso de la introducción en diversos países europeos de cruces a partir del cerdo Duroc, el cual se cruzaba con las llamadas razas “Blancas” para mejorar la calidad de éstas, gracias al alto contenido de grasa intramuscular (GIM) del Duroc (Blasco *et al.*, 1994; Steane, 1986).

1.4 La Selección y la incorporación de información genómica

Para poder obtener una mejora continua en una población animal deben evaluarse los candidatos en función de su valor genético, escoger los mejores y utilizarlos como progenitores de la siguiente generación (Tibau, 2004). Uno de los métodos ampliamente empleados para la selección de los mejores animales reproductores fue el índice de selección, que ha venido siendo sustituido por la metodología BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*), la cual nos permite obtener una mejor predicción de los valores genéticos de los animales, obtenida conjuntamente con la estimación de los efectos ambientales y teniendo en cuenta el conjunto de la información fenotípica aportada por todos los individuos emparentados. De este modo, la mejora genética se ha basado en los conocimientos de genética cuantitativa y la información procedente de los registros fenotípicos y genealógicos en las poblaciones, pero conceptualmente selecciona los animales con una composición genética más adecuada a los objetivos de selección. A lo largo de estas últimas décadas este proceder ha demostrado ampliamente su eficacia, permitiendo obtener un importante progreso genético en las poblaciones porcinas, particularmente para aquellos caracteres con una elevada heredabilidad. El creciente desarrollo de la genética molecular ha abierto no obstante interesantes perspectivas en cuanto a la utilización de información genómica para la evaluación genética de los animales. El uso de información molecular presentaría particular interés para aquellos caracteres en los que el progreso genético es complicado de obtener por métodos tradicionales como son los caracteres de baja heredabilidad, los que sólo son medibles en un sexo, después del sacrificio del animal o cuando el animal tiene una edad avanzada, o bien en aquellos en los que la obtención de los registros fenotípicos resulta económicamente costosa.

Dentro de las posibilidades de utilización a corto-medio plazo de la información genómica en la mejora genética porcina, cabe destacar tres importantes aproximaciones:

1- La selección asistida por marcadores (MAS), que permite tener en cuenta en el modelo de evaluación genética de los individuos el efecto del genotipo para aquellos marcadores en desequilibrio de ligamiento con la/s mutación/es causal/es del QTL, así como plantear la selección de aquellos alelos de los marcadores asociados con los alelos favorables del QTL. En aquellos casos donde los caracteres sean difíciles de medir, este método permitiría plantear un proceso selectivo justo al nacimiento del animal sin tener que esperar a tener los registros fenotípicos (Haley y Visscher, 2000). Asimismo, el uso de BLUP y MAS conjuntamente permitirían un beneficio genético adicional de más del 50% (Rothschild y Plastow, 1999; Paszek *et al.*, 1999). Por su parte, Meuwissen y Goddard (1996) señalan que la aplicación de la MAS conseguiría un aumento del 38-64% en la respuesta respecto a la obtenida

exclusivamente por los métodos de selección tradicionales, y los beneficios se obtendrían a corto plazo aunque, en algunos casos, puede causar una penalización a largo plazo.

2- La selección asistida por genes (GAS). Otra posibilidad es mediante la detección directa de variantes alélicas de genes que contengan una mutación causal con una importante incidencia en la expresión fenotípica del carácter. Son ejemplo de ello el gen del *Halotano* o *RYRI*, situado en el cromosoma 6 de porcino, que determina sensibilidad al estrés porcino y con efectos contrapuestos sobre la calidad de la canal y de la carne; el gen *IGF2* para contenido muscular; el gen *CAST* para ternura en el cromosoma 2; y el gen *PRKAG3* para calidad de carne en el cromosoma 15, entre otros. Estos genes son responsables de mutaciones causales, y se podrían tener en cuenta en los programas de mejora genética de la especie, tal y como ya se ha hecho con el gen *RYRI* (Bidanel, 2008). No obstante, esta aplicación puede verse limitada ya que son pocos los casos de genes descritos con un efecto mayor sobre caracteres productivos.

3- Una aplicación adicional del uso de la genética molecular en mejora genética sería la realización de programas de introgresión asistida por marcadores (MAI), donde un alelo beneficioso puede ser introducido en una población en la cual no exista (Andersson, 2001).

4- Finalmente, la Selección Genómica (GS) es una reciente aproximación que se propuso para poder predecir el mérito genético de los individuos, basándose en un genotipado masivo de alta densidad (miles de SNP) y la asociación de estos marcadores con caracteres de interés (Meuwissen *et al*, 2001). Esta técnica ya se está utilizando en ganado vacuno para poder estimar el valor genético del animal basándose en las asociaciones entre los genotipos de los marcadores y el rendimiento lechero, contajes de células somáticas, vida productiva, tasa de gestación de las hijas, y otros caracteres importantes (Weigel, 2008). Además, *Illumina* junto con el Consorcio Porcino Internacional SNP Chip han anunciado la reciente disponibilidad del panel 50K+SNP porcino para el estudio de la variabilidad estructural a nivel genómico, el cual nos abre nuevas perspectivas para la aplicación de la selección genómica en la especie porcina.

1.5. Detección de QTL en porcino

La mayoría de los caracteres de importancia económica, en los animales domésticos en general y en porcino en particular, son caracteres complejos con una herencia multifactorial. En general se trata de fenotipos distribuidos de forma continua, influenciados por múltiples genes o loci de caracteres cuantitativos (QTL) a lo largo del genoma, así como por numerosos factores ambientales, por lo que para describir la base genética de estos caracteres habría que considerar los efectos conjuntos de todos los genes causantes de la variación (Yagüe, 2008). Tal y como indica de Vries *et al.* (1998), de los genes causantes de parte de la variación fenotípica, unos pocos genes tendrán un efecto importante (Genes Mayores) mientras que el resto de la variabilidad se deberá a varios genes con efecto pequeño (de Vries *et al*, 1998).

Aunque se han hecho grandes avances en la eficiencia productiva de una gran variedad de especies animales usando la selección basada en el modelo infinitesimal, un mayor conocimiento de la arquitectura molecular de los caracteres cuantitativos complejos podría redundar en una mejora de la selección. Según Ibeagha-Awemu (2008), se espera que los nuevos conocimientos puedan generar nuevas oportunidades para que la MAS y la GAS sean más efectivas. Estos motivos explican los numerosos estudios orientados a describir los loci

con efectos sobre la variabilidad genética de los caracteres cuantitativos, los denominados QTL (del inglés *Quantitative Trait Loci*).

Los estudios encaminados a la detección de QTL en diferentes especies animales empezaron a despuntar a principios de los años 90, en parte gracias al avance de las nuevas técnicas moleculares como la PCR (Saiki *et al.*, 1985). Posteriormente y gracias al rápido desarrollo de los mapas genéticos basados en los marcadores de DNA combinado con los avances de los métodos estadísticos, se pudo llevar a cabo el mapeo de numerosos loci responsables de la variación cuantitativa o QTL (Haley *et al.*, 1994).

En el caso de la especie porcina se han descrito un gran número de QTL en prácticamente todos los cromosomas para caracteres de crecimiento, canal y calidad de la carne, y en un menor número de cromosomas para caracteres reproductivos (Rothschild, 2003). La figura I.5 refleja la evolución de los QTL descritos en porcino a lo largo de los últimos 15 años. Actualmente están recogidos en la Base de Datos de QTL de animales domésticos (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>) un total de 1831 QTL detectados en la especie porcina, vinculados a 316 caracteres productivos, resultado de 113 publicaciones (Ibeagha-Awemu, 2008).

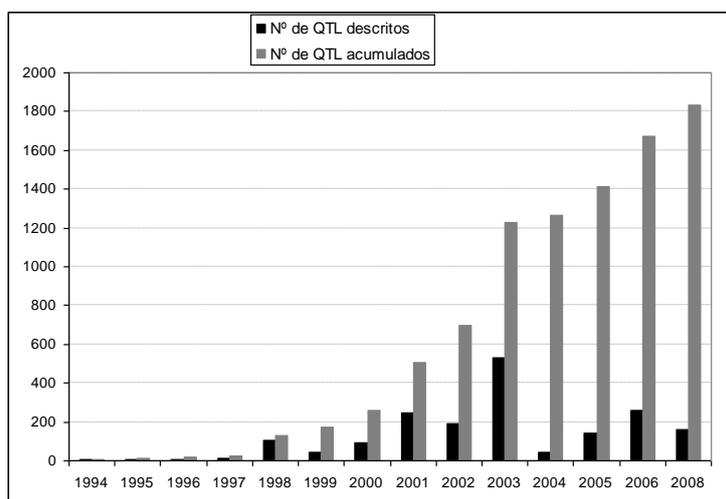


Figura I.5 Evolución de los QTL descritos en porcino a lo largo de los últimos 15 años según la Base de Datos de QTL (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>).

Tabla I.1 Principales caracteres para los cuales se ha descrito un mayor número de QTL en porcino, según la Base de Datos de QTL (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>).

Carácter	Nº QTL	Carácter	Nº QTL
Espesor grasa dorsal (media)	89	Número de tetinas	27
Área del lomo	51	Peso de la grasa dorsal	27
Ganancia media diaria	46	Espesor grasa dorsal última costilla	25
Longitud canal	42	Peso corporal al nacimiento	24
Peso jamón	42	Peso de la cabeza	24
pH 24 hr post-mortem (Lomo)	34	Peso del lomo y cuello	23
Rendimiento de la canal	33	Peso corporal (Sacrificio)	22
Color-L de la carne	33	Diámetro de fibras musculares	22
Porcentaje de magro	32	Peso canal (Fría)	20
Espesor de grasa dorsal 10ª costilla	27	Contenido grasa intramuscular	20

La tabla I.1 muestra los 20 caracteres para los cuales se han descrito un mayor número de QTL. Tal y como se muestra en esta tabla, el contenido de GIM está entre los 20 caracteres con mayor número de QTL identificados, si bien muy por debajo de caracteres mucho más ampliamente estudiados, como el espesor de grasa dorsal o la ganancia media diaria. Cabe también destacar en esta tabla la ausencia de caracteres relacionados con la composición de la grasa muscular estudiados en el presente trabajo, para los cuales existe un número mucho más modesto o incluso nulo de QTL.

1.5.1 Diseños para la detección de QTL

La base principal de la detección de QTL es el desequilibrio de ligamiento entre QTL y marcador o marcadores. En este sentido, el mapeo por intervalos descrito por Lander & Botstein (1989), el cual consiste en genotipar varios marcadores distribuidos a lo largo del genoma a analizar y estudiar en cada punto el efecto del QTL en función del genotipo y el desequilibrio de ligamiento (la distancia) con los marcadores flanqueantes, supuso una gran revolución y es el método en el que se basan prácticamente todos los estudios actuales para la detección de QTL.

Referente a los diseños, tal y como revisa Georges (2007), los dos tipos de cruce experimental para la detección de QTL en porcino en base a la generación de segregación y desequilibrio de ligamiento han venido siendo:

- 1) el cruce F2 entre dos líneas divergentes para el/los caracteres estudiados, donde los animales F1 (todos supuestamente heterocigotos para el QTL) son cruzados entre sí para generar la F2.
- 2) el retrocruce o backcross (RC), en el que la segunda generación se obtiene del cruzamiento de los animales F1 con una de las líneas parentales.

Aunque el diseño RC puede aportar una mayor detección y un mayor poder de resolución cuando se trata de búsqueda de QTL específicos (*e.g.* QTL con dominancia y haciendo RC a la línea recesiva), en muchas circunstancias se prefiere el diseño F2 por su polivalencia (Darvasi, 1998).

Si bien los cruces experimentales han resultado muy útiles para la detección de un número importante de QTL, se debe tener en cuenta algunas consideraciones y limitaciones. Por un lado, parten de la asunción de que las dos líneas parentales tienen fijados alelos alternativos para el QTL, asunción que no siempre se cumple. Por otro lado, al generar la segregación mediante el cruzamiento es muy probable que los QTL detectados no estén segregando en las poblaciones comerciales. Por estos motivos, juntamente con el elevado coste de generar un cruce experimental, cada vez es más frecuente plantear la detección de QTL en poblaciones abiertas (outbred) y aprovechando las estructuras familiares disponibles en el pedigrí de la población analizada. Entre los diseños más populares para la detección de QTL en poblaciones comerciales se encuentran dos que han sido particularmente utilizados en el vacuno de leche:

- El diseño de medio hermanos (denominado “Diseño Hijas” en vacuno de leche), en el que se analiza la presencia de QTL a partir de las diferencias fenotípicas entre los grupos de descendientes (medio-hermanos entre ellos) que han heredado alelos alternativos de un padre común heterocigoto para el/los marcadores (Giovambattista, 1998).

- El “Diseño Nietos”, aplicado específicamente en vacuno de leche, en el que se analizan las diferencias entre los descendientes machos que han heredado alelos alternativos

del padre común, pero en términos de valor genético predicho mediante un test de progenie (*i.e.* a partir de los fenotipos medidos en las nietas) (Giovambattista, 1998).

2.- Calidad del producto y metabolismo lipídico

El creciente interés por la calidad de los productos cárnicos ha dado lugar a que el porcentaje y la composición de la GIM constituyan en la actualidad objetivos de gran interés. Sin embargo, esto no siempre ha sido así; durante décadas el principal objetivo de la producción porcina era obtener la mayor cantidad de magro posible. Tal y como señalan Toro y Silió (1992), debido a una selección a favor del crecimiento y una menor deposición de grasa, caracteres como la GIM y la calidad de la carne se vieron afectados negativamente, al igual que la prolificidad de las cerdas y el apetito de los animales (Toro & Silió, 1992). Todo ello ha conducido a enfocar los objetivos actuales a la obtención de un producto final con un valor añadido y una mejor calidad.

2.1 Calidad de la carne y contenido de grasa intramuscular

Si bien parece que desde el punto de vista del consumidor la calidad de la carne viene determinada esencialmente por el sabor, la ternura y la jugosidad (Wood, 1989), la calidad de la carne en su conjunto está relacionada con parámetros de tipo sensorial, nutricional, dietético y tecnológico (García-Regueiro y Díaz, 1994; López-Bote *et al.*, 1998). En este sentido, la cantidad de GIM presente en la carne es un importante factor determinante de la calidad tanto sensorial como tecnológica y nutricional. La cantidad de GIM interviene sobre la palatabilidad de la carne afectando a la textura, la jugosidad y el sabor. Algunos autores han sugerido entre otras razones que la GIM tiende a acumularse entre los haces de fibras musculares, precisamente por donde comienza la rotura de las fibras durante la masticación (Purslow, 1985). Asimismo la GIM está relacionada con la capacidad de retención de agua, y un cierto porcentaje de GIM es indispensable para un adecuado flavor y una correcta maduración durante el proceso de secado de los productos curados (López-Bote, 1998; Chizzolini *et al.*, 1998). Por estos y otros motivos, entre los caracteres relacionados con la calidad de carne, la cantidad de GIM ha sido hasta la fecha uno de los caracteres más estudiados y es uno de los objetivos de selección más al alza.

2.2. Calidad de la carne y composición de la grasa intramuscular

La composición en ácidos grasos (AG) de la grasa muscular, así como el contenido en colesterol, muestran también un importante efecto sobre distintos parámetros de la calidad de carne: el flavor, la palatabilidad, las características tecnológicas y principalmente sobre su valor nutritivo (Cameron and Enser, 1991; Wood, 2008). El creciente interés por los productos saludables ha incrementado además la importancia de la composición de la grasa ligada a la carne. En este sentido, si bien la ingesta de carne de cerdo ha estado tradicionalmente sometida a recomendaciones de bajo consumo debido a su alto contenido en grasa, diversos trabajos han mostrado en los últimos años que el perfil de ácidos grasos de animales seleccionados genéticamente y/o sometidos a una alimentación especial (*e.g.* el cerdo ibérico) puede resultar incluso beneficioso para los humanos desde el punto de vista del riesgo cardiovascular (Martín Pena *et al.*, 1992; Steward *et al.*, 2001). Por ello, en la producción de porcino de calidad, no sólo deben tenerse en cuenta aspectos sensoriales, sino también insistir en la posibilidad de conseguir un producto que presente una composición en ácidos grasos compatible con una alimentación cardiosaludable.

Desde una perspectiva bioquímica, los ácidos grasos son moléculas formadas por cadenas de hidrocarburos no ramificadas con un residuo carboxílico (COOH) en uno de sus extremos (Frayn, 1998). Asimismo, los ácidos grasos se clasifican según el número de doble enlaces

presentes en la molécula como: ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados (ver tabla I.2). Las principales características de estos tres grupos de ácidos grasos son:

A) Ácidos grasos saturados (AGS)

Tienen enlaces simples entre los átomos de carbono. Desde el punto de vista dietético, diversos autores coinciden en que la ingestión de elevadas cantidades de AGS aumenta la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el plasma sanguíneo, con el consiguiente aumento en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Ventanas *et al.*, 2001). Dentro de los ácidos grasos saturados más representados en la carne de cerdo debemos destacar el ácido palmítico (C16:0), el ácido esteárico (C18:0) y, en menor instancia, el ácido mirístico (C14:0).

B) Ácidos grasos insaturados

Tienen uno o diversos enlaces dobles i/o triples en la cadena hidrocarbonada, y tienen un punto de fusión bajo por lo que muchas veces son líquidos a T^a ambiente. Los ácidos grasos insaturados más comunes de la carne, en general, según Swatland (1991) son: el oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3). Aunque, en nuestro caso, los más comunes son el oleico, linoleico, vacénico, palmítico y araquidónico, siendo el linolénico más minoritario.

Además, los ácidos grasos insaturados se dividen en dos categorías:

- Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

Presentan más de una insaturación en forma de doble enlace. Dentro de los Pufa encontramos los omega-3 i los omega-6 entre otros. Los omega-3 tienen el primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4, son abundantes en la grasa del pescado azul y las semillas de girasol. Son beneficiosos porque protegen de accidentes vasculares. Dentro de los omega-3 destaca el linolénico.

Los omega-6 tienen el primer doble enlace entre los carbonos 6 y 7, y un exceso es perjudicial para la salud ya que, pueden presentar inicios de placas de ateromas que causan accidentes vasculares. Destacan el linoleico y el araquidónico.

- Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA)

Presentan una única saturación en forma de doble enlace entre los carbonos 9 y 10 (caso del oleico) o entre los carbonos 7 y 8 (caso del vacénico o el palmitoleico). La importancia de los MUFA en prevención de enfermedades cardiovasculares ha estado revalorizada por nutrólogos y dietistas a partir del hecho constatado que son tan efectivos como los PUFA en disminuir los niveles de LDL-colesterol, pero sin reducir las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Ventanas, 2006). El ácido oleico es el principal representante de los MUFA.

En cuanto al impacto de la composición en ácidos grasos sobre las características tecnológicas de la carne, destacar su efecto sobre la firmeza de la grasa en función de las proporciones relativas de ácidos grasos saturados e insaturados, así como sobre la estabilidad oxidativa del músculo, repercutiendo en último término sobre el sabor de la carne. De este modo, los PUFA tienen mayor tendencia a sufrir procesos oxidativos, dando lugar a un sabor rancio y otras alteraciones indeseables, mientras que los AGS tienen una influencia positiva sobre el flavor y la firmeza y un elevado contenido en MUFA es particularmente importante para una adecuada maduración y flavor de los productos curados (López-Bote, 1998; Chizzolini *et al.*, 1998; Wood, 2008).

Tabla I.2 Nomenclatura Ácidos grasos más relevantes. (IUPAC 2001)

Nombre común	Nombre sistemático	Fórmula química
	Saturados	
Ácido Butírico	butanoico	4:0
Ácido Mirístico	tetradecanoico	14:0
Ácido Palmítico	hexadecanoico	16:0
Ácido Esteárico	octadecanoico	18:0
	Monoinsaturados	
Ácido Palmitoleico	hexadeca-9-enoico	16:1(ω -7)
Ácido Oleico	octadeca-9-enoico	18:1(ω -9)
Ácido Vacénico	octadeca-11-enoico	18:1(ω -7)
	Poliinsaturados	
Ácido Linoleico	octadeca-9,12-dienoico	18:2(ω -6)
Ácido γ -Linolenico	octadeca-6,9,12-trienoico	18:3(ω -6)
Ácido α -Linolenico	octadeca-9,12,15-trienoico	18:3(ω -3)
Ácido Araquidónico	eicosa-5,8,11,14-tetraenoico	20:4(ω -6)

Dentro de la composición de la grasa intramuscular, no debemos olvidar el contenido en colesterol, también con una cierta incidencia sobre la salud humana y una percepción negativa por parte del consumidor. A pesar de ello, el colesterol es un componente principal de la membrana plasmática porque le ofrece fluidez, permeabilidad y espesor (Crockett, 1998). Además, también actúa como precursor de la síntesis de la molécula de vitamina-D y hormonas esteroideas (progesterona, algunos estrógenos, testosterona y cortisol), e interviene en la producción de la bilis (García *et al.*, 1996)

2.3. Proceso de síntesis de los ácidos grasos y el colesterol: enzimas implicados

En los animales monogástricos, los AG procedentes de la dieta pueden ser oxidados o depositados en los tejidos adiposos, pero existe también síntesis *de novo* de AG. De este modo, los principales PUFA como son los AG omega-3 y omega-6 son etiquetados como ácidos grasos esenciales, por proceder exclusivamente de la dieta, mientras que los AGS y MUFA, particularmente el palmítico, esteárico y oleico proceden también de la síntesis de AG a partir de de la acetyl-CoA.

A diferencia de otras especies, en el cerdo es el tejido adiposo el que posee mayor actividad lipogénica, y donde se realiza por tanto la mayor parte de la síntesis de ácidos grasos (O'Hea & Leveille, 1969). La lipogénesis es la reacción bioquímica por la cual son sintetizados los ácidos grasos y unidos con el glicerol para formar triglicéridos o grasas de reserva. Su regulación ha sido ampliamente estudiada por diversos autores (*e.g.* Rothschild, 2003, 2004; Kollers *et al.*, 2005). Si nos fijamos en la figura I.6 podemos observar que la ruta principal de biosíntesis se produce en el citosol. La glucosa se metaboliza a piruvato por la vía de la glicólisis, luego en la mitocondria tiene lugar el ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs, donde mediante una serie de transformaciones, a partir del piruvato se genera citrato. Posteriormente, sale de la mitocondria al citosol y mediante la acción de la enzima ATP-citrato ligasa se combina con el acetyl-CoA, después se carboxila a malonil-CoA por acción de la enzima Acetyl-CoA carboxilasa o ACACA. El malonil se convierte entonces en precursor de los ácidos palmítico (C16:0) y mirístico (C14:0) mediante la acción de la enzima ácido

graso sintasa o *FASN*. A su vez, el palmítico será el precursor de los ácidos grasos saturados (*e.g.* ácido esteárico o C18:0) y de los ácidos grasos monoinsaturados (*e.g.* ácido oleico o C18:1 n-9; ácido palmitoleico o C16:1 n-9).

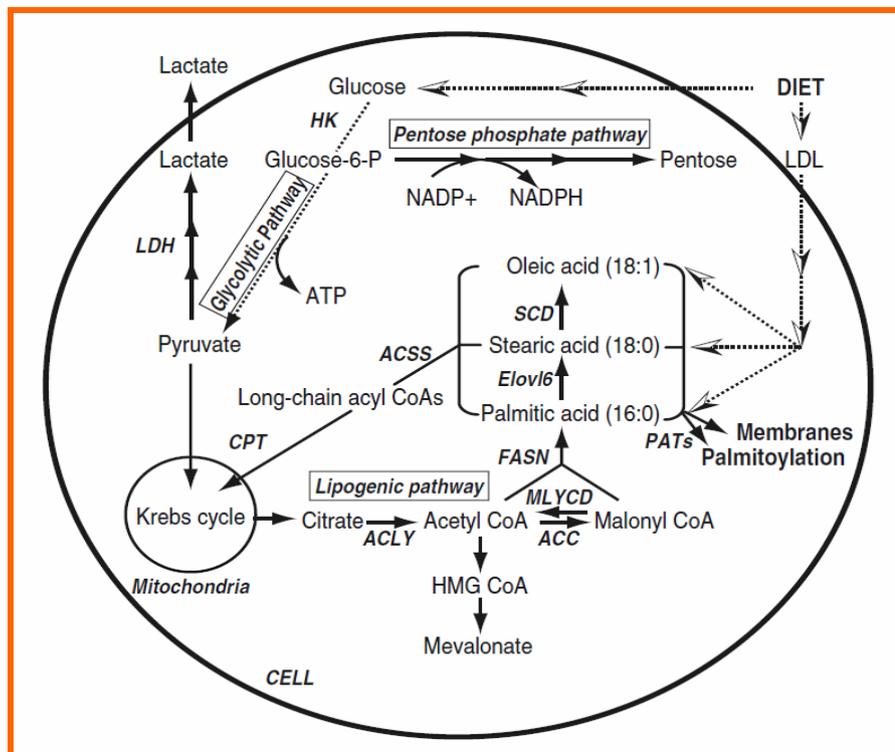


Figura I.6 Esquema de la lipogénesis (Chen *et al*, 2007b). *ACC*: Acetil-CoA carboxilasa; *ACLY*: ATP-citrato ligasa; *FASN*: ácido graso sintasa; *ACSS*: Acetil-Coa Sintetasa; *CPT*: carnitina palmitoiltransferasa; *Elov6*: ELOVL familia 6; *HK*: hexoquinasa; *LDH*: lactato deshidrogenasa; *LDL*: lipoproteínas de baja densidad; *MLYCD*: malonil-CoA descarboxilasa; *PAT*: palmitoil acil transferasas; y *SCD*: estearoil-CoA desaturasa.

Referente a la síntesis de colesterol debemos mencionar que puede sintetizarse en el retículo endoplasmático o puede proceder de la dieta (Charlton-Menys & Durrington, 2008). El órgano más importante en cuanto a biosíntesis *de novo* de colesterol es el hígado, allí tiene lugar una vía compleja cuya enzima principal es la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa o *HMG-CoA reductasa* (García *et al*, 1996).

Desde el punto de vista productivo y biomédico, puede ser de gran utilidad conocer brevemente algunos de los factores genéticos que regulan el metabolismo lipídico en porcino. Encontramos diversos puntos de regulación dentro del metabolismo de los AG y el colesterol. Entre otros, podemos mencionar los cambios que tienen lugar a nivel de transcripción, la regulación en el procesamiento del RNA mensajero y el proceso de estabilización de éste, o la actividad de varios factores de transcripción. Referente a los factores de transcripción, encontramos varios ejemplos como el caso del “*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*” o *PPAR* descrito en Lee *et al*. (1995), y el caso del “*Sterol Regulatory Element Binding Protein*” o *SREBP1* descrito en Kim (1996). Estos factores de transcripción regulan la expresión de diversos enzimas clave dentro las rutas metabólicas de los AG (Duran-Montgé, 2007). También encontramos factores de transcripción que actúan en la regulación del colesterol como por ejemplo el *SREBP*, descrito anteriormente, y el “*SREBP-cleavage activating protein*” o *SCAP*. Su función es regular la expresión de distintos loci (*e.g.* el del receptor de las lipoproteínas de baja densidad *LDLR* o la *HMG-CoA reductasa*).

3.- Interés de la raza Duroc dentro de este contexto

La raza Duroc (figura I.7) es originaria de Estados Unidos, donde surgió de la fusión entre la *Old Duroc* con la *Red Jersey* en el siglo XIX. Se distingue por ser una raza rústica y adaptable, de color rojo (variando del rojo amarillento al rojo oscuro), con unas orejas de tamaño mediano levemente erectas en su base con una inclinación hacia delante, y unas sólidas pezuñas y patas, que hacen del Duroc una excelente elección para condiciones difíciles de crianza, resistente a enfermedades y a climas cálidos (<http://www.razanostra.com/duroc.asp>).

En general, se sabe que esta raza tiene unas características productivas similares a otras razas de porcino (Tibau *et al.*, 1997) y se distingue por una mayor aceptabilidad de su carne debido a un mayor contenido de GIM en sus músculos (Barton-Gade, 1990; Edwards *et al.*, 1992; Oliver *et al.*, 1994). Generalmente, se acepta que su mayor nivel de GIM tiene una influencia positiva sobre las cualidades sensoriales de la carne y de los productos derivados. En este sentido, se sabe que la raza o tipo genético es el factor que determina en mayor parte el nivel de GIM que un cerdo puede alcanzar.

Según la revisión de Reixach (2004) existen numerosos estudios que indican la superioridad en contenido en GIM de la raza Duroc frente a las razas Large White, Landrace y Hampshire y sobre todo frente a las razas Pietrain y Landrace belga. Esta superioridad en contenido en GIM del Duroc respecto las demás razas, conjuntamente con otras características deseables inherentes al genotipo Duroc (rusticidad, docilidad, etc.), han provocado la inclusión de esta raza en muchos de los esquemas de selección actuales. Cabe destacar no obstante que dentro de la raza Duroc existe una variabilidad importante en el nivel de GIM, hasta el punto de que el porcentaje de GIM que aporta un animal Duroc de tipo finalizador, mejorado para el porcentaje de magro, puede ser similar al de una raza blanca (Reixach, 2004)



Figura I.7 Cerdas de raza Duroc.

La raza Duroc se introdujo en España en la década de los sesenta y se emplea habitualmente como línea paterna, tanto en cruzamientos a dos vías como a tres vías, ya que origina camadas muy amplias con lechones muy vigorosos al nacimiento, lo que disminuye sensiblemente la mortalidad en lactación. Es además una raza particularmente adecuada para el transformado de jamón y lomo, utilizándose masivamente para la producción a partir de cerdo blanco, como el Jamón de Trévez o de Teruel. En estos casos el interés esencial de la raza Duroc recae en su mayor infiltración de grasa que hace que estos productos mejoren en cuanto a calidad y sabor (<http://www.razanostra.com/duroc.asp>). También es adecuada para incrementar la producción de carne y jamón curado de buena calidad del cerdo ibérico (Dehesa de Extremadura, Jamón de Guijuelo y Jamón de Huelva), aprovechando en este caso la elevada GIM junto con las buenas aptitudes para el

crecimiento de la raza Duroc para obtener productos con mejores características (<http://www.razanostra.com/duroc.asp>).

Mucho menos frecuente es la utilización de la raza Duroc como línea materna, ya que aunque se le atribuye una mayor "resistencia" no supe con ello las mejores características maternas de razas como la Large White o Landrace. En España sí existen no obstante diversos esquemas de cruzamiento que utilizan la raza Duroc para la obtención de una hembra híbrida mediante cruces con animales de raza Landrace o Large White, o incluso de de tipo Ibérico (<http://www.razanostra.com/duroc.asp>).

Características varias de la raza Duroc (<http://www.razanostra.com/duroc.asp>):

Ganancia media diaria 20-90 Kg. (g/día).....	695
Índice de conversión 20-90 Kg. (kg/Kg).....	3.1
Lechones vivos/parto.....	10-10.5
Lechones destetados/parto.....	8-10

Características de la carne:

Rendimiento de la canal a los 90 Kg. sin cabeza.....	74 %
Longitud de la canal (cm.).....	93.5
% piezas nobles.....	61
% estimado de magro en la canal.....	52

4.- Estudio de la arquitectura genética de los caracteres relacionados con la cantidad y la composición de la grasa muscular

4.1 Parámetros genéticos

La mejora de la calidad de la carne en general y del perfil lipídico en particular dependerá en cualquier caso de que exista un cierto grado de determinismo genético para estos caracteres, *i.e.* de que estos caracteres sean heredables, y de su correlación genética con los caracteres productivos y/o reproductivos incluidos en los objetivos de selección. En este sentido, las heredabilidades de las principales características que definen la calidad de la carne (grasa intramuscular, terneza, capacidad de retención de agua, color, etc.), de manera general, toman valores moderados-altos, oscilando entre 0.25 y 0.50 (Tibau, 1998).

Respecto a los caracteres que enmarcan el presente trabajo, el contenido de GIM es el que ha sido objeto de un mayor número de trabajos encaminados al estudio de su determinismo genético (Knapp *et al.* 1997, Newcom *et al.* 2005, Suzuki *et al.* 2005, Suzuki *et al.* 2006). En la población Duroc analizada, Casellas *et al.* (2009) certifican una importante variabilidad genética para el contenido en GIM, obteniendo unas medias posteriores de 0.647 y 0.575 para las heredabilidades de la GIM en los músculos *gluteus medius* (GM) y *longissimus dorsi* (LD), respectivamente. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos previamente ($h^2 = 0.57$) por Solanes *et al.* (2009) en una muestra distinta de la misma línea comercial Duroc, y están comprendidos dentro del rango de estimaciones aportados en la bibliografía en distintas poblaciones porcinas (de 0.26 a 0.86; Sellier, 1998). Por su parte Suzuki *et al.* (2005) estimó algunos de los parámetros genéticos de caracteres relacionados con la calidad de carne en otra población de raza Duroc, obteniendo una heredabilidad de 0.39 para el contenido de GIM junto con algunas estimaciones de correlaciones genéticas entre la GIM y distintos parámetros de calidad. Un ejemplo es la correlación positiva entre GIM y capacidad de retención del agua, parámetro muy a tener en cuenta en la calidad de carne y principalmente en la maduración durante el proceso de secado de los productos curados. En un trabajo posterior, Suzuki *et al.* (2006) obtuvieron heredabilidades de 0.40 y 0.51 para la grasa intermuscular e intramuscular, respectivamente

En cuanto al perfil de ácidos grasos de la carne porcina, a pesar de su importancia para las características organolépticas y la salud humana, existen pocos trabajos que aporten estimaciones de los parámetros genéticos para composición de ácidos grasos en cerdos. En la población Duroc analizada, Casellas *et al.* (2009) obtienen heredabilidades medias-altas para la mayor parte de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en ambos músculos GM y LD, aunque para los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y araquidónico, y los porcentajes totales de omega-3 y omega-6, sólo obtuvieron heredabilidades de bajas a moderadas para el músculo GM. También Suzuki *et al.* (2006) obtuvieron heredabilidades para el contenido de ácidos grasos en otra población Duroc, obteniendo heredabilidades en muchos casos concordantes con las obtenidas en nuestra población por Casellas *et al.* (2009). Estos autores también estimaron correlaciones genéticas y fenotípicas de la grasa dorsal con el perfil de ácidos grasos, obteniendo correlaciones positivas con el contenido de ácidos grasos saturados, negativas con el ácido esteárico y linoleico, y nulas con el ácido oleico. Los datos de este estudio sugieren que la composición de ácidos grasos del tejido adiposo está correlacionada genéticamente con la calidad de la carne y de la canal. Por su parte Fernández *et al.* (2003) estimaron las heredabilidades de la composición de ácidos grasos de la grasa subcutánea en un cruce de cerdos Ibéricos, obteniendo unas heredabilidades para los ácidos esteárico, oleico, linoleico y palmítico que fluctuaron entre 0.29 (ácido linoleico) y 0.41 (ácido esteárico).

En su conjunto podemos decir que los resultados encontrados certifican la existencia de un relevante determinismo genético en los caracteres relacionados con la cantidad y composición de la grasa intramuscular, lo que justifica la realización de posteriores estudios orientados a la búsqueda de los loci implicados en la variabilidad genética de estos caracteres.

4.2 Estudios de QTL y Genes candidatos

4.2.1 Identificación de QTL

En el contexto de los trabajos enfocados a localizar regiones del genoma ligados al metabolismo lipídico cabe destacar como pionero el trabajo de Anderson *et al.* (1994), donde se encontraron diversos QTL con un efecto importante sobre el crecimiento y los depósitos de grasa. Posteriormente múltiples estudios sobre QTL se han llevado a cabo en la especie porcina que han dado lugar a que actualmente se hayan identificado 451 QTLs con efecto sobre el engrasamiento y 70 QTL con efecto sobre la composición de ácidos grasos (Pig QTL database, <http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>).

Concretamente respecto a los caracteres estudiados en este trabajo, cabe destacar que se han identificado varios QTL relacionados con el contenido de GIM en los cromosomas porcinos (SSC; *Sus Scrofa Chromosome*) 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 17 y X. También se han identificado varios QTL relacionados con la composición de los ácidos grasos, como por ejemplo en los SSC4 y 7 para ácido linoleico; en los SSC4, 10 y 18 para ácido mirístico; en los SSC4, 8 y 15 para ácido palmítico; en los SSC1, 4, 8 y 9 para ácido palmitoleico; en los SSC1, 4, 9 y X para ácido esteárico; y en los SSC4 y 15 para ácido oleico, entre otros (Ovilo *et al.*, 2002; Szida *et al.*, 2002; Clop *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2008; Nii *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2007).

En la tabla I.3 se muestra más detalladamente una lista de los trabajos más relevantes donde se han identificado alguno de los QTL anteriormente mencionados, en relación a la cantidad y composición de ácidos grasos. En ella vemos cómo varios de los QTL detectados en las distintas poblaciones muestran concordancia posicional, como por ejemplo, el QTL en el SSC4 para el ácido linoleico y ácido oleico, el QTL en el SSC10 para el ácido mirístico, o el QTL en el SSC8 y SSC14 para el ácido palmítico. En cambio para la GIM se han detectado múltiples QTL en distintos cromosomas y solamente el QTL descrito en el SSC6 fue detectado conjuntamente por Ovilo *et al.* (2002) y Szida *et al.* (2002). En cualquier caso, cabe destacar que todos los trabajos mencionados en la tabla I.3 se han realizado a partir de poblaciones experimentales (cruces F2), por lo que no podemos asegurar que estos QTL estén efectivamente segregando en poblaciones comerciales.

Tabla I.3 QTL detectados asociados a la cantidad y composición de la grasa intramuscular.

SSC	Carácter	Diseño	Referencia
6	GIM	F2	Ovilo <i>et al.</i> , 2002
1,3,15	GIM	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
6	GIM	F2	Szida <i>et al.</i> , 2002
7,9	GIM	F2	Sato <i>et al.</i> , 2003
4,7	Araquidónico	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
9,14	Esteárico	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
1,9,X	Esteárico	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
8	Esteárico	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
1,7,10,14	Linoleico	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
4	Linoleico	F2	Clop <i>et al.</i> , 2003
4,17	Linoleico	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
4,7,8	Linoleico	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
9	Mirístico	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
10	Mirístico	F2	Clop <i>et al.</i> , 2003
16	Mirístico	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
10	Mirístico	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
1,7,10,13	Oleico	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
8	Oleico	F2	Clop <i>et al.</i> , 2003
2,4	Oleico	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
4,7	Oleico	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
8,14,16	Palmítico	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
8	Palmítico	F2	Clop <i>et al.</i> , 2003
3,6,14,15	Palmítico	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
7,X	Palmítico	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
10,12	Palmitoleico	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
1,9	Palmitoleico	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
13	Palmitoleico	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
15	Vaccénico	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
14	AGS	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
9,15	AGS	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
7,8,X	AGS	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
1,5,10,13,14	MUFA	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
4,7	MUFA	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008
11,14	PUFA	F2	Sanchez <i>et al.</i> , 2007
5	PUFA	F2	Nii <i>et al.</i> , 2006
4,7,X	PUFA	F2	Guo <i>et al.</i> , 2008

4.2.2 Estudio de genes candidatos

El objetivo final de la mayoría de los trabajos en el ámbito de la genómica animal ha venido siendo la identificación de genes asociados a fenotipos para caracteres de interés productivo o de resistencia a enfermedades, bien abordando directamente el estudio de genes candidatos funcionales o bien localizando genes candidatos posicionales que pudieran ser responsables de los QTL descritos. Para muchos de estos genes candidatos se han detectado variaciones de DNA (polimorfismos) y se ha analizado su posible asociación con determinados caracteres de producción. Sin embargo y a pesar de los múltiples trabajos, hasta la fecha hay un escaso conocimiento sobre los genes con mutaciones responsables de QTL relevantes, lo cual limita mucho la aplicación de técnicas como la GAS (Ibeagha-Awemu, 2008).

La Tabla I.4 muestra algunos de los genes para los que se han identificado polimorfismos asociados a caracteres relacionados con el engrasamiento y las características de la carne en la especie porcina. De entre ellos cabe destacar el gen del receptor de la rianodina (*RYR1*), ampliamente estudiado en porcino por estar asociado al famoso síndrome de estrés porcino. La detección de la mutación no sinónima C1843T causante de este síndrome (Fuji et al. 1991; O'Brieny MacLennan, 1992) supuso un importante hito para la industria porcina. Este polimorfismo produce en aquellos animales con genotipo TT un aumento del porcentaje de magro y un aumento de la masa muscular, pero también son animales más propensos al estrés y con una carne de peor calidad en comparación con los animales homocigotos CC (Ibeagha-Awemu, 2008).

Tabla I.4 Variaciones de DNA o polimorfismos y sus relaciones con caracteres de engrasamiento de la carne en cerdos (Ibeagha-Awemu, 2008).

Nombre Gen	Símbolo	Variante RNA	Efecto sobre el carácter	Referencia
Variantes relacionadas con el engrasamiento				
Receptor Rianodina	RYR1	C1843T (Arg615Cys)	Los animales TT son magros y con exceso de musculatura resultando en una producción/rendimiento más magra que los animales homocigotos CC.	Fuji et al. 1991; O'Brieny MacLennan (1992)
Acetil coenzima A carboxilasa α	ACACA	c.5634T>C en exón 46 c.6681G > T en exón 54	Asociaciones altamente significativas con las concentraciones de los ácidos grasos esteárico, palmitoleico y vacénico. Efecto negativo del alelo c.5634C en el porcentaje de C18:0 y positivo en el C16:1 (n-9) y C18:1 (n-7). Efecto positivo del alelo c.6681G sobre C18:0.	Muñoz et al. (2007a)
Polipéptido inhibitorio gástrico	GIP	c.77A > G (Asp26Gly) c.394A > C (Met132Leu)	Efectos significativos con las concentraciones de los ácidos grasos palmitoleico y esteárico. Efecto positivo del alelo c.77A sobre C16:1 (n-9) y negativo sobre C18:0.	Muñoz et al. (2007a)

Centrándonos en estudios más recientes sobre genes relacionados con el metabolismo lipídico, cabe destacar el del gen que determina la síntesis de la enzima acetyl coenzima-A carboxilasa α (*ACACA*), en el que se han descrito dos polimorfismos asociados con la cantidad de grasa y el perfil de ácidos grasos en una población cruzada Ibérico×Landrace (Muñoz *et al.*, 2007a). En este mismo trabajo, Muñoz *et al.* (2007a) también describieron dos polimorfismos para un gen que determina la síntesis de un polipéptido inhibitorio gástrico (*GIP*) asociados a las concentraciones de los ácidos grasos palmitoleico y esteárico.

El gen *ACACA* ha sido también estudiado en la población Duroc objeto del presente estudio (Gallardo *et al.*, 2009a). En este trabajo se describen varios nuevos polimorfismos para este locus, y se observa una asociación entre un haplotipo para dos de estos polimorfismos con la cantidad de GIM, AGS, MUFA y PUFA del músculo LD (Gallardo *et al.* 2009a). Sin embargo, el hecho de que los polimorfismos detectados tanto por Muñoz *et al.* (2007a) como por Gallardo *et al.* (2009a) sean sinónimos o no codificantes conduce a que se descarten como mutación causal responsable de estos cambios fenotípicos.

Asimismo en la población Duroc analizada en la presente tesina se ha estudiado como gen candidato el gen de la *3-hidroxi-3-metilglutaril-coA reductasa (HMGCR)* porcino), el cual juega un papel importante en la variabilidad genética del metabolismo lipídico y del colesterol en porcino. El gen *HMGCR* ha mostrado diferencias a nivel de expresión asociadas a diversos caracteres del metabolismo lipídico, y asimismo un polimorfismo de DNA detectado en dicho locus ha mostrando una asociación con la concentración plasmática de LDL (Cánovas *et al.*, 2009a). Otro gen candidato analizado ha sido el de la *HDL-binding protein (HDLBP)*, cuya molécula está asociada a múltiples funciones relacionadas con el mantenimiento de la estructura de la heterocromatina y la regulación de la expresión génica, y cuya expresión podría estar modulada por los niveles intracelulares de colesterol; en la población Duroc analizada un polimorfismo detectado para este gen *HDLBP* ha mostrado una relevante asociación con la cantidad de GIM del músculo LD (Cánovas *et al.*, 2009b). Por último cabe mencionar el trabajo de Gallardo *et al.* (2009b) en el que se estudian las proteínas transportadoras de ácidos grasos (*FATPs*), cuya variabilidad puede alterar el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a las células, y en el que se han detectado relaciones significativas de algunos polimorfismos con los niveles séricos de lipoproteínas LDL, así como con el contenido en ácidos grasos saturados, particularmente con el contenido en ácido esteárico de la grasa intramuscular.

Por último mencionar que son muy numerosos los trabajos sobre genes candidatos llevados a cabo en otras poblaciones porcinas. Dada la imposibilidad de hacer una revisión de todos ellos, baste mencionar a modo de ejemplo el estudio del gen *H-FABP* que determina la proteína *heart fatty acid-binding*. Este gen se planteó como candidato para la grasa intramuscular, dado que se localiza en la región del cromosoma 6 porcino donde se ha detectado un importante QTL para este carácter (Ovilo *et al.* 2002; Árnayasi *et al.* 2006). Diversos trabajos han detectado polimorfismos de este gen (Gerbens *et al.*, 2000, 2001; Li *et al.* , 2006; Árnayasi *et al.*, 2006), describiéndose en todos ellos asociaciones más o menos importantes entre este gen y la cantidad de GIM en distintas poblaciones. En base sus resultados, Gerbens *et al.* (2000, 2001) sugieren el interés de implementar diversos polimorfismos del gen *H-FABP* en un esquema de selección asistida por marcadores para mejorar la GIM.

5.- Estudios de expresión mediante microarrays

Un *microarray* o chip de DNA es una red muy precisa de alta densidad en la que se encuentran representados de manera ordenada (*arrayed*) miles de genes; cada gen está representado por uno o más fragmentos específicos de DNA de una sola cadena (cDNA u oligonucleótido) inmovilizado sobre la superficie. Dicho de otro modo, un *microarray* de DNA es un formato experimental basado en la fijación de sondas (polinucleótidos que representan a los genes en estudio) a un substrato sólido (cristal, plástico, sílice), y posteriormente expuestos a las moléculas diana (la muestra) (ver revisiones de Harshman, 2002 y Dopazo, 2002).

Los *microarrays* de DNA representan por tanto una tecnología extremadamente útil con una amplia variedad de aplicaciones. Aunque la utilización de los *microarrays* de DNA para el análisis de variación de DNA (*e.g.* chips de SNPs) está en franca expansión, su aplicación más importante hasta la fecha ha venido siendo la monitorización de la expresión génica (abundancia de RNA mensajero) de un sistema biológico dado, ya sea una célula, un órgano o un tejido. En estos casos los *microarrays* de DNA nos permiten cuantificar el mRNA de las muestras estudiadas mediante ensayos de hibridación: el mRNA de las muestras, una vez extraído y marcado, es capaz de formar una doble cadena con las moléculas de DNA inmovilizadas en el chip que tengan una secuencia complementaria a la suya. El nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana, indicado generalmente mediante fluorescencia y medido por análisis de imagen, indicará el nivel de expresión del gen correspondiente a dicha sonda en la muestra analizada.

Todas las células de un organismo contienen un mismo genoma, pero existen diferencias fenotípicas entre ellas. El conjunto de genes que son expresados o transcritos a partir del DNA genómico, y que constituye el denominado “transcriptoma” o “perfil de expresión”, es un importante determinante del fenotipo y la función celular (Dopazo, 2002). Un experimento que permita medir el nivel de expresión de hasta miles de genes simultáneamente facilitará en gran medida la comprensión del funcionamiento del genoma de las células. En este sentido el *microarray* de DNA nos proporciona una potente herramienta para medir los niveles de mRNA de un elevado número de genes (Berger, 2005).

Respecto a los *microarrays* de DNA debemos mencionar también que existen dos modelos en cuanto al tipo de hibridación de los arrays. El primero de ellos está basado en la hibridación competitiva, en el que el array es hibridado simultáneamente con dos sondas generadas a partir del mRNA de las muestras a comparar (normalmente una muestra control con una muestra de estudio, por ejemplo, tejido normal vs tejido tumoral) y marcadas diferencialmente (normalmente con los fluorocromos Cy3 y Cy5, verde y rojo). El cociente de las intensidades de fluorescencia (Cy3/Cy5) en cada posición de DNA es una medida de la expresión génica comparada relativa al gen representado en esa posición del chip (Dopazo, 2002).

El segundo de ellos se basa en una hibridación no competitiva mediante el marcaje individual en arrays separados, es decir, cada chip se hibrida con una única muestra y hay un sólo marcaje fluorescente. Este es el caso de los *GeneChip* de *Affymetrix* (figura I.8) que se utilizarán en el presente trabajo. En estos arrays las sondas de oligonucleótidos son diseñadas y sintetizadas *in situ* sobre chips electrónicos de sílice, de manera que cada sonda tiene una longitud de 25 nucleótidos y cada gen está formado por varias sondas que forman parte de todo el locus genómico, lo que se denomina *group set* o grupo de sondas. Dentro de un *group*

set, cada sonda de 25 oligonucleótidos con la secuencia perfecta (*perfectmatch probe*) va acompañada de un control negativo, consistente en la misma secuencia con un cambio de base en el centro de la sonda (*missmatch probe*), de manera que así se puedan detectar y eliminar las hibridaciones inespecíficas y para poder obtener un rendimiento más robusto y preciso de la cuantificación absoluta del gen de interés (Pérez-Enciso, 2008; www.affymetrix.com). En la tecnología *GeneChip* se hibrida una sola muestra por *chip*, de manera que para la comparación de perfiles de expresión de un control y un tratamiento se comparan los resultados para cada gen en cada *chip* (Aguado, 2007).



Figura I.8 Dibujo microarray affymetrix (www.affymetrix.com).

5.1 Diseño experimental

Como sucede en cualquier experimento, los estudios basados en el análisis de expresión también deben de ser planificados adecuadamente. En la revisión de Imbeaud & Auffray (2005) se proponen 39 pasos a seguir (figura I.9) para los estudios de expresión de genes, que nos pueden servir de guía para la realización de un estudio de expresión génica. En el presente apartado nos vamos a centrar a la primera sección: el diseño experimental.

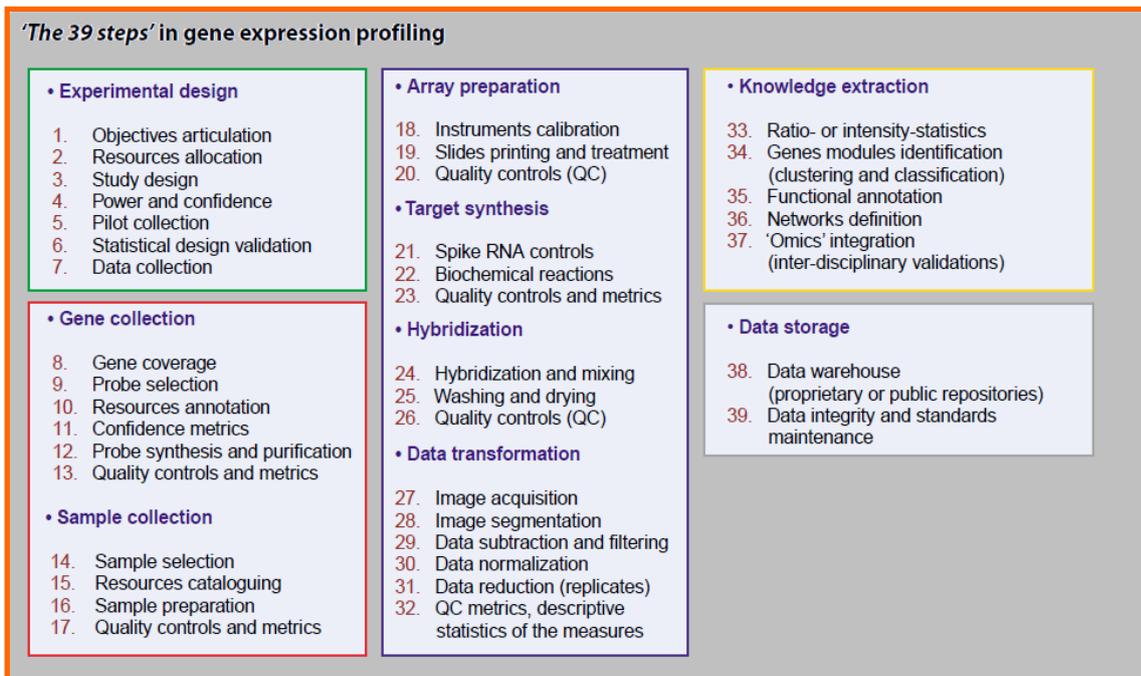


Figura I.9 Pasos a seguir para la realización de los estudios de perfiles de expresión génica según Imbeaud & Auffray (2005). Se destacan cinco secciones: diseño experimental (cuadro verde),

recolección datos (cuadro rojo), controles de calidad (cuadro azul), interpretación de los resultados (cuadro amarillo), y almacenamiento e intercambio de datos (cuadro gris).

Tal como señalan Imbeaud y Auffray (2005), el punto clave sobre el que debe fundamentarse el diseño experimental del estudio de microarrays es la definición de los objetivos del estudio. El objetivo más frecuente de los estudios de expresión llevados a cabo hasta la fecha ha sido el estudio de la expresión diferencial, en que se comparan los perfiles de expresión obtenidos de diferentes clases de muestras predefinidas. Dentro de este tipo de estudios hay dos tipos de objetivos que suelen ser de interés: 1) determinar si los perfiles de expresión difieren entre las clases; 2) identificar qué genes están diferencialmente expresados entre las clases e identificar los patrones de expresión diferencial. En este tipo de trabajos podemos encuadrar también los estudios de expresión encaminados a desarrollar un predictor multivariante de asociación de clases basado en el nivel de expresión de los genes seleccionados (Simon, 2002). Este tipo de trabajos, particularmente abordados en el ámbito de la medicina, tienen en muchos casos el objetivo final de poder realizar una *Predicción de pronósticos clínicos* a partir de la relación descrita entre los perfiles de expresión y los resultados clínicos (Simon, 2002). Por último mencionar que otro tipo de trabajos en el ámbito de los estudios de expresión, mucho más minoritarios que los citados anteriormente, son los orientados a estudiar la regulación de las rutas metabólicas, tratando de identificar aquellos genes que están siendo co-regulados o que intervienen en la misma ruta bioquímica.

Una vez determinado el objetivo, queda por determinar la elección de la fuente biológica (muestra) que necesitamos, los individuos que compondrían la muestra a analizar y el número de réplicas necesarias y/o suficientes para poder llegar a responder de una manera adecuada al objetivo marcado (Imbeaud & Auffray, 2005), lo cual supone también una elección nada trivial. Simon (2003) propone basarse en una hipótesis sencilla, como por ejemplo “si comparamos un tejido tumoral con el mismo tipo de tejido pero normal (no cancerígeno), existirán genes cuya expresión esta sobre-regulada o infra-regulada”. En esta línea, la realización de estudios de expresión diferencial se ha basado principalmente en diseños en los que se seleccionaban individuos pertenecientes a distintas categorías (*e.g.* enfermos *vs* sanos) o, en el caso del estudio de variables cuantitativas, la selección de grupos de individuos con distintos niveles (normalmente fenotipos extremos) para los caracteres en estudio, como se ha hecho en diversos estudios de expresión con animales domésticos (*e.g.* Moe *et al.* 2008; Davoli *et al.* 2007).

En cualquier caso no se debe olvidar que el número de microarrays y de réplicas necesarios dependerá de la variabilidad de los datos de expresión, de los objetivos del estudio (cuando pequeñas sean las diferencias de expresión que nosotros queramos detectar en nuestro experimento) y de la fiabilidad de la tecnología. En este sentido se deben valorar además aspectos como la posibilidad de utilizar muestras constituidas por pools de diversos individuos, lo que permite ganar potencia en los casos en que el objetivo se centra más en encontrar diferencias entre dos grupos y no resulta de interés el factor individuo; o bien la posibilidad de realizar réplicas técnicas para reducir la variación asociada al análisis. En cualquier caso, el número de arrays posibles dependerá finalmente de los recursos y el material biológico disponible para llevar a cabo el experimento (Reimers, <http://discover.nci.nih.gov/microarrayAnalysis/Experimental.Design.jsp>), y las limitaciones ligadas al coste económico del experimento constituirán en muchos casos el principal factor limitante del número de hibridaciones.

Finalmente, según el tipo de microarray (cDNA u oligonucleótidos) que escojamos, tendremos distintos diseños posibles a realizar. Muchos de los diseños descritos para los

estudios de expresión corresponden a los microarrays de cDNA de hibridación competitiva, para los que se han descrito diseños cruzados en que las muestras participan en dos hibridaciones marcadas con un fluorocromo distinto en cada una, o el diseño *loop* en que se conectan todas las muestras. También existe el “*diseño de referencia*” en el que comparamos todas las muestras con una muestra de referencia que a su vez puede ser un pool de cDNA (Pérez-Enciso, 2008).

Respecto al análisis estadístico, mencionar tan solo que la mayoría de los análisis de expresión diferencial realizados hasta la fecha se han abordado mediante una simple comparación de medias, radicando la principal complejidad de estos análisis en el tratamiento de la varianza residual asociada a cada sonda/gen y en el establecimiento de los umbrales de significación. Respecto a este último punto, atendiendo al elevadísimo número de test realizados conjuntamente, los umbrales nominales de significación estadística se traducirían en un número considerable de falsos positivos, y una corrección por multiple-testing como el caso de la corrección de Bonferroni sería demasiado conservador y ofrecería umbrales de significación demasiado restrictivos. En estas circunstancias algunos autores sugieren como más adecuado considerar simplemente un p-value nominal más conservador (*e.g.* Simon *et al.*, 2003 aconseja considerar un $p\text{-value} < 0.001$) o bien utilizar la probabilidad de que un resultado sea un falso positivo (el *False Discovery Rate*) como criterio de “corte” de los resultados de expresión.

5.2 Estudios de expresión

Los primeros estudios de expresión se realizaron para genes concretos mediante técnicas tales como el análisis Northern o diferentes tipos de PCR (Gladney, 2003; Wilson, 2002). Entre ellas, la PCR cuantitativa a tiempo real ha sido extensamente utilizada para medir la expresión génica mediante cuantificación de los niveles de mRNA. Dawson (2003) y Okomo-Adhiambo (2003), por ejemplo, han utilizado esta técnica para medir la respuesta inmune a enfermedades infecciosas. Sin embargo y a pesar de ser muy útiles, estas técnicas tienen limitaciones en cuanto a número de genes a considerar (Rothschild, 2003).

La aparición de los arrays utilizando secuencias de genes individuales para el reconocimiento de los niveles de expresión de cientos (más adelante miles) de transcritos en una célula o un tejido supuso una revolución en el ámbito de los estudios de expresión. La primera publicación acerca del uso de arrays fue llevada a cabo por Schena *et al.* (1995). Desde entonces, los objetivos de los distintos estudios llevados a cabo han ido cambiando. En muchos el objetivo ha sido comparar dos estados fisiológicos distintos (*e.g.* enfermos *vs* sanos) mediante el análisis de un solo tejido en muchos individuos (Ferraz, 2008). En otros, en cambio, se han comparado diferentes razas o líneas de cerdos, centrándose en uno o pocos tejidos para ganar potencia a la hora de cuantificar la variabilidad fenotípica relacionada con las diferencias a nivel transcriptómico, como por ejemplo, en Reiner-Benaim *et al.* (2007).

Actualmente, la metodología de los microarrays de DNA para el análisis de expresión génica está yendo en aumento. Ante la ausencia inicial de arrays de DNA porcino, diversos estudios de expresión en porcino se realizaron utilizando arrays de humano (Gladney, 2003; Moody, 2002). Sin embargo, los recientes avances en los estudios de secuencias de expresión (ESTs) en porcino han permitido los análisis de expresión con el uso de material porcino.

El primer proyecto relacionado con la expresión génica en la especie porcina fue el denominado PathoCHIP (<http://www.pathochipproject.com>), financiado por la Comunidad

Europea. En este proyecto se están utilizando arrays de cDNA para el estudio de enfermedades y la búsqueda de genes relacionados con la respuesta inmune. Más relacionado con el objetivo del trabajo que se presenta podemos mencionar el proyecto QualityPorkGENES (www.qualityporkgenes.com), en el cual se analiza la co-expresión de genes relacionados con la calidad de la carne. A modo de resumen, en el proyecto se han analizado cinco poblaciones distintas de cerdos en las que se han tenido en cuenta caracteres relacionados con el crecimiento, la respuesta al estrés, la composición de la canal y la calidad de carne. En dicho proyecto se han detectado diferencias de expresión respecto a caracteres de calidad de la carne en las razas Meishan y Duroc frente otras razas (Landrace, Large White y Pietrain). Actualmente el objetivo se centra en tratar de identificar posibles genes candidatos potenciales asociados a las variaciones de los caracteres de interés (http://ec.europa.eu/research/agriculture/projects/qlrt_2000_01888_en.htm).

Sin embargo y a pesar de la creciente utilización de la tecnología de microarrays, en la bibliografía científica son todavía escasos los estudios de expresión diferencial sobre caracteres relacionados con el metabolismo lipídico y la composición de ácidos grasos en porcino. Entre ellos podemos mencionar el estudio de MingZhou *et al.* (2008), donde se miran perfiles de expresión durante el desarrollo postnatal de la grasa dorsal en dos razas, Landrace y Taihu, y en el que se detectan genes expresados diferencialmente relacionados con caracteres de calidad de carne y canal, como el *FABP3*, el *LPL*, el *ME1*, el *SCD* y el *UCP2*.

En otros estudios, como por ejemplo el de Zhang *et al.* (2007), se realizó el análisis de expresión diferencial de adipocitos de cerdos tratados con y sin clenbuterol. Los resultados mostraron que el tratamiento con clenbuterol mejoraba el porcentaje de carne magra acerca de un 10%. Estos autores realizaron además un análisis ontológico en el que agrupaban los genes diferencialmente expresados más significativos en cuatro grupos: genes de metabolismo celular (incluyendo cinco genes relacionados con el metabolismo lipídico como la apolipoproteína D y la R), genes de transducción de señal, secuencias de expresión TAGs y otras categorías.

Por último, destacar el reciente trabajo de Wang *et al.* (2009) en el que se estudian las diferencias de expresión en el músculo LD entre dos líneas de cerdos con alto y bajo contenido de grasa intramuscular. En él se identifica el gen candidato *SFRS18* (*splicing factor serine-arginine rich protein*), el cual se sobreexpresa en el músculo LD de los individuos con alto contenido de grasa intramuscular.

OBJETIVOS

Este trabajo de investigación se enmarca dentro del proyecto LIPGENCAL (AGL2007-66707-C02-01), que lleva por título “*Mapeo e identificación de genes implicados en el metabolismo lipídico en porcino, la calidad de la carne y la calidad del jamón curado*”. El proyecto tiene como objetivo fundamental determinar la arquitectura genética de diversos caracteres relacionados con el metabolismo lipídico, en particular de aquellos vinculados al metabolismo del colesterol, la concentración de lipoproteínas plasmáticas y la composición de la grasa asociada a la carne y al jamón curado. Para ello se dispone de una población experimental de cinco familias de medio-hermanos generada a partir de una línea comercial de la raza Duroc, sobre la que existe numerosa información fenotípica y genómica disponible.

En este contexto, la presente Tesina de Máster se centra en el ámbito de la genómica estructural y funcional para el estudio de la arquitectura genética de caracteres relacionados con la cantidad y composición de la grasa muscular de dos músculos con elevado interés comercial: *gluteus medius* (GM) y *longissimus dorsi* (LD).

Los objetivos específicos de esta Tesina han sido:

1. Realizar un barrido genómico que nos permita identificar loci de caracteres cuantitativos (QTL) para la GIM, el contenido de colesterol y la composición de ácidos grasos de los músculos GM y LD en una población comercial de la raza Duroc.
2. Identificar genes que muestren una relación a nivel transcriptómico con los caracteres estudiados, mediante un experimento de expresión génica diferencial entre animales con niveles extremos para caracteres relacionados con el metabolismo de las grasas, llevado a cabo con tecnología de *microarrays*.
3. Profundizar en el estudio de las diferencias anatómicas en cuanto a la determinación genética de estos caracteres, mediante el análisis de las diferencias a nivel transcriptómico entre los músculos GM y LD.
4. Realizar una clasificación funcional a nivel biológico, celular y molecular de los genes que muestren una expresión diferencial vinculada a los músculos y a los niveles de parámetros lipídicos de los individuos, mediante la realización de un estudio ontológico de los genes diferencialmente expresados.
5. Hacer un estudio de concordancia posicional entre los QTL y los genes diferencialmente expresados con el fin de identificar genes candidatos posicionales y funcionales asociados a la cantidad y composición de la GIM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal y datos fenotípicos disponibles

El material animal procede de una población experimental de medio hermanos generada en el marco del proyecto de investigación “Arquitectura genética de los componentes lipídicos de la carne porcina relacionados con la calidad y la salud humana”. Dicha población se generó a partir de una línea comercial Duroc caracterizada por un alto contenido en GIM y utilizada para la producción de jamón curado de calidad, perteneciente a la empresa colaboradora en el proyecto, Selección Batallé S.A.

La población experimental está basada en un diseño de 5 familias de medios hermanos (figura II.1), generada a partir del apareamiento de 5 verracos con unas 400 hembras de la misma línea y seleccionando al azar un único descendiente macho de cada apareamiento en los casos que fue posible, tal y como se describe en Gallardo *et al.* (2008).

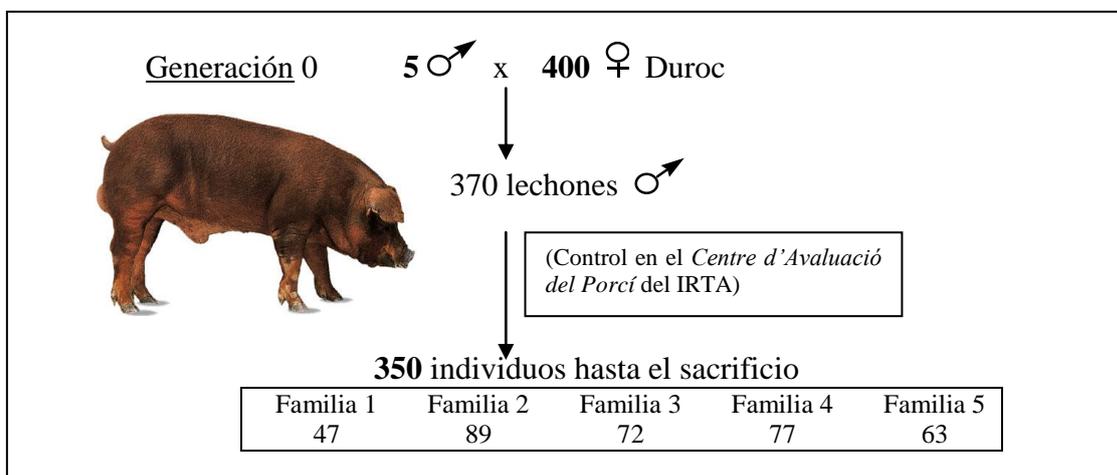


Figura II.1 Esquema de la población de medio-hermanos analizada

Estos animales fueron castrados antes del destete y fueron llevados al *Centre d'Avaluació de Porcí* (CAP-IRTA), donde estuvieron sujetos a unas mismas condiciones de manejo y alimentación.

Durante la etapa de engorde se registraron el consumo diario, así como el peso y el espesor de grasa dorsal a distintas edades. Además, se tomaron muestras de sangre a la edad aproximada de 45 y 190 días (el día anterior al sacrificio) para medir las concentraciones séricas de colesterol total (TC), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y triglicéridos (TG), tal y como se describe en Gallardo *et al.* (2008). En el momento del sacrificio (aproximadamente a los 190 d de edad, 122 kg de peso vivo) se registraron diversos caracteres relacionados con la calidad de la canal, y se tomaron muestras (200g) de los músculos GM y LD para la medición de la cantidad de GIM, la determinación de ácidos grasos en el intervalo C12 - C22 de la grasa muscular y del contenido de colesterol (Gallardo *et al.*, 2009a), así como de otros parámetros físico-químicos (pH, CE y color). En total, se dispone para estos animales de un total de 85 fenotipos relacionados con eficiencia alimentaria, crecimiento, estado de engrasamiento, y calidad de la canal y de la carne. El presente trabajo se centrará no obstante en el estudio de los caracteres relacionados con la cantidad y composición de la GIM se recogen en la Tabla III.1 del apartado de Resultados.

Adicionalmente se tomaron muestras de diversos tejidos (hígado, grasa dorsal en distintos puntos, y los músculos GM y LD) para la posterior extracción de RNA y realización de los experimentos de expresión génica. Estas muestras se tomaron en el momento del sacrificio y fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta el análisis.

Microsatélites disponibles

Se disponía del genotipo de todos los animales de la población más los cinco machos parentales para un total de 110 microsatélites informativos repartidos a lo largo del genoma. Una descripción detallada de los microsatélites genotipados y su mapa de ligamiento puede encontrarse en Gallardo *et al.* (2008).

Análisis de QTL para los caracteres de cantidad y composición de grasa intramuscular

El estudio fue llevado a cabo por la aproximación descrita por Knott *et al.* (1996) para el análisis de familias de medios hermanos utilizando el software QTL express (Seaton *et al.*, 2002), disponible en <http://qtl.cap.ed.ac.uk/>. El modelo asumido en la búsqueda de los QTL fue:

1) Análisis de toda la población:

$$y_{ijk} = \mu + b_i + \beta \text{cov}_{ijk} + \sum_{j=1}^5 \alpha_j p_{ijk} + e_{ijk}$$

2) Análisis por familias (para cada familia de hermanos paternos):

$$y_{ik} = \mu + b_i + \beta \text{cov}_{ik} + \alpha p_{ik} + e_{ik}$$

donde:

y_{ijk} representa las observaciones fenotípicas (Tabla III.1) del individuo k , perteneciente al lote i e hijo del macho j ;

b_i efecto sistemático del lote i -ésimo (4 niveles);

β y cov_{ijk} son, respectivamente, el coeficiente de regresión y la covariada que varía según el carácter: grasa dorsal (o peso vivo) para GIM, o GIM para contenido de AG;

p_{ij} es la probabilidad de que un individuo k herede un alelo determinado del padre j , calculado en todas las localizaciones putativas del genoma (cada 1 cM) por la aproximación desarrollada por Knott *et al.* (1996);

α es el coeficiente de regresión de los fenotipos bajo la probabilidad de haber heredado un alelo dado del padre en común. El caso del análisis conjunto de toda la población, el modelo considera en cada posición los cinco efectos de sustitución correspondientes a los 5 padres.

Diseño del experimento de expresión

Para el estudio de expresión génica diferencial en animales con características metabólicas extremas se llevó a cabo un análisis multivariante previo teniendo en cuenta aquellos

fenotipos directamente o indirectamente relacionados con el metabolismo lipídico y la composición de la grasa. Tras los primeros análisis, se seleccionaron 13 caracteres (ver figura II.2) como los principales descriptores de la variabilidad fenotípica global en relación al metabolismo lipídico y la composición de la grasa ligada al músculo, con los que se realizó un análisis de componentes principales con el procedimiento PRINCOMP de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). La selección final de los animales de los grupos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos se realizó en función de un índice derivado del primer componente principal. La figura II.2 muestra, para los dos primeros componentes principales, la posición de los animales seleccionados para los grupos Alto y Bajo, así como la posición relativa de las variables consideradas en dichos componentes principales.

Caracteres PRINCOMP

Colesterol sérico

HDL

LDL

Triglicéridos

Peso Vivo

Grasa Dorsal *in vivo*

Grasa Dorsal 3-4 cost.

Grasa Dorsal Jamón

%Magro

%Grasa Intramuscular

%AG Saturados

%AG Poliinsaturados

%AG Monoinsaturados

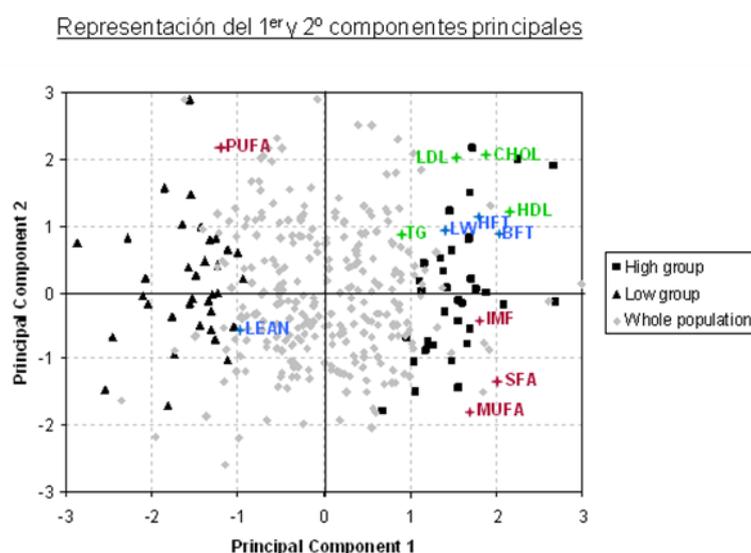


Figura II.2 Variables incluidas en el análisis de componentes principales, y representación gráfica la posición relativa de estas variables y los animales de la población y de los grupos seleccionados para el primer y segundo componente principal.

El experimento completo contempla además el estudio de las diferencias de expresión entre varios tejidos (los músculos LD y GM, el hígado y la grasa subcutánea), habiéndose realizado la extracción de RNA de un total de 268 muestras de estos tejidos en 104 animales correspondientes a los grupos de Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos.

No obstante, para este primer estudio se ha dispuesto solamente de los datos de expresión de 87 muestras de los músculos GM (68 muestras) y LD (19 muestras), correspondientes a un total de 68 animales de ambos grupos con valores extremos para el conjunto de parámetros lipídicos (34 datos grupo Alto y 34 datos grupo Bajo), tal y como se describe en la Tabla II.1.

Tabla II.1 *Experimento de expresión génica.* Datos de microarrays de *Affymetrix* disponibles para el presente trabajo.

	Grupo ALTO ^a	Grupo BAJO ^a	TOTAL arrays
Músculo GM	34	34	68
Músculo LD	10	9	19

^a Grupos de animales con niveles ALTO y BAJO de parámetros lipídicos, según el análisis de componentes principales.

Aislamiento muestras RNA

En el proceso de aislamiento del RNA total utilizamos un mortero y nitrógeno líquido para las distintas muestras de tejido, que a continuación se homogenizaron con un rotor mecánico. Posteriormente, el RNA fue aislado con el método del ácido fenol (Chomczynski and Sacchi, 1987) usando el Kid RiboPure (Ambion, Austin, TX). Finalmente, el RNA fue cuantificado en el espectrofotómetro Nanodrop-100 y su pureza e integridad fueron comprobadas en un Bioanalyser-2100 (Agilent Technologies, Inc.).

Hibridación microarrays

Se realizó una hibridación no competitiva de las muestras mediante el chip *GeneChip Porcine Genome Array* (Affymetrix) en el Centro de Investigación del *Hospital Universitari Vall d'Hebron*. Este chip se caracteriza por disponer de una batería de 23,937 sondas correspondientes a 20,201 genes (Figura II.3).

Critical Specifications	
Number of probe sets, <i>Sus scrofa</i>	23,937
Number of transcripts, <i>Sus scrofa</i>	23,256
Total # of probe sets including species specific controls	23,973
Number of arrays in set	One
Array format	100
Feature size	11 μ m
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	11
Hybridization controls:	<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> from <i>E. coli</i> and <i>cre</i> from P1 Bacteriophage
Poly-A controls:	<i>dap</i> , <i>lys</i> , <i>phe</i> , <i>thr</i> , <i>trp</i> from <i>B. subtilis</i>
Housekeeping/Control genes:	Porcine genes from Test3 Array: Alpha Actin, Angiotensinbinding protein, CTLA4, Erythropoietin receptor, GAPDH, inflammatory response protein 6, and Leptin. Additionally, there are newly selected control probe sets for Beta Actin (ACTB), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD, G3PD, GAPDH), Eukaryotic elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1).
Detection sensitivity	1:100,000*

* As measured by detection in comparative analysis between a complex target containing spiked control transcriptions and a complex target with no spikes.

Figura II.3 Especificaciones del *GeneChip Porcine Genome Array* (Affymetrix).

Los paquetes de “AFFY” y “SYMPLEAFFY” del proyecto Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) fueron utilizados para evaluar la calidad de las muestras de RNA y los procesos de marcaje e hibridación (Wilson & Miller, 2005). Esto incluye comparación de la señal de fondo, intensidad del factor de escala, porcentaje de genes nombrados, y el cociente de intensidad 3’/5’ del control de pruebas en todos los arrays.

Para la normalización de los datos se utilizó el algoritmo gcRMA incluido en la versión 3.7.1 del software BRB-ArrayTools (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>), el cual corrige la intensidad de cada una de las sondas por el contenido de GC (Li & Wong, 2001). Asimismo, todas aquellas sondas que mostraron una variación mínima en la batería de arrays analizados se excluyeron de los análisis posteriores. De este modo, tan solo se consideraron en el análisis aquellas sondas cuya expresión difería 1.5 veces respecto a la media como mínimo en el 20% de los arrays. Del total de los 23937 puntos, 4296 puntos pasaron las condiciones del filtro.

Análisis de los datos de expresión

Con el fin de detectar genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD y entre los grupos con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos, se llevó a cabo un análisis conjunto de todos los arrays disponibles (87 arrays en total, ver tabla II.1) considerando ambos efectos, a pesar del desequilibrio del diseño. Para ello se realizó un análisis de varianza a dos vías mediante un software específico para el análisis de datos de expresión, el BRB-Array Tools (Xu *et al.*, 2008), cuya principal particularidad es que permite analizar conjuntamente los resultados de expresión para un elevado número de sondas considerando la heterogeneidad de varianzas entre sondas. De este modo, el software BRB-ArrayTools considera una variancia residual para cada sonda ponderada por el background (variabilidad de la expresión de todas las sondas). Asimismo el BRB-Array Tools permite, para cada test individual (comparación de los niveles de RNA de una sonda en dos clases determinadas), el cálculo del p-value mediante permutación de los datos y el False Discovery Rate obtenido mediante el procedimiento propuesto por Benjamini y Hochberg (1995).

Los datos de expresión filtrados y normalizados se analizaron con el BRB-ArrayTools utilizando la aplicación de análisis de varianza (dentro de Class Comparison), considerando el siguiente modelo de efectos fijos:

$$y_{jkl(i)} = m_{j(i)} + g_{k(i)} + e_{jkl(i)}$$

donde

$y_{jkl(i)}$ es el l-ésimo dato de expresión correspondiente al gen i, y perteneciente al músculo j y al grupo k;

$m_{j(i)}$ es el efecto del músculo j (2 niveles, GM y LD), dentro de gen;

$g_{k(i)}$ es el efecto del grupo k (2 niveles, Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos), dentro de gen;

$e_{jkl(i)}$ es el residuo correspondiente a la observación, con distribución $N(0, \sigma_i)$.

Como criterios para seleccionar los genes como diferencialmente expresados entre músculos y/o grupos se tomó un p-value inferior a 0.001, tal y como recomienda Simon (2008), y un False Discovery Rate inferior a 0.05. Asimismo y a efectos de interpretar los cambios en la expresión, se calculó la “tasa de cambio” (fold-change) para cada sonda a partir del cociente entre los valores medios de expresión en las distintas clases de los efectos analizados.

Por último y dada la imposibilidad de testar la interacción grupo*músculo con los programas disponibles, ésta se evaluó de un modo no formal mediante la comparación de las tasas de cambio entre las clases (GM vs LD, o Alto vs Bajo) dentro de cada una de las clases del otro efecto (dentro de grupo o dentro de músculo, respectivamente).

Estudio ontológico

Posteriormente se realizó un análisis ontológico para clasificar desde una perspectiva funcional los genes diferencialmente expresados. El estudio ontológico tiene como finalidad unificar de un modo jerárquico la información genómica disponible, en este caso dos listas de

genes con expresión diferencial, de manera que clasifica a cada uno de los genes o productos génicos en categorías de tipo Biológico, Molecular o Celular que, a su vez, se dividen en sub-categorías interrelacionadas entre sí por un identificador único.

Para llevar a cabo el estudio ontológico de los genes diferencialmente expresados entre músculos y entre grupos se utilizó el paquete de herramientas bioinformáticas DAVID (Huang *et al.*, 2009), disponible en <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>.

Correspondencia entre resultados de QTL y transcriptómica

Finalmente se realizó una búsqueda de genes diferencialmente expresados en los intervalos de confianza de los QTL detectados, a fin de elaborar una lista de genes candidatos posicionales y funcionales, utilizando la aplicación para el alineamiento de los elementos *Affymetrix* incluida en Pig QTL DataBase (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>).

RESULTADOS

VARIABLES RELACIONADAS CON LA CANTIDAD Y COMPOSICIÓN DE LA GRASA INTRAMUSCULAR EN LOS MÚSCULOS *longissimus dorsi* Y *gluteus medius*

En la tabla III.1 se pueden observar los valores fenotípicos relativos a las variables analizadas en el estudio de QTL: porcentaje de GIM, contenido de colesterol y composición de los ácidos grasos mayoritarios en los músculos GM y LD. Respecto al porcentaje de GIM se observa una mayor deposición en el músculo GM (5.21%) frente al músculo LD (3.91%), resultado también destacable en el caso del contenido de colesterol con una media de 64.65 mg/g en el músculo GM frente a una media de 58.60 en el músculo LD. A pesar de estas diferencias en lo referente al contenido de grasa y de colesterol, los músculos LD y GM no diferían sustancialmente en el perfil de ácidos grasos. Como esperábamos, el ácido oleico ha sido el ácido graso mayoritario tanto en el músculo GM (35.10%) como en el LD (34.92%), seguido del ácido palmítico (23.22% en GM y 23.47% en LD) y el ácido linoleico (14.95% en GM y 14.16% en LD).

Tabla III.1 Media y desviación estándar (SD) fenotípicas del contenido y la composición lipídica en los músculos GM y LD.

CARACTER	SÍMBOLO	<i>gluteus medius</i>		<i>longissimus dorsi</i>	
		MEDIA	SD	MEDIA	SD
Grasa intramuscular (%)	GIM	5.21	2.05	3.91	1.53
Contenido colesterol (mg/g)	COL	64.65	11.06	58.6	9.45
Mirístico (%)	C14:0	1.39	0.23	1.37	0.28
Palmítico (%)	C16:0	23.22	1.42	23.47	1.63
Palmitoleico (%)	C16:1(n-7)	2.82	0.49	2.98	0.59
Esteárico (%)	C18:0	11.21	1.12	11.71	1.21
Oleico (%)	C18:1(n-9)	35.1	4.48	34.92	5.18
Vaccénico (%)	C18:1(n-7)	4.06	0.31	4.28	0.34
Linoleico (%)	C18:2	14.95	4.1	14.16	5.11
Araquidónico (%)	C20:4	3.2	1.55	3.53	1.81

Identificación de QTL para grasa intramuscular, contenido de colesterol y composición de ácidos grasos en los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius*

Un primer análisis de QTL (tabla III.2) con el conjunto de todos los datos disponibles ha permitido identificar 4 y 2 QTL afectando el porcentaje de GIM en los músculos GM (en SSC 1, 3, 6 y 7) y LD (en SSC 3 y 13) respectivamente. Todos ellos a excepción del QTL para GIM_GM del SSC1 fueron significativos independientemente de la covariable utilizada en el análisis (peso vivo o grasa dorsal), si bien en el caso del SSC 3 la localización del QTL se modificó sustancialmente. Estos resultados son consistentes con la existencia de un QTL para el carácter espesor de grasa dorsal encontrado en esta misma población Duroc en posiciones cercanas a las de los QTL del SSC1 y SSC3 (resultados no mostrados en tablas).

Tabla III.2 QTL para la GIM (%) de los músculos GM y LD detectados en el análisis conjunto de toda la población.

<i>gluteus medius</i>								
Covariable Peso								
SSC	POS	F	P-value					
			Nominal	Fam.1	Fam.2	Fam.3	Fam.4	Fam.5
1	62cM	2.67 ⁺	0.0219	-1.085	0.213	0.034	-1.484**	0.724
3	28cM	3.00 ⁺	0.0115	-0.847	-0.715	1.731**	-0.108	-0.768
6	92cM	3.68 ⁺	0.0029	2.412**	0.58	-1.103*	0.108	1.351
7	133cM	3.75 ⁺⁺	0.0025	-2.787**	0.411	-0.627	-0.254	-0.85
Covariable Grasa dorsal								
SSC	POS	F	P-value					
			Nominal	Fam.1	Fam.2	Fam.3	Fam.4	Fam.5
3	15cM	3.10 ⁺	0.0094	-0.712	-0.257	1.655**	0.074	-1.479*
6	92cM	3.43 ⁺	0.0049	2.381**	0.501	-0.892	0.259	0.882
7	133cM	3.55 ⁺	0.0038	-2.752**	0.157	-0.547	-0.311	-0.425
<i>longissimus dorsi</i>								
Covariable Peso								
SSC	POS	F	P-value					
			Nominal	Fam.1	Fam.2	Fam.3	Fam.4	Fam.5
3	33cM	3.33 ⁺	0.0059	-0.551	-1.134**	0.467	-0.035	0.141
13	111cM	2.63 ⁺	0.0237	0.655	-0.174	-1.230**	0.406	-0.698
Covariable Grasa dorsal								
SSC	POS	F	P-value					
			Nominal	Fam.1	Fam.2	Fam.3	Fam.4	Fam.5
3	86cM	4.72*	0.0003	0.624	-0.868**	-0.012	-0.218	-1.276**
13	108cM	2.85 ⁺	0.0154	0.658	-0.445	-0.998*(*)	0.383	-0.855

^a * p<0.05 a nivel genómico; ++ p<0.01 a nivel cromosómico; + 0.01<p<0.05 a nivel cromosómico.

En lo que respecta al contenido en colesterol en músculo (tabla III.3), cabe destacar los resultados obtenidos en el cromosoma 11, donde se han detectado sendos QTL vinculados a la concentración de colesterol en ambos músculos, GM y LD, siendo uno de ellos significativo a nivel genómico. Este es el único QTL significativo para este carácter en el músculo GM,

mientras que en el músculo LD hay cinco posiciones más que alcanzan la significación a nivel cromosómico, en los cromosomas 1, 6, 8, 14 y 18.

Tabla III.3 QTL para el contenido de colesterol (mg/g) de los músculos GM y LD detectados en el análisis conjunto de toda la población.

<i>gluteus medius</i>								
Efectos de sustitución dentro de familias								
SSC	POS	F	P-value Nominal	Fam. 1	Fam. 2	Fam. 3	Fam. 4	Fam. 5
11	33	3.10 ⁺	0.0094	7.868	-5.219	-6.107*	-7.999*	-4.568
<i>longissimus dorsi</i>								
Efectos de sustitución dentro de familias								
SSC	POS	F	P-value Nominal	Fam. 1	Fam. 2	Fam. 3	Fam. 4	Fam. 5
1	28cM	2.78 ⁺	0.0177	-7.334*	-0.925	-6.152*	-3.522	-3.064
6	40cM	2.87 ⁺	0.0148	4.828	12.057**	-3.7	-1.627	3.194
8	27cM	2.63 ⁺	0.0237	0.938	-5.181	-1.912	9.012*	-11.572
11	64cM	4.47*	0.0006	12.129**	3.344	-3.687	0.766	-9.324**
14	79cM	3.31 ⁺	0.0062	-5.43	-4.695	6.551*	6.796*	5.069
18	40cM	3.40 ⁺	0.0052	6.675	0.797	5.505*	-2.398	19.409**

^a * p<0.05 a nivel genómico; + 0.01<p<0.05 a nivel cromosómico.

Para la composición de ácidos grasos, en el análisis conjunto de toda la población se detectaron 21 QTL en el músculo GM (tabla III.4) y 11 QTL en el músculo LD (tabla III.5) con un efecto significativo sobre el porcentaje de uno o más ácidos grasos o sobre índices relacionados. De entre ellos destacar el QTL encontrado en el cromosoma 12 vinculado a la cantidad de ácidos grasos saturados del músculo LD, el único que alcanzó la significación a nivel genómico. Asimismo destacar la falta de concordancia posicional entre los QTL detectados para los dos músculos analizados, con escasas excepciones como los QTL para el ácido vacénico encontrados en los cromosomas 6 y 7.

Analizando en su conjunto los resultados obtenidos en el análisis de QTL llevado a cabo en el conjunto de la población (tablas III.2-III.5), pueden observarse que existen importantes diferencias entre familias. En la mayoría de los casos los efectos medios de sustitución estimados para cada uno de los machos parentales en las posiciones más probables de los QTL diferían notablemente en magnitud, y en ningún caso se ha visto un efecto medio significativamente distinto a cero en todas las familias conjuntamente. Estos resultados sugerían posibles diferencias entre los loci que están segregando en las distintas familias paternas. Por este motivo, también se procedió a un segundo análisis de QTL dentro familias. Los resultados de estos análisis se muestran en las tablas III.6, III.7, III.8 y III.9.

Tabla III.4 QTL para la composición de ácidos grasos del músculo GM detectados en el análisis conjunto de toda la población.

Efectos de sustitución dentro de familias									
SSC	Carácter	F	P-value Nominal	POS	Fam. 1	Fam. 2	Fam. 3	Fam. 4	Fam. 5
2	Vaccénico	2.96 ⁺	0.0124	93cM	0.291	-0.041	-0.117	0.263**	-0.624
3	Vaccénico	2.64 ⁺	0.0233	15cM	0.003	0.213*	0.119	0.011	-0.004
5	Mirístico	3.25 ⁺	0.007	89cM	-0.128	-0.061	0.059	0.289**	0.007
6	Vaccénico	3.15 ⁺	0.0085	73cM	0.353*	-0.146	-0.287*	-0.026	-0.079
7	Palmítico	2.95 ⁺	0.0127	70cM	1.247*	0.11	0.463	-0.417	0.542
7	Vaccénico	3.83⁺⁺	0.0022	82cM	-0.111	0.125	0.254**	0.059	0.106
7	Linoleico	2.74 ⁺	0.0191	80cM	0.621	-0.615	-3.037**	-0.278	-2.492
8	Mirístico	3.54 ⁺	0.0039	76cM	-0.008	-0.032	-0.055	0.184**	0.249*
8	Linoleico	2.71 ⁺	0.0203	0cM	-2.528	-1.363	-3.150*	2.357*	2.481
11	Palmitoleico	3.43 ⁺	0.0049	69cM	0.402*	-0.27	-0.207	-0.148	-0.344*
12	Vaccénico	2.87 ⁺	0.0148	73cM	0.277*	-0.174	-0.077	0.148*	0.022
14	Palmitoleico	3.14 ⁺	0.0087	50cM	-0.427*	0.302	-0.271	0.324	0.095
14	Esteárico	3.61 ⁺	0.0034	45cM	1.415**	-0.201	0.313	0.988*	0.263
15	Oleico	3.41 ⁺	0.0051	66cM	-1.188	3.874	-3.399*	-2.620*	2.419
15	Linoleico	3.54 ⁺	0.0039	66cM	0.592	-3.1	3.394**	2.065*	-2.003
15	Araquidónico	2.91 ⁺	0.0137	63cM	0.035	-1.685*	1.080*	0.675	-0.616
15	MUFA	3.31 ⁺	0.0062	66cM	-1.218	3.928	-3.773*	-2.808*	2.567
15	PUFA	3.37 ⁺	0.0055	66cM	0.683	-5.467	4.839**	2.936	-2.671
15	Omega 6	3.45 ⁺	0.0047	66cM	0.5697	-5.265	4.595**	2.821*	-2.685
18	Palmítico	3.44 ⁺	0.0048	35cM	1.095*	0.643*	0.776**	0.226	-0.524
18	SAT	3.28 ⁺	0.0066	37cM	1.584*	1.003*	1.013*	-0.285	-0.621

^a ++ p<0.01 a nivel cromosómico; + 0.01<p<0.05 a nivel cromosómico.

Tabla III.5 QTL para la composición de ácidos grasos del músculo LD detectados en el análisis conjunto de toda la población

Efectos de sustitución dentro de familias									
SSC	Carácter	F	P-value Nominal	POS	Fam. 1	Fam. 2	Fam. 3	Fam. 4	
4	Palmítico	2.53 ⁺	0.0288	74cM	-0.676	-0.769*	-0.251	-0.765	
6	Palmitoleico	2.78 ⁺	0.0177	107cM	-0.051	-0.350**	-0.101	-0.342	
6	Vaccénico	2.60 ⁺	0.0251	96cM	-0.013	-0.263**	-0.065	0.007	
7	Vaccénico	3.32 ⁺	0.0061	76cM	0.136	0.230**	0.177*	0.071	
12	Palmítico	2.80 ⁺	0.017	74cM	-0.314	0.988*	0.218	-0.824**	
12	Esteárico	3.65 ⁺	0.0031	65cM	-1.973**	0.39	-0.027	-0.810**	
12	SAT	4.29[*]	0.0008	73cM	-1.889*	1.646*	0.25	-1.635**	
14	Vaccénico	3.98⁺⁺	0.0016	91cM	-0.318*	0.276**	0.182*	0.194	
14	Esteárico	3.09 ⁺	0.0096	85cM	1.225*(*)	-0.026	0.222	-0.008	
14	Mirístico	2.78 ⁺	0.0177	11cM	0.179	0.115(*)	-0.120	0.179*	
16	Mirístico	3.03 ⁺	0.0108	19cM	0.178*	-0.078	-0.228**	-0.056	

^a * p<0.05 a nivel genómico; ++ p<0.01 a nivel cromosómico; + 0.01<p<0.05 a nivel cromosómico.

El análisis intra-familia permitió confirmar varios de los QTL anteriormente detectados en el análisis conjunto de la población, si bien hubo cambios sustanciales en la significación de algunos de ellos. Asimismo, también hubo algunos QTL que no aparecieron como significativos en este segundo análisis y otros QTL que tan solo resultaron significativos en el análisis intra-familia. Estas discrepancias entre los resultados obtenidos en ambos análisis pueden ser debidas a varias razones, tal y como señalaba Knott (2005) al referirse a las diferencias en los QTL obtenidos en distintos análisis en poblaciones outbred y Gallardo *et al.* (2008) en el caso concreto de la población analizada. Por un lado, los padres tan solo resultan informativos cuando estos son heterocigotos para el marcador y el QTL, y a esto se añade que las fases de ligamiento entre los alelos del QTL y el marcador pueden variar entre familias. Teniendo en cuenta que los análisis conjuntos asumen un máximo común para todas las familias, las diferencias entre la informatividad de los marcadores y los patrones de segregación entre familias podrían explicar las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en el análisis intra-familia. Por último las diferencias de potencia ligadas a los distintos tamaños familiares, así como las diferencias en la estimación de los efectos fijos y covariables también podrían haber intervenido en la obtención de distintos resultados. En resumen, las discrepancias entre los resultados obtenidos en ambos análisis deben interpretarse con cautela, ya que resulta difícil discernir si se deben a factores genéticos o experimentales. La realización de estudios más potentes con un mayor número de individuos contribuirá a dilucidar estas cuestiones.

Tabla III.6 QTL para la GIM (%) de los músculos GM y LD detectados en los análisis intra-familia.

<i>gluteus medius</i>									
Covariable Peso					Covariable Grasa dorsal				
SSC	FAM	F	P-value nominal	POS	Ef. medio (SD)	F	P-value nominal	POS	Ef. medio (SD)
1	4	10.10++	0.0022	63cM	-1.553(0.489)	-	-	-	-
3	3	12.90*	0.0006	28cM	2.035(0.567)	12.64*	0.0007	15cM	1.721(0.484)
6	1	9.88+	0.003	92cM	2.514(0.800)	11.70++	0.0014	92cM	2.653(0.776)
7	1	16.11**	0.0002	133cM	-2.750(0.685)	16.48**	0.0002	133cM	-2.798(0.689)
11	1	-	-	-	-	9.24+	0.004	19cM	2.741(0.902)
15	5	8.37+	0.0053	98cM	2.107(0.728)	-	-	-	-
<i>longissimus dorsi</i>									
Covariable Peso					Covariable Grasa dorsal				
SSC	FAM	F	P-value nominal	POS	Ef. medio (SD)	F	P-value nominal	POS	Ef. medio (SD)
1	4	13.31*	0.0005	66cM	-1.025(0.281)	-	-	-	-
3	2	11.57++	0.001	33cM	-1.123(0.330)	10.24++	0.0019	53cM	-1.149(0.359)
3	5	-	-	-	-	10.73++	0.0018	85cM	-1.227(0.374)
13	2	-	-	-	-	9.46+	0.0028	58cM	-1.006(0.327)
13	3	7.60+	0.0075	113cM	-1.187(0.430)	-	-	-	-
17	2	9.05+	0.0034	11cM	-1.040(0.346)	8.85+	0.0038	9cM	-0.953(0.320)

^a ** p<0.01 a nivel genómico; * p<0.05 a nivel genómico; ++ p<0.01 a nivel cromosómico; + 0.01<p<0.05 a nivel cromosómico.

A diferencia del análisis conjunto de toda la población, en el análisis intra-familia se han identificado un número importante de QTL significativos a nivel genómico que aparentemente están segregando en al menos una de las familias. De este modo, para el porcentaje de GIM (tabla III.6) se observa un QTL altamente significativo a nivel genómico (p-value<0.01) para la GIM del GM en el cromosoma 7. En los SSC1 y 3 se observan

asimismo QTL afectando la GIM de ambos músculos (GM y LD), siendo dos de ellos significativos a nivel genómico (p -value <0.05). Al igual que en el análisis conjunto de toda la población, los QTL del SSC1 pierden significación cuando consideramos la covariable grasa dorsal en el modelo y el del SSC3 cambia su posición más probable.

En referencia al contenido de colesterol, el análisis intra-familias (tabla III.7) permitió confirmar algunos de los QTL anteriormente descritos si bien no siempre se mantuvo su relevancia. El resultado más destacable para este carácter fue el QTL altamente significativo (p -value <0.01 a nivel genómico) del cromosoma 6 detectado en una de las familias, así como el QTL del SSC11, con efectos similares sobre el contenido en colesterol de ambos músculos, GM y LD.

Tabla III.7 QTL para el contenido en colesterol (mg/g) de los músculos GM y detectados en los análisis intra-familia.

<i>gluteus medius</i>					
SSC	Fam.	F-value	P-value nominal	POS	Ef. medio (SD)
11	4	8.27+	0.0053	69cM	-8.875(3.085)
<i>longissimus dorsi</i>					
SSC	Fam.	F-value	P-value nominal	POS	Ef. medio (SD)
6	2	16.57**	0.0001	35cM	14.063(3.455)
8	4	9.30+	0.0032	41cM	12.486(4.094)
11	1	7.87+	0.0075	63cM	10.954(3.904)
11	5	11.25++	0.0014	71cM	-10.020(2.987)
14	4	11.42++	0.0012	40cM	13.095(3.874)
17	5	8.39+	0.0053	0cM	7.665(2.646)
18	5	8.59+	0.0048	6cM	9.946(3.394)

^a ** $p<0.01$ a nivel genómico; ++ $p<0.01$ a nivel cromosómico; + $0.01<p<0.05$ a nivel cromosómico.

Respecto al perfil de ácidos grasos de la grasa asociada a los músculos estudiados, también se identificaron varios QTL significativos a nivel genómico, la mayor parte de ellos para el músculo GM. De este modo, en la tabla III.8 se observan dos QTL altamente significativos ($p<0.01$ a nivel genómico) en los cromosomas 7 y 18 relacionados con los ácidos vacénico y palmítico respectivamente; así como otros dos QTL ($p<0.05$ a nivel genómico) en los cromosomas 3 y 5 ligados al contenido en ácidos vacénico y palmítico del músculo GM.

En cuanto al músculo LD (tabla III.9), también a nivel genómico se detectaron tres QTL: para ácido vacénico en el cromosoma 6, para el contenido total de ácidos grasos saturados en el cromosoma 12, y para ácido esteárico en el cromosoma 14.

Tabla III.8 QTL para la composición de ácidos grasos del músculo GM detectados en los análisis intra-familia.

SSC	Carácter	Fam.	F	P-value nominal	Posición	Ef. medio (SD)
1	Palmítico	2	9.04+	0.0044	8cM	-1.465(0.487)
3	SAT	2	7.56+	0.0073	23cM	-1.084(0.394)
3	SAT	1	9.12+	0.0042	86cM	-2.217(0.734)
3	Vaccénico	2	12.95*	0.0005	15cM	0.207(0.058)
4	Palmítico	5	8.11+	0.0060	90cM	-1.378(0.484)
5	Mirístico	4	13.98*	0.0004	94cM	0.346(0.092)
5	Palmitoleico	4	9.55+	0.0028	86cM	0.568(0.184)
5	Esteárico	4	9.24+	0.0033	79cM	-1.124(0.370)
6	Vaccénico	2	7.74+	0.0066	120cM	-0.208(0.075)
6	Vaccénico	3	9.40+	0.0031	59cM	-0.324(0.106)
7	Palmítico	1	7.72+	0.008	79cM	1.597(0.575)
7	Vaccénico	3	17.60**	0.0001	81cM	0.250(0.060)
7	Linoleico	3	8.73+	0.0043	82cM	-2.915(0.986)
7	MUFA	3	7.96+	0.0062	82cM	3.493(1.238)
7	PUFA	3	7.71+	0.0071	82cM	-4.029(1.451)
7	Omega 6	3	7.70+	0.0071	82cM	-3.904(1.407)
8	Mirístico	4	9.17+	0.0034	69cM	0.229(0.076)
8	Vaccénico	5	9.72+	0.0028	0cM	-0.297(0.095)
11	Palmitoleico	1	7.91+	0.0073	71cM	0.409(0.145)
13	Esteárico	5	11.82++	0.0011	73cM	-0.758(0.220)
13	Mirístico	1	9.88+	0.0030	101cM	0.166(0.053)
13	Linoleico	5	9.16+	0.0036	72cM	2.777(0.917)
13	PUFA	5	7.70+	0.0074	72cM	3.949(1.423)
13	Omega 6	5	7.47+	0.0082	72cM	3.681(1.347)
14	Esteárico	1	9.15+	0.0041	42cM	1.358(0.449)
14	Linoleico	4	7.69+	0.0070	40cM	-4.536(1.636)
15	Linoleico	3	7.85+	0.0066	67 cM	3.295(1.176)
15	PUFA	3	7.52+	0.0078	64cM	4.870(1.781)
15	Omega 6	3	7.50+	0.0078	65cM	4.679(1.708)
15	PUFA/MUFA	3	7.64+	0.0073	63cM	0.182(0.066)
18	Palmítico	3	15.67**	0.0002	39cM	0.912(0.230)
18	SAT	3	14.46*	0.0004	40cM	1.302(0.342)

^a ** p<0.01 a nivel genómico; * p<0.05 a nivel genómico; ++ p<0.01 a nivel cromosómico; + 0.01<p<0.05 a nivel cromosómico.

Tal y como puede observarse en las tablas III.6-III.9, además de los QTL anteriormente mencionados se ha identificado un número mucho mayor de QTL significativos nivel cromosómico pero que no alcanzan el umbral de significación a nivel genómico, y que en cualquier caso deberán confirmarse con una muestra mayor de animales. Asimismo en estas tablas puede observarse la existencia de algunas regiones cromosómicas con efecto sobre más de uno de los caracteres relacionados con la cantidad y composición de grasa muscular en los cromosomas 3, 6, 7, 11, 12, 13, 14 y 15, sugiriendo la posible existencia de pleiotropía.

Tabla III.9 QTL para la composición de ácidos grasos del músculo LD detectados en los análisis intra-familia.

SSC	Carácter	Fam.	F	P-value nominal	POS	Ef. medio (SD)
1	Vaccénico	3	9.36+	0.0033	54cM	0.258(0.084)
4	Palmítico	1	7.58+	0.0087	70cM	-0.882(0.320)
4	Linoleico	4	8.30+	0.0052	46cM	3.119(1.083)
4	PUFA	4	7.73+	0.0069	46cM	4.392(1.579)
4	Omega 6	4	7.80+	0.0066	46cM	4.258(1.525)
6	Vaccénico	2	14.56*	0.0003	95cM	-0.275(0.072)
7	Vaccénico	2	11.19++	0.0012	75cM	0.230(0.069)
12	Palmítico	4	9.37+	0.0031	74cM	-0.809(0.264)
12	Esteárico	4	7.90+	0.0063	69cM	-0.714(0.254)
12	SAT	4	13.31*	0.0005	74cM	-1.534(0.421)
12	Palmitoleico	1	8.27+	0.0062	74cM	0.527(0.183)
12	Esteárico	1	9.94+	0.0029	62cM	-2.168(0.688)
12	Vaccénico	1	8.22+	0.0063	80cM	0.598(0.209)
13	Esteárico	5	11.76++	0.0011	56cM	-1.028(0.300)
13	Mirístico	4	7.58+	0.0074	101cM	-0.148(0.054)
14	Esteárico	5	12.28*	0.0009	85cM	-1.110(0.317)
14	Vaccénico	2	11.24++	0.0012	68cM	0.410(0.122)
16	Mirístico	1	11.24++	0.0017	18cM	0.185(0.055)
16	Mirístico	3	11.48++	0.0012	43cM	-0.178(0.053)
17	Mirístico	5	8.39+	0.0053	44cM	0.181(0.062)

^a * p<0.05 a nivel genómico; ++ p<0.01 a nivel cromosómico; + 0.01<p<0.05 a nivel cromosómico.

Estudio de expresión diferencial entre los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* y entre los grupos con niveles alto y bajo de parámetros lipídicos

El análisis de varianza considerando los efectos músculo y grupo y heterogeneidad de varianzas entre sondas nos proporcionó una lista de sondas (genes) que mostraban expresión diferencial considerando un umbral de significación de $p < 0.001$ y un $FDR < 0.05$. La figura III.1 muestra el número de sondas diferencialmente expresadas entre los músculos LD y GM (350, correspondientes a 292 genes) y entre los grupos de animales con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos (579 sondas, correspondientes a 459 genes). Debemos por tanto señalar en primer lugar que el efecto “grupo de metabolismo lipídico” conlleva un mayor número de diferencias en expresión que las asociadas a pertenecer a distintos músculos, si bien como veremos más adelante estas diferencias son en los casos más extremos de menor magnitud. De entre los genes diferencialmente expresados, tan solo 35 genes mostraron expresión diferencial simultáneamente para ambos efectos, músculo y grupo.

Número sondas

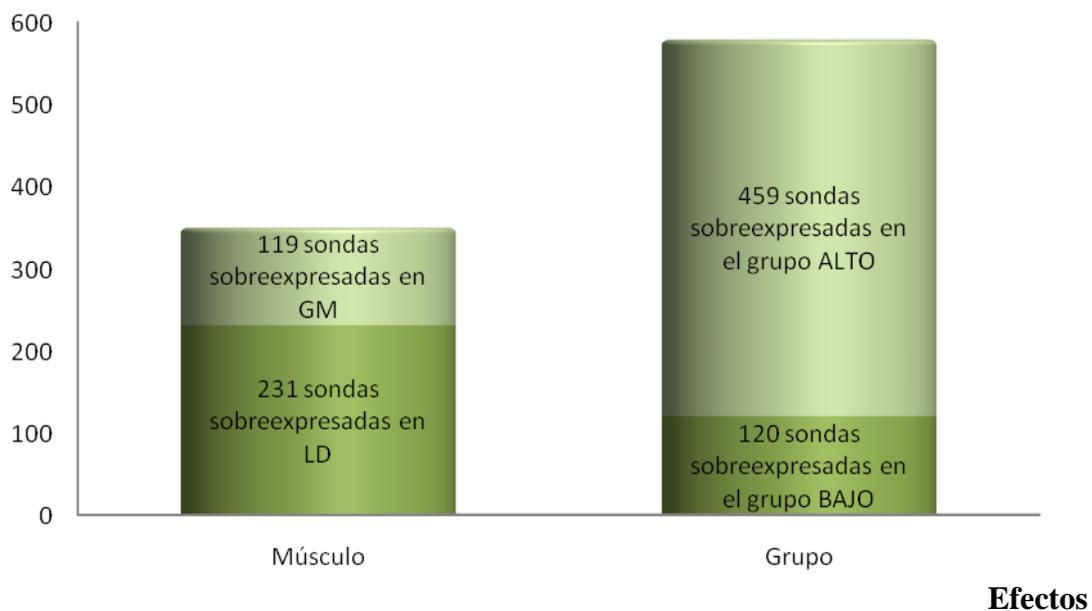


Figura III.1 Número de sondas diferencialmente expresadas entre los músculos GM y LD y entre los grupos con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos con el programa BRB-ArrayTools.

De la figura III.1 debemos también destacar que hubo un mayor número de sondas sobreexpresadas en el músculo LD (231, correspondientes a 196 genes; en color verde oscuro) frente a las sondas que se sobreexpresaban en músculo GM (119, correspondientes a 96 genes; en color verde claro). Asimismo, una elevadísima proporción (80%) de las sondas diferencialmente expresadas entre grupos de metabolismo lipídico mostraron sobreexpresión en los individuos del grupo Alto (459 sondas correspondientes a 376 genes; en color verde claro). Estos resultados concuerdan con los observados por Cánovas *et al.* (2008), quienes trabajando con un único tejido encontraron un claro predominio de los genes sobreexpresados en animales con valores elevados de parámetros lipídicos. Estos resultados estarían indicando

una sobreactividad transcripcional para un importante número de genes en aquellos individuos con un mayor nivel de engrasamiento, lípidos en sangre y deposición de grasa intramuscular.

En la figura III.2 se muestra la distribución de los p-value y de los FDR de todas las sondas diferencialmente expresadas entre músculos (GM y LD) y entre grupos (niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos). Puede observarse cómo el criterio por el cual se establece el “umbral de corte” puede llevarnos a resultados cuantitativamente (en términos de número de sondas que se consideran diferencialmente expresadas) muy distintos. Si bien en los análisis de expresión donde se llevan a cabo un ingente número de análisis de modo simultáneo el FDR parece un criterio más adecuado que el p-value, en el presente análisis preliminar en el que analizaban dos efectos en un diseño considerablemente desequilibrado se ha preferido incorporar los dos parámetros (p-value y FDR) como criterio de corte. La figura III.2 muestra claramente cómo en la comparación de la expresión entre músculos y a pesar de los menores p-value, hay un mayor grado de incertidumbre que se traduce en mayores probabilidades de que se trate de un resultado falsamente positivo. Esta circunstancia, probablemente ligada al mayor desequilibrio en el diseño (68 muestras de GM vs 19 muestras de LD) y en consecuencia el mayor error en la estimación de las diferencias, esperamos se subsanará parcialmente cuando se disponga de la totalidad de los datos de expresión del músculo LD.

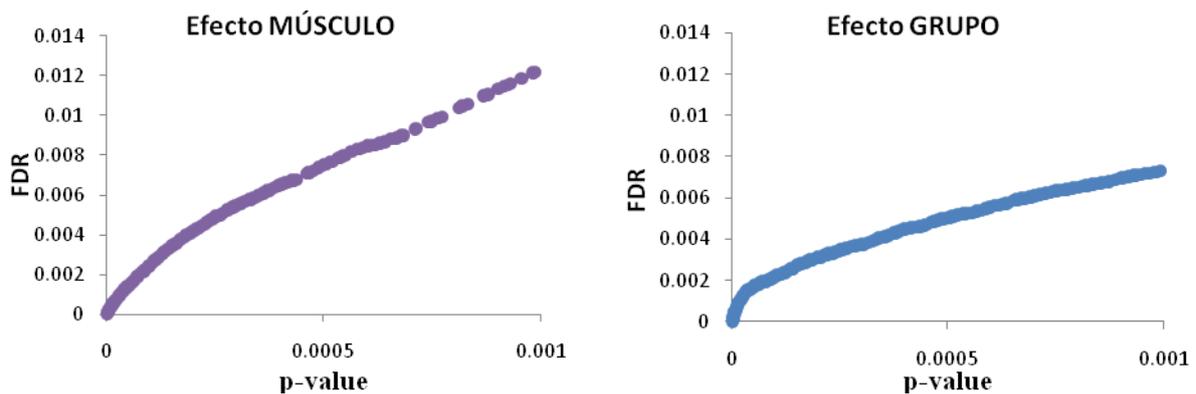


Figura III.2 Distribución de los p-value y FDR de los genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD (efecto Músculo) y entre los grupos con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos (efecto Grupo).

Para poder evaluar en mayor detalle las diferencias de expresión entre músculos y entre grupos, se estudiaron también las tasas de cambio (Fold-change) entre clases, definidas como el cociente entre la expresión media de cada sonda dentro de las dos clases de cada efecto. En la figura III.3 se representan en escala logarítmica dichas tasas de cambio para las sondas diferencialmente expresadas entre los músculos LD y GM. Para todas las sondas diferencialmente expresadas entre los músculos, este cociente entre las expresiones medias mostraba una tasa superior al 20% de sobre/infraexpresión en uno de los músculos. La figura III.3 permite apreciar además cómo, a pesar de haber un mayor número de sondas sobreexpresadas en el músculo LD (como ya hemos dicho anteriormente), el rango de las diferencias en cuanto a niveles de expresión es mayor en el caso de las sondas sobreexpresadas en el músculo GM, donde 55 sondas (43 genes) superaron el 50% de sobreexpresión en GM vs LD y llegaron incluso a encontrarse sondas que se expresaban hasta 8 veces más en el músculo GM que el músculo LD.

De la misma manera, la figura III.4 muestra la dispersión de las tasas de cambio entre las sondas diferencialmente expresadas entre individuos con niveles extremos para diversos caracteres relacionados con el metabolismo lipídico. En este caso, y a pesar de que haya un número considerablemente mayor de genes diferencialmente expresadas, cabe señalar que el rango de sobre/infra-expresión es considerablemente menor que en el caso del efecto músculo.

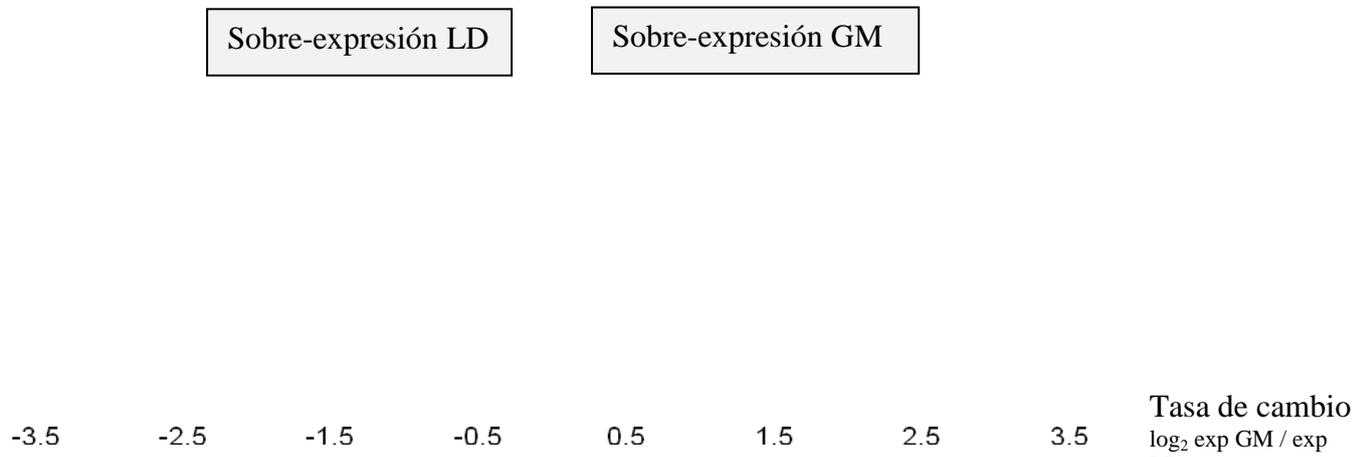


Figura III.3 Tasa de cambio de los genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD.

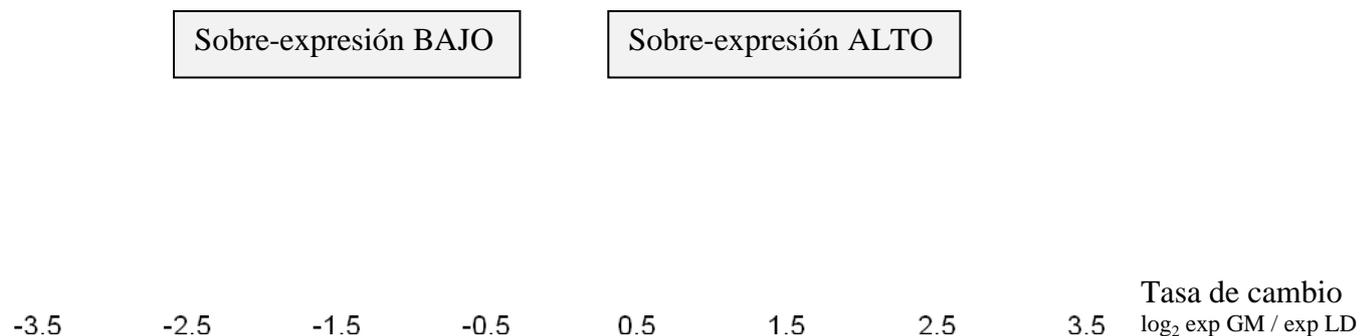


Figura III.4 Tasa de cambio de los genes diferencialmente expresados entre los grupos con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos.

Asimismo y a efectos de evaluar la posible existencia de interacción entre los efectos músculo y grupo de parámetros lipídicos, dada la imposibilidad de hacer este análisis de forma sistemática en todas las sondas con los software disponibles, se analizaron las tasas de cambio de la expresión en las distintas combinaciones músculo*grupo. Las figuras III.5 (6) muestran, para aquellas sondas que resultaron diferencialmente expresadas entre músculos (grupos), la dispersión de las “tasas de cambio” de las expresiones entre músculos (grupos) dentro de cada subclase del efecto grupo (músculo). En ambos casos podemos apreciar cómo las tasas de cambio siguen una tendencia lineal, y tan solo para un reducido número de sondas la tasa de cambio de las expresiones entre grupos (figura III.6) difiere notablemente o llega a invertirse entre los músculos LD y GM. Estos resultados, si bien no constituyen un contraste formal que nos permita descartar de forma concluyente la existencia de interacción en todos los casos, avalan en cierta medida y para la mayor parte de las sondas el modelo aditivo sin interacción entre los efectos utilizado en el análisis de expresión.

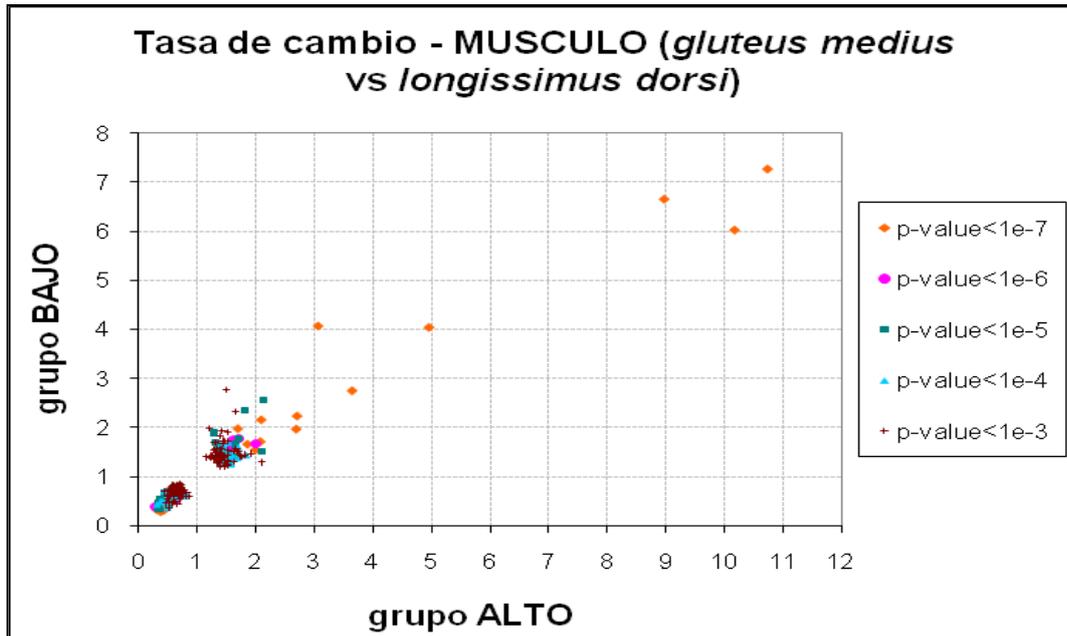


Figura III.5 Distribución de la tasa de cambio de los genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD dentro de los grupos Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos.

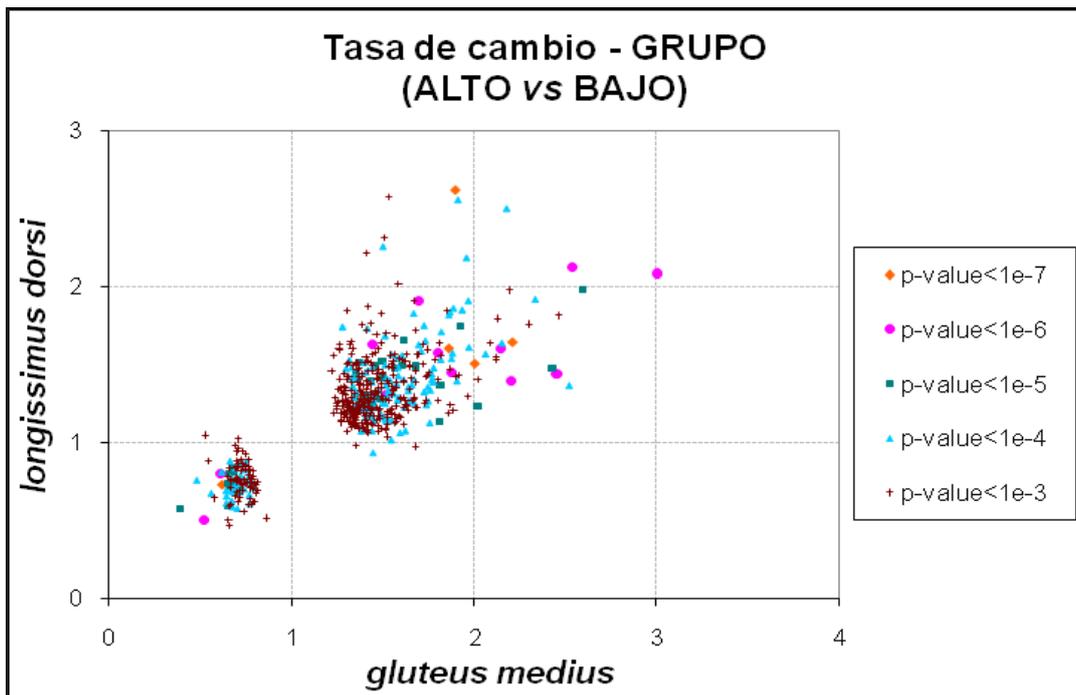


Figura III.6 Distribución de la tasa de cambio de los genes diferencialmente expresados entre los grupos con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos dentro de los músculos GM y LD.

Por último y tras asignar las sondas a los genes correspondientes utilizando la notación proporcionada por Affymetrix, se confeccionó una relación de los genes con resultados más relevantes en términos de expresión diferencial entre músculos y entre grupos. La tabla III.10 muestra dicha relación de genes, pudiéndose distinguir 4 grupos correspondientes a: 1) genes sobreexpresados en el músculo LD (cuadro verde); 2) genes sobreexpresados en el músculo GM (cuadro naranja); 3) genes sobreexpresados en el grupo con nivel Bajo de parámetros

lipídicos (cuadro azul); y 4) los genes sobreexpresados en el grupo con nivel Alto de parámetros lipídicos (cuadro lila). De nuevo cabe destacar que las mayores significaciones en términos de p-value y las mayores tasas de cambio, incluso los menores FDR, se observan en los genes con mayor expresión diferencial entre músculos, si bien en la comparación entre grupos se obtuvo un mayor número de genes diferencialmente expresados y los FDR en su conjunto fueron menores (ver figura III.6).

Entre los genes diferencialmente expresados entre músculos, aquellos sobreexpresados en el GM y que obtuvieron las mayores diferencias de expresión pertenecen en su mayor parte a la familia de los genes HOX. Esta familia de genes se caracteriza por participar durante en el desarrollo embrionario en procesos de regulación de la morfogénesis y diferenciación celular, pero también se pueden expresar en tejidos adultos (El-Mounayri, 2005).

En cuanto a los genes con una mayor sobreexpresión en el grupo con nivel Alto de parámetros lipídicos, hemos centrado nuestra atención en aquellos relacionados con el metabolismo lipídico. Entre ellos queremos destacar el gen *LIPE* u *Hormone-sensitive lipase*, que presenta una tasa de cambio (cociente entre expresiones) particularmente elevada dentro de este grupo de genes: se expresa 2.8 veces más en los individuos con un mayor nivel de engrasamiento, lípidos en sangre y deposición de grasa intramuscular. EL gen *LIPE* codifica para una lipasa clave en el proceso de movilización de los ácidos grasos ya que controla la hidrólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo y que también se expresa en otros tejidos.

Tabla III.10 Principales genes diferencialmente expresados (con p-value y FDR más significativos) entre los músculos GM y LD y entre los grupos con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos.

GEN	p-value	FDR	Fold-change	LOG Fold-change	GEN	p-value	FDR	Fold-change	Log Fold-change
Sobreexpresados músculo LD					Sobreexpresados grupo BAJO				
NIT1	0	< 1e-07	0.546	-0.872	PGM3	0	< 1e-07	0.687	-0.543
TMEM183A	0	< 1e-07	0.558	-0.841	RAB3A	0	< 1e-07	0.690	-0.536
LAMA2	0	< 1e-07	0.415	-1.271	ORAI1	0.0000002	8.54E-05	0.647	-0.629
LMCD1	0	< 1e-07	0.321	-1.641	ZDHHC14	0.0000014	0.00023	0.679	-0.559
PGF	0	< 1e-07	0.540	-0.888	TMEM60	0.0000017	0.000259	0.711	-0.491
MUSTN1	0	< 1e-07	0.465	-1.104	Sobreexpresados grupo ALTO				
C18orf37	0	< 1e-07	0.634	-0.658	MST150	0.0000001	5.33E-05	1.865	0.899
C10orf11	0	< 1e-07	0.511	-0.968	ALDOC	0.0000001	5.33E-05	1.792	0.841
AKAP11	0	< 1e-07	0.553	-0.855	AHSA1	0.0000001	5.33E-05	1.368	0.452
ZMYND17	0	< 1e-07	0.354	-1.498	CES1	0.0000001	5.33E-05	2.053	1.038
ITIH4	0	< 1e-07	0.334	-1.582	ITIH3	0.0000002	8.54E-05	2.171	1.119
ZNF697	0	< 1e-07	0.601	-0.736	GNL2	0.0000003	0.000116	1.469	0.554
PALMD	0	< 1e-07	0.500	-0.999	LIPE	0.0000004	0.000122	2.765	1.467
Sobreexpresados músculo GM					HSPH1	0.0000005	0.000142	2.045	1.032
HOXA10	0	< 1e-07	7.973	2.995	PTPLB	0.0000006	0.000151	1.766	0.821
HOXA10	0	< 1e-07	3.201	1.678	SFRP1	0.0000008	0.00019	1.979	0.985
HOXB6	0	< 1e-07	3.542	1.824	PLCD4	0.0000009	0.000202	1.491	0.576
HOXB7	0	< 1e-07	2.131	1.092	ASPH	0.0000001	0.000204	1.745	0.803
HOXA10	0	< 1e-07	4.516	2.175	GPKOW	0.0000011	0.000204	1.374	0.458
HOXA9	0	< 1e-07	2.490	1.316	PTX3	0.0000011	0.000204	2.428	1.280
HOXA10	0	< 1e-07	7.825	2.968	LAMC2	0.0000011	0.000204	1.480	0.566
SLC37A1	0	< 1e-07	1.907	0.932	PLSCR4	0.0000014	0.00023	1.372	0.456
FABP3	0	< 1e-07	1.769	0.823	SLC25A5	0.0000016	0.000253	1.618	0.695
PITX2	0	< 1e-07	1.832	0.873	PPID	0.0000018	0.000265	1.439	0.525
MAOB	0	< 1e-07	2.340	1.226	SLC25A17	0.0000019	0.00027	1.882	0.912

Estudio ontológico de los genes diferencialmente expresados entre los músculos *longissimus dorsi* y *gluteus medius* y entre los grupos con niveles alto y bajo de parámetros lipídicos

Con el objetivo de determinar diferencias funcionales ligadas a los dos factores estudiados, se realizó un estudio ontológico de las dos listas de genes que habían presentado expresión diferencial entre músculos (LD y GM) y entre grupos (Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos). En las figuras III.7 y III.8 se muestra la agrupación de las principales categorías GO biológicas de las sondas diferencialmente expresadas entre músculos (figura III.7) y entre grupos (figura III.8). Un primer resultado a destacar es, tal como cabía esperar, las importantes diferencias en cuanto a las categorías GO en las que se clasifican los genes que muestran expresión diferencial entre músculos y entre grupos. De hecho ambas clasificaciones tan solo comparten una única categoría GO biológica que además no es una de las categorías más representadas: la categoría “protein folding” (en amarillo).

En cuanto a la clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD, la figura III.7 muestra que las diferencias entre estos músculos a nivel transcriptómico vienen determinadas principalmente por la expresión de genes relacionados con el desarrollo, la regulación y la funcionalidad del músculo. Más concretamente, el 12.4% de las entradas GO para los genes que se expresan diferencialmente entre estos músculos corresponden al grupo formado por categorías GO relacionadas con las características musculares con una significación inferior al 0.00085. De este modo, a pesar de la considerable generalidad de muchas de las categorías GO, esta clasificación nos permite afirmar que entre los músculos GM y LD existen importantes diferencias en la expresión de genes relacionados con las características funcionales del músculo.

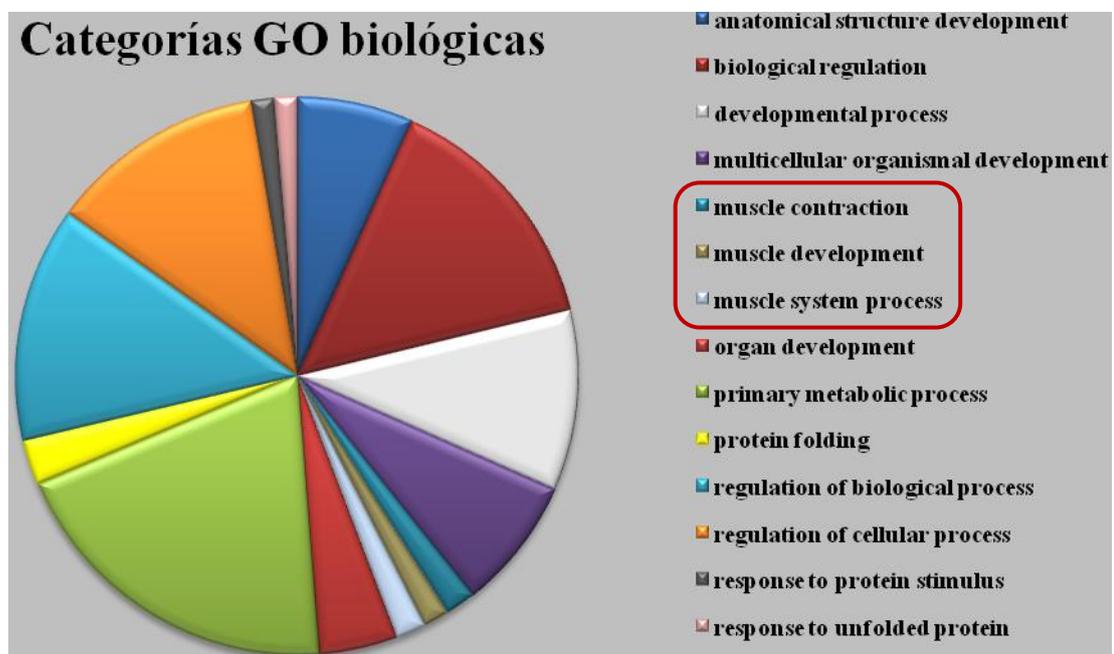


Figura III.7 Agrupación en categorías GO biológicas de los genes diferencialmente expresados en los músculos GM y LD.

En lo referente a las categorías GO en las que se clasifican los genes que presentan diferencias de expresión entre los grupos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos, la figura III.8

muestra cómo la principal categoría en la que se agrupan estos genes es la relacionada con la organización de los componentes celulares y la biogénesis, categoría que abarca multitud de procesos. Las cuatro siguientes categorías están directamente relacionadas con el metabolismo lipídico, lo cual es del todo coherente con las diferencias fenotípicas que determinan la clasificación de los animales en los grupos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos. Los animales de ambos grupos diferían en cuanto al engrasamiento y los niveles de lípidos en sangre, así como la cantidad y composición de la grasa intramuscular. Coherentemente, un 20.8% de las entradas GO para los genes que se expresan diferencialmente entre estos dos grupos de animales corresponden a procesos relacionados con el metabolismo lipídico (intracelular y en su conjunto), el metabolismo de los ácidos grasos o más concretamente del ácido monocarboxílico con una significación inferior al 0.0078.

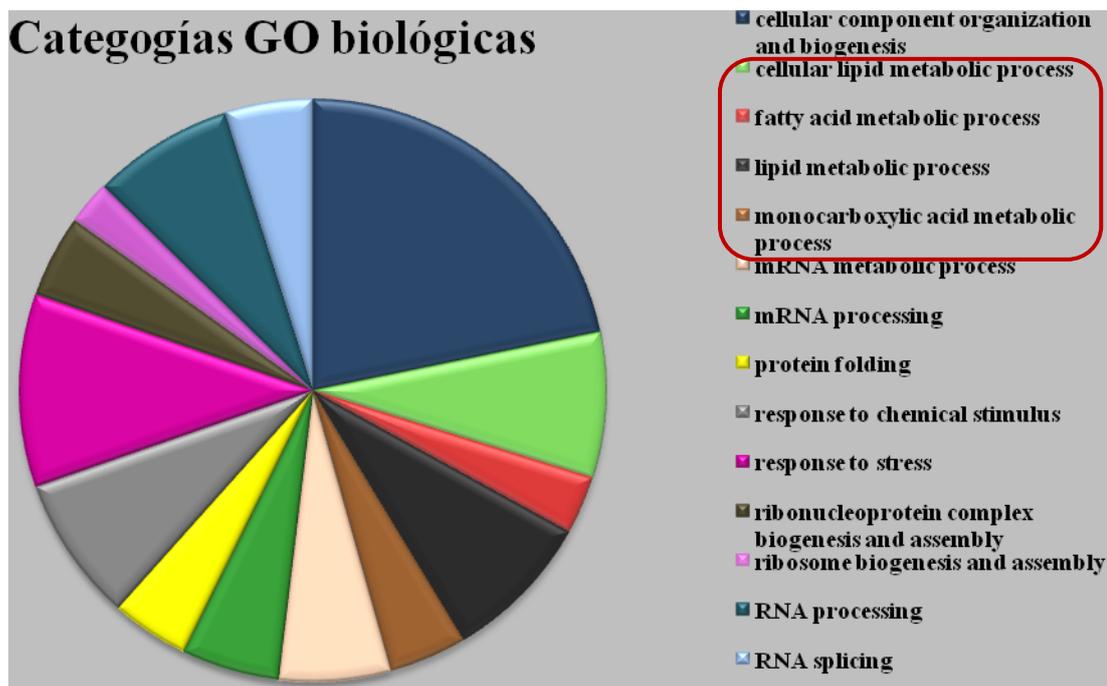


Figura III.8 Agrupación en categorías GO biológicas de los genes diferencialmente expresados en los individuos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos.

Por otro lado, las figuras III.9 – III.12 presentan la clasificación de las principales categorías GO moleculares (figuras III.9 y III.10) y celulares (figuras III.11 y III.12) de los genes diferencialmente expresados entre músculos y entre grupos con un p-value inferior a 0.05 en todos los casos.

En lo referente a las categorías GO moleculares (figuras III.9 y III.10) se observa como en ambos casos la categoría más representada es la de *binding* o unión en general, si bien si valoramos todo el conjunto observamos diferencias entre ambas clasificaciones de los genes diferencialmente expresados entre músculos y entre grupos. Así la figura III.9 muestra que, aunque existan varias categorías *binding*, la mayoría de categorías en las que se agrupan los genes están relacionadas con la transcripción; concretamente el 38.5% de las entradas GO de los genes con expresión diferencial entre músculos se clasifican dentro de estas categorías. También podemos distinguir más detalladamente que, entre estas categorías, algunas guardan relación con la regulación a nivel transcripcional, lo que podría estar indicando diferencias en la regulación de los genes entre los músculos GM y LD.

A diferencia de los resultados anteriores, en lo tocante a los genes diferencialmente expresados entre los grupos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos, la figura III.10 muestra que la mayoría de categorías en las que se agrupan estos genes están a su vez “anidadas” a la categoría general de unión o *binding*, que en su conjunto abarca aproximadamente el 70% de las entradas GO de los genes diferencialmente expresados entre los dos grupos con distintos parámetros lipídicos.

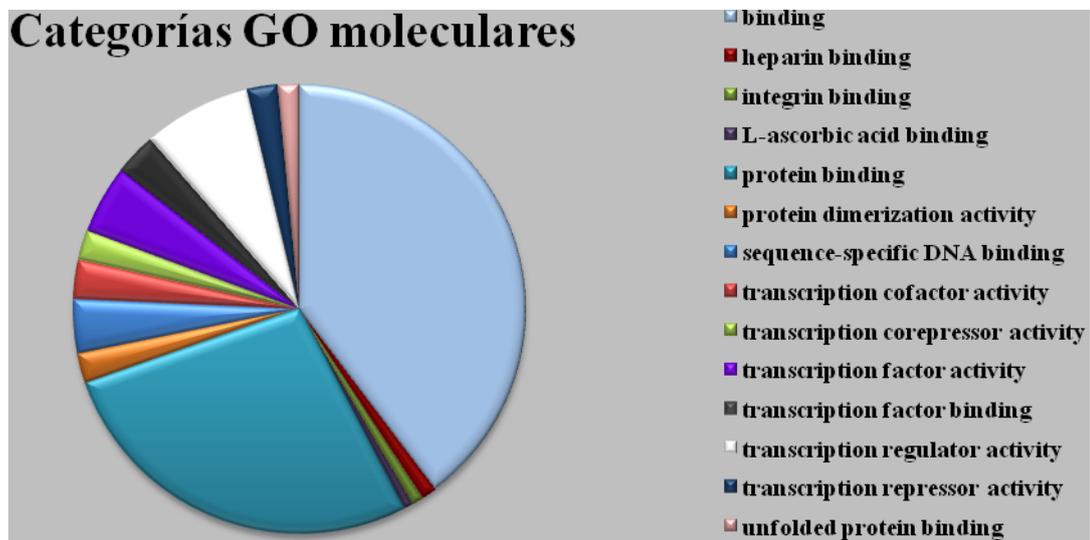


Figura III.9 Agrupación en categorías GO moleculares de los genes diferencialmente expresados en los músculos GM y LD.

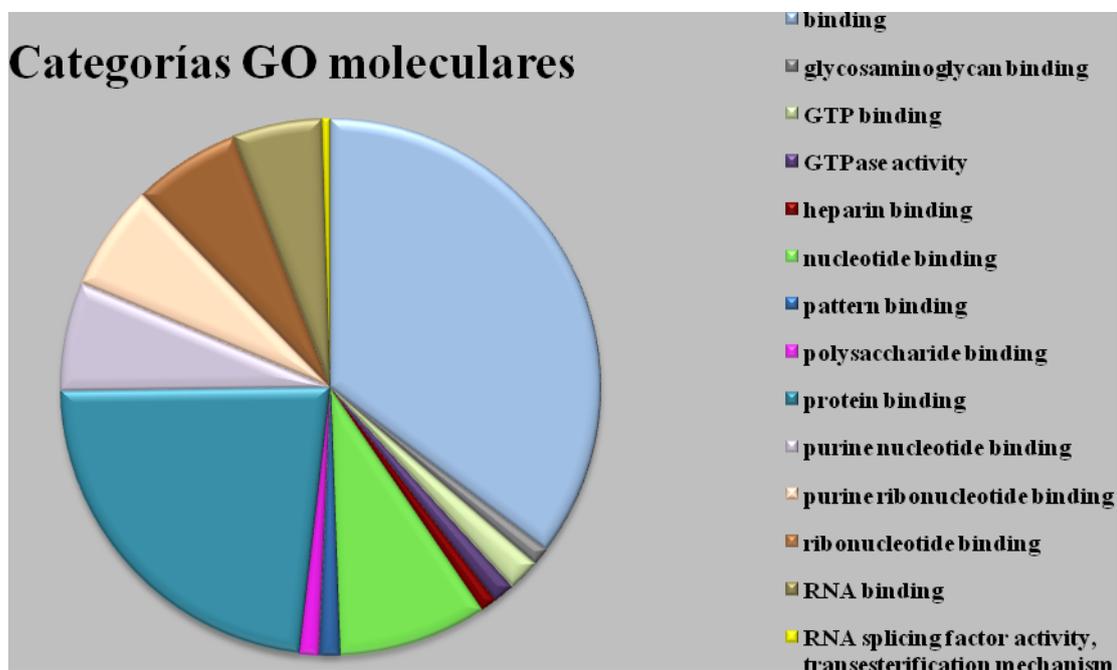


Figura III.10 Agrupación en categorías GO moleculares de los genes diferencialmente expresados en los individuos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos.

En cuanto a la clasificación a nivel celular (figuras III.11 y III.12) observamos diferencias menos notables entre las categorías en las que se agrupan las dos listas de genes diferencialmente expresados, siendo la mitad de las categorías compartidas entre los genes

que diferencian los músculos y los grupos con distintos parámetros lipídicos. Podemos destacar no obstante algunas diferencias bastante razonables. Por ejemplo, el 7.2% de las entradas GO de genes que se expresan diferencialmente entre los músculos GM y LD se agrupan en una categoría relacionadas con la contracción de las fibras (figura III.11) que no aparece en la clasificación GO de los genes diferenciales entre grupos. En la figura III.12 por su parte se ve un grupo de categorías relacionadas con el núcleo y el nucléolo, que entre las dos abarcan más del 50% de las entradas GO de los genes diferencialmente expresados entre los grupos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos.

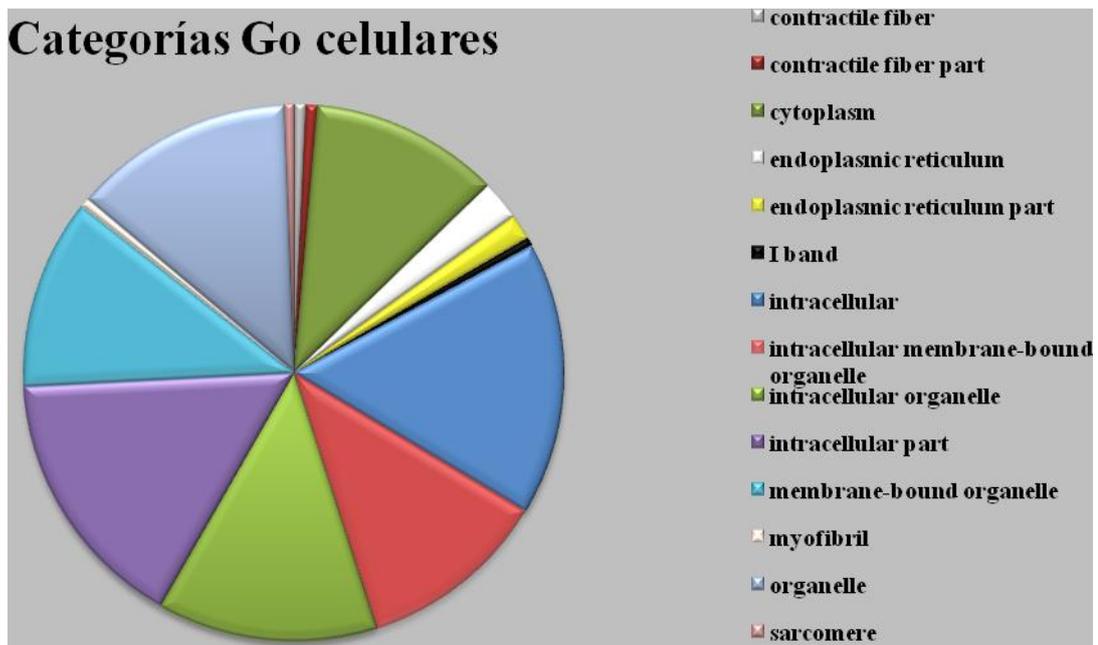


Figura III.11 Agrupación en categorías GO celulares de los genes diferencialmente expresados en los músculos GM y LD.

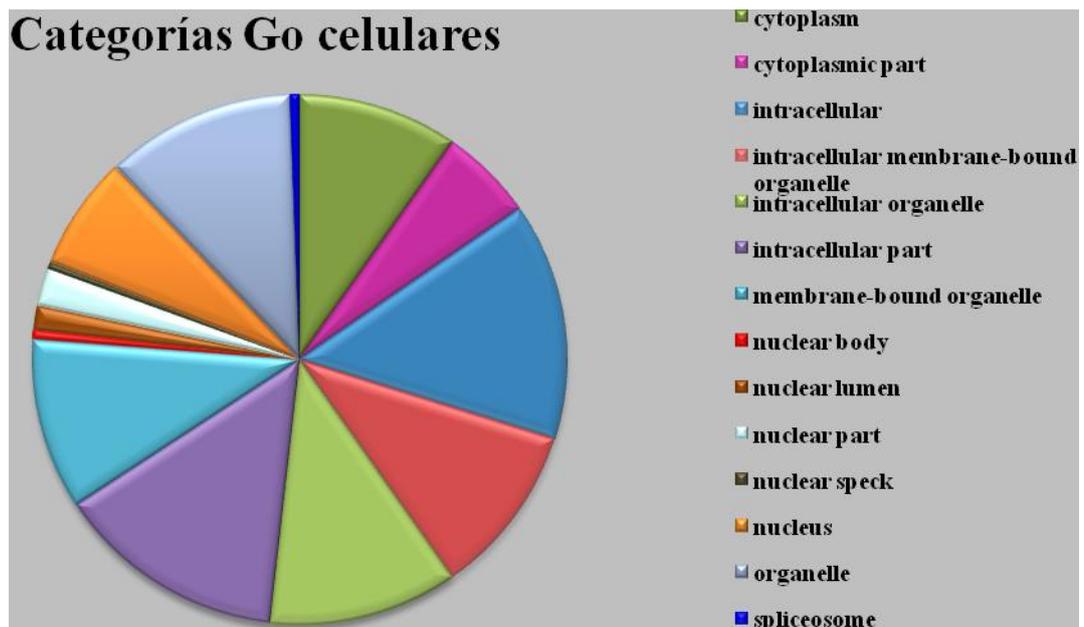


Figura III.12 Agrupación en categorías GO celulares de los genes diferencialmente expresados en los individuos con niveles Alto y Bajo de parámetros lipídicos.

Identificación de genes candidatos funcionales y posicionales para la cantidad y composición de la grasa intramuscular

Finalmente, se realizó una búsqueda de genes diferencialmente expresados entre individuos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos que estuvieran en los intervalos de confianza de los QTL detectados a nivel genómico, utilizando la aplicación para el alineamiento de los elementos *Affymetrix* incluida en la base de datos de QTL para porcino o “pig QTL DataBase” (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>). Este estudio de concordancia posicional entre las sondas diferencialmente expresadas y los principales QTL detectados para algunos parámetros lipídicos nos permitió elaborar una lista de genes candidatos (tabla III.11) que podrían presentar una asociación estructural y funcional con la cantidad y composición de la GIM de los músculos GM y LD en porcino.

Tras una primera lista de genes obtenida a partir del alineamiento de QTL y sondas diferencialmente expresadas (tabla III.11), se procedió a comprobar la asignación del gen a la sonda proporcionada por *Affymetrix*, utilizando para ello el alineamiento de las secuencias sonda-gen mediante la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Asimismo, también se comprobó que el gen descrito mapease efectivamente en la zona del genoma humano homóloga al QTL, según la base de datos ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ambas comprobaciones condujeron a descartar aproximadamente la mitad de los genes inicialmente descritos, bien por no mapear en la zona del genoma humano homóloga al QTL (genes de color gris en tabla III.11), bien por haber una homología del 100% entre la sonda de *Affymetrix* y otro gen distinto al anotado por *Affymetrix* (gen de color verde en tabla III.11).

Finalmente, se dispuso de una lista de genes que presentaban una asociación funcional con un conjunto de caracteres relacionados con el metabolismo lipídico y que tenían una concordancia posicional con los QTL detectados. Después de analizar la funcionalidad de cada uno de estos genes, se seleccionaron tres de ellos (enmarcados en rojo en la tabla III.11) como posibles genes candidatos a ser estudiados en un futuro por su relevante papel dentro del metabolismo lipídico. El gen *GPD1* o “*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1*”, relacionado con el incremento en la producción de triacilglicerol en el tejido adiposo de los humanos obesos y, los genes *NPC1* y *NCP2* o “*Niemann-Pick disease*”, que codifican para proteínas relacionadas con la captación de colesterol.

Tabla III.11 Genes con expresión diferencial entre los grupos con Alto y Bajo nivel de parámetros lipídicos y concordancia posicional con los QTL detectados. ^a El subíndice denota los genes diferencialmente expresados entre Músculos.

SSC	POS. QTL	Región cromosómica porcina	Región cromosómica humana	Genes candidatos
3	15cM	chr.3 (0-33 cM)	chr.7 (63-102 cM)	GNAI2
3	53cM	chr.3 (33-76 cM)	chr.16 (0-31 cM); chr.2 (50-114 cM)	RRN3 ; IK
5	94cM	chr.5 (88-118 cM)	chr.12 (0-105 cM)	MRLC2 ^a GPD1 MKRN1 ^a SPI ^a TAF9
6	95cM	chr.6 (84-107 cM)	chr.1 (11-40 cM); chr.18 (0-40 cM)	OXCT1 ; NPC1 AQP4
6	35cM	chr.6 (0-53 cM)	chr.16 (56-89 cM)	SERF1A
7	133cM	chr.7 (100-137 cM)	chr.14 (72-92 cM)	NPC2
7	81cM	chr.7 (74-100 cM)	chr.15 (31-95 cM); chr.14 (18-73 cM)	TCF12 ^a IDH1 ; MYH10 ^a PRPF39
12	74cM	chr.12 (56-89 cM)	chr.17 (31-65 cM)	GALNT1 ^a COASY PKCNT1
14	85cM	chr.14 (80-101 cM)	chr.10 (118-130 cM)	TIAL1 ^a BAG3 LYRM2 ALDOC
18	40cM	chr.18 (27-50 cM)	chr.7 (25-120 cM)	GNAI2 COASY

DISCUSIÓN

La cantidad y la composición de la GIM constituyen parámetros determinantes de las características organolépticas y tecnológicas de la carne (García-Regueiro *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1999; López-Bote, 1998). Este hecho, unido a la relación existente entre la composición de la grasa de la carne y la salud humana, ha despertado un creciente interés por estos caracteres. Los valores fenotípicos de la población Duroc analizada en el presente trabajo confirman el elevado contenido en GIM de la raza Duroc cuando se compara con otras poblaciones comerciales (Morales *et al.*, 2003), y avala la idoneidad de la población estudiada para la producción de productos curados de calidad. Asimismo estos valores muestran una composición de la grasa muscular particularmente rica en ácido oleico, cuyo valor nutritivo y cuya positiva influencia sobre la salud humana son sobradamente conocidos, y que además es importante para la adecuada maduración y flavor de los productos curados (López-Bote, 1998; Chizzolini *et al.*, 1998). En el presente trabajo se han analizado dos músculos de relevante interés comercial, observando que el músculo GM es sensiblemente más graso y con mayor contenido en colesterol que el músculo LD, tal como habían observado anteriormente Kim *et al.* (2008) y Fiedler *et al.* (2003). No hubo sin embargo diferencias relevantes en lo que respecta al perfil de los ácidos grasos mayoritarios, si bien es importante señalar que en el músculo GM hubo un mayor contenido en ácidos grasos omega-3.

En relación a estos caracteres, hasta la fecha han sido numerosos los estudios que han abordado la búsqueda de loci con efecto sobre el contenido en GIM (*e.g.* de Koning *et al.*, 1999; Paszek *et al.*, 2001; Ovílo *et al.* 2002; Rohrer *et al.*, 2006; Sanchez *et al.* 2007). Aunque más escasos, también existen diversos barridos genómicos para encontrar QTL ligados a la composición en ácidos grasos de distintos tejidos como la grasa dorsal (Pérez-Enciso *et al.* 2000; Clop *et al.* 2003; Nii *et al.* 2006; Guo *et al.* 2009), la grasa perirenal (Nii *et al.* 2006) o la GIM (Sanchez *et al.* 2007; Guo *et al.* 2009). La mayoría de estos trabajos han sido realizados a partir de cruzamientos divergentes, por lo que no existe demasiada información acerca de la segregación de loci asociados a estos caracteres en poblaciones comerciales. El contenido en colesterol del músculo ha sido sin embargo un carácter escasamente estudiado hasta la fecha, encontrándose en la bibliografía un único estudio de QTL para este carácter que permitió detectar un QTL sugestivo en el SSC18 (Malek *et al.*, 2001).

En el presente trabajo se han identificado un número considerable de QTL relacionados con la GIM, la composición de ácidos grasos y el contenido de colesterol para los músculos GM y LD en una población comercial de raza Duroc. Debe tenerse en cuenta no obstante que muchos de estos QTL han sido detectados solamente en una de las cinco familias analizadas, que existieron algunas discrepancias entre los dos análisis expuestas en el apartado de Resultados, y que existen limitaciones de potencia ligadas a la estructura poblacional y el reducido tamaño muestral. Estas limitaciones del experimento aconsejan tomar con cautela estos resultados y no descartar la posible presencia de algunos resultados espúreos. No obstante y más allá de estas limitaciones, estos resultados en su conjunto representan un indicador de la existencia de variabilidad genética para estos caracteres en la población analizada, y estarían en la línea de las heredabilidades medias-altas estimadas por Casellas *et al.* (2009). La realización de futuros estudios con un mayor tamaño poblacional permitirá confirmar la consistencia de los QTL detectados.

Uno de los QTL más relevantes ha sido el detectado para GIM del músculo GM en el SSC7 (133cM, tabla III.6), localizado en una región genómica donde ya se habían descrito

anteriormente varios QTL para la GIM (de Koning *et al.* 2000, Szyda *et al.* 2002, Sato *et al.* 2003). Además, el alineamiento realizado con las sondas diferencialmente expresadas permitió describir un gen ubicado en la región del QTL y que muestra importantes diferencias en sus niveles de RNA entre individuos con niveles extremos de parámetros lipídicos: el gen *NPC2* o “*Niemann-Pick disease*”, sobreexpresado en el grupo Alto; el papel de este gen será discutido más adelante. Adicionalmente, se han encontrado diversos QTL para GIM segregando en nuestra población en posiciones homólogas a las de QTL previamente descritos por otros autores en cruces divergentes, como son los QTL para GIM en el SSC6 (Ovilo *et al.*, 2002) y en el SSC13 (Sánchez *et al.*, 2007). Asimismo, hemos detectado un QTL en el SSC3 que aparentemente está relacionado con la GIM de ambos músculos GM y LD y que no había sido descrito anteriormente, y un QTL en el SSC 1 ligado tanto a la GIM como a la deposición de grasa dorsal.

Entre los resultados del análisis de QTL debemos también destacar los QTL descritos para la concentración de colesterol en músculo, por ser un carácter apenas estudiado hasta la fecha a pesar de su importancia de cara al consumidor. En este sentido, debemos decir que sólo hemos detectado un QTL con efecto significativo sobre ambos músculos en el SSC11 (tabla III.7). El resto de QTL para este carácter han sido identificados afectando al músculo LD exclusivamente (ver tabla III.7); entre ellos cabe destacar un QTL altamente significativo en el SSC6 y un QTL significativo a nivel cromosómico en el SSC 18 que podría corresponder al QTL previamente descrito por Malek *et al.* (2001).

En cuanto al perfil de ácidos grasos del músculo, el presente trabajo ha permitido detectar un elevado número de QTL ligados a la proporción de uno o más ácidos grasos en la grasa muscular o índices relacionados. De entre ellos el más significativo ($p < 0.001$ a nivel genómico) ha sido el QTL del SSC7 detectado en una de las familias, que afecta al contenido en ácido vacénico del músculo GM. Este QTL está localizado en una región en la que se han descrito además otros QTL sugestivos ligados al contenido de otros ácidos grasos (palmítico y linoleico) y a los porcentajes de PUFA, MUFA y omega-6, así como de un QTL para el contenido de vacénico del músculo LD. Este QTL se encuentra asimismo próximo a las regiones donde Guo *et al.* (2009) y Sanchez *et al.* (2007) han descrito diversos QTL para la composición en ácidos grasos.

Para el músculo LD vale la pena destacar el QTL relacionado con el contenido de AGS, afectando a los dos AGS mayoritarios, palmítico y esteárico, además de a los ácidos palmitoleico y vacénico. La posición de este QTL coincide con la del gen acetyl-coenzyme A carboxylase α (*ACACA*). Cabe mencionar que en un experimento anterior sobre la misma población se detectaron asociaciones significativas entre diversos polimorfismos para este gen y los contenidos en AGS, MUFA, PUFA y GIM (Gallardo *et al.* 2009a). También Muñoz *et al.* (2007) detectaron asociaciones significativas entre dos polimorfismos de este gen y el contenido en diversos ácidos grasos. Sin embargo todos los polimorfismos detectados en estos trabajos fueron sinónimos o no codificantes, lo que *a priori* los descartaría como mutación causal del QTL detectado. Asimismo el estudio de expresión no permitió detectar diferencias de expresión para este gen entre individuos con niveles extremos de parámetros lipídicos, lo que parece apoyar la hipótesis de que la mutación causal de este QTL estaría en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos detectados en este gen.

Por otro lado, cabe señalar que la mayor parte de los QTL obtenidos para la composición de AG estuvieron asociados al contenido en AG que pueden ser sintetizados *de novo*, como son los AG saturados y monoinsaturados. Aunque menos numerosos, también se han encontrado

no obstante algunos QTL para ácidos grasos esenciales, como son los AG poliinsaturados, la mayoría de ellos para el músculo GM. Estos resultados son consistentes con los parámetros genéticos estimados por Casellas *et al.* (2009) en la población estudiada, ya que estos autores encontraron heredabilidades moderadas para ambos AG poliinsaturados (linoleico y araquidónico) en el músculo GM, mientras que el determinismo genético de estos ácidos grasos en LD fue menos relevante. En este sentido, también otros autores (*e.g.* Sanchez *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009) han encontrado QTL para el contenido en AG poliinsaturados. A pesar de que estos ácidos grasos proceden exclusivamente de la dieta, no es descartable cierto grado de determinismo ligado a genes implicados en la absorción intestinal o la distribución órgano-específica de estos AG.

El análisis de QTL ha permitido asimismo detectar diversas regiones genómicas con efecto sobre dos o más caracteres estudiados, que podría ser debido a mutaciones causales en uno o más loci con efecto pleiotrópico. Entre estas regiones potencialmente pleiotrópicas podemos señalar las encontradas en el SSC7 o SSC12 anteriormente mencionadas, además de una región del SSC13 con efecto sobre los ácidos esteárico y linoleico juntamente con los índices PUFA y omega-6 del músculo GM, entre otras. La existencia de regiones con efectos pleiotrópicos sobre el perfil de ácidos grasos ya había sido previamente puesta de manifiesto por varios autores (*e.g.* Sanchez *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009), en varios casos en regiones homólogas a las encontradas en el presente estudio. Estos resultados pondrían de manifiesto la existencia de loci que intervienen paralelamente en diversas rutas del metabolismo lipídico.

Un importante resultado extraído del presente estudio es la ausencia general de correspondencia entre los QTL detectados para los caracteres de cantidad y composición de la GIM de los músculos GM y LD. De los numerosos QTL detectados en el barrido genómico, tan solo los QTL de los SSC 1 y 3 para GIM, del SSC 11 para el contenido de colesterol, de los SSC6 y 7 para el ácido vacénico, y del SSC13 para esteárico y mirístico, presentan cierta concordancia posicional entre ambos músculos. Estos resultados avalarían la hipótesis de que existe distinta determinación genética de las características de la grasa en los músculos LD y GM. Las diferencias en la regulación de estos caracteres en distintos tejidos grasos del organismo ya habían sido observadas anteriormente por otros autores. Por ejemplo, Guo *et al.* (2009) identificaron una clara falta de correspondencia entre los QTL que afectaban la composición de los ácidos grasos del músculo LD y de la grasa abdominal, hecho que les llevo a determinar la existencia de distintos factores genéticos afectando a estos caracteres. Asimismo Nii *et al.* (2006) mostraron que la localización y magnitud de los QTL para el perfil de ácidos grasos diferían notablemente entre la grasa subcutánea y la grasa perirenal. Ninguno de estos trabajos había comparado no obstante la concordancia posicional de los QTL para la cantidad y composición de la grasa de dos músculos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la puesta en marcha de un esquema de selección asistida por marcadores o por genes para estos caracteres tendría consecuencias distintas dependiendo del músculo considerado.

En la misma línea de la ausencia de correspondencia entre los QTL, el estudio de expresión permitió detectar importantes diferencias a nivel transcriptómico entre ambos músculos (ver figura III.1). Se identificaron 350 sondas (correspondientes a 292 genes) diferencialmente expresadas entre ambos músculos, de las cuales 119 (96 genes) se sobreexpresaban en el músculo GM y 231 (196 genes) en el músculo LD. Centrando el interés en los genes que han mostrado resultados más relevantes en cuanto a expresión diferencial entre los músculos GM y LD, cabe destacar el grupo de genes pertenecientes a la familia *HOX*. Este grupo de genes estaba notablemente sobreexpresado en el músculo GM vs el músculo LD, llegando a alcanzar

un cociente entre las expresiones medias de hasta 800% en el caso del gen *HOXA10*. Esta familia de genes abarca múltiples funciones, entre la cuales destacamos el papel de algunos de ellos como el *HOXA10* sobre la diferenciación de células musculares (El-Mounayri *et al.*, 2005).

El estudio ontológico del conjunto de todos los genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD mostró que, a nivel biológico, las diferencias a nivel transcriptómico entre estos músculos están asociadas a genes principalmente implicados en el desarrollo, la regulación y la funcionalidad del músculo (ver figura III.7). De la misma manera, el estudio ontológico a nivel molecular (figura III.9) ha mostrado que los genes diferencialmente expresados se agrupan en categorías GO moleculares relacionadas con la regulación transcripcional, lo que ratifica las diferencias en cuanto a la regulación de estos dos músculos. En cuanto a las categorías GO celulares (tabla III.11), se aprecia un grupo de categorías relacionadas con las fibras musculares. Este hecho es consistente con la distinta composición en cuanto a tipo de fibras entre los dos músculos que había sido descrita por algunos autores (*e.g.* Serra *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 2008). Los resultados aquí presentados, particularmente los relativos al estudio ontológico, parecen corroborar la teoría demostrada por Essen-Gustavson y Fjelkner-Modig (1985) sobre la existencia de perfiles metabólicos distintos entre ambos músculos.

En su conjunto, los resultados de expresión diferencial entre músculos del presente trabajo están en la línea de los obtenidos en otros estudios de expresión. De este modo, Bai *et al.* (2003) estudiaron la expresión diferencial en distintos tipos de músculos (rojos vs blancos) en porcino, e identificaron un gran número de genes diferencialmente expresados, siendo el grupo de las fibras blancas (*e.g.* LD) el que muestra un mayor número de genes sobreexpresados, entre ellos un grupo de genes relacionado con funciones estructurales del músculo. Asimismo existe un paralelismo con los resultados obtenidos en la comparación de distintos tejidos musculares en otras especies. Cabe citar por ejemplo el trabajo de Campbell *et al.* (2001), quienes estudiaron las diferencias a nivel de expresión entre las fibras musculares rojas y blancas de ratón, e identificaron varios genes diferencialmente expresados con funciones relacionadas con el desarrollo y la regulación.

Otro de los objetivos principales del estudio de expresión fue evaluar las diferencias a nivel transcriptómico ligadas a los fenotipos relacionados con el metabolismo lipídico y la deposición de grasa. La comparación de los niveles de expresión entre animales de dos grupos extremos para una combinación de parámetros lipídicos ha permitido detectar un elevadísimo número de sondas diferencialmente expresadas (579 sondas; figura III.1) correspondientes a 459 genes, estando un 82% de estos genes sobreexpresados en el grupo de animales con Alto nivel de parámetros lipídicos. Estos resultados son notablemente paralelos a los obtenidos por Cánovas *et al.* (2008) trabajando sobre un único tejido muscular (músculo GM), lo cual es razonable teniendo en cuenta que era el tejido del cual se disponía de un mayor número de muestras en este trabajo. No obstante las diferencias de expresión en términos de cociente entre expresiones medias (tasas de cambio o *fold change*, figura III.3) mostraron un rango (0.42-2.76) notablemente inferior al encontrado por Cánovas *et al.* (2008) (0.38-5.58), obteniéndose además un número notablemente inferior de sondas con una sobreexpresión de más del 50% (163 vs 388). Asimismo, tan sólo un 59% y un 53% de los genes sobreexpresados e infraexpresados en el grupo Alto coinciden a los obtenidos previamente por Cánovas *et al.* (2008), si bien se debe tener en cuenta que las diferencias experimentales entre ambos trabajos. En su conjunto, los resultados relativos a la expresión diferencial entre animales extremos para diversos parámetros lipídicos nos indican que aquellos animales con

un mayor nivel de engrasamiento, lípidos plasmáticos y deposición de GIM tendrían una sobreactividad transcripcional respecto a un importante número de genes.

El estudio de la funcionalidad de los genes diferencialmente expresados entre los grupos de animales con niveles extremos de parámetros lipídicos se abordó también mediante la realización de un análisis ontológico a nivel biológico, molecular y celular. La parte más destacable de este análisis ha sido la clasificación en categorías GO biológicas (figura III.8), que muestra cómo una proporción importante de los genes diferencialmente expresados participan en procesos directamente relacionadas con el metabolismo lipídico, como son “*proceso metabólico lipídico celular*”, “*proceso metabólico de ácidos grasos*”, “*proceso metabólico lipídico*”, y “*proceso metabólico del ácido monocarboxílico*”, lo cual en cierta medida nos confirma la validez del diseño del experimento de expresión para el estudio de genes relacionados con el metabolismo lipídico. La agrupación desde una perspectiva molecular (tabla III.10) permitió observar que muchas de las categorías GO moleculares en que se clasifican estos genes están relacionadas con la unión molecular (*binding*). En cuanto a la clasificación a nivel celular, tan solo mencionar que estos resultados (tabla III.12) aportaban una información vaga y general sobre la funcionalidad de estos genes, no existiendo diferencias relevantes en cuanto a las categorías GO celulares en que se agrupaban los genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD y entre los grupos de animales con niveles extremos de parámetros lipídicos. Todos los resultados de este análisis ontológico fueron en su conjunto equivalentes a los previamente obtenidos por Cánovas *et al.* (2008) a pesar de que estos autores trabajaron sobre un solo tejido, con un menor número de muestras y con distintos umbrales de significación. Ello nos permite extender algunas conclusiones al conjunto de los dos músculos.

En el análisis individual de los genes diferencialmente expresados entre grupos, donde predominan los genes sobreexpresados en individuos con valores elevados de parámetros lipídicos, hemos destacado como gen con una particular relevancia por su importante papel en el metabolismo lipídico el gen *LIPF* que codifica para la *Hormone-sensitive lipase*. Este gen está descrito en el cromosoma 6 de porcino (Gu *et al.*, 1992), en una región que ha sido ampliamente estudiada por la presencia del locus que determina la hipertermia maligna en cerdos (*RYRI*). Además, este gen codifica para una lipasa clave en el proceso de movilización de los ácidos grasos porque interviene sobre la hidrólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo, y también se expresa en otros tejidos (Harbitz *et al.*, 1999). Otros autores como Oscai *et al.* (1990) han sugerido además que este gen podría mediar la lipólisis intramuscular a través de la regulación cooperativa con el gen de la lipoproteína lipasa o *LPL*. Cabe señalar no obstante que este gen mapea en una región del genoma porcino que no está próxima a ninguno de los QTL descritos en el presente trabajo, por lo que a pesar de su relación funcional y transcripcional con el metabolismo lipídico, no será considerado *a priori* como gen candidato a contener una mutación responsable de alguno de los QTL observados.

Por último, en el presente trabajo se ha elaborado una lista de genes candidatos tanto posicionales como funcionales (ver tabla III.2) considerando aquellos genes que mapean en las regiones de los QTL más significativos detectados en la población y que presentan además relevantes diferencias en sus niveles de expresión entre individuos con niveles extremos de parámetros lipídicos. De entre los genes que cumplían estos requisitos, se han seleccionado tres de ellos por su relevante función dentro del metabolismo lipídico. El primero de ellos es el gen *GPD1* o “*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1*”. Este gen se caracteriza por determinar un incremento de la producción de triacilglicerol en el tejido adiposo de los humanos obesos, y además en humanos mapea en una región homóloga a la región del SSC 5

donde se ha detectado un QTL altamente significativo para el ácido mirístico y donde también Nii *et al.* (2006) encontraron un QTL afectando al contenido de ácidos grasos saturados. Asimismo los genes *NPC1* y *NPC2* o de “*Niemann-Pick disease*” se presentan como genes de interés puesto que codifican para proteínas relacionadas con la captación de colesterol. El gen *NPC2* mapearía en una región del SSC 7 donde se ha detectado un QTL particularmente relevante para GIM del músculo GM, anteriormente comentado. En cuanto al gen *NPC1*, éste mapea en una región genómica (SSC6) dónde se ha detectado un QTL para ácido vacénico para ambos músculos, GM y LD, siendo el QTL para este último altamente significativo.

Finalmente y a modo de resumen comentar que en el presente trabajo se han identificado un número considerable de QTL relacionados con la cantidad y la composición de la grasa de los músculos GM y LD en una población comercial de raza Duroc. Asimismo se ha realizado un estudio de expresión en el que se han detectado un importante número de genes diferencialmente expresados entre individuos con fenotipos extremos para caracteres relacionados con el engrasamiento y la deposición de grasa intramuscular. Más allá de las limitaciones del experimento anteriormente mencionadas, estos resultados en su conjunto corroboran la existencia de variabilidad genética para estos caracteres y avalan la posibilidad de que sean considerados objetivos de selección en la población analizada. Por otro lado también se han descrito importantes diferencias entre los músculos GM y LD, tanto a nivel de mutaciones reguladoras (distintos QTL) como a nivel transcriptómico, con un importante número de genes que mostraron expresión diferencial entre ambos músculos. Estas diferencias hacen muy complejo poder predecir las consecuencias en los distintos músculos de las estrategias de selección en base a información molecular. En este sentido se necesitan un mayor número de estudios que permitan caracterizar los factores genéticos implicados en la cantidad y composición de grasa de distintos tejidos y localizaciones anatómicas. Por último el presente trabajo ha permitido identificar una serie de genes candidatos funcionales y posicionales a tener en cuenta para la realización de futuros estudios.

CONCLUSIONES

- 1- Se han detectado numerosos QTL asociados a la cantidad y al perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular de los músculos GM y LD en una población comercial de animales Duroc caracterizada por un alto contenido de GIM. Varios de estos loci son homólogos a QTL previamente descritos en experimentos con cruces divergentes, demostrando que existe un relevante grado de variabilidad genética dentro de la población analizada.
- 2- Se han identificado también diversos QTL asociados al contenido de colesterol en músculo, carácter escasamente estudiado hasta la fecha. De entre ellos cabe destacar el QTL del cromosoma 11 ligado a la concentración de colesterol en ambos músculos, y un QTL altamente significativo en el cromosoma 6 detectado para el músculo LD.
- 3- La comparación entre los QTL detectados en los músculos GM y LD ha revelado importantes diferencias que sugerirían distinta determinación genética de las variables relacionadas con la cantidad y composición de la grasa en estos músculos.
- 4- El estudio de expresión ha permitido asimismo identificar un gran número de genes con distintos niveles de expresión entre los músculos GM y LD, con un rango de sobre/infraexpresión en uno de los músculos de entre el 20 y el 800%. Las sondas con mayores diferencias de expresión entre músculos correspondieron a genes sobreexpresados en el músculo GM, perteneciendo varios de ellos a la familia de los genes HOX.
- 5- El estudio ontológico ha revelado que los genes diferencialmente expresados entre los músculos GM y LD se clasifican principalmente en categorías GO relacionadas con el desarrollo, la regulación y la funcionalidad del músculo.
- 6- Hemos detectado un número aún mayor de genes diferencialmente expresados entre individuos con niveles extremos para una combinación de parámetros lipídicos; la mayor parte de estos genes mostraban sobreexpresión en el grupo de animales con niveles altos de engrasamiento, lípidos sanguíneos y deposición de grasa muscular. Entre la lista de genes con diferencias de expresión más significativas cabe destacar el gen LIPE, que interviene en la hidrólisis de los triglicéridos.
- 7- El estudio ontológico ha constatado que una proporción importante de los genes con expresión diferencial entre los grupos de animales con distintos niveles de parámetros lipídicos se clasificaban en categorías GO relacionadas con el metabolismo de los lípidos en su conjunto, abarcando el metabolismo y la síntesis de los ácidos grasos y de rutas metabólicas concretas como la del ácido monocarboxílico.
- 8- Un estudio de alineamiento entre los QTL más significativos y las sondas diferencialmente expresadas ha permitido elaborar una lista preliminar de genes candidatos posicionales y funcionales para caracteres relacionados con el metabolismo de las grasas, entre los cuales se han destacado el gen *GPD1*, relacionado con el incremento en la producción de triacilglicerol en el tejido adiposo de humanos obesos, y los genes *NPC1* y *NCP2*, que codifican para proteínas relacionadas con la captación de colesterol.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado M. (2007) *Microarrays de DNA en microbiología*. Revista complutense de ciencias Veterinarias Vol. 1. (ISSN: 1988-2688)
- Anderson L., Haley C.S., Ellegren H., Knott S.A., Johansson M., Andersson K., Andersson-Eklund L., Edfors-Lilja I., Fredholm M., Hansson I. (1994) *Genetic of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs*. Science 263:1771-1774.
- Árnyasi M., Grindflek E., Jávora A., Lien S. (2006) *Investigation of two candidate genes for meat quality traits in a quantitative trait locus region on SSC6: the porcine short heterodimer partner and heart fatty acid binding protein genes*. Journal of Animal Breeding and Genetics 123:198-203.
- Bai Q.F., McGillivray C., da Costa N., Dornan S., Evans G., Stear M.J., Chang K.C. (2003) *Development of a porcine skeletal muscle cDNA microarray: analysis of differential transcript expression in phenotypically distinct muscles*. BMC Genomics 4: 8 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/4/8>).
- Barton-Gade, P.A. (1990) *Pork quality in genetic improvement programmes—The Danish experience*. In: Proc. Natl. Swine Improv. Fed. Ann. Mtg., Des Moines, Iowa (USA), pp 10–18.
- Benjamini, Y., Hochberg Y. (1995) *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological). 57 (1): 289–300.
- Berger A., Roberts M.A. (2005) *Unraveling Lipid Metabolism with Microarrays*. E. Berger & M.A. Roberts Eds. Marcel Dekker, New York, USA. (ISBN: 0-8247-5811-0).
- Bidanel J.P., Boichard D., Chevalet C. (2008) *De la génétique à la génomique*. INRA Productions Animales 21: 15-32.
- Blasco A., Gou P., Gispert M., Estany J., Soler Q., Distre A., Tibau J. (1994) *Comparison of five types of pig crosses. I. Growth and carcass traits*. Livestock Production Science. 40: 171-178.
- Campbell W.G., Gordon S.E., Carlson C.J., Pattison J.S., Hamilton M.T., Booth F.W. (2001) *Differential global gene expression in red and white skeletal muscle*. American Journal of Physiology-Cell Physiology 280: C763-C768. (<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/full/280/4/C763>).
- Cánovas, A., Quintanilla, R., Varona, L., Díaz, I., Casellas, J., Pena, R.N. (2008) *Gene network analysis on muscle expression data from Duroc pigs with extreme values for cholesterol and fat deposition traits*. 3rd International Symposium on Animal Functional Genomics (ISAFG), April 7-9th, Edinburgh (United Kingdom).
- Cánovas, A., Quintanilla, R., Gallardo, D., Díaz, I., Noguera, J.L., Ramírez, O., Pena, R.N. (2009a) *Functional and association studies on the pig HMGCR gene, a cholesterol-synthesis limiting enzyme*. Animal (aceptado).

- Cánovas E., Quintanilla R., Badaoui B., Porredón C., Gallardo D., Pena R.N., Díaz I., Amills M. (2009b) *Association between the polymorphism of the pig HDL-binding protein (HDLBP) gene and intramuscular fat percentage*. *Livestock Science (en prensa)*.
- Cameron, N.D., and Enser M. (1991) *Fatty acid composition of lipid in longissimus dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its relationship with eating quality*. *Meat Science* 29: 295-307.
- Casellas J., Noguera J.L., Reixach J., Díaz I., Amills M. and Quintanilla R. (2009) *Bayes factor analyses of heritability for plasma and muscle lipid traits in pigs*. (Enviado).
- Charlton-Menys V., Durrington P.N. (2008) *Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules*. *Experimental Physiology* 93: 27-42.
- Chen Y.Q., Edwards I.J., Kridel S.J., Thornburg T., Berquin I.M. (2007) *Dietary fat-gene interactions in cancer*. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 535-551.
- Chizzolini, R., Novelli, E. and Zanardi, E. (1998) *Oxidation in traditional mediterranean meat products*. *Meat Science* 49 Suppl. 1, S87-S99.
- Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) *Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Biochemistry* 162: 156-159.
- Clop A., Ovilo C., Perez-Enciso M., Cercos A., Tomas A., Fernandez A., Coll A., Folch JM., Barragan C., Diaz I., Oliver MA., Varona L., Silio L., Sanchez A., Noguera JL. (2003) *Detection of QTL affecting fatty acid composition in the pig*. *Mammalian Genome* 14: 650-656.
- Crockett E.L. (1998) *Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature*. *American zoologist*. 38: 291-304.
- Darvasi A. (1998) *Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models*. *Nat. Genet.* 18: 19-24.
- Davoli R., Colombo M., Schiavina S., Fontanesi L., Buttazon L., Russo V. (2007) *Transcriptome analysis of porcine skeletal muscle: differentially expressed genes in Italian Large White pigs with divergent values for glycolytic potential*. *Italian Journal of Animal Science* 6: 113-115.
- Dawson H., Nishi S., Beshah E., et al. (2003). *Use of real-time assays of immune gene expression to assess the genetic basis of disease resistance*. *Proceedings of the Plant and Animal Genome XI Meetings, San Diego, CA, USA.* (<http://www.intlpag.org/11/abstracts/W52 W330 XI.html>)
- de Koning D.J., Rattink A.P., Harlizius B., van Arendonk J.A., Brascamp E.W., Groenen M.A. (2000) *Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 7947-7950.

- de Vries A.G., Sosnicki A., Garnier J.P. and Plastow G.S. (1998) *The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs*. Meat Science 49 (Suppl. 1): S245-S255.
- Dopazo A. (2002) *Micro y nanotecnología en Medicina: Los chips y microarrays de DNA*. Encuentros Multidisciplinares nº 12. (<http://www.encuentros-multidisciplinares.org/>).
- Duran-Montgé D., Theil P.K., Lauridsen C., Esteve-Garcia E. (2007) *Efecto de la grasa de la dieta sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico del cerdo*. ITEA 28 vol. Extra, pp. 207-209.
- Edwards S.A., Wood J.D., Moncrieff C.B., Porter S.J. (1992) *Comparison of the Duroc and Large White as a terminal sire breeds and their effect on pig meat quality*. Animal Production 54: 289-297.
- El-Mounayri O., Jason W.T., Charles W.Y. and Herring B.P. (2005) *Regulation of Smooth Muscle-specific Gene Expression by Homeodomain Proteins, Hoxa10 and Hoxb8*. The J. Biolog. Chem. 280: 25854–25863.
- Essén-Gustavsson B. and Fjelkner-Modig S. (1985) *Skeletal muscle characteristics in different breeds of pigs in relation to sensory properties of meat*. Meat Science 13: 33-47.
- Fernández X., Monin G., Talmant A., Mourot J., Lebret B. (1999) *Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat – 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum*. Meat Science 53:59-65.
- Fernández, A., de Pedro E., Núñez N., Silió L., García-Casco J. and Rodríguez C. (2003) *Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in Iberian pigs*. Meat Science 64:405-410.
- Ferraz LJ A., Ojeda A., López-Béjar M., Fernandez L.T., Castelló A., Folch J.M. and Pérez-Enciso M. (2008) *Transcriptome architecture across tissues in the pig*. BMC Genomics 9:173. (doi:10.1186/1471-2164-9-173)
- Fiedler I., Nürnberg K., Hardge T., Nürnberg G., Ender K. (2003) *Phenotypic variations of muscle fibre and intramuscular fat traits in Longissimus muscle of F2 population DurocxBerlin Miniature Pig and relationships to meat quality*. Meat Science 63: 131–139.
- Frayn N. (1998) *Metabolismo de las lipoproteínas. Regulación del metabolismo (Una perspectiva humana)*. Ediciones Omega.
- Fuji J., Ostu K., Zorzato F., Leon S.D., Khama V.K. et al. (1991) *Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia*. Science 253:448–451.
- Gallardo D., Pena R.N., Amills M., Varona L., Ramírez O., Reixach J., Díaz I., Tibau J., Soler J., Prat-Cuffi J.M., Noguera J.L. and Quintanilla R. (2008) *Mapping of*

quantitative trait loci for cholesterol, LDL, HDL and triglyceride serum concentrations in pigs. *Physiological Genomics* 35: 199–209.

- Gallardo D., Quintanilla R., Varona L., Díaz I., Ramírez O., Pena R.N., Amills M. (2009a) *Polymorphism of the pig acetyl-coenzyme A carboxylase alpha gene is associated with fatty acid composition in a Duroc commercial line.* *Animal Genetics (en prensa)*; (doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01854.x.)
- Gallardo D., Quintanilla, R. and Pena, R.N. (2009b) *Caracterización de los genes porcinos de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (SLC27A / FATP solute carrier family 27^a.* En *XIII Jornadas sobre Producción Animal AIDA*. M. Joy, J. H. Calvo, C. Calvete, M. A. Latorre, I. Casasús, A. Bernués, B. Panea, A. Sanz, J. Balcells (Eds.). AIDA, Zaragoza. pp 3-5.
- García M.V., Bayón Darkistake J.E., Culebras Fernández J.M., Jorquera Plaza F, García Díez F. (1996). *Hepatic metabolism of cholesterol.* *Nutr. Hosp.* 11: 37-42.
- García-Regueiro, J. A., Gilbert, J., & Diaz, I. (1994). *Determination of neutral lipids from subcutaneous fat of cured ham by capillary gas chromatography and liquid chromatography.* *Journal Chromatography A667*: 225-233.
- Georges M. (2007) *Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals.* *Annual review of genomics and human genetics.* 8: 131-162.
- Gerbens F., Rettenberger G., Lenstra J.A., Veerkamp J.H., te Pas M.F.W. (1997) *Characterization, chromosomal localization and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene.* *Mammalian Genome* 8:328–332.
- Gerbens F, de Konig D.J., Harders F.L., Meuwissen T.H.E., Janss L.L. *et al.* (2000) *The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and back fat content in Meishan crossbred pigs.* *Journal of Animal Science* 78:552–559.
- Gerbens F, Verburg F.J., Van M.H.T., Engel B., Buist W. *et al.* (2001) *Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs.* *Journal of Animal Science* 79:347–354.
- Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang Y.H.J. and Zhang J. (2004) *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.* *Genome Biology* 5: R80.
- Giovambattista G., Ripoli M.V., Peral-García P., De Lúea J.C., Dulout F.N. (1998) *Mapping of QTLs associated with milk production: Present status.* *Agro Sur* 26(2):78-96.
- Gladney C.D., Bertani G.R., Johnson R.K., Pomp D. (2004) *Evaluation of gene expression in pigs selected for enhanced reproduction using differential display PCR and human microarray. I. Ovarian follicles.* *Journal of Animal Science* 82:17-31.

- Gu F., Harbitz I., Chowdhary B.P., Bosnes M., Gustavsson I. (1992) *Chromosomal localizations of the hormone sensitive lipase (LIPE) and insulin receptor (INSR) genes in pigs*. Hereditas 17: 231-236.
- Guo T., Ren J., Yang K., Ma J., Zhang Z. and Huang L. (2009) *Quantitative trait loci for fatty acid composition in longissimus dorsi and abdominal fat: results from a White Duroc · Erhualian intercross F2 population*. Animal Genetics 40: 185–191.
- Haley, C.S., Knott S.A. and Elsen J.M. (1994) *Mapping Quantitative Trait Loci in Crosses Between Outbred Lines Usin Least Squares*. Genetics 136:1195-1207.
- Haley, C. and P. Visscher (2000) *DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: current applications and future prospects*. Roslin Institue Annual Report 1998-1999.
- Harbitz I, Langset M., Ege A.G., Høyheim B., Davies W. (1999) *The porcine hormone-sensitive lipase gene: sequence, structure, polymorphisms and linkage mapping*. Animal Genetics 30: 10-15.
- Harshman K. (2002) *Detección y ácidos nucleicos y nanotecnología: El Gran potencial de los ensayos a pequeña escala*. Encuentros Multidisciplinares nº 12. (<http://www.encuentros-multidisciplinares.org/>)
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. (2009) *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources*. Nature Protocols 4: 44-57.
- Ibeagha-Awemu E.M., Kgwatalala P., Zhao X. (2008) *A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig*. Mammalian Genome (doi 10.1007/s00335-008-9141-x.)
- Imbeaud S. and Auffray C. (2005) *'The 39 steps' in gene expression profiling: critical issues and proposed best practices for microarray experiments*. Drug Discov Today 10 (17): 1175-1182.
- Jones, G. F., (1998) *Genetic aspects of domestication, common breeds and their origin*, pp. 17–50 in *The Genetics of the Pig*, edited by A. Ruvinsky and M. F. Rothschild. CAB International University Press, Cambridge, UK.
- Kefei C, Baxter T., William M.M., Groenen M.A., Schook L.B. (2007) *Genetic Resources, Genome Mapping and Evolutionary Genomics of the Pig (Sus scrofa)*. International Journal of Biological Sciences 3: 153-165. ISSN 1449-2288 (www.biolsci.org)
- Kim J.B., Spiegelman B.M. (1996) *ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism*. Genes Development 10: 1096-1107.
- Kim J.H., Seong P.N., Cho S.H., Park B.Y., Hah K.H., Yu L.H., Lim D.G., Hwang I.H., Kim D.H., Lee J.L. and Ahn C.N. (2008) *Characterization of nutritional value for twenty-one pork muscles*. Asian-Austral. Journal of Animal Science 21: 138-144.

- Knapp P., Willam A., Sölkner J. (1997) *Genetic parameters for lean meat content and meat quality traits in different pig breeds*. *Livestock Production Science* 52: 69-73.
- Knott, S.A., Elsen J.M. and Haley C. S. (1996) *Methods for multiplemarker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations*. *Theoretical and Applied Genetics* 93:71–80.
- Knott. S.A. (2005) *Regression-based quantitative trait loci mapping: robust, efficient and effective*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360(1459):1435-1442.
- Kollers S., Megy K., Rocha D. (2005) *Analysis of public single nucleotide polymorphisms in commercial pig populations*. *Animal Genetics* 36:426-431.
- Lander, E.S., Botstein D. (1989) *Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using Linkage Maps*. *Genetics* 121:185-199.
- Lee S.S., Pineau T., Drago J., Lee E.J., Owens J.W., Kroetz D.L., Fernandez-Salguero P.M., Westphal H. and Gonzalez F.J. (1995) *Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator- activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators*. *Molecular and Cellular Biology* 15: 3012-3022.
- Li C., Wong W. (2001) *Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 31-36.
- Li C.L., Pan Y.C., Meng H., Wang Z.L., Huang X.G. (2006) *Distributions of polymorphism of ADD1, MC4R, H-FABP gene, associated with IMF and BF in 3 populations in pig*. *Yi Chuan* 28:159-164.
- López-Bote, C. (1998) *Sustained utilization of the Iberian pig breed*. *Meat Science* 49 (Suppl. 1): S17-S27.
- Malek M., Dekkers J.C., Lee H.K., Baas T.J., Prusa K., Huff-Lonergan E., Rothschild M.F. (2001) *A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition*. *Mammalian Genome* 12:637-645.
- Meuwissen T.H.E., Goddard M.E. (1996) *The use of marker haplotypes in animal breeding schemes*. *Genetic Selection Evolution* 28: 161-176.
- Meuwissen T.H.E., Hayes B.J. and Goddard M.E. (2001) *Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps*. *Genetics* 157: 1819–1829.
- MingZhou Li., Zhu Li., XueWei Li., SuRong S., XiaoKun T., HuaSheng X., Qiang Li., Lei C., YuJiao G., JinYong W. (2008) *Expression profiling analysis for genes related to meat quality and carcass traits during postnatal development of backfat in two pig breeds*. *Science in China Series C: Life Sciences* 51: 718-733.
- Moe M., Lien S., Bendixen C., Hedegaard J., Hornshøj H., Berget I., Meuwissen T.H.E., Grindflek E. (2008) *Gene expression profiles in liver of pigs with extreme high and*

- low levels of androstenone*. BMC Veterinary Research 4: 29. (<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/4/29>).
- Moody D.E, Zou Z, McIntyre L. (2002) *Cross-species hybridization of pig RNA to human nylon microarrays*. BMC Genomics 3: 27.
- Morales J, Baucells MD, Perez JF, Mourot J, Gasa J. (2003) *Body fat content, composition and distribution in Landrace and Iberian finishing pigs given ad libitum maize- and acorn-sorghum-maize-based diets*. Animal Science 77: 215-224.
- Muñoz G., Alves E., Fernández A., Ovilo C., Barragán C., Estellé J., Quintanilla R., Folch J.M., Silió L., Rodríguez M.C., Fernández A.I. (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*. Animal Genetics 38: 639-346.
- Newcom D.W., Baas T.J., Schwab C.R. and Stalder K.J. (2005) *Genetic and phenotypic relationships between individual subcutaneous backfat layers and percentage of longissimus intramuscular fat in Duroc swine*. Journal of Animal Science 83: 316-323.
- Nii M., Hayashi T., Tani F., Niki A., Mori N., Fujishima-Kanaya N., Komatsu M., Aikawa K., Awata T., Mikawa S. (2006) *Quantitative trait loci mapping for fatty acid composition traits in perirenal and back fat using a Japanese wild boar x Large White intercross*. Animal Genetics 37:342-347.
- O'Brien P.J., MacLennan D.H. (1992) *Application in the swine industry of a DNA-based test for porcine stress syndrome*. Proc. Am. Assoc. Swine Pract., pp 433-435.
- O'Hea, E.K, Leveille G.A. (1969) *Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis*. Journal of Nutrition 99:338-344.
- Okomo-Adhiambo M.A., Beattie C.W., Rink A. (2003) *Relative quantification of the differential expression of apoptosis genes in an in vitro porcine Toxoplasma gondii infection using real-time RTPCR*. Proceedings of the Plant and Animal Genome XI Meetings, San Diego, USA (<http://www.intlpag.org/11/abstracts/P7cP840 XI.html>).
- Oliver M.A., Gou P., Gispert M., distre A., Arnau J., Noguera J.L., Blasco A. (1994) *Comparison of five types of pig crosses. II. Fresh meat quality and sensory characteristics of dry cured ham*. Livestock Production Science 40: 179-185.
- Oscari L.B., Essig D.A. and Palmer W.K. (1990) *Lipase regulation of muscle triglyceride hydrolysis*. Journal of Applied Physiology 69: 1571-1577.
- Ovilo C., Clop A., Noguera J.L., Oliver M.A., Barragán C., Rodriguez C., Silió L., Toro M.A., Coll A., Folch J.M., Sánchez A., Babot D., Varona L., Pérez-Enciso M. (2002) *Quantitative trait locus mapping for meat quality traits in an Iberian x Landrace F2 pig population*. Journal of Animal Science 80:2801-2808.

- Paszek, A.A., Wilkie P., Flickenger G., Rohrer G., Alexander L., Beattie C. and Schook L. (1999) *Interval mapping of growth in divergent swine cross*. *Mammalian Genome* 10:117-122.
- Paszek A.A., Wilkie P.J., Flickinger G.H., Miller L.M., Louis C.F., Rohrer G.A., Alexander L.J., Beattie C.W., Schook L.B. (2001) *Interval mapping of carcass and meat quality traits in a divergent swine cross*. *Animal Biotechnology* 12: 155-165.
- Pérez-Enciso M., Clop A., Noguera J.L., Ovilo C., Coll A., Folch J.M., Babot D., Estany J., Oliver M.A., Díaz I., Sánchez A. (2000) *A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross*. *Journal of Animal Science* 78:2525-2531.
- Pérez-Enciso M. (2008) *Essential bioinformatics for animal breeders*. Lecciones Máster “Mejora genética animal y Biotecnología de la reproducción”. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Purslow P.P. (1985) *The physical basis of meat texture: observation on the fracture behaviour of cooked bovine M. semitendinosus*. *Meat Science* 12:39-60.
- Reiner-Benaim A., Yekutieli D., Letwin N.E., Elmer G.I., Lee N.H., Kafkafi N., Benjamini Y. (2007) *Associating quantitative behavioral traits with gene expression in the brain: searching for diamonds in the hay*. *Bioinformatics* 23: 2239-2246.
- Reixach J. (2004) *TB-DUROC: la Calidad de Carne*. (http://www.batalle.com/pdfs/pdfs_documents/atec2.pdf).
- Rohrer G.A., Thallman R.M., Shackelford S., Wheeler T., Koohmaraie M. (2006) *A genome scan for loci affecting pork quality in a Duroc-Landrace F population*. *Animal Genetics* 37:17-27.
- Rothschild M.F., Ruvinsky A. (1998) *The Genetics of the Pig*, edited by A. Ruvinsky and M. F. Rothschild. CAB International University Press, Cambridge, UK.
- Rothschild M.F. and Plastow G.S. (1999) *Advances in pig genomics and industry applications*. *AgBiotechNet* 1:1-7.
- Rothschild M.F. (2003) *Advances in pig genomics and functional gene discovery*. *Comparative and Functional Genomics* 4: 266–270.
- Rothschild M.F. (2003) *From a sow’s ear to a silk purse: real progress in porcine genomics*. *Cytogenet Genome Research* 102:95-99.
- Rothschild M.F. (2004) *Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market*. *Genetics Research* 83:1-6.
- Ryu, Y.C., Choi, Y.M., Lee, S.H., Shin, H.G., Choe, J.H., Kim, J.M., Hong, K.C., Kim, B.C., (2008) *Comparing the histochemical characteristics and meat quality traits of different pig breeds*. *Meat Science* 80: 363–369.

- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985) *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science* 230:1350-1354.
- Sanchez M.P., Iannuccelli N., Basso B., Bidanel J.P., 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 Genetics* 8:55.
- Sato S., Oyamada Y., Atsuji K., Nade T., Sato S., Kobayashi E., Mitsuhashi T., Nirasawa K., Komatsuda A., Saito Y., Terai S., Hayashi T., Sugimoto Y. (2003) *Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan x Duroc F2 resource population*. *Journal of Animal Science* 81:2938-2949.
- Schena M., Shalon D., Brown P.O., Davis R.W. (1995) *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. *Science* 270:467-470.
- Seaton G., Haley C.S., Knott S.A., Kearsley M., Visscher P.M. (2002) *QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees*. *Bioinformatics* 18: 339-340.
- Sellier P. (1998) *Genetics of meat and carcass traits*. Pages 463-510 in *The Genetics of the Pig*. M. F. Rothschild and A. Ruvinsky Eds., CAB International, New York.
- Serra X., Gil F., Perez-Enciso M., Oliver M.A., Vazquez J.M., Gispert M., Diaz I., Moreno F., Latorre R., Noguera J.L. (1998) *A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbas line) and Landrace pigs*. *Livestock Production Science* 56: 215-223.
- Simon R.M., Radmacher M.D., Dobbin K. (2002) *Design of Studies Using DNA Microarrays*. *Genetic Epidemiology* 23: 21-36.
- Simon R.M., Korn E.L., McShane L.M., Radmacher M.D., Wright G.W. and Zhao Y. (2003) *Design and Analysis of DNA Microarray Investigations*. In: *Statistics for Biology and Health, Series Eds.: K. Dietz, M. Gail, K. Krickeberg, J. Samet, A. Tsiatis*. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg. (ISBN 0-387-00135-2).
- Simon R.M. (2008) *Microarray Based Expression Profiling and Informatics*. *Curr. Opin. Biotechnology* 19(1): 26-29.
- Steane, D.E. (1986) *The potencial of the Duroc breed of pig*. *Research and Development in Agriculture* 3: 153-157.
- Steward J.W., Kaplan M.L., Beitz D.C. (2001) *Pork with a high content of polyunsaturated fatty acids lowers LDL cholesterol in women*. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:179-187.
- Suzuki K., Irie M., Kadowaki H., Shibata T., Kumagai M. and Nishida A. (2005) *Genetic parameter estimates of meat quality traits in Duroc pigs selected for average daily gain, longissimus muscle area, backfat thickness, and intramuscular fat content*. *Journal of Animal Science* 83:2058-2065.

- Suzuki K., Ishida M., Kadowaki H., Shibata T., Uchida H. and Nishida A. (2006) *Genetic correlations among fatty acid compositions in different sites of fat tissues meat production, and meat quality traits in Duroc pigs*. Journal of Animal Science 84:2026-2034.
- Swatland H.L. (1991) *Estructura y desarrollo de los animales de abasto*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Szyda J., Liu Z., Grindflek E., Lien S. (2002) *Application of a mixed inheritance model to the detection of quantitative trait loci in swine*. Journal of Applied Genetics 43(1):69-83.
- Tibau J., Puigvert X., Soler J., Trilla N., Diestre A., Gispert M., Fernandez J., Manteca X. (1997) *Incidencias de factores genéticos y de comportamiento en la eficiencia del crecimiento, la composición, la calidad de la canal y de la carne en distintas razas porcinas*. Anaporc 171: 74-91.
- Tibau J. (1998) *Calidad de carne y mejora genética*. (www.batalle.com/pdfs/cal-gen.pdf)
- Tibau J. (2004) *La Genética y la producción porcina*. Lecciones Máster “Mejora genética animal y Biotecnología de la reproducción”. IRTA.
- Toro M.A., Silió L. (1992) *La mejora de la selección porcina*. Porci 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*. Czech Journal of Animal Science 47: 411–417.
- Ventanas J. et al. (2001) *Tecnología del jamón Ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y aroma*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Ventanas J. (2006) *El jamón Ibérico: de la dehesa al paladar*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Wang X., Xue C., Wang X., Liu H., Xu Y., Zhao R., Jiang Z., Dodson M.V., Chen J. (2009) *Differential display of expressed genes reveals a novel function of SFRS18 in regulation of intramuscular fat deposition*. International Journal of Biological Sciences 5:28-33.
- Weigel K. (2008) *Selección Genómica: Una Explicación Práctica* CRI International Horizons (<http://documents.crinet.com/Genex-Cooperative-Inc/Dairy/IntlSHorizons-11-08-p4-5.pdf>).
- Wilson C.L., Miller C.J. (2005) *Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis*. Bioinformatics 21: 3683-3685.
- Wilson M.E., Fahrenkrug S.C., Smith T.P., et al. (2002) *Differential expression of cyclooxygenase-2 around the time of elongation in the pig conceptus*. Animal Reproduction Science. 71: 229–237.

- Wood J. D., Enser M., Whittington F.M., Moncrieff C.B. and Kempster, A.J. (1989) *Backfat composition in pigs: Differences between fat thickness groups and sexes*. *Livestock Production Science* 22: 351-362.
- Wood J.D., Enser M., Fisher A.V., Nute G.R., Sheard P.R., Richardson R.I., Hughes S.I., Whittington, F.M. (2008). *Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A Review*. *Meat Science* 78:343-358.
- Xu X., Zhao Y. and Simon R. (2008) *Gene Set Expression Comparison kit for BRB-ArrayTools*. *Bioinformatics* 24: 137–139
- Yagüe G. (2008) *Puntos clave de los genes y QTL porcinos*. *Albéitar* nº 112:4-7.
- Zhang J., He Q., Liu Q., Guo W., Deng X.M., Zhang W.W., Hu X.X., Li N. (2007) *Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated with/without clenbuterol*. *BMC Genomics* 8:433.

ABREVIATURAS

AG	ácidos grasos
AGS/SFA	ácidos grasos saturados
BLUP	<i>Best Linear Unbiased Prediction</i>
BFT	grasa dorsal
CAST	Calpastatina
cDNA	ácido desoxiribonucleico copia
CHOL/COL	cantidad de colesterol
DNA	ácido desoxiribonucleico
FABP3	<i>Fatty acid binding protein-3</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
GAS	Selección Asistida por Genes
GIM/IMF	grasa intramuscular
GM	<i>gluteus medius</i>
GO	<i>gene ontology</i>
GS	Selección Genómica
HDL	lipoproteínas de alta densidad
IGF2	<i>Insulin-like growth factor-2</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	<i>longissimus dorsi</i>
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LEAN	% de magro
LIPE	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
LW	peso vivo
MAI	Introgresión Asistida por Marcadores
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MAS	Selección Asistida por Marcadores
ME1	<i>Malic enzyme-1</i>
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MUFA	ácidos grasos monoinsaturados
NPC1	<i>Niemann-Pick disease Type C-1</i>
NPC2	<i>Niemann-Pick disease Type C-2</i>
p	<i>p-value</i> (tasa de error tipo I)
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
POS	posición
PUFA	ácidos grasos poliinsaturados
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
RC	retrocruce o <i>backcross</i>
RNA	ácido ribonucleico
SCD	<i>Stearoyl-CoA desaturase</i>
SD	desviación estándar
SNP	<i>single nucleotide polymorfism</i>
SSC	cromosoma porcino (<i>Sus Scrofa Chromosome</i>)
TC	colesterol total
TG	triglicéridos
UCP2	<i>Uncoupling protein-2</i>