

XXXIII Reunión científica de la Asociación Peruana de Producción Animal (APPA). 14-16 Septiembre 2010. Huancavelica. Perú
Polimorfismos de los genes de los ácidos grasos (A.G.) en cabras Murciano-Granadinas: Efectos sobre el perfil de A.G. y sobre la reología de la leche.

Título Abreviado: Genética de los ácidos grasos en las cabras

Serradilla J.M.^{1*}, A. Zidi², M. Amills², J. Jordana², O. Polvillo³, V.M. Fernández-Cabanás³, B. Urrutia³, J.A. Carrizosa⁴ y F. Moya⁵

¹ Departamento de Producción Animal. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Ctra. N IV Km 396. 14014 Córdoba, España. palsemaj@uco.es

² Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España. marcel.amills@uab.es

³ Departamento de Ciencias Agroforestales Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola- Universidad de Sevilla, Carretera Utrera, km. 1. 41013 Sevilla, España. victorf@us.es

⁴ Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Estación Sericícola. La Alberca, Murcia, España. balatar.urrutia@carm.es

⁵ KPRA. Sociedad Cooperativa. Camino de Fortuna. Apdo. 125. Cabezo de Torres. Murcia, España. Kpra@cajamar.es

* Correspondencia a: e-mail: palsemaj@uco.es

Resumen

Se han caracterizado estructuralmente los genes que codifican las enzimas lipoproteína lipasa (LPL), acetil-coA-carboxilasa α (ACACA), esteroil-coA desaturasa 1 (SCD1), lipasa sensible a hormonas (LIPE), málica 1 (ME1), el receptor de la prolactina (PRLR) y la molécula CD36 (CD3621 y CD364), cuya función fisiológica está estrechamente relacionada con el metabolismo, transporte y secreción de lípidos en la glándula mamaria. Se secuenció la región codificante, 5'UTR y 3'UTR de estos genes en distintos individuos con la finalidad de identificar posiciones polimórficas (mutaciones de un solo nucleótido). A continuación, se pusieron a punto métodos de determinación del genotipo, basados en las técnicas de 'primer extension analysis' y/o pirosecuenciación. Mediante dos experimentos realizados en 4 rebaños diferentes, se estudiaron las asociaciones de estos polimorfismos con los principales componentes (grasa, proteína, lactosa y materia seca), perfil de ácidos grasos y características reológicas de la leche en la raza Murciano-Granadina. Muchos de los polimorfismos encontrados resultaron estar asociados con las propiedades reológicas de la leche (punto y velocidad de coagulación y firmeza de la cuajada), con el contenido y con la composición de la grasa, principalmente con los A.G. considerados saludables.

Palabras clave: cabras, ácidos grasos, reología, SNP

Summary

The molecular features of genes coding for lipoprotein lipase (LPL), stearoyl-coA carboxilasa α (ACACA), stearoyl-coA desaturase (SCD), hormone-sensitive lipase (LIPE), malic enzyme 1 (ME1), prolactin receptor (PRLR) and CD36 molecule (CD3621 y CD364), whose physiological function is deeply connected with lipid metabolism, transport and secretion in the mammary gland have been studied. The coding region, 5'UTR and 3'UTR of these genes was sequenced in diverse individuals with the aim of identifying polymorphic positions (SNP). Moreover, genotyping methods, based on primer extension analysis and/or pyrosequencing, were developed. Two experiments were carried out in four different herds in order to find associations with milk main components, fatty acid profile and rheology traits in the Murciano-Granadina breed of goats. Many of the found polymorphisms were associated with milk fat content and coagulation properties (curdling rate and curd firmness) and with contents of fatty acids (CLA, MUFA, PUFA) considered healthy.

Key words: goats, fatty acids, milk rheology, SNP

Introducción

La grasa es el componente que mayor incidencia tiene sobre las características organolépticas de la leche y el queso y sobre sus propiedades nutritivas (Chilliard *et al.*, 2003; Sanz Sampelayo *et al.*, 2007). La grasa de la leche está constituida fundamentalmente por triglicéridos (algo más del 95%), siendo el colesterol y los ácidos grasos libres solamente entre un 0,1 y un 0,4 % del contenido total de grasa (Le Mens, 1991). La proporción de ácidos grasos saturados en la leche de los rumiantes varía entre el 71% y el 80%, con una elevada proporción (15 a 19%) de ácidos grasos de cadena corta (C4:0 y C6:0) (Jensen *et al.*, 1991). La leche de cabra tiene un mayor contenido de ácidos grasos de cadena media, como el caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) (Sanz Sampelayo *et al.*, 2007) que la leche de vaca. Desde el punto de vista terapéutico estos triglicéridos de cadena media (MCT), que se caracterizan por seguir una vía de utilización metabólica distinta de la de los triglicéridos constituidos por ácidos grasos de cadena larga (LCT), presentan un gran interés en el tratamiento de determinadas enfermedades metabólicas (Haenlein, 2004). El contenido de ácidos grasos monoinsaturados y PUFA, presenta un interés particular en relación con la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Davignu *et al.*, 1997) y por su papel modulador del sistema inmune (Gómez García *et al.*, 2003). El ácido linoleico conjugado (CLA) de la grasa láctea tiene una acción anti carcinogénica, anti adipogénica, anti aterogénica y antidiabética, resultando igualmente modulador de la respuesta inmune (Parodi, 1997; Ip *et al.*, 2003).

Al contrario de lo que ocurre con los genes implicados en la síntesis de las proteínas de la leche, los genes que intervienen en el metabolismo de los lípidos no han sido aún bien caracterizados en la especie caprina. Entre los más importantes de estos genes están los que codifican las enzimas lipoproteína lipasa (*LPL*), acetil-coenzima A carboxilasa α (*ACACA*), diacilglicerol aciltransferasa 1 (*DGAT1*), málica 1 (*ME1*), lipasa sensible a hormonas (*LIPE*), estearoil-CoA desaturasa (*SCD*), el receptor de la prolactina (*PRLR*) y el receptor *CD36*.

Los parámetros reológicos de la leche están directamente relacionados con la eficacia del proceso de transformación en queso y son, por tanto de interés para la industria quesera (Clark y Sherbon, 2000). Las relaciones entre la composición y los parámetros reológicos de la leche de cabra han sido establecidas en diversos trabajos (Storry *et al.*, 1983; Remeuf y Lenoir, 1986; Ambrosoli *et al.*, 1988). Sin embargo, no se han realizado hasta el momento estudios que relacionen los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos con las características reológicas de la leche.

En esta ponencia se van a resumir los trabajos realizados por nuestro equipo para la caracterización molecular de estos genes, la identificación de polimorfismos y el estudio de su asociación con los principales componentes, el perfil de ácidos grasos y las características reológicas de la leche de cabra.

Material y Métodos

Animales y diseño experimental: Los resultados presentados en este trabajo proceden de dos experimentos llevados a cabo en rebaños de cabras de la raza Murciano-Granadina en un régimen semi-extensivo de explotación, con pastoreo y alimentación en pesebre, en dos periodos de tiempo diferentes entre 2005 y 2009. Se extrajo sangre 133 cabras, pertenecientes a tres rebaños, en el primer experimento y a 176 cabras, pertenecientes a un solo rebaño, en el segundo experimento, para la determinación de los genotipos de los genes estudiados. Todos los rebaños estaban reproductivamente desconectados. Se registró la producción de estas cabras y se recogieron muestras de leche del primer ordeño del día cada dos meses durante dos años. Las muestras comenzaban a recogerse a partir del cuarto mes de lactación. Se puede encontrar una descripción más detallada del primer experimento en Badaoui *et al.* (2007a) y del segundo en Zidi *et al.* (2010c).

Determinación del genotipo de los animales: Los protocolos de amplificación y secuenciación del ADN y análisis de las muestras mediante 'primer extension analysis' y pirosecuenciación para la identificación del genotipo de cada animal para cada uno de los genes estudiados se hallan descritos en Badaoui *et al.* (2007a y 2007b).

Análisis de la composición de la leche: Los contenidos (medidos en porcentajes) de proteína, grasa, lactosa y materia seca, así como el número de células somáticas de las muestras de leche se determinaron con un instrumento CombiFoss 600 FC (constituido por un espectrofotómetro en infrarrojo medio MilkoScan FT 6000 para el análisis de los componentes de la leche y un contador de células somáticas Fossomatic FC).

Análisis de la composición de ácidos grasos: El procedimiento de determinación del perfil de ácidos grasos de muestras de leche correspondientes a las cabras del experimento 2, está descrito en Zidi *et al.* (2010c) El proceso de extracción y esterificación de los ácidos grasos fue desarrollado por Sukhija y Palmquist (1988) y posterior identificación de los esteres metílicos mediante cromatografía de gases, empleando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890CN provisto de una columna capilar HP-88 (100mx 0,25 de diámetro interno x 0,2um) y equipado con un detector de ionizador de llama (FID). Los ácidos grasos analizados están descritos en la Tabla 1.

Tabla 1.- Ácidos grasos analizados

Estructura	Nombre común	Nomenclatura química
C4:0	butírico	Butanoico
C6:0	caproico	Hexanoico
C8:0	caprílico	Octanoico
C10:0	cáprico	Decanoico
C11:0		Undecanoico
C12:0	láurico	Dodecanoico
C13:0		Tridecanoico
C14:0	mirístico	Tetradecenoico
C14:1	miristoleico	Tetradecenoico
C15:0		Pentadecanoico
C15:1		Pentadecenoico
C16:0	palmítico	Hexadecenoico
C16:1	palmitoleico	9-hexadecanoico
C17:0	margárico	Heptadecanoico
C17:1		Heptadecenoico
C18:0	esteárico	Octadecenoico
C18:1n9t		Octadecenoico
C18:1n11t	trans-vaccénico	
C18:1n9c	oleico	9-octadecenoico
C18:2n6t	linoleico	
C18:2n6c (linoleic)	linoleico	9,12-octadecadienoico
C18:3 n6 □-linolenic	gamma linolénico	6,9,12-octadecatrienoico
C20	araquídico	Eicosanoico
C20:1n9	gadoleico	Eicosaenoico
9c-11t CLA	linoleico conjugado	
C18:3n3 □-linolenic	alfa-linolénico	9,12,15-octadecatrienoico
10t12c CLA	linoleico conjugado	
C21		Heneicosanoico
C20:2		Eicosadienoico
C22	behénico	Docosanoico
C20:3n6	dihomo-□-linolénico	8,11,14-eicosatrienoico
C22:1 n9 erucic	erucico	13-docosenoico
C20:4 n6 arachidonic	araquidónico	5,8,11,14-eicosatetranoico
C20:3n3	Ác. eicosatrienoico	5,8,11-eicosatrienoico
C23:0		Tricosanoico
C20:5n3(EPA)	eicosapentanoico, EPA	5,8,11,14,17-eicosapentanoico
C22:2		Docosadienoico
C24:0	lignocérico	Tetracosanoico
C24:1n9	nervónico	15-tetracosenoico
C22:5n3 (DPA)	clupanodónico	4,7,10,13,16,-docosapentaenoico
C22:6n3 (DHA)	docosahexaenoico, DHA	4,7,10,13,16,19-docosahexanoico

Determinación de las variables reológicas de la leche: A todas las muestras de leche se les midió el pH antes de realizar los análisis de coagulación. Las propiedades de coagulación de la leche se determinaron mediante un coagulómetro Optigraph® ((ISEBAERT - Frepillon, Francia) equipado con un sensor que detecta las variaciones de la señal de infrarrojo cercano transmitidas a través de la leche en proceso de coagulación contenida en unos pocillos de 10 ml mantenidos a 32°C. Se determinó el tiempo (en minutos) transcurrido desde la adición del cuajo (3 µl de una dilución 1:100 peso/volumen de polvo de cuajo CHR-Hansen, fuerza 1300 IMCU/g, IDF-157) a la leche hasta que comienza la coagulación (R), la velocidad de coagulación, expresada en minutos transcurridos para que se alcancen diferentes niveles de firmeza de la cuajada, medidos al alcanzarse en el sensor 1000 V (S2), 2000 V (S4), 3000 V (S6) y 4000 V (S8). La firmeza de la cuajada a tiempos equivalentes a R, 2R, 20 minutos (A20), 30 minutos (A30) y al finalizar la coagulación (Afin) se determina mediante el voltaje generado en el sensor en los momentos antes indicados. Se analizaron dos réplicas de cada muestra de leche y el valor medio de las medidas de cada variable se utilizó para los análisis estadísticos.

Análisis estadísticos: Se utilizó el procedimiento MIXED del SAS (V8e, 2007), siguiendo la metodología expuesta por Littell *et al.* (1998) para el análisis de medidas repetidas. El factor cabra se consideró aleatorio y subordinado a todos los demás factores. Se estimaron las medias mínimo cuadráticas y se llevaron a cabo todos los contrastes a posteriori entre ellas, aplicando las correcciones de Bonferroni y de Benjamini y Hochberg para controlar los posibles falsos positivos. En los modelos utilizados se incluyeron todos los factores fijos a considerar (estación y año de parto, número de orden de parto, número de cabritos nacidos, edad de la cabra) y el genotipo como un factor fijo más. El modelo utilizado para los análisis de asociación de los genotipos estudiados con las variables reológicas, se incluyeron también el pH y el logaritmo del número de células somáticas como covariables.

Resultados y discusión

La Tabla 2 muestra las asociaciones entre los polimorfismos encontrados en las regiones codificante y UTR de los genes estudiados y las variables de composición de la leche y de la grasa de la leche.

Tabla 2.- Asociaciones de los polimorfismos encontrados con las variables de composición y el perfil de ácidos grasos de la leche.

Gen	SNP	Tipo	Denominación HGVS ¹	Variable	P≤
ACACA ²	SNP C/T	Sinónimo	c.5493C>T	% grasa % lactosa	0,05 0,05
LPL ³	SNP G/C	3'UTR	c.50G>C	% grasa	0,05
SCDI ⁴	SNP C/T	Sinónimo	c.732C>T	% lactosa	0,02
	IndelTGT	3'UTR	c.*1902_1904delTGT	% lactosa	0,009
				trans10,cis12 CLA	0,0024
	SNP A/G	3'UTR	c.*3504G>A	% lactosa	0,02
				trans10,cis12 CLA	0,0051
			CLA total	0,0071	
MEI ⁵	SNP C/T	Sinónimo	c.483C>T	C16:0	0,0096
	SNP G/A	Sinónimo	c.667G>A	C18:1n9t	0,0068
	SNP A/G	Sinónimo	c.1200G>A	CLA total	0,0049
LIPE ⁶	SNP C/T/A	Sinónimo	c.327C>A>T	C12:0	0,0084
	SNP C/T	Sinónimo	c.558C>T	Producción leche	0,0032
				% grasa	0,019
				trans10,cis12 CLA	0,0070
	SNP G/T	Cambio A/S	c.1162G>T	C18:3n6g	0,0051
PRLR ⁷	SNP A/G	Cambio R/G	c.1201G>A	C16:0	0,03
				C16:1	0,004
				C18:2n6c	0,03
				PUFA	0,05
	SNP C/T	Sinónimo	c.1355C>T	C16:1	0,0067
				C18:1n9t	0,01
				SFA	0,03
				MUFA	0,05
			Omega 3	0,01	
CD362I ⁸	SNP C/T	3'UTR	c.*141C>T	C11:0	0,006
	SNP C/T	3'UTR	c.*422C>T	C14:0	0,0032
				C16:1	0,0015
	SNP T/A	3'UTR	c.*428T>A	C14:1	0,01
CD364 ⁸	SNP C/A	Sinónimo	c.390A>C	C18:1n9c	0,03

¹HGVS: Human Genome Variation Society

²Badaoui *et al.* (2007a); ³Badaoui *et al.* (2007b); ⁴Zidi *et al.* (2010a); ⁵Zidi *et al.* (2010b); ⁶Zidi *et al.* (2010c); ⁷Zidi *et al.* (2010d); ⁸No publicado.

Gen ACACA: Se han amplificado y secuenciado 5,5 kb que constituyen el 78% de la región codificante del gen que abarca parcialmente del exón 3 al 46 (entrada DQ370054 en el GenBank) que codifica una proteína constituida por 1838 AA con los siguientes motivos estructurales identificados con el programa ProSite (<http://www.expasy.org/prosite>): 1) el dominio biotil/lipoil que contiene un grupo biotina ligado covalentemente a un residuo Lys; 2) el dominio de carboxilación del grupo biotina; y 3) el dominio carboxil transferasa que cataliza el paso de del grupo carboxil de la biotina al acetyl-CoA para producir malonil-CoA. La asociación encontrada entre los genotipos de este SNP y el contenido de grasa y de lactosa en la leche debe de ser debida a que este locus esté ligado a otros que influyen en dichos caracteres, ya que la mutación encontrada es sinónima y no está localizada en una región en la que se pueda ver afectada la expresión génica; consecuentemente, no es esperable que produzca un cambio estructural en la encima ACACA. Otro indicio de que esto es así lo da el hecho de que, aun cuando la síntesis de la lactosa y la lipogénesis son procesos que están metabólicamente relacionados, los efectos esperable de una sola mutación sobre cada uno de los dos componentes deberían de ser opuestos, puesto que ambas rutas metabólicas compiten por el mismo precursor (glucosa), lo que indica que debe de haber dos mutaciones ligadas a la observada, influyendo cada una de ellas en un componente.

Gen LPL: Se ha amplificado y secuenciado la región codificante completa (1437 bp) del gen (entrada DQ370053 en el GenBank), que codifica una proteína de 478 AA con motivos estructurales, determinados mediante el programa ProSite, comunes a las lipasas y a otras encimas relacionadas funcionalmente con éstas, que incluyen: 1) el dominio de la lipasa que hidroliza el enlace ester de los triglicéridos; 2) el de la policistina-1, lipoxigenasa, y alfa toxina (PLAT) que pueden estar involucrado en las interacciones proteína-proteína y proteína-lípidos (Delrieu *et al.*, 2002); 3) los residuos de cisteína que forman los puentes disulfídicos (Yang *et al.*, 1989); 4) sitios de N-glicosilación; and 5) el sitio activo altamente conservado (triada S162, D186, and H271), responsable de la catálisis enzimática. Se han descrito diferencias en la actividad enzimática de la LPL entre las razas Noruega, Alpina y Saanen (véase revisión de Chilliard *et al.*, 2003) que sugieren la existencia de factores genéticos regulando la expresión, localización y la actividad de esta encima. Los análisis de asociación de las variables productivas dieron como resultado diferencias significativas ($P > 0.05$) de contenido de grasa entre los genotipos G50C. Esta asociación puede explicarse porque la encima LPL anteviene en la hidrólisis de los triglicéridos que realizan los quilomicrones y las proteínas de baja densidad que es el paso que condiciona la velocidad de aporte de ácidos grasos libres a la glándula mamaria y al tejido adiposo.

Gen SCD1: Se han amplificado y secuenciado 4,7 kb que abarcan el 95% de la región codificante y el 96% la UTR 3' del gen. De las tres mutaciones detectadas, una de ellas (c.*1902_1904delTGT, exón 6 en la UTR 3') ha sido previamente descrita por Bernard *et al.*, (2001). Esta mutación está, además, ligada a la c.*3504G > A en la UTR 3'. La asociación de estos tres polimorfismos con el contenido de lactosa en la leche no tiene una explicación biológica, puesto que el gen SCD1 no está relacionado funcionalmente con el metabolismo de la lactosa. Una explicación plausible es que dichas asociaciones sean el resultado de un desequilibrio de ligamiento de este gen con otras posibles mutaciones causales no identificadas. Es digno de mención que no se haya observado una asociación de estos polimorfismos con el contenido ácidos grasos mono insaturados (MUFA) y los índices de desaturación, ya que la función primordial del gen SCD1 es la síntesis de MUFA, aunque no todos los estudios realizados, fundamentalmente en bovino han arrojado resultados positivos en relación con estas asociaciones. Bionaz and Loor (2008) no encontraron ninguna relación entre el ARNm del SCD1 en la glándula mamaria y los índices de desaturación, de donde concluyeron que deben intervenir muchos otros factores en la regulación de la síntesis de ácidos grasos. La variación del nivel de expresión del RNAm del gen SCD1 durante la lactación, decayendo a partir del segundo mes (Bionaz and Loor, 2008) podría explicar estas discrepancias en los resultados de diferentes trabajos y se deben de tener en cuenta al interpretar los anteriores resultados, ya que los muestreos con los que se obtuvieron comenzaron al tercer mes de lactación. Los ácidos grasos poli insaturados (PUFA) son ácidos graso esenciales que no se sintetizan endógenamente, si no que se adquieren a través de la alimentación, pero existen evidencias de que los contenidos de C18:2 y C18:3 vienen regulados también por factores genéticos, ya que su heredabilidad varía entre 0,09 y 0,27 (Arnould and Soyeurt, 2009) y se observó que dichos contenidos aumentaron en la leche de cabras transgénicas con el gen SCD1 modificado (Reh *et al.*, 2004). Estos hechos sugieren que existe una interacción entre los niveles de expresión de este y otros genes o rutas metabólicas que influyen en la absorción, esterificación y secreción de PUFA en las glándulas mamarias, lo que está de acuerdo con la multiplicidad de funciones del gen SCD1 en la regulación del metabolismo de los lípidos y los carbohidratos (Paton and Ntambi, 2009). La asociación de dos de estos polimorfismos con los niveles de trans-10, cis-12 ácido linoléico conjugado (CLA) hay que entenderla

también en los anteriores términos, ya que este isómero de CLA solamente se produce a través de la acción de las bacterias ruminales (Khanal and Dhiman, 2004). Sin embargo, cis-9,trans-11 CLA se sintetiza fundamentalmente en la glándula mamaria mediante la encima SCD con el ácido trans-vacénico como sustrato (Griinari *et al.*, 2000). Estos dos polimorfismos están localizados, además, en la UTR 3', que es una región que juega un papel fundamental en la regulación postranscripcional de la expresión génica y que frecuentemente contiene secuencias que influyen en la traducción y en la estabilidad del ARNm (Grzybowska *et al.*, 2001), y los análisis locales de la estructura del ARNm realizados demuestran que las dos mutaciones referidas generan cambios de conformación con importantes consecuencias.

Gen ME1: Se secuenciaron 1,4 kb de la región codificante del gen ME1 (entrada GQ387511 en el GenBank). El análisis de un 81,6% de la secuencia aminoacídica primaria con Scan Prosite permitió encontrar un motivo típico de las encimas málicas. Se identificaron también, mediante el uso de datos de la encima málica mitocondrial humana de Yang *et al.* (2000), tres residuos aminoacídicos (E245, D246 y D269), muy conservados en mamíferos, que juegan un papel esencial en la formación de complejos con Mn₂₁ que es un cofactor necesario para la actividad enzimática. Se identificaron también dos secuencias firmas con motivos de unión de dinucleótidos, pero ninguno de las asociaciones encontradas son fácilmente explicables, ya que ninguno de los SNP descrito implica cambios funcionales en la secuencia aminoacídica, al menos a nivel estructural. Esto es lo que, por otra parte, cabría esperar del papel auxiliar que juega la ME1 en la lipogénesis en rumiantes, a pesar de que se han aportado observaciones que muestran que este gen tiene un alto nivel de expresión en tejidos lipogénicos de ovino (Stefos *et al.*, 2008) y que sus niveles de expresión se ven modificados mediante la suplementación de lípidos en la dieta (Bernard *et al.*, 2005; Stefos *et al.*, 2008).

Gen LIPE: Un 83% de la región codificante del gen LIPE (1890 bp) se ha amplificado y secuenciado (entrada GQ927175 del GenBank). En los análisis 'in-silico' de una parte de la secuencia aminoacídica (de las posiciones 37 a 666) se identificaron los dominios del terminal NH₂, el catalítico (con un sitio activo para la serina) y del plegamiento α/β hidrolasa. Se identificaron también dos posibles sitios de fosforilación conservados en ovino (Lampidonis *et al.*, 2008) y bovino (Garton *et al.*, 1989). A pesar de que el polimorfismo c.558C>T es una mutación sinónima sin efecto funcional directo, existe una asociación con la producción de leche y con el contenido de grasa en esta que puede ser la consecuencia de algún otro polimorfismo ligado a éste. La primera asociación puede explicarse porque la cantidad de energía disponible en la glándula mamaria para producir leche depende de la movilización de los lípidos; así una suplementación lipídica incrementa los niveles productivos en vacuno lechero (Wu & Huber, 1994). La asociación de este polimorfismo con el contenido de grasa es más directamente explicable, dada la función bioquímica de esta encima. Las asociaciones observadas en relación con la composición de ácidos grasos de la leche están en consonancia con el papel preferente de LIPE en la síntesis de ácidos grasos de cadena media y ácidos grasos insaturados en las células lipídicas (Raclot & Groscolas, 1993). Una de las asociaciones más significativas es la que relaciona el polimorfismo c.1162G>T con el nivel de C18:3n6g y otra la que relaciona el polimorfismo c.558C>T con el nivel de trans10,cis12 CLA. Ambas confirman la observación de Gavino & Gavino (1992) de que LIPE moviliza selectivamente los ácidos grasos poli-insaturados. Otra asociación significativa, la del polimorfismo c.327C>A>T con C12:0 es también destacable porque éste es uno de los ácidos grasos saturados más eficientemente hidrolizado por la enzima LIPE (Raclot & Groscolas, 1993).

Gen PRLR: Se han amplificado 1,5 kb del gen PRLR (del exón 2 al 9) que abarcan la mayor parte de la región codificante, lo que ha permitido identificar dos isoformas de mRNA, una larga y una corta (entradas GU075815 y GU075814 del GenBank) que se diferencian por la presencia de una inserción de 39 pares de bases que incluyen dos codones de parada prematura, constituyendo un mecanismo alternativo de empalme ("splicing") ya descrito en rumiantes (Bignon *et al.*, 1997). Los polimorfismos c.1201G>A y c.1355C>T generan sustituciones aminoacídicas (G401R y T452I, respectivamente), pero los programas Polyphen y SIFT no predecían ninguna alteración en las funciones del receptor. Por el contrario, el programa Pmut predijo que a sustitución G401R podría implicar un cambio en la función de la proteína, pero con una fiabilidad muy baja. Por otra parte, el programa Panther indicó una elevada probabilidad de que la sustitución T452I sea deletérea. Se han observado asociaciones entre las variantes alélicas no sinónimas y los contenidos de determinados ácidos grasos (palmitoléico, palmítico, elaidico, linoleico, saturados, mono insaturados, poli insaturados y omega 3), aunque las asociaciones con el polimorfismo c.1355C>T deben ser tomadas solamente como posibles, debido a que las frecuencias genotípicas de este locus presentan un fuerte desequilibrio y el genotipo CT tiene está muy poco representado. Aunque no existen evidencias que permitan asignar la causa de las asociaciones observadas a los polimorfismos descritos o a otros polimorfismos de genes estrechamente ligados a ellos, encajan bien con el

papel que la prolactina juega en el metabolismo lipídico en las glándulas mamarias. Las asociaciones encontradas con los ácidos grasos mono-insaturados podría explicarse por la acción de la prolactina sobre la expresión del ARN mensajero del estearoil-coA (Naylor *et al.*, 2005). La prolactina también media en la actividad del glicerol-3-fosfato y las lisofosfolidato-aciltransferasas (Morand *et al.*, 1998), influyendo en la tasa en que los ácidos grasos saturados e insaturados se incorporan en los triaglicéridos.

Genes CD36: Se han secuenciado 2158 pb del gen CD36-21 que corresponden al total de la región codificante (1419 pb) y a parte de la región 3'UTR. Del gen CD36-4 se han secuenciado 1885 pb que incluyen 1411 pb (99% de la región codificante) y 474 pb de la región 3'UTR. En trabajos recientes en los que se han utilizado roedores transgénicos se ha demostrado que los genes CD36 juegan un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos, como translocasa de los ácidos grasos de cadena larga (Baillie *et al.*, 1996; Hajri *et al.*, 2002). Están asociados también con la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias (Sebastián *et al.*, 2009).

La Tabla 4 muestra las asociaciones entre los polimorfismos encontrados en las regiones codificante y UTR de los genes estudiados y las variables reológicas de la leche

Tabla 4.- Asociaciones de los polimorfismos encontrados con las variables reológicas de la leche

Gen	SNP	Variables ¹	Genotipos	Diferencia ²	P≤	P ajustada Bonferroni
<i>SCD1</i>	SNP C/T	S2	CC-TT	-0,72±0,35	0,044	0,460
		S4		-1,75±0,77	0,024	0,279
Afin		3,85±1,27		0,003	0,008	
	SNP A/G	S4	AG-GG	-1,08±0,54	0,046	0,140
		Afin		1,76±0,73	0,017	0,065
<i>MEI</i>	SNP C/T	AR	CC-TT	-1,55±0,69	0,025	0,077
		A2R		-2,05±1,00	0,043	0,128
		Afin		-3,51±1,25	0,006	0,016
		A2R	CT-TT	1,84±1,01	0,069	0,209
		A30		-2,29±1,00	0,024	0,074
		Afin		-2,97±1,26	0,019	0,058
	SNP G/A	S2	AG-GG	-0,58±0,32	0,041	0,123
		S4		-1,23±0,57	0,032	0,096
AR		1,24±0,59		0,038	0,113	
A2R		1,74±0,76		0,023	0,069	
Afin		2,64±0,92		0,005	0,014	
<i>LIPE</i>	SNP C/T	S2	CC-CT	-0,51±0,23	0,027	0,082
		S4		-1,04±0,49	0,036	0,109
		S6		-1,43±0,64	0,028	0,085
<i>CD3621</i>	SNP-A/G	S2	AA-AG	0,60±0,32	0,0144	0,0144
		S4		1,86±0,67	0,0054	0,0054
		AR		-1,36±0,70	0,0517	0,0517
	SNP C/T(1755)	A20	CC-TT	2,47±1,04	0,0192	0,0576
			CT-TT	2,64±1,04	0,0120	0,0359
	SNP C/T (1755)	A30	CC-TT	-2,91±1,22	0,0177	0,0531
			CT-TT	-3,12±1,22	0,0110	0,0330
	SNP C/T (2037)	R	CT-TT	1,05±0,58	0,0699	0,0699
SNP A/T	R	AT-TT	1,24±0,59	0,0375	0,0375	
<i>CD364</i>	SNP C/A	A30	AA-CC	2,09±0,94	0,0267	0,080
		Afin		-2,32±1,16	0,0464	0,014

¹R: tiempo en minutos transcurrido hasta el comienzo de la coagulación; S2, S4, S6: velocidad de coagulación expresada en minutos transcurridos para que se alcancen diferentes niveles de firmeza de la cuajada en los momentos en los que se alcanzan voltajes de 1000, 2000 y 3000 V en el sensor; AR, A2R, A30 y Afin: firmeza de la cuajada a tiempos equivalentes a R, 2R, 30 minutos y al finalizar la coagulación, respectivamente.

²El contenido de ácidos grasos está expresado como porcentaje del total de ésteres metílicos identificados.

Puesto que muchos de los genes estudiados han sido parcialmente amplificados y secuenciados muy recientemente, no existen referencias relativas a las asociaciones de sus variantes polimórficas con las características reológicas de la leche. Algunas de las asociaciones encontradas pueden explicarse por el efecto que los correspondientes genes tienen sobre el contenido de grasa de la leche. Sin embargo otras no son tan fácilmente explicables puesto que no se ha observado asociación entre las variantes encontradas y dicho contenido. En estos casos sería necesario investigar si los polimorfismos descritos tienen realmente un efecto sobre dichas variables o están lo suficientemente ligados a otros genes que si tienen realmente efecto sobre dichas variables, bien directamente, o influyendo en la composición proteica de la leche. La relación entre los polimorfismos de los genes que codifican las caseínas y las variables reológicas ha sido demostrada por miembros de nuestro equipo (manuscrito en fase de revisión).

Agradecimientos

Los resultados descritos en esta ponencia se obtuvieron mediante los proyectos de investigación GAN AGL2002-04304-C03-01 y GAN AGL2007-66161-C02-01 y 02 financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Ministerio de Ciencia e Innovación (actualmente Ministerio de Educación) del Gobierno de España.

Referencias

- Ambrosoli R., DiStasio L. & Mazzocco P. 1988. Content of α s1-casein and coagulation properties in goat milk. *J. Dairy Sci.*, 71: 24-28.
- Badaoui B., Serradilla J.M., Tomàs A., Urrutia B., Ares J.L., Carrizosa J., Sánchez A., Jordana J. & Amills M. 2007a. Goat acetyl-coenzyme A carboxylase α : Molecular characterization, polymorphism, and association with milk traits. *J. Dairy Sci.*, 90: 1039–1043.
- Badaoui B., Serradilla J.M., Tomàs A., Urrutia B., Ares J.L., Carrizosa J., Sánchez A., Jordana J. & Amills M. 2007b. Short Communication: Identification of Two Polymorphisms in the Goat Lipoprotein Lipase Gene and Their Association with Milk Production Traits. *J. Dairy Sci.*, 90: 3012-3017.
- Baillie A.G., Coburn C.T. & Abumrad N.A. 1996. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J. Membr. Biol.*, 153(1): 75–81.
- Bernard L., Leroux C., Hayes H., Gautier M., Chilliard Y. & Martin P. 2001. Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon. *Gene*, 281: 53–61.
- Bernard L., Rouel J., Leroux C., Ferlay A., Faulconnier Y., Legrand P. & Chilliard Y. 2005. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in Alpine goats fed vegetable lipids. *J. Dairy Sci.*, 88: 1478–1489.
- Bignon C., Binart N., Ormandy C., Schuler L.A., Kelly P.A. & Djiane J. 1997. Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. *J. Mol. Endocrinol.*, 19:109-20.
- Bionaz M. & Looor J.J. 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, 9: 366.
- Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J. & Lamberet G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.*, 86: 1751–1770.
- Clark S. & Sherbon J.W. 2000. Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Rum. Res.*, 38: 123–134.
- Daviglu M.L., Stamler J., Orenca A.J., Dyer A.R., Liu K., Greenland, P., Walsh M.K., Morris D. & Sekelle, R.B. (1997). Fish consumption and the 30-years risk of fatal myocardial infarction. *New Engl. J. Med.*, 336: 1046-1053.
- Delrieu I., Waller C.C., Mota M.M., Grainger M., Langhorne J. & Holder A.A. 2002. PSLAP, a protein with multiple adhesive motifs, is expressed in Plasmodium falciparum gametocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1: 11–20.
- Gavino V.C. & Gavino G.R. 1992. Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. *Lipids*, 27 950–954.

- Garton J.A., Campbell G.D., Carling D., Hardie D.G., Colbran R.J. & Yeaman S.J. 1989. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Europ. J. Biochem.*, 179: 249–254.
- Gómez García V., Sanz Sampelayo M.R., Fernández Navarro J.R., Carmona López F.D., Gil Extremera F., Rodríguez Osorio M. 2003. Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, 117: 85-97.
- Griinari J.M., Corl B.A., Lacy S.H., Chouinard P.Y., Nurmela K.V. & Bauman D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *J. Nutr.*, 130: 2285–2291.
- Grzybowska E.A., Wilczynska A. & Siedlecki J.A. 2001. Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288: 291–295.
- Hajri T., Han X.X., Bonen A. & Abumrad N.A. 2002. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J. Clin. Invest.*, 109(10): 1381–9.
- Haenlein G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin. Res.*, 51: 155-163.
- Ip M.M., Masso-Welch P.A. & Ip C. 2003. Prevention of Mammary Cancer with Conjugated Linoleic Acid: Role of the Stroma and the Epithelium. *J. Mammary Gland Biol.*, 8: 103-118.
- Jensen R.G., Ferris A.M. & Lammi-Keefe C.J. 1991. The composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 74: 3228-3243.
- Khanal R.C. & T.R. Dhiman. 2004. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Pakistan J. Nutr.*, 3: 72–81.
- Lampidonis A.D., Argyrokastritis A., Stravopodis D.J., Voutsinas G.E., Ntouriopi T.G., Margaritis L.H., Bizelis I. & Rogdakis E. 2008. Cloning and functional characterization of the ovine hormone sensitive lipase (LIPE) full-length cDNAs: an integrated approach. *Gene*, 416: 30–43.
- Le Mens P. 1991. Propiedades físico-químicas, nutricionales y químicas. En: F.M. Luquet (coord.). Leche y Productos Lácteos. Cap. 1, p.343. Acribia, Zaragoza.España.
- Littell R.C., Henry P.R. & Ammerman C.B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.*, 76: 1216-31.
- Morand L.Z., Morand J.N., Matson R. & German J.B. 1998. Effect of insulin and prolactin on acyltransferase activities in MAC-T bovine mammary cells. *J. Dairy Sci.*, 81:100–106.
- Naylor M.J., Oakes S.R., Gardiner-Garden M., Harris J., Blazek K., Ho T.W.C., Li F.C., Wynick D., Walker A.M. & Ormandy C.J. 2005. Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development. *Mol. Endocrinol.*, 19: 1868–1883.
- Parodi P. W. 1997. Cows' Milk Fat Components as Potential Anticarcinogenic Agents. *J. Nutr.*, 127: 1055–1060.
- Paton C.M. & Ntambi J.M. 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 297: E28–E37.
- Raclot T. & Groscolas R. 1993. Differential mobilization of white adipose tissue fatty acids according to chain length, unsaturation, and positional isomerism. *J. Lipid Res.* 34: 1515–1526.
- Reh W.A., Maga E.A., Collette N.M.B., Moyer A., Conrad-Brink J.S., Taylor S.J., DePeters E.J., Oppenheim S., Rowe J.D., BonDurant R.H., Anderson G.B. & Murray J.D. 2004. Hot Topic: Using a stearoyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.*, 87: 3510–3514.

- Remeuf F. & Lenoir J. 1986. Relationship between the physicochemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *IDF Bulletin No. 202*: 68-72.
- Sanz Sampelayo M.R., Chilliard Y., Schmidely Ph. & Boza, J. 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 68: 42-63.
- Sebastián D., Guitart M., García-Martínez C., Mauvezin C., Orellana-Gavaldà J.M., Serra D., Gómez-Foix A.M., Hegardt F.G., & Asins G. 2009. Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J. Lipid Res.*, 50: 1789-1799.
- Stefos C.G., Argyrokastritis A., Bizelis I. & Rogdakis E. 2008. Molecular cloning and characterization of the sheep malic enzyme cDNA. *Gene*, 423: 72-78.
- Storry J.E., Grandison A.S., Millard D., Owen A.J. & Ford G.D. 1983 Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *J. Dairy Res.*, 50: 215-229.
- Sukhija & Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food. Chem.*, 36: 1202-1206.
- Wu Z. & Huber J.T. 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Liv. Prod. Sci.*, 39: 141-155.
- Yang C.Y., Gu Z.W., Weng S.A., Kim T.W., Chen S.H., Pownall H.J., Sharp P.M., Liu S.W., Li W.H & Gotto A.M. Jr. 1989. Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins. *Arteriosclerosis 1*: 96-108.
- Yang Z., Floyd D.L., Loeber G. and Tong L. 2000. Structure of a closed form of human malic enzyme and implications for catalytic mechanism. *Nat. Struct. Biol.*, 7: 251-257.
- Zidi A., Fernández-Cabanás V.M., Carrizosa J., Urrutia B., Polvillo O., González-Redondo P., Jordana J., Gallardo D., Amills M. & Serradilla J.M. 2010a. Association between the polymorphism of the goat stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene and milk fatty acid composition in Murciano-Granadina goats. *J. Dairy Sci.*, doi:10.3168/jds.2009-2597.
- Zidi A., Serradilla J.M., Jordana J., Carrizosa J., Urrutia B., Polvillo O., González-Redondo P., Gallardo D., Amills M. & Fernández-Cabanás V.M. 2010b. Polymorphism of the caprine malic enzyme 1 (ME1) gene and its association with milk quality traits in Murciano-Granadina goats. *Animal*, doi:10.1017/S1751731110001230.
- Zidi A., Fernández-Cabanás V.M., Carrizosa J., Jordana J., Urrutia B., Polvillo O., González-Redondo P., Gallardo D., Amills M. & Serradilla J.M. 2010c. Genetic variation at the goat hormone-sensitive lipase (LIPE) gene and its association with milk yield and composition. *J. Dairy Res.*, 77:190-198.
- Zidi A., Serradilla J.M., Jordana J., Carrizosa J., Urrutia B., Polvillo O., González-Redondo P., Gallardo D., Amills M. & Fernández-Cabanás V.M. 2010d. Pleiotropic effects of the goat prolactin receptor genotype on milk fatty acid composition. *Domestic Animal Endocrinology*, 39(2): 85-89.e2.