

Frecuencia alélica del Síndrome de Estrés Porcino en Uruguay (análisis por PCR-RFLP)

Montenegro, M.¹; Castro, G.¹; Barlocco, N.²; Llambí, S.¹

RESUMEN

El Síndrome de Estrés Porcino (SEP) es una enfermedad hereditaria causada por una mutación puntual (C→T) en el gen que codifica para el receptor de la ryanodina (CRC1). El SEP genera importantes pérdidas económicas en la industria porcina debido a muerte súbita de los animales y/o disminución en la calidad de la carne. Los marcadores moleculares de ADN constituyen un método seguro para la determinación genotípica de dicha mutación. En el presente trabajo, se estudió la frecuencia alélica de esta mutación mediante PCR-RFLP en un total de 64 animales de diferentes razas (cerdos criollos Pampa Rocha, híbridos comerciales, Landrace, Large White y Duroc). De estos el 48.43% presentó genotipo homocigota normal (NN), el 40.62% presentaron un genotipo heterocigota portador de la mutación (Nn) y un 10.93% presentaron un genotipo homocigota recesivo afectados (nn). Este es el primer trabajo donde se determina en Uruguay por técnicas moleculares: a) presencia de individuos portadores, Nn (razas Landrace, Large White e híbridos comerciales), b) presencia de animales afectados, nn (raza Landrace e híbridos comerciales), c) ausencia del alelo n en cerdos Pampa Rocha, en la muestra poblacional analizada.

Palabras clave: Porcino, síndrome de estrés, PCR-RFLP.

SUMMARY

Porcine Stress Syndrome (PSS) is a hereditary disease caused by a point mutation (C→T) in the gene encoding the ryanodine receptor (CRC1). The PSS generates significant economic losses in the swine industry due to sudden death of animals and / or decrease in the quality of the meat. DNA molecular markers are a safe method for genotype determination of the mutation. In this paper, we study the allele frequency of this mutation by PCR-RFLP in a total of 64 animals of different breeds (Creole pigs Pampa Rocha, hybrids, Landrace, Large White and Duroc). Of these, 48.43% had a homozygous normal genotype (NN), 40.62% had a heterozygous genotype, being mutation carriers (Nn) and the other 10.93% had a homozygous recessive genotype (nn). This study is the first one in Uruguay where, using molecular techniques, the following groups could be determined in a sample from a population: a. Carriers Nn (Landrace, Large White and commercial hybrids); b. affected animals nn (Landrace and commercial hybrids) and c. Pampa Rocha animals where the n allele was not present.

Key words: Porcine, Stress Syndrome, PCR-RFLP

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Estrés Porcino (SEP) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por una mutación puntual (C→T) en el gen que codifica para el receptor de la ryanodina (CRC1). Esta sustitución provoca un cambio aminoácido (arginina → cisteína) en dicha proteína la cual funciona como canal de calcio en el retículo sarcoplásmico (Fuji y col., 1991). El gen CRC1 se encuentra localizado en el par autosómico 6 presentando dos variantes alélicas asociadas al SEP. El alelo normal es dominante sobre el alelo mutado identificándose al genotipo homocigota dominante con la nomenclatura NN (individuos normales), genotipo heterocigota, Nn (portadores de la mutación) y genotipo homocigota recesivo, nn (individuos susceptibles al SEP) (Bonelli y Schifferli, 2001). La frecuencia de la mutación varía dependiendo de las razas, siendo alta en Pietrain (hasta 97% del alelo

mutado), media en Landrace (35%) y media a baja en Large White (19%) (Riojas-Valdés y col., 2005). La mutación provoca una apertura del canal de calcio impidiendo su cierre (Riojas-Valdés y col., 2005). Se produce así un aumento en la concentración de calcio citoplasmático en el miocito, incrementándose el metabolismo aeróbico, la glucogenólisis y la glucólisis, agotando el ATP, la glucosa y el oxígeno. Esto genera un exceso de dióxido de carbono, ácido láctico, potasio y calor en la sangre, además de un desorden en el equilibrio de iones intra y extracelular y un aumento en la cantidad de agua en la célula. La asociación entre la respuesta al estrés fisiológico, con hipercalcemia, produce como consecuencia final el paro cardíaco del animal. El estado de contracción permanente de la célula muscular provoca hipertrofia muscular, lo cual produce el aumento del desarrollo muscular de la canal (Reiner, 1993). La

canal de los animales homocigotos recesivos manifiesta un disminución rápida e importante del pH post mortem como consecuencia del incremento del metabolismo causado por el estrés (transporte, faena, cópula, calor excesivo, etc.) (Pommier y col., 1998). De esta manera, el SEP genera importantes pérdidas económicas en la industria porcina debido a la muerte súbita de los animales susceptibles al estrés y a una disminución en la calidad de la carne (carnes pálidas, exudativas y blandas) (Leach y col., 1996).

Por otro lado se ha visto la ventaja del efecto gen sobre la producción y diversos autores encuentran que los animales Nn presentan una mejor conversión y ganancia diaria de peso frente a los NN (Puentes Martínez, y Pérez Ede, 2007).

Los marcadores moleculares de ADN constituyen un método seguro para la determinación genotípica de portadores de patologías hereditarias causadas por

¹Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo-Uruguay.
Correo electrónico: silvia.llambi@gmail.com.

²Facultad de Agronomía, Departamento de Producción Animal y Pasturas, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo-Uruguay.

Recibido: 5/8/10 Aprobado: 1/11/10

mutaciones puntuales (Bonelli y Schifferli, 2001). Uno de los métodos empleados en la determinación de la mutación es la técnica de PCR y RFLP (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción). Este consiste en la amplificación por PCR de una secuencia del gen donde se encuentra la mutación mediante la utilización de oligonucleótidos específicos con una posterior digestión de dicho fragmento con enzimas de restricción (ER) (Bonelli y Schifferli, 2001).

Hernández y col. (2008) mediante PCR-RFLP, amplifican un fragmento de 659pb del gen CRC1 que incluye a la mutación y mediante cortes con la enzima Alw21I identifican animales portadores genotipo, Nn (fragmentos de 524, 358, 166 y 135pb), animales normales, genotipo NN (fragmentos de 524 y 135 pb) y animales enfermos genotipo nn (fragmentos 358,166 y 135pb).

En nuestro país se identifica por primera vez la mutación mediante técnicas con marcadores moleculares por Montenegro y col. (2009). El objetivo de este trabajo fue realizar el estudio de las frecuencias alélicas para el polimorfismo mencionado utilizando la técnica de PCR-RFLP en una muestra de animales pertenecientes a la raza local Pampa Rocha (de interés a nivel de conservación de recursos zoogenéticos) y razas de importancia comercial para nuestro País (Large White, Landrace, Duroc e híbridos).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procedió a la extracción de ADN partir de 5 mL sangre periférica de 64 animales de diferentes razas: 28 híbridos, 14 Pampa Rocha, 14 Landrace, 5 Large White y 3 Duroc. Se entiende por híbridos a las cruza estandarizadas para venta comercial. Dentro de los híbridos estudiados se incluyen animales cruza de Duroc x Pampa Rocha, Landrace x Large White, y Pietrain x Large White. Los animales muestreados pertenecen a diferentes establecimientos: Unidad de Producción de Cerdos del Centro Regional Sur (Facultad de Agronomía-UdelaR); Servicio Veterinario de Remonta del Campo Militar N°1 (localidad los Cerrillos) y a empresas de chacinados.

En el aislamiento de ADN se empleó un kit de extracción (AxyPrep, Axygen). Para la técnica de PCR se utilizaron un

par de oligonucleótidos que flanquean la secuencia de 659pb donde se encuentra la mutación: F-CRC1 5'-TCC AGT TTG CCA CAG GTC CTA CCA-3' y R-CRC2 3'-ATT CACCGG AGT GGA GTC TCT GAG-5' (Villareal y col., 2005). Para dicha técnica se optimizó un programa de desnaturalización inicial de 94 °C/5 minutos, seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C/1 minuto, hibridización a 58 °C/1 minuto y extensión a 72 °C/1 minuto, con un programa de extensión final a 72 °C/5 minutos. Para aumentar la especificidad de la reacción de PCR se utilizó DMSO (dimetilsulfóxido). Para la técnica de RFLP, se utilizó 10U de la endonucleasa de restricción Alw21I durante 3 h a 37 °C, con una posterior inactivación de la enzima a 65 °C durante 20 minutos y una desnaturalización con proteínasa K, incubándose a 37 °C durante 1 h (Hernández y col., 2008). Los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa (2% tinción bromuro de etidio) y minigeles de acrilamida (6 % tinción nitrato de plata). Para el cálculo de las frecuencias alélicas se utilizó el software de diseño público Popgene 32 versión 1.32 (Yeh y col., 2000).

Cuadro 1. Frecuencia por razas de los genotipos para el SEP.

Raza	Genotipo NN	Genotipo Nn	Genotipo nn	Nº Total
Pampa Rocha	14	0	0	14
Landrace	1	8	5	14
Large White	4	1	0	5
Duroc	3	0	0	3
Híbridos	9	17	2	28
Totales (%)	31 (48.43)	26 (40.62)	7 (10.93)	64 (100%)

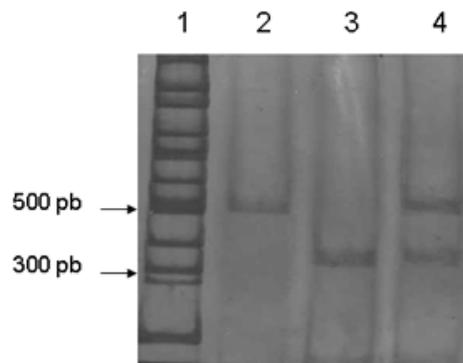


Figura 1. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata. Carril 2: genotipo de un cerdo de raza Large White donde se distingue una única banda de 524 pb, tratándose de un individuo con genotipo normal (homocigota dominante). Carril 3 y 4: individuos de la raza Landrace, en el primer caso se observa una única banda de 358 pb, por lo cual el individuo es homocigota recesivo; mientras que en el segundo caso se observan dos bandas de 524 y 358 pb lo cual permite afirmar que este animal es heterocigota (portador de la mutación).

DISCUSIÓN

Los individuos más susceptibles encontrados en este estudio, entre portadores y enfermos, son los híbridos y los Landrace mientras que en la raza local Pampa Rocha no se encontraron animales portadores ni enfermos. En cerdos híbridos, estudios previos indican una frecuencia de la mutación causante del SEP de un 16%, mientras que en Landrace es de un 35%. En el caso de las razas Large White y Duroc, la frecuencias previas encontradas son de 19 y 15% respectivamente (Riojas-Valdés y col., 2005). De todas maneras no se pueden hacer inferencias respecto a la prevalencia de la mutación en las diferentes razas debido al bajo número de animales analizados para cada una de las mismas.

Se destaca como principal resultado que mediante la técnica de PCR-RFLP, se detectó por primera vez en nuestro país la presencia de la mutación puntual causante del SEP, pudiéndose identificar animales portadores y enfermos. La información generada permitirá eliminar a estos individuos como reproductores, disminuyendo de esta manera la frecuencia de dicha mutación. Debemos tener en cuenta que esta patología hereditaria afecta a la industria porcina (Bonelli y Schifferli, 2001). Por otro lado existe la tendencia de producir animales con menos grasa y más músculo llevando a que los productores seleccionen animales heterocigotos

(efecto gen asociado a mayor rendimiento de la canal y menos grasa) (Puentes Martínez y Pérez Ede, 2007). Sin embargo, el beneficio de la selección realizada a favor de los portadores aún se encuentra en discusión. Esta selección posibilitó el aumento de la frecuencia, así como su difusión a través de reproductores seleccionados para esta característica.

La optimización de las técnicas empleadas (PCR-RFLP), podría ser empleada como metodología para el diagnóstico de esta patología hereditaria así mismo como una herramienta para identificar portadores y realizar cruzamientos dirigidos aplicados a mejorar la producción porcina.

Por otro lado, resultó interesante el estudio del recurso zoogenético local Pampa Rocha, debido a que se generaron datos que contribuyen con la caracterización genética de la misma, aspecto muy importante a tener en cuenta cuando se quieren realizar estudios para la conservación de una raza. En un principio se esperaba encontrar animales portadores de la mutación o enfermos, debido a que esta raza tendría en sus orígenes sangre de las razas Berkshire y Poland China (Kelly y col., 2004), en esta última la prevalencia de la mutación causante del Síndrome estudiado es de un 80% (Bonelli y Schifferli, 2001). Sin embargo, todos los cerdos Pampa Rocha analizados resultaron normales, no encontrándose hasta el momento individuos portadores o enfermos.

Estos datos resultan de interés, considerando que es una raza local utilizada por pequeños y medianos productores del este de nuestro país (Departamento de Rocha), y que podría ampliarse su uso por otros productores. Este resultado también podía esperarse al tratarse de una raza local, en la cual se supone que ha sido mínima la aplicación de métodos de selección.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de técnicas moleculares (PCR y marcadores moleculares) se detectó por primera vez en nuestro país; la presencia de la mutación puntual causante del Síndrome de Estrés Porcino, pudiéndose identificar animales portadores y enfermos. La optimización de las técnicas empleadas (PCR-RFLP), podría ser utilizada como metodología para el diagnóstico de esta enfermedad hereditaria contribuyendo a la mejora genética en producción porcina. En la muestra de la raza Pampa Rocha no se detectó el alelo mutante.

Agradecimientos

A colegas veterinarios y productores de la industria porcina por facilitarnos las muestras sanguíneas. A Br. Wanda Iriarte, Br. Rody Artigas, Dra. Mónica Martínez y Dra. Rosa Gagliardi por la colaboración técnica en el laboratorio. A la ANII (Agencia Nacional en Investigación e Innovación) y CSIC-UdelaR por la financiación del presente trabajo.

Referencias Bibliográficas

- Bonelli, A. M.; Schifferli, R. (2001). Síndrome Estrés Porcino. Arch. Med. Vet. v.33 n.2, p 125-135.
- Fuji, J.; Otsu, K.; Zorsato, F.; de Leon, S.; Khanna, V.K.; Weiler, J.E.; O, Brien, P.J.; MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science. 253, p. 448-451.
- Hernández, D. Y.; Posso Terranova, A. M.; Muñoz Flores, J. E. (2008). Detección de una mutación puntual en el gen receptor Ryanodina (Ryr1) en cerdos criollos colombianos. Acta Agron (Palmira). 57 (4), p275-278.
- Kelly, L.; Clop, A.; Vadell, A.; Nicolini, P.; Monteverde, S. (2004). El cerdo Pampa Rocha como recurso zoogenético en Uruguay. Marcadores moleculares. Veterinaria (Montevideo) v. 39 (155-156), p. 15-16.
- Leach, L.M.; Ellis, M.; Sutton, D.D.; Mckeith, F.K., Wilson, E.R. (1996). The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. J Anim. Sci, 74.p 934-943.
- Montenegro, M.; Artigas, R.; Gagliardi, R.; Castro, G.; Llambí, S. (2009). Primer diagnóstico molecular del síndrome de estrés porcino en Uruguay (técnica de PCR-RFLP). 6as Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria. Montevideo-Uruguay, pp 128.
- Pommier, S.A.; Pomar, C.; Godbout, D. (1998). Effect of the Halothane genotype and stress on animal performance, carcass composition and meat quality of crossbred pigs. Can J. Anim. Sci. 78, p 257-264.
- Puentes Martínez, T.; Pérez Ede, T. (2007). Canalopatías en veterinaria: dos ejemplos de interés. Rev. Complutense de Ciencias Veterinarias: Vol 1 (2): 603-611.
- Reiner, G. (1993). A new physiological pathway controlling muscle growth and its potencial relevance for pig production. Pig News and Information. 14, p 123-125.

-
- Riojas Valdés, V.; Canales, J.; Gómez de la Fuente, J.; Dávalos, G.; Hernández, G.; Salinas, J.** (2005). Frecuencia alélicas del síndrome de estrés Porcino en Nuevo León, mediante análisis PCR-RFLP. *Vet. Méx.*, 36 (3),p261-267.
- Villareal, P.; Diéguez, F.J.; Rodríguez, M.** (2005). Estandarización de una prueba de ADN para detectar el Síndrome de Estrés Porcino (SEP) en cerdos cubanos. *Rev. Ciencia Agrícola*, Tomo 39, (1), p69-74.
- Yeh, F.C.; Yang, R.; Boyle, T.J.; Ye, Z.; Xiyang, J.M.** (2000). POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre,