

## BÚSQUEDA MOLECULAR DE MUTANTES EN EL GEN *RYR-1* QUE PREDISPONEN AL SÍNDROME DEL ESTRÉS PORCINO, EN ANTIOQUIA (COLOMBIA)

### MOLECULAR SCREENING IN ANTIOQUIA (COLOMBIA), FOR MUTANTS IN THE *RYR-1* GENE THAT PREDISPOSE TO PORCINE STRESS SYNDROME

Esperanza Trujillo<sup>1</sup>, Mauricio Camargo<sup>2</sup> y David Noriega<sup>3</sup>

#### Resumen

El síndrome del estrés porcino es una de las anomalías que más impacto económico ocasiona en los cerdos. Es producido por la mutación del gen *n*, en el gen receptor de la ryanidina porcina (Fujii *et al.*, 1991), localizado en la región p11-q21 del cromosoma 6 (Davies *et al.*, 1988; Harbitz *et al.*, 1990). Además de elevar la tasa de mortalidad de la piara, va en detrimento de la calidad de la carne. Los animales que sufren este síndrome pueden presentar muerte súbita cuando son expuestos a actividades como la monta, el contacto con animales de distinta procedencia o durante el transporte.

La incidencia y el diagnóstico de la mutación del gen *RYR-1* en Colombia aún no había sido determinada utilizando técnicas moleculares. Nuestro propósito fue aplicar la técnica de PCR-RFLP (Otsu *et al.*, 1992) para determinar la frecuencia de heterosis y la homocigosis del gen mutado presente en las piaras, y utilizar esta metodología para implementar su uso en la selección genética de animales con la mutación.

En una población de veintinueve cerdos seleccionados al azar, se determinaron las siguientes frecuencias genotípicas: dieciocho homocigóticos (*N/N*) (0.62), diez heterocigóticos (*N/n*) (0.34) y un homocigótico (*n/n*) (0.034). Las frecuencias alélicas para *N* y *n* fueron 0.793 y 0.207, respectivamente.

El test de equilibrio Hardy-Weinberg indicó que no hay diferencia significativa para equilibrio genético ( $p > 0.5531$ ). Y aunque los valores muestran un aparente exceso de heterocigóticos, la prueba exacta de Hardy-Weinberg para exceso de heterocigosis también reveló diferencias no significativas ( $p > 0.3774$ ).

**Palabras clave:** gen *RYR-1* porcino, hipertermia maligna, PCR-RFLP.

#### Abstract

The porcine stress syndrome is one of the anomalies that cause more economic impact in pigs. Produced by a mutation (*n*) in the porcine ryanidine receptor gene (*RYR-1*) (Fujii *et al.*, 1991), localized in the 6p11-6q12 region on chromosome 6 (Davies *et al.*, 1988; Harbitz *et al.*, 1990), elevates the mortality rate of the herd, and leads to a detriment in the quality of the meat. The animals suffering this syndrome, may present sudden death when exposed to certain activities such as copulation, contact with strange animals or during transport.

The incidence and diagnosis of the *RYR-1* gene mutation in Colombia had not yet been determined using molecular techniques. Our purpose, was to apply the PCR-RFLP (Otsu *et al.*, 1992) to determine the heterosis frequency and possibly undiagnosed homozygotes in the herds, in order to implement its use in genetic selection of animals with the mutation.

In a population of twenty nine pigs randomly selected, the following genotypes and frequencies, were determined: 18 homozygous (*N/N*) (0.621), ten heterozygous (*N/n*) (0.345), and one homozygous (*n/n*) (0.034). The allelic frequencies for *N* and *n* were 0.793 and 0.207, respectively.

Recibido: diciembre de 2000; aprobado para publicación: marzo de 2001.

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín, Colombia. E-mail: etbravo@epm.net.co.

<sup>2</sup> Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín, Colombia. E-mail: mcamargo@epm.net.co.

<sup>3</sup> Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín, Colombia. E-mail: danove13@hotmail.com.

A Hardy-Weinberg equilibrium test indicated no significant difference for genetic equilibrium ( $p > 0.5531$ ). Although the values showed an apparent excess of heterocigotes, the exact Hardy-Weinberg test for excess of heterocigosis, also revealed no significant differences ( $p > 0.3774$ ).

**Key words:** porcine *RYR-1* gene, malignant hiperthermia, PCR-RFLP.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome del estrés porcino es una de las anomalías que más impacto económico ocasiona en el ganado porcino (Taylor, 1992). Además de elevar la tasa de mortalidad de la piara, va en detrimento del producto final de la explotación. Los animales que sufren este síndrome pueden presentar muerte súbita cuando son expuestos a actividades como la monta, el contacto con animales de distinta procedencia o durante el transporte. Además presentan hipertermia maligna, y sus carnes son pálidas, blandas y exudativas (O'Brien y McLennan, 1992).

La afección se presenta primordialmente a partir de los nueve meses de edad, y con mucha más frecuencia si la temperatura ambiental supera los 22 °C. Las manifestaciones iniciales del síndrome son temblores musculares y de la cola, disnea, piel pálida y con manchas rojas, aumento de la temperatura corporal a más de 41.5 °C, colapso, rigidez muscular y muerte (Christian, 1992).

Ya que los cerdos afectados son generalmente de aspecto saludable y portadores de mucha carne, por efecto del estrés producido en el momento del sacrificio suministran una carne impropia y deshidratada, ocasionando pérdidas económicas en la industria cárnica.

El *background* genético, la fisiología y la fisiopatología de la mutación del gen *RYR-1* conllevan a considerar la eliminación de la mutación *RYR-1* por selección, apoyada en una simple razón económica, ya que la fertilidad y reproducción se ven seriamente reducidos con el síndrome (Wendt *et al.*, 2000).

El síndrome es producido por mutación del gen *RYR-1* (*n*), localizado en el cromosoma 6 (Davies *et al.*, 1988), y científicamente se ha confirmado que se trata de una mutación en el gen receptor de la ryanidina porcina (Fujii *et al.*, 1991), locali-

zada en la región p11-q21 (Harbitz *et al.*, 1990), detectable mediante el método molecular basado en PCR-RFLP (Otsu *et al.*, 1992).

Los canales de calcio, también conocidos como receptores de ryanidina, desempeñan un papel muy importante en la iniciación de la contracción muscular (O'Brien y Klip, 1990). Un transporte deficiente de calcio en la membrana celular, principalmente del músculo esquelético (Keniazev y Khardge, 1996), tiene como consecuencia un incremento en las concentraciones citosólicas de calcio en estas células, induciendo una actividad incontrolada del músculo (Martens, 1997).

Este gen recesivo también produce una sensibilidad a la inhalación de anestésicos como el halotano, por lo cual la exposición a éste se utiliza como un método de diagnóstico del síndrome. El test del halotano, originalmente desarrollado por Christian (1972), es generalmente aceptado por su especificidad y sensibilidad en la detección de homocigóticos para la mutación, pero no detecta los heterocigóticos, ya que no son sensibles, y por consiguiente pueden transmitir el gen a su descendencia (Deufeel y Olla, 1992).

El gen mutado presenta además penetrancia incompleta, lo que implica que en muchos casos un animal homocigótico para la mutación puede no expresar las características fenotípicas del síndrome, y por consiguiente no presentar la sensibilidad al halotano y no ser detectado por esta metodología de selección (Davies *et al.*, 1988).

La prevalencia de la mutación para animales homocigóticos (*n/n*) en granjas de Estados Unidos, Canadá e Inglaterra para las siguientes razas, fue: 97% Pietran, 35% Landrace, 15% Duroc, 19% Large White, 14% Hampshire, 19% Yorkshire y 16% para Crossbred (O'Brien *et al.*, 1993).

La selección genética mediante técnicas moleculares ofrece el único acercamiento sensible para reducir la incidencia del síndrome en las manadas problema. La genotipificación del pie de cría permite la identificación de los afectados, que deben ser separados de la manada y manejados cuidadosamente hasta que logren un peso aceptable en el mercado y reducir así, en parte, la pérdida económica.

En la actualidad, la selección de animales libres de este gen es llevada a cabo en la mayoría de las explotaciones teniendo en cuenta sólo aquellos que evidencian manifestaciones francas del síndrome y su descendencia, por lo cual heterocigóticos y homocigóticos asintomáticos no son seleccionados y eliminados de la piara.

La incidencia y el diagnóstico de la mutación del gen *RYR-1* en Colombia aún no había sido determinada utilizando técnicas moleculares. Nuestro propósito fue realizar un estudio piloto, con el fin de hacer un diagnóstico de la heterosis presente en las piaras, y utilizar esta metodología para implementar su uso en la selección genética de animales con la mutación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de veintinueve cerdos, elegidos al azar, fueron seleccionados de dos explotaciones porcícolas cercanas a la ciudad de Medellín (Colombia) con el propósito de determinar la frecuencia de homocigosis y heterocigosis, en relación con la mutación del gen *RYR-1* (tabla 1).

**Extracción de DNA.** Se tomó una muestra de 5 ml de sangre a cada animal, recolectada en tubos secos con EDTA, que fue refrigerada hasta su

procesamiento. El DNA fue extraído utilizando el método de *salting out* y la precipitación del DNA fue realizada con isopropanol. El DNA obtenido fue resuspendido en 200  $\mu$ l de buffer TE (10 mM tris, 1 mM EDTA) y almacenado en tubos eppendorf de 0.5 ml a  $-4$  °C. En su defecto y/o simultáneamente, a cada animal se le tomó una muestra de treinta pelos a partir de los cuales se extrajo DNA con el método de fenol-cloroformo.

**Amplificación de DNA.** Se amplificó un fragmento de 659 pb del DNA genómico en un volumen total de 25  $\mu$ l de mezcla de reacción. La mezcla de PCR contenía: buffer 10X,  $MgCl_2$  25 mM, Taq Polimerasa 2.5u, dNTPs 10 mM c/u, primers 5' pM c/u y 0.7  $\mu$ g/ml de DNA. El volumen final se completó con agua tridestilada estéril. Los primers utilizados fueron: ET-R 5'TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA3' y ET-F 5'ATTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAG3' (Nakajima *et al.*, 1996). Las muestras fueron amplificadas utilizando un termociclador Perkin Elmer 2400 mediante 35 ciclos a las siguientes temperaturas: desnaturalización 94 °C, 1 min; alineación de primers 64 °C, 1 min; extensión 72 °C, 1 min. Extensión final 72 °C, 4 min.

**Reacción de restricción.** El fragmento amplificado fue sometido a digestión con la enzima de restricción Alw21I por dieciséis horas a 37 °C. La mezcla de reacción contenía 5u de Alw21I (Fermentas), 10  $\mu$ l de PCR-DNA, 50 mM Tris-HCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA y se completó el volumen con agua tridestilada estéril hasta 20  $\mu$ l.

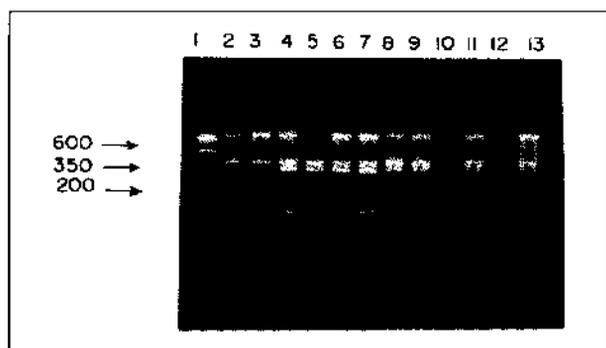
**Parámetros de electroforesis.** Los fragmentos amplificados y cortados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% al cual se adicionaron 0.7 ml de bromuro de etidio

Tabla 1. Muestra poblacional, descripción de los individuos tipificados para la mutación en el gen *RYR-1*

Granja	Raza			
	Pietrain	Landrace	Pietrain x Landrace	Pietrain x Landrace x Large White
1	3	1	6	9
2	1	1	8	
Total	4	2	14	9

(10 mg/ml) en buffer TBE 1X y se corrió durante 45 minutos a 60 voltios; se utilizó además un marcador de peso molecular (Promega).

Los productos de la digestión presentan un tamaño de 524 y 135 pb para los animales con genotipo *N/N*, 524, 358, 166 y 135 pb para el genotipo *N/n*, y 358, 166 y 135 pb para animales con genotipo *n/n* (figura 1).



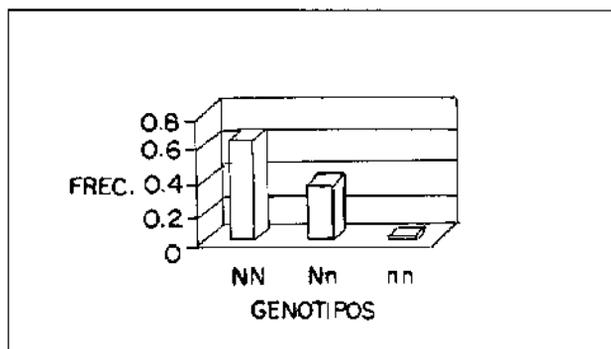
**Figura 1.** Patrón de bandas de los genotipos *N/N* y *N/n*. PCR-RFLP. Línea 1, leader 1.000 pb; líneas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 13, genotipo *N/n*; líneas 10 y 12, genotipo *N/N*; línea 2, amplificado

**Análisis estadísticos.** Las pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg se realizaron empleando el programa GenePop-3.2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos de PCR de los veintinueve animales analizados se diagnosticaron por RFLP, para los genes *N* y *n*. De este grupo, dieciocho presentan genotipo homocigótico (*N/N*) con una frecuencia de 0.62, diez presentan genotipo heterocigótico (*N/n*) con una frecuencia de 0.34 y uno homocigótico (*n/n*) para la mutación del gen *RYSR-1* con una frecuencia de 0.034 (figura 2). Las frecuencias alélicas fueron:  $p(N) = 0.793$  y  $q(n) = 0.207$ .

Se aplicó el test de Hardy-Weinberg y mostró que la población analizada se encuentra en equilibrio genético ( $p > 0.5531$ ). Aunque los valores encontrados muestran un aparente exceso de heterocigóticos, la prueba exacta de Hardy-Weinberg para exceso de heterocigosis ( $p > 0.3774$ ) indica que no es significativo. Al respecto es pertinente anotar



**Figura 2.** Representación gráfica de las frecuencias genotípicas de *N/N*, *N/n* y *n/n*, obtenidas en dos granjas de Antioquia

que de acuerdo con el tamaño de muestra empleado ( $n = 29$ ), a la frecuencia esperada de heterocigotos [ $p(Nn) = 0.328$ ] le corresponde un error estándar de 8.7%. Y con este valor, es de esperar que en muestras de tamaño  $n = 29$  la frecuencia esperada de heterocigotos, en el 95% de las veces, caiga dentro del intervalo 0.149-0.506 (IC del 95%) y, por tanto, cualquier variabilidad generada por endogamia no sería detectada, incluso la generada por un coeficiente de endogamia correspondiente a la cruce entre hermanos ( $F = 0.25$ ). De hecho, con  $F = 0.25$ , la frecuencia esperada de heterocigotos sería 0.246, la cual está dentro del intervalo antes indicado.

Teniendo en cuenta los niveles de endogamia que tienen estos animales y la letalidad de la enfermedad para el homocigótico (*n/n*), estos resultados serían inusuales. Sin embargo, para evaluar una variación en la frecuencia de heterocigotos debida a endogamia, o a selección en contra de los homocigotos recesivos (*n/n*), o a la existencia de un equilibrio puntuado a expensas de una selección sobredominante de heterocigotos, se requeriría una muestra poblacional de mayor tamaño.

Otra explicación es que la enfermedad no sea letal tempranamente, sino que los cerdos (*n/n*) logran reproducirse, y por algún motivo los seleccionadores de las piaras escogen a los cerdos homocigóticos recesivos por tener mayor cantidad de carne o crecer más rápido. También se puede pensar que la frecuencia detectada del gen en la población probablemente sea el resultado de una

campana en las pasadas décadas encaminada a mejorar la tasa de crecimiento en los cerdos y la producción de carnes con bajo contenido de grasa.

En la actualidad el incremento en las pérdidas económicas por el síndrome ha llevado a iniciar programas de selección en los diferentes criaderos. Y como metodología de selección se ha implementado la exposición de animales *n/n* al halotano (Christian, 1992), ya que el gen recesivo produce una alta sensibilidad a la inhalación de este anestésico. Sin embargo, no ha mostrado ser muy efectiva en el control del gen mutado para *RYR-1* en las granjas analizadas, ya que la muestra poblacional evidencia estar en equilibrio, lo que es indicativo de que la utilización de esta metodología, que no permite seleccionar los heterocigóticos, determinará en un futuro cercano un incremento en la incidencia de la anomalía en las poblaciones porcinas, como consecuencia de los cruces entre heterocigóticos no detectados, elevando de esta manera la tasa de mortalidad en la piara y el deterioro de la calidad del producto final de la explotación.

Es importante considerar también que la utilización de la técnica PCR-RFLP, realizada en este trabajo, y que constituye uno de los primeros acercamientos moleculares realizados en Colombia

para detectar la mutación del gen *RYR-1*, permitió determinar la presencia de la mutación en el grupo de animales analizados, con una mayor precisión. De esta manera, la tipificación e identificación de heterocigóticos conllevará a un manejo más cuidadoso de la piara, sobre todo en lo relacionado con el pie de cría.

## CONCLUSIONES

El presente estudio permite concluir que la frecuencia de heterocigotos en la población aún es elevada, a pesar de las campañas de selección utilizando la prueba del halotano tendientes a eliminar de las piaras a los animales homocigóticos para la mutación (*n/n*) del gen *RYR-1*. Esta evidencia sugiere que dicha metodología no ha sido efectiva en la detección de genotipos (*N/n*) o (*n/n*) asintomáticos, lo que posiblemente llevará en un futuro cercano al incremento en la frecuencia de homocigóticos para el síndrome, y/o a la permanencia de heterocigóticos en la población.

Por el contrario, la metodología utilizada en este trabajo, basada en detección molecular con PCR-RFLP, contribuiría de manera importante a las campañas de selección en las piaras, ya que detecta además de los homocigóticos, los heterocigóticos portadores de la mutación.

## REFERENCIAS

- Christian LL. 1972. A review of the role of genetics in animal stress susceptibility and meat quality. *Proc Pork Qual Symp*, Univ. of Wisconsin, Madison. pp. 91-115.
- Christian LA. 1992. Halothane test for PSS field application. *Proc Am Assoc Swine Pract Meet* 13:6-11.
- Davies W, Harbitz J, Fries R. 1988. Porcine malignant hyperthermia carriers detection and chromosomal assignment using a linked probe. *Anim Genet* 19:203-212.
- Deufel T, Olla A. 1992. Evidence for genetics heterogeneity of malignant hyperthermia susceptibility. *Am J Hum Genet* 50:1.151-1.161.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, McLennan DH. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253:448.
- Harbitz J, Chowdhary B, Thomsen PD, Davies W, Kauffmann U, Kran S, Gustavsson I, Christensen K, Hauge JG. 1990. Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11-q21 segment of chromosome 6. *Genomics* 2:243-248.
- Keniazev SP, Khardge T. 1996. Molecular genetics screening of Siberian swine population. *Genetika* 32:1.423-1.425.
- Martens H. 1997. Physiology and physiopathology of ryanodine receptors in swine. *Tierarztl Prax* 25:41-51.
- Nakajima E, Matsumoto T, Yamada R, Kawakami K, Takeda K, Ohnishi A, Komatsu M. 1996. Use of a PCR-Single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) for detection of a point mutation in the swine ryanodine receptor (*RYR1*) gene. *J Anim Sci* 74:2.904-2.906.
- O'Brien PJ, Klip A. 1990. Malignant hyperthermia susceptibility: biochemical basis for pathogenesis and diagnosis. *J Vet Res* 54:83-92.
- O'Brien PJ, McLennan DH. 1992. Application in the swine industry of a DNA-based test for porcine stress syndrome. *Proc Am Assoc Swine Pract Meet* 13:835-837.
- O'Brien PJ, Shen H, Cory R. 1993. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10.000 breeding swine. *J Am Vet Med Assoc* 203:842-851.

Otsu K, Phillips MS, Khanna VK, Leon S, McLennan DH. 1992. Refinement of diagnostic assays for a probable causal mutation of porcine and human malignant hyperthermia. *Genomics* 13:835.

Taylor DJ. 1992. *Enfermedades del cerdo*. Manual Moderno, 2ª. ed, España.

Wendt M, Bickhardt K, Herzog A, Fisher A, Martens H, Rütcher T. 2000. Porcine stress syndrome and PSE meat: clinical symptoms, pathogene ethiology and animal rights aspects. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 113(5):173-190.