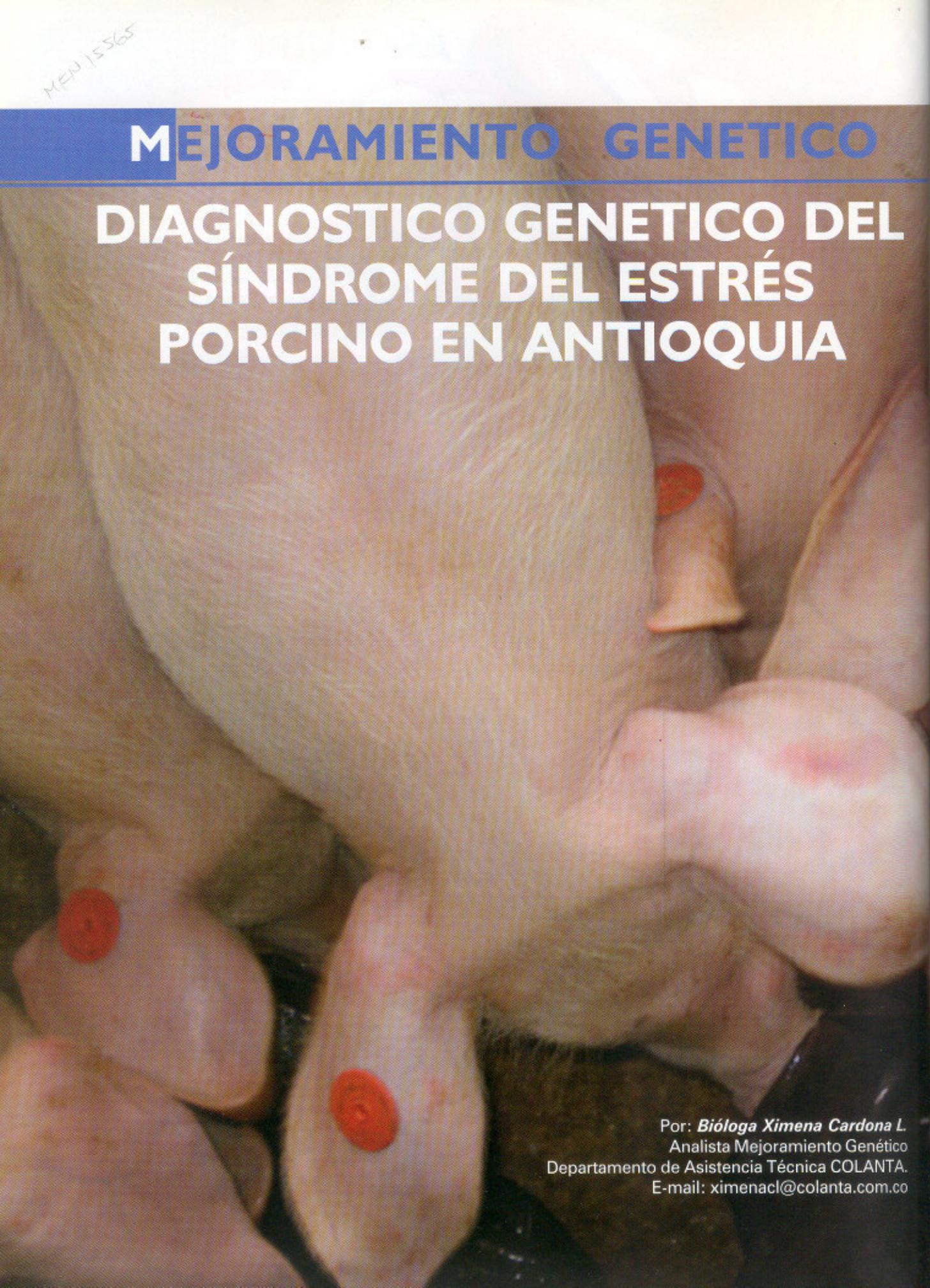


MEV 15565

MEJORAMIENTO GENETICO

DIAGNOSTICO GENETICO DEL SÍNDROME DEL ESTRÉS PORCINO EN ANTIOQUIA



Por: *Bióloga Ximena Cardona L.*
Analista Mejoramiento Genético
Departamento de Asistencia Técnica COLANTA.
E-mail: ximenacl@colanta.com.co

INTRODUCCIÓN

En la producción de carne de cerdo de calidad están implicados varios aspectos que deben ser tenidos en cuenta tales como, la raza, la alimentación y el manejo, los cuales pueden ser controlados directamente por el productor porcícola con el fin de obtener el volumen y la calidad deseada. Pero existen otros rasgos que son inherentes exclusivamente a los individuos, como las variantes genéticas, las cuales tienen efectos importantes sobre las cualidades de la carne y sobre sus propiedades de transformación tecnológica para la fabricación de embutidos.

El genoma porcino consta de 19 pares de cromosomas (38 cromosomas); 18 pares corresponden a los cromosomas autosómicos (36) y un par corresponden a los cromosomas sexuales, XX para el caso de las hembras y XY para el caso de los machos.

En el cromosoma 6 porcino se encuentra el gen denominado inicialmente Gen Halotano (HAL) y en la actualidad llamado Gen Receptor de la Ryanodina (RYR-1) y codifica para una proteína que hace parte de las células musculares. Dicha proteína se ha denominado Receptor de Ryanodina y funciona como un canal liberador de calcio que da inicio al proceso de la contracción muscular (O'Brien, 1995).

Cuando se presenta una mutación, es decir, una alteración en el gen RYR-1, se produce una proteína receptor de Ryanodina anormal, la cual liberará calcio de forma continua provocando un

desorden neuromuscular, agotándose el glucógeno y el oxígeno, produciendo un estado de contracción permanente del músculo. Lo anterior se conoce como Síndrome del Estrés Porcino (PSS) o Hipertermia Maligna (MH), condición hereditaria que es producida por una mutación en el gen RYR-1 y que se manifiesta en rigidez muscular, disnea, aumento notable de la temperatura corporal, taquicardia, arritmia cardíaca, hipertrofia muscular y finalmente muerte por paro cardíaco sistólico (O'Brien, 1995).

El PSS se caracteriza por producir muerte súbita en los cerdos cuando son expuestos a diferentes actividades y/o condiciones tales como la monta, el transporte, contacto con otros animales, temperaturas elevadas, hacinamiento, ejercicio físico, privación de comida y agua, ambientes nuevos, entre otros (Shen y col. 1992); así, como la aparición de canales con carne pálida, blanda y exudativa (PSE) o carne oscura, dura y seca (DFD) (Webb, 1996).



La carne PSE (Figura 1) es causada en especial por la rápida descomposición del glucógeno antes y después del sacrificio. El resultado es una carne muy pálida y adquiere una acidez pronunciada (valores de pH 5.4 – 5.6 inmediatamente después del sacrificio), poca retención de agua, poco sabor y color, cualidades netamente inferiores respecto a la cocción, elaboración y procesamiento tecnológico (Blood y col., 1998; Webb, 1996; Calvo y col., 1995).



Figura 1. Carne PSE.

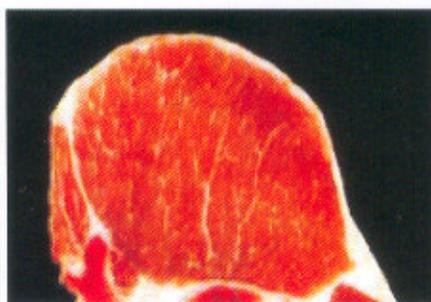


Figura 2. Carne normal.

Fuente: www.fao.org

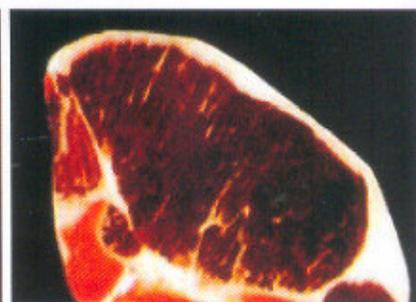


Figura 3. Carne DFD.

La existencia de carne DFD (Figura 3) es menos frecuente y se produce por la descomposición del glucógeno muscular y por ende, la poca generación de ácido láctico. La carne DFD es de calidad inferior, pues el sabor es menos acentuado y su color oscuro son poco apetecidos por el consumidor. De igual manera, tiene una menor vida útil por sus niveles de pH anormalmente altos (6.4 – 6.8), reteniendo mayor cantidad de agua y deteriorándose la canal con facilidad (Webb, 1996; Calvo y col., 1997).

El PSS constituye un problema importante en la producción porcina, representando graves pérdidas económicas, debido al incremento de la tasa de mortalidad y a que las carnes provenientes de los individuos afectados no tienen mercado, son inadecuadas para procesos tecnológicos como la producción de embutidos y son decomisadas. En Estados Unidos se han estimado pérdidas de USD 100 millones anuales debido a carne proveniente de cerdos con PSS (Kauffman y col. 1998). Tal hecho ha dependido de la selección negligente o descuidada con respecto a este síndrome en los programas de mejoramiento genético, en especial los programas donde no se tienen en cuenta los grados de consanguinidad y en los programas de selección basados puramente en características de rendimiento y producción.

Adicional a la tasa de mortalidad y a los efectos graves en la carne, los individuos PSS se encuentran relacionados con otros factores que comprometen la producción como son: reducción en la fertilidad, disminución del tamaño de la camada (Warnants y col., 1993), volumen y número de espermatozoides totales en el eyaculado significativamente menores. Por este último factor, los machos PSS no deben ser utilizados en programas de inseminación artificial (Wysocki y col., 1998).

La incidencia del Síndrome del Estrés Porcino y el incremento de las pérdidas económicas plantea la necesidad de iniciar programas de selección de reproductores superiores libres de PSS. Para ello, se emplean las estrategias de la Biología Molecular y la Genética Animal, analizando el DNA de cada individuo, proporcionando un

diagnóstico claro y cien por ciento confiable de INDIVIDUOS SANOS NO PORTADORES HOMOCIGOTOS DOMINANTES (NN); INDIVIDUOS PORTADORES HETEROCIGOTOS (Nn) E INDIVIDUOS MUTADOS HOMOCIGOTOS RECESIVOS (nn), permitiendo proponer cruces dirigidos con el objetivo de lograr la exclusión de la mutación (n) y obtener descendencias con características genéticas deseadas.

EVALUACION DE CERDOS PARA EL PSS EN ANTIOQUIA

El aumento de la tasa de mortalidad y de la aparición de carnes PSE y DFD en el Departamento de Antioquia, plantean la necesidad de seleccionar los reproductores utilizando marcadores moleculares. La Cooperativa COLANTA, en convenio con la Asociación de Porcicultores de Antioquia (A.P.A.) y la Asociación Colombiana de Porcicultores (A.C.P.), realizó la evaluación genética de un grupo de individuos provenientes de diferentes granjas comerciales.

Un total de 418 reproductores, 74 machos y 344 hembras, fueron seleccionados de 28 explotaciones porcícolas del Departamento de Antioquia, con el propósito de realizar el diagnóstico molecular en la muestra poblacional y determinar la frecuencia de la mutación del gen RYR-1.

EXTRACCIÓN DE DNA

Se tomaron 409 muestras de sangre, 8 muestras de semen y 1 muestra de folículo piloso. Las muestras de sangre (5 ml) se recolectaron en tubos con EDTA (Anticoagulante) y se refrigeraron a 4°C hasta su procesamiento. El DNA genómico fue extraído a partir de las células nucleadas presentes en la sangre utilizando el método de Salting Out. Para las muestras de semen

y de folículo piloso se extrajo el DNA con el método del Fenol-Cloroformo. El material genético obtenido fue almacenado a -20°C.

AMPLIFICACIÓN DE DNA

Los primeros utilizados para la amplificación fueron seleccionados a partir de las secuencias reportadas en el Genbank (M91452) y publicadas en la literatura, las cuales fueron adecuadas hasta alcanzar la temperatura correcta de alineamiento. Se amplificó un fragmento 659 pb del exón 17 del gen RYR-1 utilizando la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction).

REACCIÓN DE RESTRICCIÓN

El fragmento amplificado fue sometido a digestión con la enzima de restricción ALW21I (Fermentas) por dieciséis horas a 37 °C en un volumen final 20 μ L.

PARÁMETROS DE ELECTROFORESIS

Los fragmentos amplificados y digeridos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 2.5%. Los geles fueron visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta en un equipo de fotodocumentación (Bioanalyse).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron las pruebas de equilibrio de Hardy - Weinberg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos de la reacción PCR de 659 pb fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción ALW21I. 418 individuos fueron diagnosticados y se detectaron los tres genotipos. Los productos de la digestión que presentan bandas de 524 y 135 pb corresponden a animales con genotipo Homocigoto Dominante NN (SANOS); 524, 358, 166 y 135 pb corresponden a

animales con genotipo Heterocigótico Nn (PORTADORES) y 358, 166, 135 pb para los animales con genotipo Homocigoto Recesivo nn (MUTADOS). (Figura 4).

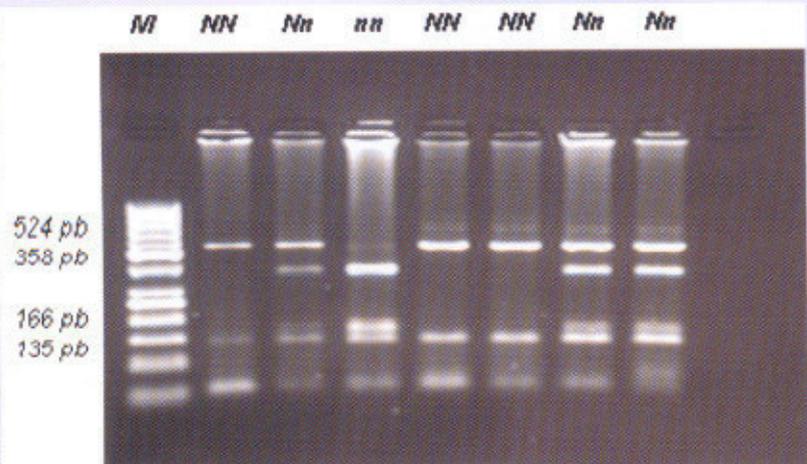


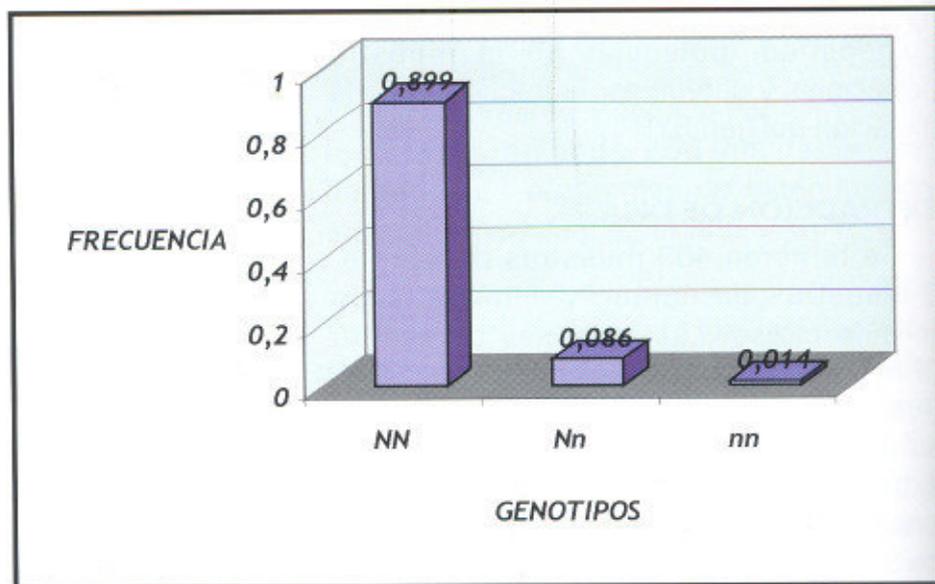
Figura 4. Electroforesis en gel de Agarosa B.P.F. 2.5%. Genotipificación para RYR-1. Se presentan los productos de la digestión con la enzima de restricción ALW21I, donde dos bandas (524 y 135 pb) corresponden al genotipo NN; cuatro bandas (524, 358, 166 y 135 pb) corresponden al genotipo Nn y tres bandas (358, 166 y 135 pb) corresponden al genotipo nn. Carril 1 (M): Marcador de peso molecular 50 pb. Carril 2: Macho, Genotipo NN (Individuo sano). Carril 3:

Macho, Genotipo Nn (Individuo portador). Carril 4: Macho, Genotipo nn (Individuo mutado). Carril 5: Hembra, Genotipo NN (Individuo sano). Carril 6: Hembra, Genotipo NN (Individuo sano). Carril 7: Hembra, Genotipo Nn (Individuo portador). Carril 8: Hembra, Genotipo Nn (Individuo portador).

RESULTADOS POBLACIÓN TOTAL EVALUADA

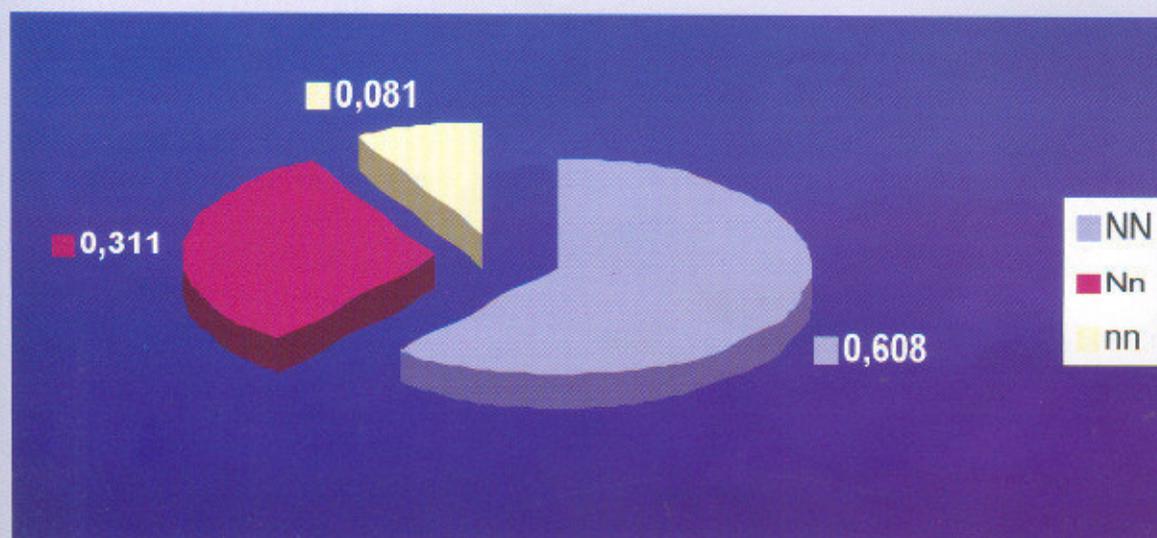
De la población total diagnosticada para N y n (418), 376 individuos presentaron genotipo Homocigótico Dominante NN con una frecuencia de 0.899; 36 presentaron genotipo Heterocigótico Nn con una frecuencia de 0.086 y 6 individuos presentaron genotipo Homocigótico recesivo nn para la mutación del gen RYR-1 con una frecuencia de 0.014 (Gráfica 1). Las frecuencias alélicas para N y n fueron 0.942 y 0.057, respectivamente.

Gráfica 1. Representación gráfica de las frecuencias genotípicas de NN, Nn y nn obtenidas en las explotaciones porcícolas.



RESULTADOS GRUPO DE MACHOS REPRODUCTORES

Para el grupo de machos reproductores evaluados (74), 45 individuos presentaron genotipo Homocigótico Dominante NN con una frecuencia de 0.608; 23 presentaron genotipo Heterocigótico Nn con una frecuencia de 0.311 y 6 individuos presentaron genotipo Homocigótico recesivo nn para la mutación del gen RYR-1 con una frecuencia de 0.081 (Gráfica 2).

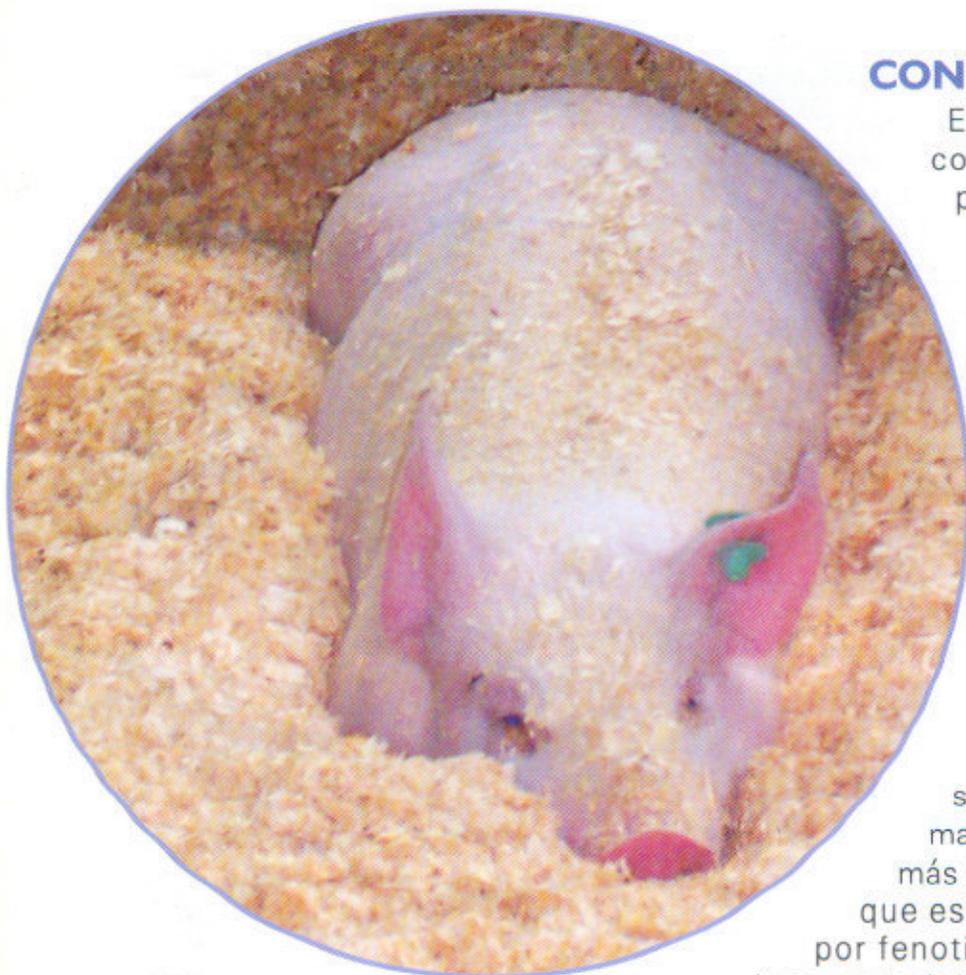


Gráfica 2. Representación gráfica de frecuencias genotípicas para NN, Nn y nn obtenidas en grupo de machos reproductores evaluados.

Se aplicó el test de Hardy – Weinberg en la población total evaluada y mostró que las frecuencias genotípicas observadas son significativamente diferentes a las frecuencias esperadas, indicando que la población analizada no se encuentra en equilibrio genético.

Los valores encontrados muestran un aumento de individuos homocigotos recesivos (nn). Estos resultados se deben en primer lugar, a que en la población porcícola analizada los animales no se aparean azarosamente; en segundo lugar, en las explotaciones porcícolas se realiza selección de reproductores favoreciendo genotipos, de manera que su frecuencia aumenta en la población a lo largo del tiempo; y tercero, la introducción de alelos nuevos en la población debido a la importación de material seminal y/o animales en pie.

La frecuencia de la mutación en la población de machos reproductores analizados es elevada, el 40% de los machos presentan al menos una copia del gen mutado (n), debido probablemente a que los cerdos nn son seleccionados para reproductores por tener mayor cantidad de carne o crecer más rápido; esta evidencia sugiere que estos parámetros de selección por fenotipo conllevará en el futuro al incremento de la frecuencia de homocigotos (nn) para el síndrome y/o la permanencia de heterocigotos (Nn) en la población; comprometiendo la tasa de mortalidad y la calidad del producto final de la explotación. Adicional a la fertilidad y al tamaño de camadas, pues los machos Nn y nn no se recomiendan para ser utilizados en programas de inseminación artificial porque presentan volumen y número de espermatozoides totales en el eyaculado significativamente menores.



CONCLUSIONES

El presente trabajo investigativo confirma la presencia en la población porcícola antioqueña del alelo mutado (n) del gen RYR-1 causante del Síndrome del Estrés Porcino, de muertes súbitas y carnes PSE y DFD.

Se concluye que la frecuencia de individuos heterocigotos (Nn) e individuos homocigotos recesivos (nn) para mutación en la población aún es elevada, probablemente debido a altos niveles de endogamia y a que los cerdos nn logran reproducirse ya que son seleccionados por tener mayor cantidad de carne o crecer más rápido; esta evidencia sugiere que estos parámetros de selección por fenotipo conllevará en el futuro al incremento de la frecuencia de homocigotos (nn) para el síndrome y/o la permanencia de heterocigotos (Nn) en la población.

El incremento en las pérdidas económicas por el síndrome ha llevado a iniciar programas de selección en los diferentes criaderos. Como metodología de selección se ha implementado la exposición de los animales al halotano, ya que el gen recesivo produce una alta sensibilidad a la inhalación de este anestésico. Sin embargo, esta metodología no resulta ser muy efectiva porque no permite seleccionar los heterocigotos, incrementándose la incidencia de la anomalía como consecuencia de los cruces de los heterocigotos no detectados, elevándose la tasa de mortalidad y la aparición de canales PSE y DFD.



Los resultados del estudio plantean la necesidad de iniciar programas de selección asistida por marcadores genéticos y programas de cruces dirigidos, que facilite la clasificación de los animales con mayor precisión y permita la exclusión del alelo mutado (n) de la población y lograr el control final del PSS.

Por otra parte, el desarrollo de la Biología Molecular y la Genética Animal ofrece información directa acerca del patrimonio genético de los individuos y un importante número de herramientas para mejorar la calidad del producto final de las explotaciones porcícolas, y en este sentido, los trabajos investigativos relacionados tiene un alto potencial ya que con su implementación se beneficia la empresa privada, pero sobre todo, los productores porcícolas.

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos al Departamento de Asistencia Técnica COLANTA, a la Asociación de Porcicultores de Antioquia (A.P.A.) y a la Asociación Colombiana de Porcicultores (A.C.P.). De igual manera, al Laboratorio de Genética Animal, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia.

BIBLIOGRAFÍA

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A.; RADOSTITS, O. M. Medicina Veterinaria. México: Interamericana. 1998. p. 1352 -1356.

CALVO, J. H.; OSTA, R; GARCIA - MURO, E., ZARAGOZA, P. Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. En: Med. Vet. Vol. 14, no. 2 (1997); p. 100 - 113.

KAUFFMAN, R. G.; [Et. Al]. Can pale, soft, exudative pork be prevented by postmortem sodium bicarbonate injection? In: Journal Animal Science 76. (1998); p. 3010 - 3015.

O'BRIEN P. J. The causative mutation for porcine stress syndrome. In: Food Animal. (1995); p. 257 - 269.

SHEN, H.; LAHUCKY, R.; KOVAC, L.; O'BRIEN, P. J. Comparison of hal gene status with ³¹P NMR-determined muscle metabolites and with Ca sequestration activity of anoxia - challenged muscle from pigs homozygous and heterozygous for porcine stress syndrome. In: Pig News and Information. 13 (1992); p. 105 - 109.

TRUJILLO, E.; NORIEGA, D. Búsqueda molecular de mutantes en el gen RYR-1 que predisponen al Síndrome del Estrés Porcino, en Antioquia (Colombia). Actualidades Biológicas, Universidad de Antioquia. 23 (2001); p. 47 - 52.

WARNANTS, N., W. EECKHOUT, CH. V. J. BOUCQUE. Serum pyruvate kinase and its relation to stress susceptible in pigs. In: Anim. Breed. Genet. 110 (1993); p. 357 - 362.

WEBB, A. J. Future challenges in pig genetics. Pig News and Information. 17 (1996); p. 11 - 16.

WYSOCKI, P.; SAIZ CIDONCHA, F.; STRZEZEK, J. Influencia de la mutación del gen receptor de la ryanodina (Ryr1) en verraco sobre la calidad del semen y su capacidad de conservación en estado líquido. En: ANAPORC. 182 (1998.); p. 144 - 154.