



Estudios de caracterización genética en el cerdo Pampa Rocha:

- 1) Polimorfismo en el gen CRC1 (Receptor de ryanodina, SEP)
- 2) Microsatélites
- 3) Transcriptómica



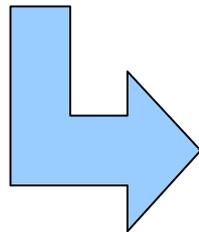
Estudios de caracterización genética en el cerdo Pampa Rocha:
1) Polimorfismo en el gen CRC1 (Receptor de ryanodina)

SINDROME DE ESTRÉS PORCINO (SEP)

Descrito por Topel *et al.*, 1968. Hipertermia maligna.

¿Qué produce el SEP en los individuos afectados?

- 1) Muerte súbita de los animales frente a situaciones estresantes:
- 2) Disminución en la calidad de la carne (carnes pálidas, exudativas y blandas).

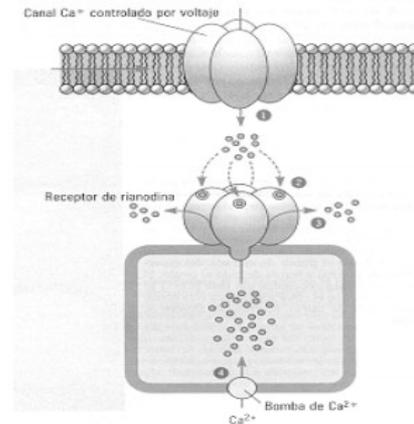


Pérdidas económicas

Identificación de la mutación:

Fuji *et al.*, 1991 identifican mutación en el gen que codifica para el **Receptor de Ryanodina de tipo 1 (CRC1-RYR1)**:

Canal de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (RS) del músculo esquelético, el cual cuando es activado libera Ca^{2+} desde el RS al citosol. Canalopatía





Fragmento del gen CRC1 que contiene la mutación:

CAATGGTGTGGCCGTG**CGC**TCCAACCAAGATCTCATT

↓
T

sustitución aminoacídica
arginina → cisteína.

El gen presenta dos variantes alélicas asociadas a este síndrome:
alelo normal (N) dominante sobre el alelo mutado (n).

- ♦ NN: individuos normales
- ♦ Nn: portadores de la mutación
- ♦ nn: individuos susceptibles al SEP



Propagación de la mutación

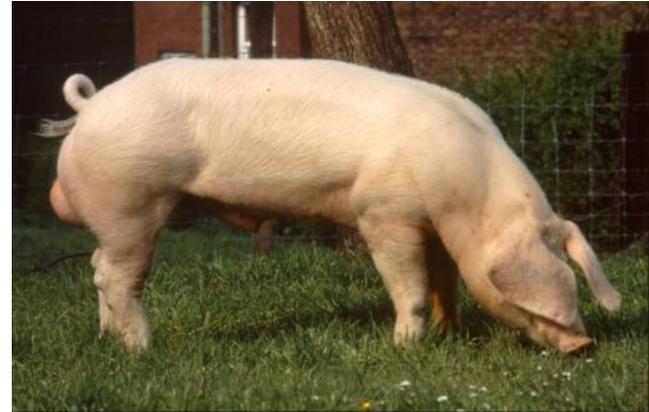
En los últimos 35 años el objetivo del mejoramiento ha sido la selección de cerdos magros. A partir de la década del sesenta, se observó que los resultados de selección iban unidos a una alta mortalidad por estrés (Hernández *et al.*, 2008).

Razas más afectadas:

Pietrain



Landrace Belga



La utilización de heterocigotas u homocigotas recesivos como reproductores, debido a su mayor musculatura y menor contenido de grasa, condujo a un aumento en la incidencia del síndrome.



1) Análisis de polimorfismo en el gen CRC1 en cerdos Pampa Rocha.

PCR-RFLP y secuenciación
N=16 Pampa Rocha

Primer forward 5' → 3'

```

-----
18241 TGGGCCCCCGATATGCTTCCTTAGATCTTTGAAGTGTTTTCTAAATGTCTAATGTAAATG
18301 CAGGCGGCTGCATATACACGCTCCAGTTTGCCACAGGTCTACCAETCCCCACTGAATTA
18361 ATTATTTCTAACCACCTCATGTATGGACAACATCCACCTGGCCCCGAAGATGCACGTTGG
18421 TGACCCCCGCCCATCCAGAACCTCGTCTTGGTCTCCGTGCTCTCGCACTGACCCGGCCTT
18481 TCACTCTTGCTCCGACTTCTCACCCCTTGCTCCCGTCTCTCCTTTCCTCCTCTGCTGAT
18541 GCCCGATCCCATCCCTTCRCAGCCCCCTGCGTCTCACCAGACCTTTCTCTTTGACCTTGAT
18601 CTCCCTGTGTTCATCCCTGACCTTCCCGCTTTCACCACCTCTTCTCAGTCACATCCCCACC
18661 TCCCACCCTGGGACATCATCCTTCTGGCTTCCCACCCTGGGTCTCCATGGACCACACCC
18721 TCCCCGCAAGTGCCCTCACACCTTGACCTCTGACCTTGACCCCTAGGTGCTGGATGTCCT
18781 GTGTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTGTGGCCGT TGCTCCAACCAAGATCTCATTACTGA
18841 GAAGTTGCTCCCTGGCCGYGAGCTTCTGCTGCAGACAAACCTCATCAACTATGTCACCAG
18901 GTCTGGCCCCCAACCTTTGACCCAGAGCTTAGAACCTCCACCACCCCGCCCGCTC
18961 AGAGACTCCACTCCGGTGAATGGCCCTTCCCTCCGTCCCCACCCCGGACTTAATGCCAG
19021 TCCCACCCTGTGCTGCTTGTCCCAGCTTGTCCCTGGCTTCTTACTTCTCTTACCCTTC
-----

```

Primer reverse 3' → 5'

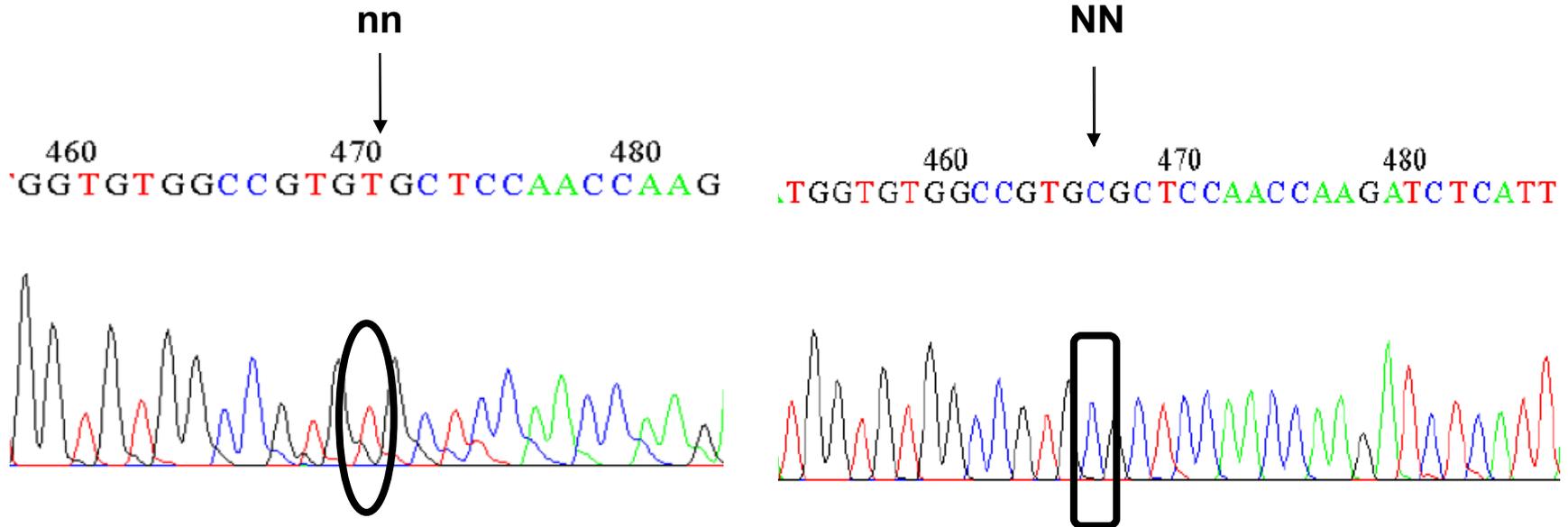
No se encontró la presencia del alelo mutante en la raza Pampa Rocha.



por

Valentina Raquel CEDREZ CALERO

Patrón visualizado en los electroferogramas para los genotipos nn y NN



Estas técnicas permiten detectar de forma fácil y rápida a individuos enfermos y portadores.



Estudios de caracterización genética en el cerdo Pampa Rocha: 2) Microsatélites

Marcadores Microsatélites

- Estudio de la variabilidad genética en especies domésticas.
- Recomendados por la FAO/ISAG.
- Estimación de la diversidad genética dentro y entre razas.
- Secuencias de 1 a 6 pb repetidas en tándem e intercaladas al azar en el genoma.
- Herencia mendeliana y el polimorfismo se basa en la variabilidad del nº de repetidos.



Análisis mediante marcadores microsatélites:

- N=39 muestras de ADN de cerdos Pampa Rocha
- panel de 25 microsatélites (FAO/ISAG) <http://www.user.gwdg.de/FAO/pig.htm>

CGA, S0068, S0355, SW24, S0101, SW632, SW911, S0215, SW936, S0225, S0226, S0227, S0228, S0090, SW951, S0178, S0005, S0026, S0386, IGF1, SW72, SW857, S0155, SW240, S0002

Genotipado: Secuenciación automática ABI PRISM 377 (Applied Biosystems)

Parámetros analizados: N^o promedio de alelos, Contenido de información polimórfica (PIC), Heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad observada (Ho), Estadístico F_{IS}, Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg.

“Caracterización genética de los cerdos Pampa Rocha de Uruguay”

Lic. María del Carmen Montenegro

Tesis Maestría en Ciencias Biológicas-PEDECIBA

Tutor. Dra. Silvia Llambí



Principales resultados obtenidos:

- Todos los loci estudiados resultaron polimórficos:
S0386 y S0002: 2 alelos/ S0068 y SW240: 10 alelos
- H_e 0.603 ± 0.199
variación entre 0.030 (S0386) y 0.837 (CGA).
- H_o 0.583 ± 0.208
variación entre 0.031 (S0386) y 0.875 (S0005).
- FIS Multilocus: 0.0475
Variación entre -0.115 (S0227) y 0.401 (S0002).
- 95.8 % de los marcadores en equilibrio HW
SW72: no se encuentra en equilibrio ($p < 0.01$).

Variabilidad
alta

Bajo nivel de
endogamia

Población
homogénea



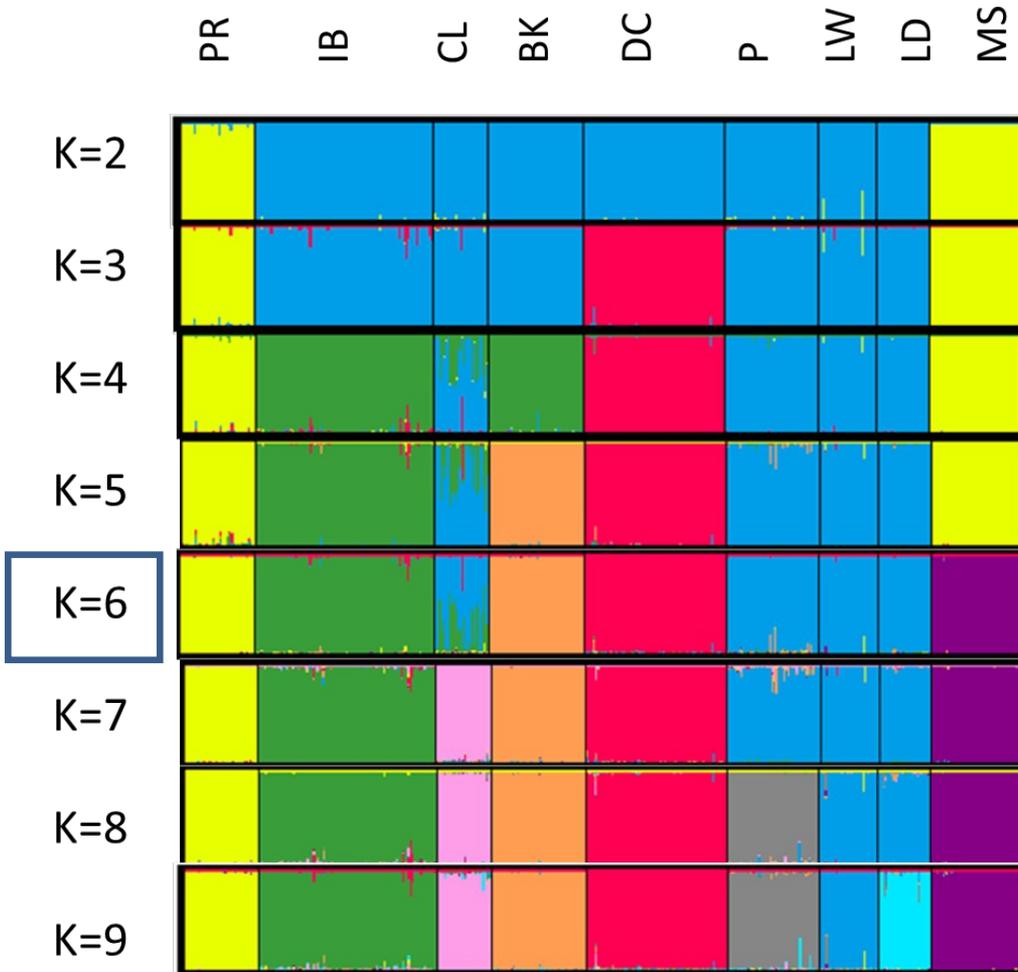
Estudio comparativo del Pampa Rocha con otras razas:

37 muestras de Pampa Rocha y 23 microsatélites

N=415 (Ibérico, Celta, Berkshire, Duroc, Landrace, Large White y Meshian).

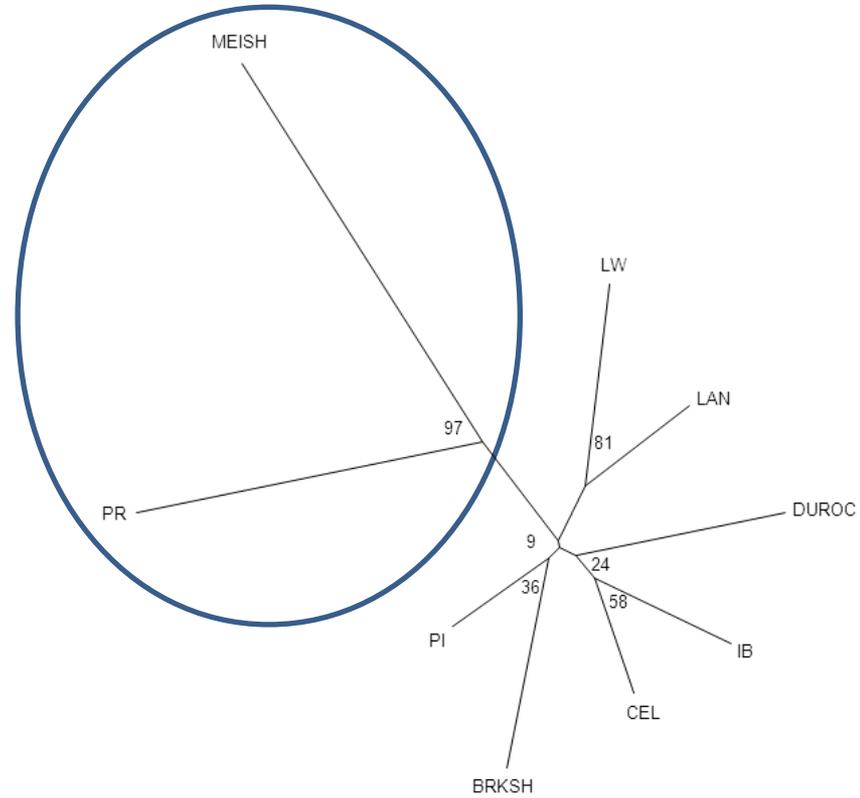
Análisis molecular de la varianza (AMOVA), Asignación de individuos a clusters, Gráficos Distruct, Cálculo de distancia genética D_A (Nei et al., 1983) y elaboración de árboles, análisis factorial de correspondencia.

Asignación de individuos a clusters (Structure)



PR: Pampa Rocha; IB: Ibérico
 CL: Celta; BK: Berkshire
 DC: Duroc; P: Pietrain,
 LW: Large White;
 LD: Landrace
 MS: Meishan

Árbol construido con la distancia DA (Nei et al., 1983).



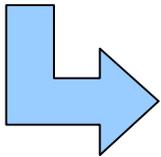
0.1



Estudios de caracterización genética en el cerdo Pampa Rocha: 2) Microsatélites

Conclusiones

- Los cerdos Pampa Rocha presentan una alta diferenciación genética y conforman un grupo bien definido y diferenciado.
- Los diferentes análisis realizados no relacionan a los Pampa Rocha con los cerdos ibéricos, de los cuales se supone que existe influencia debido al proceso histórico que han experimentado las razas criollas.



Tiempo de separación entre estos recursos, en donde la deriva genética puede haber influido en la diferenciación.

Aportes posteriores de otras razas: Meishan aparece más cercana en los análisis realizado



Estudios de caracterización genética en el cerdo Pampa Rocha:
3) Transcriptómica (Proyecto de investigación en curso).

“Estudio del perfil de expresión génica en hígado y músculo esquelético de cerdos Pampa Rocha sometidos a diferentes dietas”

Proyecto de Doctorado (Doctorado en Ciencias Agrarias-Facultad de Agronomía-UdelaR)
Proyecto de Iniciación de CSIC

- Nutrición
- Análisis de la expresión génica mediante secuenciación del ARN (RNAseq).
- Calidad de carne



Primera etapa: trabajo a campo-generación de muestras

- Unidad de producción de Cerdos-Centro regional Sur (FAgro).
- Tratamientos: dietas con diferente contenido lipídico.

Tratamiento 0: 0 % de afrechillo de arroz (grupo testigo).

Tratamiento 15: 15 % de afrechillo de arroz (mayor contenido lipídico).

- Sistema de cama profunda
- N= 16 animales (8 por tratamiento).



Toma de la muestras:

1) Evaluación instrumental y bioquímica: muestras de músculo esquelético (aprox. 2.5 cm de espesor y 8 cm de longitud).

pH, color (luminosidad, índice de rojo e índice de amarillo), pérdida de agua, terneza instrumental, perfil de ácidos grasos y contenido de grasa intramuscular.

2) Análisis transcriptómico: inmediatamente posterior a la faena, a partir de hígado y músculo esquelético (*Longissimus dorsi*).

Parámetros productivos: Eficiencia de conversión, ganancia en peso, consumo de ración.



Segunda etapa: procesamiento de las muestras y análisis de los datos (transcriptómica y análisis de calidad de carne):

- Extracción de ARN
- Construcción de librerías y secuenciación
- Análisis bioinformático: Mapeo y ensamblado de los reads, Análisis de expresión, Confirmación de la expresión diferencial por RT-qPCR, Análisis de las vías metabólicas y/o procesos biológicos afectados, Identificación de genes candidatos, nuevos transcritos e isoformas.

Gracias por la atención!



Bibliografía:

- Anders S. & Huber W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, 11(10):R106
- Barlocco N. (2011). Experiencias en la caracterización productiva del cerdo Pampa Rocha en Uruguay. Producción de carne natural. En: Situación y conservación de recursos zoogenéticos porcinos (Curso-Taller de Posgrado, Facultad de Veterinaria, Udelar) p31-39.
- Blencowe B., Ahmad S., Lee L. (2009). Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes. *Genes Dev*. 23: 1379- 1386.
- Bonelli A., & Schifferli R. (2001). Síndrome Estrés Porcino. *Arch. Med. Vet*. 33(2): 125-135.
- Cánovas A., Quintanilla R., Amills M., Pena R. (2010). Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. *BMC Genomics*, 11:372
- Cedrez, V. (2013). Síndrome de estrés porcino 1) actualización del problema a nivel nacional, 2) análisis de secuencias del gen Ryr1 en cerdos de raza Pampa Rocha. Tesis de grado.
- Fuji J., Otsu K., Zorsato F., de Leon S., Khanna V., Weiler J., O'Brien P. & MacLennan D. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253: 448-451.
- Hernández D., Posso A., Muñoz J. (2008). Detección de una mutación puntual en el gen Receptor Ryanodina (Ryr1) en cerdos criollos colombianos. *Acta Agron (Palmira)*. 57 (4) pp 275-278
- Kato H. & Kimura T. (2003). Evaluation of the Effects of the Dietary Intake of Proteins and Amino Acids by DNA Microarray Technology. 2nd Amino Acid Workshop. *The Journal of Nutrition* 2073S-2077S
- Kelly L., Clop A., Vadell A., Nicolini P., Monteverde S., Amills M., Sanchez A. (2004). El cerdo Pampa-Rocha como recurso zoogenético en Uruguay. *Marcadores Moleculares. Veterinaria (Montevideo)*. 39(155-156): 15-16.
- Montenegro M, Castro G., Barlocco N., Llambí S (2010). Frecuencia alélica del Síndrome de Estrés Porcino en Uruguay (análisis por PCR-RFLP). *Veterinaria, (Montevideo)* 46(177-178-179-180): 23-2