

PRIMEROS ESTUDIOS MOLECULARES DEL GEN ESR EN CERDOS DE LA RAZA PAMPA ROCHA (URUGUAY)

FIRST MOLECULAR STUDIES OF ESR GENE IN PAMPA ROCHA BREED PIGS (URUGUAY)

Montenegro, M.¹; Castro, G.¹; Barlocco, N.²; Vadell, A.²; Llambí, S.^{1*}

¹ Facultad de Veterinaria-UdelaR. * silvia.llambi@gmail.com

² Facultad de Agronomía-UdelaR

Palabras clave:

Caracterización genética
Marcadores moleculares

Keywords:

Genetic characterization
Molecular markers

Abstract

The breed of pigs Pampa Rocha is one of the three genetic resources of the Oriental Republic of Uruguay. This race is in a situation without risk to preserve, according to FAO classification. In the present paper reports the first molecular studies of the gene encoding the estrogen receptor (ESR). This gene is related to litter size in pigs, and thus has important economically. It is currently at the stage of development of the RFLP technique. For conventional PCR amplification using specific primers are used, obtaining a 120 bp amplicon, which was subsequently digested with the restriction enzyme Pvu II to generate a characteristic pattern of digestion. Several authors have associated with the B allele with increased litter size. In the future we seek to establish through statistical methods, the relationship between the genotype of the animals tested with reproductive records (litter size). The study of a candidate gene, such as ESR, using molecular markers, will continue the molecular-genetic characterization of a breed of pigs in our country, which is of great importance for the understanding and conservation of it.

Resumen

La raza de cerdos Pampa Rocha es uno de los tres recursos zoogenéticos de la República Oriental del Uruguay. Esta raza se encuentra en situación sin riesgo a preservar, según la clasificación de la FAO. En el presente trabajo se informa acerca de los primeros estudios a nivel molecular del gen que codifica para el Receptor de Estrógeno (ESR). Dicho gen se relaciona con el tamaño de camada en cerdos, y tiene así importancia a nivel económico. Actualmente se está en la etapa de puesta a punto de la técnica de RFLP. Para la amplificación mediante PCR convencional se emplean cebadores específicos, obteniéndose un amplicón de 120 pb, que posteriormente se digiere con la enzima de restricción *Pvu II* para generar un patrón de digestión característico. Diversos autores han asociado al alelo B con un aumento en el tamaño de camada. En un futuro se buscará establecer a través de métodos estadísticos, la relación existente entre el genotipo de los animales analizados con registros reproductivos (tamaño de camada). El estudio de un gen candidato, como el ESR, mediante marcadores moleculares, permitirá continuar con la caracterización genético-molecular en una de las razas de cerdos de nuestro País, lo cual es de gran importancia para el conocimiento y conservación de la misma.

Introducción

La raza de cerdos Pampa Rocha es, junto con los Mamellados y Casco de Mula, uno de los tres recursos zoogenéticos de la República Oriental del Uruguay. Dicha raza habita el este de nuestro País, en una zona que se caracteriza por la presencia de praderas, humedales, y palmares, ambiente al cual están totalmente adaptados estos animales. Los productores de la zona utilizan un sistema de producción extensivo, con un uso mínimo de ración (Vadell, A.; 2008). En la actualidad esta raza forma parte del plantel de la Unidad de Producción de Cerdos (Estación Experimental de Facultad de Agronomía-UdelaR), también bajo un sistema de cría a campo. La raza Pampa Rocha se encuentra en situación sin riesgo a preservar, según la clasificación de la FAO. Se postula que se había originado a partir de los cerdos introducidos durante la colonización española y portuguesa, con cruces posteriores con las razas Berkshire y Poland China. Estudios moleculares empleando microsátélites y ADN mitocondrial, han determinado que el origen de la raza sería a partir de razas europeas con posterior introgresión de razas asiáticas (Kelly y col., 2004). En nuestro País la industria porcina ocupa un lugar secundario en comparación con otros rubros agrícolas, y si bien desde hace unos años han aumentado las

investigaciones respecto a las razas locales de cerdos, aún es escaso el conocimiento de las mismas, principalmente a nivel de caracterización molecular. En este trabajo se presenta la puesta a punto de la técnica de PCR para el gen que codifica para el Receptor de Estrógeno (ESR). Los estrógenos tienen un rol integral en la fisiología de la reproducción de los animales superiores y todas sus funciones están mediadas por sus receptores. El gen que codifica para el Receptor de Estrógeno se ha identificado como gen candidato para el tamaño de camada en cerdos (Short y col., 1997). Se ha encontrado una mutación de una timina por una guanina en la posición 1665 del gen ESR en las razas Meishan y Large White (Hernández y col., 2007). La prolificidad es una de las características reproductivas de mayor importancia económica, pero posee baja heredabilidad. Diversos autores han asociado al alelo B con un aumento en el tamaño de camada (Lemus-Flores y col., 2009). El objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el gen que codifica el Receptor de Estrógeno en la raza de cerdos locales Pampa Rocha.

Material y métodos

Se utilizaron 10 animales de la raza local Pampa Rocha, pertenecientes a la Unidad de Producción de Cerdos, del Centro Regional Sur (Estación Experimental de Facultad de Agronomía-UdelaR). La amplificación mediante PCR convencional se realizó en un volumen final de 50 μ L, el cual contenía 5 μ L de Buffer 10X, 1.5 μ L de cada cebador (10 μ M), 1 μ L de dNTPs (2.5 μ M), 5 μ L de colorante, 0.6 μ L de Taq Polimerasa (U-Taq SBS), 34.4 μ L de agua y 1 μ L de ADN. Se emplearon cebadores específicos: F 5'CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3' y R 5'CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3' (Ramos y col., 2008). Se optimizó un programa de termociclado con una desnaturalización inicial a 95°C/3 minutos; seguido de 30 ciclos de 95°C/1 minuto, 58°C/1 minuto y 72°C/1 minuto; con una extensión final de 72°C/5 minutos. Se obtiene así un fragmento amplificado de 120 pb. Estos productos se observaron en geles de agarosa al 2% teñidos con GoodView, en transiluminador UV. Dos de los productos amplificados fueron secuenciados mediante secuenciación automática (Capillary electrophoresis, 3730 XL). Aún nos encontramos en la etapa de puesta a punto de la técnica RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción).

Resultados y discusión

En todos los animales analizados se logró la amplificación del fragmento esperado de 120 pb. En la figura 1 se observa dicha amplificación en una de las muestras junto con el marcador de peso molecular. Dos de las muestras fueron enviadas a secuenciar, coincidiendo los resultados obtenidos con una secuencia del gen ESR de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). En dicha base de datos no figura anotado el gen como tal, sino la secuencia del cromosoma 1 en la cual se encuentra dicho gen (Sscrofa10.). Hemos encontrado dificultades en hallar la mutación que se describe en diferentes artículos, sin embargo, en la base de datos NCBI se hace referencia a errores en el ensamblaje del genoma en cerdos. Próximamente se espera la publicación de un nuevo ensamblaje por parte del Swine Genome Sequencing Consortium.

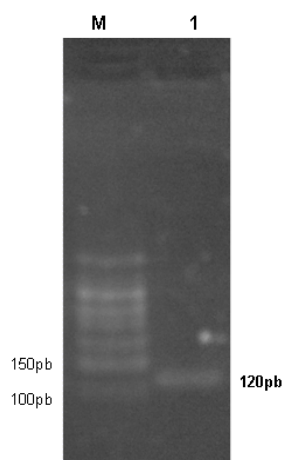


Figura 1. Gel de agarosa al 2% teñido con GoodView. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (M: 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, y 500 pb), y en el carril 2 el amplicón obtenido para una de las muestras. A los lados de las figuras se detallan los tamaños de los fragmentos [Agarose gel stained with 2% Goodview. In

the lane 1 shows molecular weight marker (M: 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, and 500 bp) and lane 2 amplicon obtained for a sample. On the sides of the figures detailing the sizes of the fragments]

En la figura 2 se observa las secuencias obtenidas mediante secuenciación y alineadas con el Programa de acceso libre BioEdit, donde se visualiza la conservación de ambas secuencias y algunos sitios variables.

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90
MT1-ESRF  TCTAGATGCAGATCAAGTTTTATGAGACCAACTTTTCTTGTCGAAGTCCCATTCCACCCTATTCTAATTGGACTGACCCCTCGAAGTGAAACT
MT2-ESRF  TCTAGATGCAGATCA-GTTTTATGAGACCAACTTTTCTTGTCGAAGTCCCATTCCACCCTATTCTAATTGGACTGACCCCTCGAAGTGACCCCT

          110      120
MT1-ESRF  TTGACGGGGCCCCCCTTT-----
MT2-ESRF  CTGACCTGGGCCCTCCTGCT-----

```

Figura 2. Secuencias obtenidas por la técnica de secuenciación. Se observa las dos secuencias alineadas mediante el programa BioEdit, observándose algunas regiones con variabilidad (*Sequences obtained by sequencing technique. Henoted the two aligned sequences using the program BioEdit, showing some regions with variability*)

Conclusiones

Se logró la optimización de la técnica de PCR convencional para el gen ESR en la raza de cerdos criollos Pampa Rocha, obteniéndose un fragmento amplificado de 120 pb. Las muestras secuenciadas se identificaron dentro del contig Sscrofa10. (NCBI, NW_003299184) y se observaron 10 sitios variables al alinear ambas secuencias. El estudio de un gen candidato, como el ESR, mediante marcadores moleculares, permite continuar con la caracterización genético-molecular de la raza Pampa Rocha.

Agradecimientos y financiación

El presente trabajo fue financiado por CSIC (Comisión Sectorial de Enseñanza) y ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación). Agradecemos al personal de la Unidad de Producción de Cerdos, del Centro Regional Sur (Facultad de Agronomía-UdelaR).

Bibliografía

- Hernández S., Lemus C., Alonso R., Herrera J.G. (2007). Influencia del gen Receptor de los Estrógenos (ESR) sobre la capacidad reproductiva de cerdas en condiciones de producción comercial. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 4(2): 132-136
- 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
- Lemus C., Mejía K., Rodríguez J., Barrera A., Herrera J., Alonso R. (2009). Genetic Diversity and Variation of ESR, RBP4 and FUT1 Genes in Mexican Creole and Yorkshire Pig Populations. *Journal of Biological Sciences* 9(8): 878-883.
- Ramos E., Rojas R., Herrera G., García A., Lemus C., Hernández A. (2008). Estandarización de una técnica de extracción de ADN en sementales porcinos para evaluar la frecuencia de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2(1): 39-50
- Short T.H., Rothschild M.F., Southwood O.I., McLaren D.G., de Vries A., van der Steen H., Eckardt G.R., Tuggle C.K., Helm J., Vaske D.A., Mileham A.J., Plastow G.S. (1997). Effect of the Estrogen Receptor Locus on Reproduction and Production Traits in Tour Comercial Pig Lines. *J. Anim. Sci.* 75: 3138-3142
- Vadell A. (2008). Una reseña corta sobre la raza criolla de cerdos Pampa-Rocha y su utilización en Uruguay. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 5(2): 105-112

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>