

POLIMORFISMO DEL EXON 10 DEL RECEPTOR DE LA PROLACTINA (PRLR) Y EFECTOS SOBRE CARACTERES DE SUPERVIVENCIA DE LECHONES EN UN CRUCE IBERICO X MEISHAN

Tomás A.¹, Casellas J.¹, Ramírez O.¹, Muñoz G.², Pérez-Enciso M.^{1,3}, J.L. Noguera⁴ y Sánchez A.¹

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra. ² Departamento de Genética y Mejora Animal SGIT-INIA, Ctra. De la Coruña km.7, Madrid, 28040, Spain. ³ Institut Català de Recerca i Estudis Avançats, C/ Lluís Companys 23, 08010, Barcelona.

⁴Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, C/ Alcalde Rovira Roure 177, 25198, Lleida.

INTRODUCCION

La prolactina (PRL) es la hormona hipofisaria responsable de la activación de la síntesis de los componentes principales de la leche (proteínas lactogénicas, lactosa y lípidos) durante la gestación. En humano, bajos niveles de prolactina sérica durante las semanas 31,5-37 de gestación se hallan asociados al síndrome de estrés respiratorio neonatal (Parker *et al.* 1989). El mecanismo de acción de la PRL está mediado por la unión a su receptor (PRLR). En el cerdo, el gen *PRLR* se encuentra en el cromosoma 16 (Vincent *et al.*, 1997). Se ha descrito un polimorfismo en el exón 10 del gen *PRLR* que se ha asociado a un mayor número de lechones nacidos (Vincent *et al.*, 1998). Además de su efecto sobre el tamaño de camada, se han descrito otros efectos de esta mutación sobre el número de tetinas (Putnová *et al.*, 2002; van Rens y van der Lende, 2002), la edad a la pubertad y la tasa de ovulación (van Rens *et al.*, 2003); sin embargo, aun no se ha estudiado el efecto de *PRLR* sobre la viabilidad de los lechones en el momento del nacimiento.

En un trabajo anterior desarrollado por nuestro grupo se identificaron 3 polimorfismos situados en el exón 10 del gen *PRLR* (Tomás *et al.*, 2003). El objetivo del presente trabajo es el análisis de todos los polimorfismos del exón 10 del gen *PRLR* y el estudio de sus efectos sobre caracteres de supervivencia de los lechones en un cruce F₂ Ibérico x Meishan.

MATERIAL Y METODOS

Material animal y registros fenotípicos

Los animales utilizados provienen de un cruce experimental F₂ entre 3 machos Ibéricos de la estirpe Guadyerbas (CIA Dehesón del Encinar, Oropesa, Toledo) y 18 hembras de la raza hiperprolífica Meishan (Domaine du Magneraud, INRA, Francia), los cuales produjeron 116 reproductores F₁ y éstos a 389 reproductoras F₂ (Nova Genètica, Solsona, Lleida). En el momento del nacimiento, se registraron las siguientes medidas fenotípicas en los lechones F₂: temperatura rectal al nacimiento (TR-0) y una hora después (TR-1), frecuencia cardíaca (FC-0, FC-1) y saturación de oxígeno (SO-0, SO-1), peso al nacimiento (PN), el intervalo nacimiento - llegada a las ubres (TU) y el intervalo nacimiento - primera toma de leche (TM) (Casellas *et al.*, 2004).

Polimorfismos del exón 10 del gen PRLR

Se ha secuenciado el exón 10 del gen *PRLR* en los 21 individuos parentales siguiendo el protocolo descrito por Tomás *et al.* (2003). El alineamiento de dichas secuencias ha permitido la identificación de 2 nuevos polimorfismos que se encuentran segregando en los individuos de la población. Se ha diseñado un protocolo basado en la técnica *primer extension analysis* para el genotipado conjunto de los 3 polimorfismos (SNP1, SNP2 y SNP3) descritos por Tomás *et al.* (2003), del polimorfismo descrito por Vincent *et al.* (1998) (SNP6), y dos nuevos polimorfismos caracterizados en el presente trabajo (SNP4 y SNP5).

Análisis estadístico

Para la realización del estudio de asociación se empleó el modelo estadístico descrito por Casellas *et al.* (2004) añadiendo, en el caso de los SNPs, dos covariadas para estimar el efecto aditivo (con valores -1, 0 y 1 para los genotipos 11, 12 y 22, respectivamente) y de dominancia (con valores 0, 1 y 0 para los genotipos 11, 12 y 22, respectivamente). En el caso de los haplotipos, se utilizó el

mismo modelo añadiendo una covariada para cada haplotipo, la cual toma valores de 0, 1 ó 2 en función del número de copias de cada haplotipo que tiene el individuo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización del polimorfismo del exón 10 del gen *PRLR* porcino

Se ha secuenciado completamente la región codificante del exón 10 del gen *PRLR* en los individuos de la generación parental. Tras alinear las secuencias obtenidas se han detectado 2 nuevos polimorfismos no conservativos, en las posiciones 1.283 (C/A) y 1.600 (G/A), considerando como primera posición la de inicio de traducción. Los cambios aminoacídicos producidos por ambas mutaciones fueron Ala/Asp₄₂₈ y Gly/Ser₅₃₄, respectivamente. El exón 10 del gen *PRLR* codifica íntegramente el dominio intracelular del receptor. Tras la activación del receptor por la unión de la PRL, se desencadena la activación en cascada de una serie de mediadores intracelulares asociados al receptor (proteínas STAT y JAKS-quinasas). Por tanto, mutaciones en este dominio podrían afectar la funcionalidad de la proteína.

El análisis conjunto de los 6 polimorfismos en el cruzamiento experimental Ibérico x Meishan ha permitido la detección de 5 haplotipos distintos (Tabla 1). Los haplotipos A y B se han identificado exclusivamente en los 3 machos Ibéricos; mientras que los haplotipos C, D y E sólo están presentes en las hembras Meishan.

Tabla 1. Haplotipos detectados en el exón 10 del gen *PRLR* porcino

HAPLOTIPO		SNP1	SNP4	SNP3	SNP2	SNP5	SNP6
		1217 ^a / 406 ^b	1283 / 428	1439 / 480	1528 / 510	1600 / 534	1789 / 597
A	nt	T	A	A	A	G	G
	aa	Leu	Asp	Lys	Met	Gly	Gly
B	nt	T	A	A	A	G	A
	aa	Leu	Asp	Lys	Met	Gly	Ser
C	nt	C	A	G	T	G	G
	aa	Pro	Asp	Arg	Leu	Gly	Gly
D	nt	C	C	G	T	G	G
	aa	Pro	Ala	Arg	Leu	Gly	Gly
E	nt	C	C	G	A	A	A
	aa	Pro	Ala	Arg	Met	Ser	Ser

^a posición de la mutación nucleotídica; ^b posición de la mutación aminoacídica

Efectos del polimorfismo del gen *PRLR* sobre caracteres de supervivencia

Hemos detectado efectos significativos del gen *PRLR* sobre la frecuencia cardíaca en el momento del nacimiento, sobre la temperatura rectal y la saturación de oxígeno al cabo de una hora de nacer y sobre los intervalos nacimiento – llegada a las ubres y nacimiento primera toma de leche (Tabla 2). Tres de las mutaciones (SNP1, SNP3 y SNP4) afectan la FC-0, siendo los alelos de origen Meishan los favorables para el carácter en los tres casos. Sin embargo, este efecto no lo hemos detectado en el análisis considerando los haplotipos (Tabla 3). Lo mismo ocurre con el efecto sobre SO-1, donde el alelo A del SNP2 está asociado a una mayor saturación de oxígeno; sin embargo, ningún haplotipo parece tener efecto sobre dicho carácter. Por el contrario, el alelo A del SNP5 influye positivamente sobre el carácter TR-1. La variante A de esta mutación únicamente aparece en el haplotipo E, haplotipo en el que hemos detectado una asociación sugestiva con TR-1. Hecho que refuerza la asociación detectada e indica que el efecto sobre TR-1 se debe casi exclusivamente a la variante que presenta el individuo en la posición del SNP5. Finalmente, hemos detectado asociaciones significativas del SNP4 sobre TU y TM debidas, principalmente, a fenómenos de dominancia.

La principal causa de muerte de los lechones durante el parto es la asfixia producida como consecuencia de una rotura prematura del cordón umbilical. La asfixia neonatal retrasa el tiempo de llegada a las ubres y, por tanto, la primera ingesta de calostro indispensable para el mantenimiento de la homeotermia durante las primeras horas de vida (Herpin *et al.*, 1996). El estudio de genes relacionados con la viabilidad de los lechones resulta de gran interés dado el elevado coste económico que supone una alta tasa de mortalidad neonatal.

Tabla 2. Número de registros (n) y estimaciones del efecto aditivo (A) y de dominancia (D) para los seis SNP bialélicos analizados.

	SNP1			SNP2			SNP3		
	n	A	D	n	A	D	n	A	D
TR-0 (°C)	280	0,03	0,07	280	-0,05	0,06	280	-0,03	0,07
TR-1 (°C)	264	-0,05	0,25	264	-0,05	0,08	264	0,05	0,25
FC-0 (ppm)	253	-8,70*	-0,72	253	6,75	4,97	253	8,70*	-0,72
FC-1 (ppm)	238	-3,27	0,49	238	0,27	8,88	238	3,27	0,49
SO-0 (%)	236	-3,93	-3,18	236	1,77	-2,61	236	3,93	-3,18
SO-1 (%)	232	0,65	0,43	232	-1,42*	1,40†	232	-0,65	0,43
TU (min)	274	-2,85	-1,69	274	3,14	0,28	274	2,85	-1,69
TM (min)	277	-1,28	-4,66	277	2,64	-0,09	277	1,28	-4,66
PN (g)	282	-10,17	43,82	282	21,53	-15,96	282	10,17	43,82

	SNP4			SNP5			SNP6		
	n	A	D	N	A	D	n	A	D
TR-0 (°C)	280	-0,12	0,14	284	-0,10	0,01	279	-0,07	0,14
TR-1 (°C)	264	-0,02	0,17	268	0,47*	0,02	263	0,10	0,14
FC-0 (ppm)	253	12,69*	-3,18	257	11,03	-0,04	252	-5,53	6,55
FC-1 (ppm)	238	9,65	-3,45	241	4,34	0,12	236	-5,96	4,93
SO-0 (%)	236	1,13	0,20	239	0,91	0,02	234	-0,35	-3,46
SO-1 (%)	232	-0,42	-0,38	236	1,64	0,83	231	0,77	-0,28
TU (min)	274	5,91*	-9,20**	277	-0,15	0,07	272	-0,27	-1,29
TM (min)	277	7,30†	-9,90*	280	-6,07	4,33	275	-1,41	2,48
PN (g)	282	-36,93	35,58	286	-7,07	-2,01	281	8,57	-1,95

† = $P < 0,1$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; Las estimas sin superíndice no alcanzan la significación estadística ($P > 0,1$)

Tabla 3. Número de registros (n) y efecto genético aditivo ($\pm$ ES) de los diferentes haplotipos para los caracteres analizados (el haplotipo C se ha fijado a 0).

	n	Haplotipo A	Haplotipo B	Haplotipo D	Haplotipo E
TR-0 (°C)	279	0,09 $\pm$ 0,10	-0,03 $\pm$ 0,09	-0,07 $\pm$ 0,12	-0,06 $\pm$ 0,15
TR-1 (°C)	264	0,11 $\pm$ 0,20	-0,08 $\pm$ 0,18	-0,14 $\pm$ 0,23	0,53† $\pm$ 0,28
FC-0 (ppm)	253	3,19 $\pm$ 9,52	-5,71 $\pm$ 7,87	6,50 $\pm$ 10,14	14,64 $\pm$ 12,07
FC-1 (ppm)	239	11,42 $\pm$ 8,42	3,33 $\pm$ 7,89	15,41 $\pm$ 10,03	15,97 $\pm$ 12,15
SO-0 (%)	236	1,16 $\pm$ 2,28	-0,93 $\pm$ 2,28	1,09 $\pm$ 2,89	1,29 $\pm$ 3,44
SO-1 (%)	233	1,74 $\pm$ 1,03	0,50 $\pm$ 0,97	-0,22 $\pm$ 1,24	2,34 $\pm$ 1,50
TB (min)	272	-4,96 $\pm$ 3,84	-0,11 $\pm$ 3,56	0,90 $\pm$ 4,56	-3,73 $\pm$ 5,54
TM (min)	275	-0,39 $\pm$ 5,04	5,84 $\pm$ 4,66	11,24† $\pm$ 5,99	-5,27 $\pm$ 7,15
PN (g)	281	-73,96 $\pm$ 31,14	-19,09 $\pm$ 29,38	-63,70† $\pm$ 37,17	-77,22† $\pm$ 45,33

† = $P < 0,1$

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por MCYT (AGL2000-1229-C03). Los autores les agradecen a Jean Pierre Bidanel (INRA) y a J.C. Caritez (INRA) y M. Arqué (IRTA) por su inestimable colaboración. Al personal de *Nova Genética* por su excelente cooperación en el desarrollo del protocolo experimental, en particular a Paco Márquez y Eva Ramells. Los autores agradecen especialmente las contribuciones del INRA (Francia) y del CIA *El Dehesón del Encinar* (Toledo) por proporcionar las cerdas puras Meishan y los verracos Guadyerbas, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Casellas *et al.* 2004. *J Anim Sci*, 82: 1919-1924.
- Herpin *et al.*, 1996. *J. Anim. Sci.*, 74: 2067-75.
- Parker *et al.* 1989. *Am J Obstet Gynecol.* 161(3):795-802.
- Putnová *et al.* 2002. *Journal of Animal Breeding Genetics* 119: 57-63.
- Tomás *et al.* 2003. X Jornadas sobre Produccion Animal, ITEA, Zaragoza, 2003.
- Van Rens BTTM. y van der Lende T. 2002. *Theriogenology* 57: 883-893.
- Van Rens *et al.* 2003. *Theriogenology* 59: 915-926.
- Vincent *et al.* 1997. *Mammalian Genome* 8: 793-4.
- Vincent *et al.* 1998. *Proc. 6th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod* 27: 15-18.