

ANÁLISIS DE MARCADORES DE RESILIENCIA EN RELACIÓN CON LA TASA DE ABORTOS EN CERDAS

Pena R.N.^a, Fernández C.^b, Blasco-Felip M.^c, Fraile L.^a, y Estany J.^a

^aDepartament de Ciència Animal, Universitat de Lleida - Agrotecnio Center, 25198 Lleida.

^bINZAR S.L., 50018 Zaragoza. ^cVeterinaria Autònoma, 50001 Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

El concepto de resiliencia se ha aplicado en una amplia variedad de situaciones, desde el nivel molecular a ecosistemas, pero en el ámbito de las producciones se utiliza con mayor frecuencia para definir la capacidad de los animales de sobreponerse a estresores tanto internos como externos. La respuesta de los individuos a agentes infecciosos se toma como una medida de la resiliencia aguda donde interviene las fases de detección, reacción y superación del desafío (Colditz & Hine 2016). En el caso del cerdo, sin duda una de las respuestas más estudiadas en los últimos años ha sido en relación a la infección con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV). Esta enfermedad provoca unos altos costes a la industria porcina debido a la virulencia de sus brotes epidémicos, su transmisión tanto vertical como horizontal y a que, dada la altísima tasa de mutación del virus, no existe todavía ninguna vacuna totalmente efectiva (Dekkers *et al* 2017). Por esta razón se ha propuesto el uso de la selección genética de cerdos como un esfuerzo adicional y complementario. La respuesta del huésped a la infección por PRRSV tiene un componente genético considerable y recientemente se han descrito los primeros marcadores relacionados con una mejor respuesta o una mayor tolerancia a la infección.

Uno de los primeros marcadores descritos fue un SNP en el cromosoma 4 porcino, seleccionado de una región genómica que explica cerca del 16% de la varianza genética para la carga viral en sangre durante los 21 días posteriores a un desafío experimental con cepas americanas del virus (Boddicker *et al* 2012). Esta mutación, denominada WUR10000125 (WUR), se localiza en la región 3'UTR del gen *GBP1* (Guanylate binding protein-1), un gen de respuesta a interferones tipo II. Nuestro grupo ha validado el efecto positivo de WUR sobre la viremia también en cepas europeas (Abella *et al* 2016). El allele G de WUR modifica una señal cercana de poliadenilación del gen *GBP1*, invirtiendo la proporción de dos transcritos alternativos (Gol *et al* 2016). Sin embargo, la causalidad de esta región del cromosoma 4 se ha imputado recientemente a un gen cercano, *GBP5*, donde un SNP intrónico (rs340943904) genera un nuevo sitio aceptor de *splicing* y resulta en cambios en la proporción de dos transcritos alternativos (Koltes *et al* 2015). Complementariamente, se han estudiados otros genes candidatos por su relación con la patogenia de esta infección. Por ejemplo el gen *CD163* codifica para un receptor de membrana que utiliza PRRSV para entrar en los macrófagos e iniciar la infección. Es de destacar que los cerdos donde este gen ha sido eliminado total (Whitworth *et al* 2016) o parcialmente (Burkard *et al* 2017) mediante herramientas de edición génica son totalmente resistentes a la infección con este virus. Se han descrito varias mutaciones naturales en este gen, algunas de las cuales se han relacionado con una mejor capacidad de respuesta de los cerdos ante el virus. Por ejemplo, el genotipo CC del polimorfismo *CD163:c.3534C>T* se asocia a niveles elevados de anticuerpos después del desafío de PRRSV (Lim *et al* 2018). Por otra parte, la mutación -1533G>A en el promotor del gen *USP18* (ubiquitin specific protease 18) se ha asociado a mayor expresión de este gen, que puede detener la infección *in vitro* de macrófagos con PRRSV (Li *et al* 2014). Por último, una inserción de 275 bp en el promotor del gen *MX1* (MX Dynamin Like GTPase

1) potencia la actividad transcripcional de este gen mediador de la respuesta humoral a la infección con PRRSV.

El objetivo de este trabajo es analizar la relación de los marcadores WUR, GBP5, CD163, USP18 y MX1 con el porcentaje de abortos durante un brote epidémico de PRRSV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal. Los animales utilizados proceden de una granja de producción negativa a PRRSV con 1500 cerdas Landrace x Large White. Esta granja sufrió un brote epidémico de PRRSV en diciembre de 2017 que perduró durante seis semanas. La tasa de abortos durante el brote fue del 30%. La presencia del brote se confirmó por la detección del virus PRRSV por PCR en suero de las cerdas abortadas. Además, todos los animales seroconvirtieron al virus PRRSV (medido por ELISA PRRSV IDEXX) transcurridos dos meses después del brote epidémico, confirmando, por tanto, que todos las cerdas fueron expuestas al virus. A partir de estas observaciones se tomaron para este estudio muestras de sangre de 180 cerdas contemporáneas (60 que abortaron y 120 que no).

Genotipado. El marcador WUR se genotipó mediante un protocolo de discriminación alélica con sondas marcadas fluorescentemente tal como se describe en Abella *et al* (2016). Para los marcadores GBP5, CD163 y USP18 se pusieron a punto protocolos de HRM-PCR con los *primers* que se indican en la Tabla 1. Las reacciones de PCR (1xLuminaris HRM Master Mix (ThermoFisher), 0.4 uM de cada primer y ~10 ng de ADN) se incubaron en un termociclador QuantStudio QS3 (ThermoFisher) con el siguiente programa de temperaturas: 95°C x 10min, seguido de 40 ciclos de 60°C x 1min y 95°C x 15seg. Seguidamente, se llevó a cabo una curva de disociación de la PCR, calentando las reacciones de 60°C a 95°C con una rampa de 0.015°C/min. Se utilizó el programa HRM (ThermoFisher) para analizar las curvas de disociación y asignar los genotipos. La inserción de 275 bp del gen *MX1* fue detectada con una PCR convencional con los *primers* que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de *primers* utilizados para determinar el genotipo de los marcadores.

Marcador	Primer Fw (5' → 3')	Primer Rv (5' → 3')	Tamaño amplicón
GBP5	AGGATGGCTGCTAACACTTG	GGAGGGAGAAGGATGGGTACT	117 bp
CD163	CTCCTGGTATCCAAAGACTGC	GAAATCAAGAACAAGAATCAGCA	133 bp
USP18	ATGCAGGAAAGAAGGGAAGG	GGGACATGAACACAAACACG	112 pb
MX1	CCAGATTGCCAAATCCCTA	CAGGCTAGGGGTTGACTCAG	247 bp / 522 bp

Análisis estadístico. El efecto de cada marcador sobre la tasa de aborto se analizó con un modelo de regresión logística. Cada marcador se analizó por separado. Las diferencias entre genotipos dentro de cada marcador se contrastaron mediante una prueba χ^2 . Con las estimas obtenidas del efecto de cada genotipo se estimó la probabilidad que cada genotipo tiene de abortar. Los análisis se realizaron con el programa JMP Pro12 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos las cerdas eran homocigotas GG para el marcador del gen *USP18*, lo que concuerda con los resultados descritos por Li *et al* (2014) donde el alelo A solo segregaba en razas indígenas chinas pero no en las occidentales (Landrace, Yorkshire y Duroc). En los

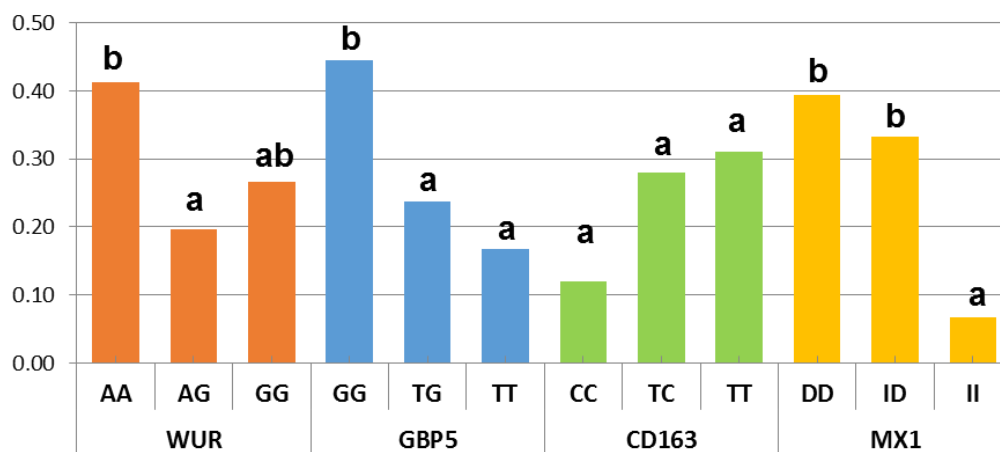
cuatro polimorfismos restantes la frecuencia alélica del alelo minoritario se situó entre 0.20 y 0.32 (Tabla 2).

El porcentaje de abortos fue significativamente distinto en las homocigotas para el alelo minoritario de los marcadores WUR, GBP5 y MX1, pero no para CD163 (Tabla 2). La tasa de aborto en las cerdas heterocigotas para WUR y GBP5 fue similar a la observada en las homocigotas para el alelo minoritario, mientras que en MX1 se dio la situación contraria. Aunque los marcadores WUR y GBP5 están parcialmente ligados, la probabilidad de abortar en los homocigotos alternativos fue dos veces superior en GBP5 respecto a WUR (Figura 1). En el caso del marcador MX1, el genotipo II mostró una probabilidad de abortar marcadamente menor respecto al resto de genotipos. Estos resultados son un primer paso en la selección de cerdas resilientes que sobrelleven con más éxito una infección epidémica de PRRSV. Estos resultados están actualmente siendo validados en otras poblaciones tanto en fase endémica como epidémica de la enfermedad.

Tabla 2. Distribución de los genotipos y frecuencia del alelo minoritario (MAF) para cada marcador.

Genotipos	WUR			GBP5			CD163			MX1		
	AA	AG	GG	TT	TG	GG	TT	TC	CC	DD	ID	II
N	109	56	15	18	76	83	89	45	25	117	39	15
MAF	0.24 (G)			0.32 (T)			0.30 (C)			0.20 (I)		

Figura 1. Probabilidad de abortar según el genotipo de los cuatro marcadores analizados. Dentro de cada marcador, los genotipos con índices distintos indican diferencias en la tasa de abortos ($p < 0.05$).



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abella et al (2016) Res Vet Sci 104:117-122 • Boddicker et al (2012) J Anim Sci 90:1733-1746 • Burkard et al (2017) PLoS Pathog 13:e1006206 • Colditz & Hine (2016) Anim Prod Sci 6:1961-1983 • Dekkers et al (2017) Vet Microbiol 209:107-113 • Gol et al (2015) Anim Genet 46:599-606 • Koltjes et al (2015) BMC Genomics 16:412 • Pena et al (2012) XVI Reunión Mejora Genética Animal, Menorca • Lim et al (2018) Anim Genet 49:98-99 • Whitworth et al (2016) Nat Biotechnol 34:20-22

Agradecimientos. Proyecto financiado por FEDER (COMRDI16-1-0035-03).