ITEA (2004), Vol. **100A N.° 3,** 167-171

# IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS 1 (*ESR1*) Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL *ESR1* Y *ESR2* SOBRE EL TAMAÑO DE CAMADA EN UNA LÍNEA SINTÉTICA DE CERDOS

**G. Muñoz, C. Óvilo, L. Silió, A. Fernández, C. Rodríguez**

Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, Ctra de la Coruña KM 7.5, 28040 Madrid

## Introducción

Los estrógenos son hormonas esteroideas que presentan importantes efectos relacionados con la gestación y sus funciones están mediadas por los receptores de estrógenos. El receptor de estrógeno alfa o *ESR1*, ha sido considerado como el único receptor que mediaba las funciones de la hormona, hasta la identificación de un nuevo receptor de estrógeno llamado beta o *ESR2*. Ambos receptores son factores de trascripción activados por ligando y presentan importantes funciones en el desarrollo sexual y en los procesos reproductivos.

El tamaño de camada es uno de los caracteres reproductivos más importantes en la producción porcina, ya que el mayor número de lechones por camada reduce el coste unitario por lechón destetado y conlleva un aumento de los beneficios económicos para los ganaderos. El gen del *ESR1* ha sido propuesto como gen candidato para el estudio de caracteres reproductivos. ROTHSCHILD *et al.* (1996) detectaron un polimorfismo en este gen que se ha asociado al tamaño de camada en cerdos (SHORT *et al.*, 1997), aunque este efecto ha sido objeto de controversia por otros autores (GIBSON *et al.*, 2002; NOGUERA *et al.*, 2003), que no detectaron esta asociación en otras poblaciones.

El gen del *ESR2*, descubierto más recientemente, presenta una alta afinidad por los estrógenos (TREMBLAY *et al.*, 1997) y se le relaciona con funciones estrogénicas implicadas en la maduración y desarrollo de folículos, así como en la regulación del crecimiento y desarrollo embrionario en el momento de la implantación (ROSENFIELD *et al.*, 1999; KOWALSKI *et al.*, 2002). En un estudio reciente realizado por nuestro grupo (MUÑOZ *et al.*, 2004), se llevó a cabo el mapeo físico del gen *ESR2*, la detección de SNPs en diversas poblaciones de cerdos y se realizó el estudio del efecto de las variantes genéticas detectadas sobre el tamaño de camada en dos poblaciones de cerdo ibérico.

Debido a la homología estructural y fisiológica que comparten ambos receptores, se considera interesante realizar un estudio conjunto de ambos genes y de sus efectos sobre la prolificidad en una población comercial. El presente trabajo resume los resultados obtenidos hasta la fecha en esta investigación.

## Material y métodos

### Material

La línea genética utilizada, es una línea sintética formada durante nueve generaciones, a partir de animales de razas Meishan y Large White hiperprolífica. Esta nueva línea de cerdos, conjuga las excepcionales características maternales de la raza Meishan (elevada prolificidad, alto número de tetinas y buenas cualidades maternas) y unos rendimientos productivos adecuados a las demandas europeas de crecimiento y engrasamiento, aportados por las líneas hiperprolíficas Large White existentes en la actualidad y por la selección efectuada con ese objetivo.

### *ESR1*

#### Secuenciación del ADNc

Para identificar otros SNPs de interés localizados en la región codificante, se realizó la secuenciación del ADNc del *ESR1*.

Las muestras utilizadas para la síntesis y secuenciación de ADNc corresponden a tejido ovárico y a músculo, obtenido de seis cerdas de raza ibérica (2 Guadyerbas y 4 Torbiscal) y a dos cerdas de la línea sintética citada. Los tejidos fueron recogidos en nitrógeno líquido y conservados a -80°C. El ARN total se purificó a partir de 100 mg de muestra utilizando el reactivo Tri Reagent (Sigma), y se utilizó directamente como molde para la transcripción inversa, mediante el enzima Superscript II (Invitrogen) y hexámeros aleatorios, siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la retrotranscripción se utilizó para la amplificación por PCR de cuatro fragmentos solapados del ADNc, utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia publicada del mRNA completo del gen *ESR1* porcino (Genbank nº acceso Z37167). Las secuencias de los primers utilizados y los tamaños de los fragmentos amplificados se detallan en el cuadro 1.

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 ml, conteniendo buffer estándar 1X, 200mM dNTPs, 2mM $MgCl_2$, 0,5mM oligos, 0,75U Tth (Biotools) y 2ml ADNc. Las condiciones de amplificación fueron de 94° durante 5min, seguido de 40 ciclos de 94° (30s), Tª anillamiento específica de cada pareja de oligonucleótidos, indicada en el cuadro 1, (30s), 72° (45s) y una extensión final de 72° durante 10 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). Los fragmentos obtenidos se purificaron con el kit de Amersham PCR purification (Bioscience) y se secuenciaron utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencig Kit en un secuenciador automático ABI-3100 (Applied Biosystems). Se utilizó el paquete de programas DNAstar para la edición y alineamiento de las secuencias obtenidas (aplicaciones Editseq y Megalign).

#### Genotipado PCR-RFLP

Se realizó el genotipado del polimorfismo PCRRFLP *Pvu*II, en 266 muestras de ADN genómico de cerdas de la línea sintética con datos de tamaño de camada, siguiendo el protocolo descrito por SHORT *et al.* (1997). Este polimorfismo descrito por ROTHSCHILD *et al.* (1996), es un SNP localizado en región no codificante.

### *ESR2*

La secuenciación del ADNc, la detección de un SNP en la posición 949 en el exón 5

Cuadro 1. Primers utilizados en la secuenciación del ADNc

| Fragmento | Secuencia cebadores | Tª anillamiento | Tamaño |
|---|---|---|---|
| Extremo 5'-ex1 | 5'-TAACCGCGGGCTGTGCTCTTCTTC-3'<br>5'-CCGCTCGGCTCATTCTCCAGGTAA-3' | 65°C | 510pb |
| Ex1-ex4 | 5'-GCCGCAGCTCTCGCCCTTCCT-3'<br>5'-ACCGCTTCATTCCTGCCCTCTCCA-3' | 62°C | 501pb |
| Ex4-ex6 | 5'-GGGGGATACGGAAAGACC-3'<br>5'-ACGGAAGCGAGATGATGTAGC-3' | 57°C | 551pb |
| Ex6-ex8 | 5'-TGTGTCGAGGGAATGGTGGAG-3'<br>5'-TCAGATTGTGGTGGGGAAGTT-3' | 58°C | 540pb |

del gen *ESR2* y el diseño de los cebadores y protocolo de genotipado mediante PCR-RFLP, aparece detallado en un trabajo previo realizado por nuestro grupo (MUÑOZ *et al.*, 2003). Se genotiparon para este SNP 267 cerdas de la línea sintética.

### Estudio de asociación

Se realizó un análisis de asociación de los polimorfismos descritos en los genes *ESR1* y *ESR2* con caracteres reproductivos (nacidos vivos, NV). Para ello se ha contado con 927 registros de tamaño de camada de 330 cerdas de la línea sintética, 64 de ellas con genotipo desconocido.

Se empleó un modelo animal con repetibilidad en el que se consideraron como efectos fijos el año-época de parto (con 6 niveles) y el genotipo del individuo para el SNP del gen *ESR1* (con 4 niveles: AA, AB, BB o desconocido) o del gen *ESR2* (con 4 niveles: AA, GA, GG o desconocido). La heredabilidad y el efecto permanente estimados a partir de todos los registros fueron respectivamente 0.140 ± 0.029 y 0.007 ± 0.001. Se realizaron análisis independientes para el primer, segundo y tercer o más partos.

## Resultados y discusión

### ESR1

Se ha obtenido la secuencia de bases de un total de 1885 pb correspondientes al ADNc del gen *ESR1*. Esta secuencia correspondiente al fragmento comprendido entre las posiciones de la base 3 del extremo 5´ y la base 1888 del exón 8, cubre la totalidad del ADNc. Las secuencias obtenidas en las seis hembras de raza Ibérica son idénticas a la publicada (Genbank nº acceso Z37167). En las dos secuencias obtenidas en hembras de la línea sintética se han identificado 5 SNPs. La posición y características de estos SNPs se describen en el cuadro 2.

Ninguno de los 5 SNPs detectados en los individuos de la línea sintética produce un cambio aminoacídico en la proteína codificada.

#### *Estudio preliminar de asociación para los genes ESR1 y ESR2*

El efecto de los distintos genotipos de los genes *ESR1* y *ESR2* sobre el número de lechones nacidos vivos, además del número

Cuadro 2. SNPs detectados en la secuenciación del ADNc del gen ESR1 en individuos de diversas líneas

| | SNPex3 | SNPex5 | SNPex7 | SNPex8-1 | SNPex8-2 |
|---|---|---|---|---|---|
| Posición Z37165 | 669 | 1227 | 1452 | 1665 | 1755 |
| Individuo | | | | | |
| Torbiscal 1 | TT | CC | CC | TT | AA |
| Torbiscal 2 | TT | CC | CC | TT | AA |
| Torbiscal 3 | TT | CC | CC | TT | AA |
| Torbiscal 4 | TT | CC | CC | TT | AA |
| Guadyerbas 1 | TT | CC | CC | TT | AA |
| Guadyerbas 2 | TT | CC | CC | TT | AA |
| Sintética 1 | CT | CC | CC | CC | GG |
| Sintética 2 | TT | CT | CT | CC | GG |

de cerdas y número de partos empleados en cada uno de los análisis, se muestran en los cuadros 3 y 4, respectivamente. Se estimó el efecto aditivo del gen como la diferencia entre los homocigotos y el efecto dominante como la diferencia del heterocigoto respecto de la media de los homocigotos.

Como puede observarse, el efecto de los genotipos del gen *ESR1* sobre el número de nacidos vivos, fue muy pequeño. Ni las diferencias ni los efectos fueron significativos en ningún caso, al contrario de lo descrito por ROTHSCHILD *et al.* (1996) y SHORT *et al.* (1997) en el que el alelo B presentaba un importante efecto favorable sobre el tamaño de camada en las razas Large White, Meishan y líneas sintéticas de ambas.

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con trabajos posteriores realizados tanto en un cruce experimental $F_2$ entre líneas de las mismas razas Large White y Meishan (GIBSON *et al.*, 2002) como en distintas poblaciones de cerdas Landrace hiperprolíficas (NOGUERA *et al.*,

Cuadro 3. Efecto del gen *ESR1* sobre el tamaño de camada

| | Primer parto | | Segundo parto | | Tercer o más partos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{cerdas}$ | NV | $N_{cerdas}$ | NV | $N_{cerdas}$ | $N_{partos}$ | NV |
| Genotipos | | | | | | | |
| AA | 29 | 0.00 | 30 | 0.00 | 28 | 36 | 0.00 |
| AB | 116 | -0.44 (0.76) | 113 | 0.63 (0.74) | 95 | 136 | 0.12 (0.71) |
| BB | 108 | -0.01 (0.77) | 102 | 0.72 (0.76) | 80 | 127 | 0.24 (0.72) |
| Desconocido | 64 | -0.02 (0.82) | 45 | 0.36 (0.85) | 19 | 21 | 0.40 (1.02) |
| Total | 317 | | 290 | | 222 | 320 | |
| Efecto | | | | | | | |
| Aditivo | | -0.00 (0.39) | | 0.36 (0.38) | | | 0.12 (0.36) |
| Dominante | | -0.43 (0.50) | | 0.27 (0.52) | | | -0.00 (0.48) |

Cuadro 4. Efecto del gen *ESR2* sobre el tamaño de camada

| | Primer parto | | Segundo parto | | Tercer o más partos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{cerdas}$ | NV | $N_{cerdas}$ | NV | $N_{cerdas}$ | $N_{partos}$ | NV |
| Genotipos | | | | | | | |
| AA | 15 | 0.00 | 15 | 0.00 | 13 | 18 | 0.00 |
| GA | 96 | 1.47 (1.01) | 93 | 0.63 (1.01) | 79 | 107 | -1.41 (0.95) |
| GG | 143 | 1.00 (1.00) | 138 | 0.96 (1.00) | 112 | 176 | -1.31 (0.94) |
| Desconocido | 63 | 1.24 (1.05) | 44 | 0.56 (1.09) | 18 | 19 | -1.14 (1.22) |
| Total | 317 | | 290 | | 222 | 320 | |
| Efecto | | | | | | | |
| Aditivo | | 0.50 (0.50) | | 0.48 (0.50) | | | -0.66 (0.47) |
| Dominante | | 0.97 (0.62) | | 0.15 (0.62) | | | -0.75 (0.58) |

2003), en los que no se encontraron efectos significativos.

Con respecto al gen *ESR2*, cabe destacar la disparidad entre el genotipo favorable (GG) para el primer y segundo parto, respecto del genotipo favorable para tercer y siguientes partos (AA). Sin embargo, en ningún caso las diferencias fueron significativas.

La significación de los efectos observados puede estar condicionada por el reducido número de registros disponibles, ya que la frecuencia de aparición de los tres genotipos en la población analizada fue muy diferente, siendo relativamente baja la frecuencia del genotipo AA (5.99%) frente al GA (37.83%) y GG (56.18%). Por lo tanto, sería aconsejable ampliar estos estudios a un mayor número de animales de modo que pueda estar mejor representado el genotipo minoritario AA.

## Agradecimientos

Los autores desean mostrar su agradecimiento a Fernando Flamarique por las facilidades dadas en la obtención de muestras biológicas y registros productivos. Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FIT 01 0000-2001-027.

## Bibliografía

GIBSON *et al.*, 2002. *Animal Genetics* 33, 448-450.

KOWALSKI *et al.*, 2002. *Biology of Reproduction* 66, 760-769.

MUÑOZ *et al.*, 2003. ITEA, Vol 24, Tomo II, 429-31.

MUÑOZ *et al.*, 2004. *Animal Genetics* 35(3), 242-4.

NOGUERA *et al.*, 2003. *Livestock Production Science* 82, 53-59.

ROSENFIELD *et al.*, 1999. *Biology of Reproduction* 60, 691-697.

ROTHSCHILD *et al.*, 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 201-205.

SHORT *et al.*, 1997. *Journal of Animal Science* 75, 3138-3142.

TREMBLAY *et al.*, 1997. *Molecular Endocrinology* 11 (3), 353-365.