POLIMORFISMO DEL GEN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ß(*ESR2*) EN CERDOS IBÉRICOS

Gloria Muñoz, Cristina Óvilo, Carmen Castellanos, Carmen Rodríguez
Dpto. Mejora Genética Animal, INIA, Ctra. de La Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos presentan importantes funciones en el endometrio y en el ovario, relacionadas con el desarrollo sexual y los procesos reproductivos. Estas funciones están íntimamente relacionadas con la gestación y están mediadas por dos subtipos de receptores nucleares ESRα y ESRβ, presentando ambos múltiples isoformas. Estos receptores son factores de transcripción activados por ligando, compuestos por varios dominios importantes para la unión de la hormona, unión al ADN y activación de la transcripción.

Debido a su potencial papel embriotrófico, el gen *ESR*α se ha considerado tradicionalmente candidato para caracteres reproductivos. Polimorfismos en este gen se han asociado al tamaño de camada en cerdos (Rothschild et al, 1996; Short et al, 1997), aunque el grado de desequilibrio de ligamiento varía entre poblaciones (Gibson et al, 2002). El segundo receptor de estrógenos (*ESR*β o *ESR2*), descubierto más recientemente, presenta una alta afinidad para unir estrógenos (Tremblay et al, 1997). Por otra parte estudios recientes sugieren que el receptor β está relacionado con funciones estrogénicas implicadas en la maduración y desarrollo de folículos ováricos, así como en la regulación del crecimiento y desarrollo embrionario en el momento de la implantación (Rosenfeld et al, 1999; Kowalski et al, 2002)

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de polimorfismos en el gen *ESR2*, mediante la secuenciación del ADNc, así como el estudio del efecto de las variantes genéticas detectadas sobre el tamaño de camada en dos poblaciones de cerdo ibérico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Secuenciación de ADNc

Las muestras utlizadas para la síntesis y secuenciación de ADNc corresponden a tejido ovárico obtenido de cerdas de raza Ibérica. Los tejidos fueron recogidos en nitrógeno líquido y conservados a -80ºC. 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 (figura 1), utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia publicada del mRNA completo del gen *ESR2* porcino (Genbank nº acceso AF164957). Las secuencias de los primers utilizados y los tamaños de los fragmentos amplificados se detallan en la tabla 1.

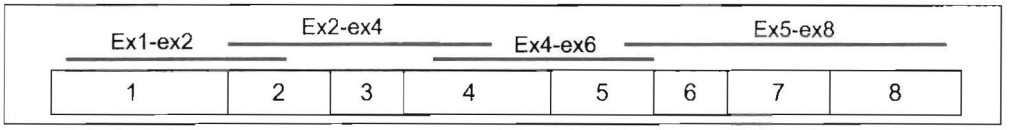
Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µl, conteniendo buffer estándar 1X, 200µM dNTPs, 2mM $MgCl_2$, 0,5µM oligos, 0,75U Tth (Biotools) y 2µl ADNc. Las condiciones de amplificación fueron de 94º durante 5min, seguido de 40 ciclos de 94º (30s), Tª anillamiento específica de cada pareja de oligonucleótidos, indicada en la tabla 1, (30s), 72º (45s) y una extensión final de 72º durante 10 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). Los fragmentos obtenidos se purificaron con el kit Qiaquick PCR purification

(QIAGEN) y se secuenciaron utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencig Kit en un secuenciador automático ABI-310 (Applied Biosystems). Se utilizó el paquete de programas DNAstar para la edición y alineamiento de las secuencias obtenidas (aplicaciones Editseq y Megalign).

Tabla 1: Secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación del ADNc

Fragmento	Secuencia cebadores	Tª anillamiento	Tamaño
Ex1-ex2	5'-CACCATCTAACCTTAACTCTCCTG-3'	55,5°C	413pb
	5'-GGCATCCCTCTTTGAACTTG-3'		
Ex2-ex4	5'-AGGAAGGCTAGTGGGAGCAGTTGTGC-3'	59,5°C	402pb
	5'-GAGCAGCTCCTTCACTCGGGTTGTG-3'		
Ex4-ex6	5'-GAAATTCTGAGGGGCATCTG-3'	58,6°C	409pb
	5'-CATTTCCCTTCATCCCTGTC-3'		
Ex5-ex8	5'-ATGGTGGGGCTGATGTGG-3'	59,5°C	569pb
	5'-TGAGCCTGGGGTTTCTGG-3'		

Figura 1: Representación de los exones del ADNc del gen *ESR2* y ubicación de los cuatro fragmentos amplificados para su secuenciación.



Secuenciación del intrón 4 del gen ESR2

Se detectó un SNP a cinco bases del inicio del exón 5. Con el fin de diseñar un protocolo PCR-RFLP para su genotipado, se diseñó una pareja de cebadores para amplificar y secuenciar el intrón 4. La secuencia de los primers utilizados fue: Forward: 5'-CAAGCTGGCCGACAAGGAACTGGT-3'; y Reverse: 5'-AAGATGAGCTTGCCGGGGTGGTC-3'. La reacción de amplificación se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero con una Tª de anillamiento de 60,4°C y utilizando 60ng de ADN genómico como molde. El producto de amplificación, de aproximadamente 3 Kb, se purificó a partir de gel de agarosa utilizando el GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham) y se secuenció como se describe en el apartado anterior.

Genotipado PCR-RFLP y estudio preliminar de asociación

La secuencia obtenida de la secuenciación del intrón 4 con el primer reverse se utilizó, junto con la secuencia del exón 5, en el diseño de cebadores para la amplificación en ADN genómico de un fragmento del gen que comprendiera la posición 949, correspondiente al SNP detectado. Los cebadores diseñados amplifican un fragmento de 218pb y presentan la siguiente secuencia: Forward: 5'-AAAATACTGATACCCACCCCACAT-3', y Reverse: 5'-CGCCACATCAGCCCCACCAT-3'. La reacción de amplificación se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero con una Tª de anillamiento de 61°C y utilizando 60ng de ADN genómico como molde. El producto amplificado se digirió a 37°C, con el enzima de restricción *Hsp92II* en un volumen de 20µl, utilizando 4U de enzima. El producto de digestión se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Este protocolo de genotipado se aplicó a 176 muestras de ADN de cerdos ibéricos de las estirpes *Guadyerbas* (45) y *Torbiscal* (131), con registro de tamaño de camada (nº de lechones nacidos totales). Se realizó un análisis preliminar de asociación utilizando un modelo animal de repetibilidad, con 1271 camadas registradas, en el que se consideraron como efectos fijos la línea genética (2 niveles: *Guadyerbas* y *Torbiscal*), el ordinal de parto (4 niveles) y el genotipo del individuo para el SNP del gen *ESR2*. Se estimó el efecto aditivo del gen como la diferencia entre homocigotos y el dominante como la diferencia del heterocigoto respecto a la media de los homocigotos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha obtenido la secuencia de bases de un total de 1561pb correspondientes al ADNc del gen *ESR2*. Esta secuencia corresponde al fragmento comprendido entre las posiciones 17 y 1577, localizadas respectivamente en los exones 1 y 8, cubriendo prácticamente la totalidad de dicho ADNc. Las secuencias obtenidas son idénticas a la publicada, e idénticas entre sí, excepto la base localizada en la posición 949, que constituye un SNP. Este SNP es una transición A/G contenida en el exón 5. La secuencia publicada corresponde al alelo A. Los dos individuos *Guadyerbas* secuenciados presentaron los genotipos GG y AG.

El SNP detectado produce un cambio aminoacídico en la proteína codificada del tipo metionina/valina y se localiza en la región del ADNc responsable de la codificación del dominio de unión a la hormona del receptor, fundamental para su función como factor de transcripción. Este polimorfismo es el primero observado en este gen en porcino, cuyo ADNc ha sido caracterizado muy recientemente (Kowalski et al, 2002).

La localización de este polimorfismo a tan sólo cinco bases del inicio del exón 5 condiciona la puesta a punto de un protocolo rápido de genotipado basado en PCR a partir de muestras de ADN genómico. Por ello se realizó la secuenciación de un fragmento genómico que incluye el intrón 4. La amplificación en ADN genómico con cebadores localizados en los exones 4 y 5 produjo un producto único de aproximadamente 3Kb, que se secuenció por ambos extremos. Las secuencias obtenidas confirmaron que se trataba del intrón 4. Así, se ha podido optimizar un protocolo rápido de genotipado mediante PCR-RFLP, con un primer forward localizado en el intrón 4 y un reverse en el exón 5. La digestión con el enzima *Hsp92II* produce fragmentos de 202 y 16 pb para el alelo G; y 142, 60 y 16 pb para el alelo A.

La frecuencia del alelo A en la población *Torbiscal* fue de 0,36 y en *Guadyerbas* fue de 0,10, estando ausente en esta población el genotipo AA. Los resultados del estudio de asociación muestran un efecto aditivo de: GG-AA=-0,38 (±0,47) y un efecto dominante de: GA-1/2[GG+AA]=-0,30 (±0,28). La significación de los efectos observados puede estar condicionada por el reducido número de registros disponibles, especialmente para el genotipo AA, siendo aconsejable ampliar estos estudios a un mayor número de animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gibson et al (2002) *Animal Genetics* 33, 448-450.
Kowalski et al (2002) *Biology ofRreproduction* 66, 760-769.
Rosenfeld 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.