

VALIDACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS Y FENOTIPOS DE INMUNIDAD PARA MEJORAR LA ROBUSTEZ Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN CERDOS

Descarga el PDF



Maria Ballester y Joaquim Tarrés
Programa de Genética y Mejora Animal, IRTA-Torre Marimón

maria.ballester@irta.cat



joaquim.tarres@irta.cat



En el sector porcino, la mejora genética se ha convertido en una herramienta clave para enfrentar patógenos endémicos y emergentes. Este artículo presenta los resultados de la validación de marcadores genéticos asociados con la inmunocompetencia y la supervivencia frente al PRRSV, destacando su potencial para fortalecer la salud de la cabaña porcina y reducir la mortalidad en situaciones de brote.



MEJORA GENÉTICA PARA HACER FRENTE A LAS ENFERMEDADES PORCINAS

En los últimos años, el sector porcino ha realizado un esfuerzo significativo para reducir el uso de antibióticos con el fin de hacer frente al incremento de las resistencias antimicrobianas. No obstante, **el control de patógenos endémicos y emergentes sigue siendo uno de los mayores desafíos de la producción porcina**, dado el impacto social y económico que generan.

En este contexto, además de los métodos convencionales de vacunación y el refuerzo de las medidas de bioseguridad, **las empresas de selección genética están incorporando en sus programas de mejora marcadores genéticos y caracteres relacionados con la salud animal para producir poblaciones porcinas más robustas y resilientes.**

Existen diversas aproximaciones para identificar marcadores de robustez y resiliencia.

MÉTODOS DIRECTOS

Los métodos directos consisten en **estudiar la susceptibilidad/resistencia genética a enfermedades específicas** y, por tanto, **requieren la exposición de los animales a los agentes infecciosos.**

- ✓ Con esta aproximación se han podido identificar **marcadores de resistencia para *E. coli* F18 y F4 o PRRSV.**
- ✗ No obstante, esta aproximación es **patógeno-específica y no tiene en cuenta las infecciones polimicrobianas o coinfecciones con múltiples patógenos** que normalmente encontramos en las granjas.

MÉTODOS INDIRECTOS

Los métodos indirectos centrados en **mejorar la inmunocompetencia global de los animales sanos** son una buena estrategia para tener una cabaña porcina más robusta y resistente a enfermedades.

En esta aproximación los **caracteres de inmunidad** se consideran **parámetros biológicamente relevantes para medir la inmunocompetencia.**

Estos caracteres pueden dividirse en los dos componentes principales del sistema inmunitario:

- Inmunidad innata o no específica.
- Inmunidad adaptativa o específica.

PROYECTOS IMMUIPIGEN Y METAPIGEN

En los últimos años y como resultado de los proyectos **IMMUIPIGEN** (AGL2016-75432-R) y **METAPIGEN** (PID2020-112677RB-C21), hemos analizado un total de **41 caracteres relacionados con la salud animal**, que engloban **fenotipos de inmunidad, hematológicos y de estrés**, en 432 animales sanos de una línea comercial Duroc de la empresa Selección Batallé.

Los principales resultados muestran que muchos de estos caracteres están **determinados a nivel genético**, mostrando heredabilidades medias-altas y correlaciones genéticas, tanto positivas como negativas, entre estos fenotipos, así como con otros fenotipos relacionados con la producción y la calidad de la carne.

A nivel genómico, se han identificado un total de **58 polimorfismos**, ubicados en 11 regiones cromosómicas y asociados a las variaciones en:

- Niveles de IgG en plasma y Proteína C reactiva (CRP) en suero.
- Capacidad fagocítica de linfocitos.
- Número total de leucocitos, neutrófilos y linfocitos.
- Volumen corpuscular medio (MCV) y hemoglobina corpuscular media (MCH).
- Diferentes poblaciones de células T (células T helper, T memoria y T naive/ $\gamma\delta$).

Además, mediante la utilización de datos de transcriptómica en sangre total, hemos podido analizar los niveles de ARN mensajero en un total de 255 individuos de la población IMMUIPIGEN, identificando **biomarcadores para algunas de las poblaciones de células T**.

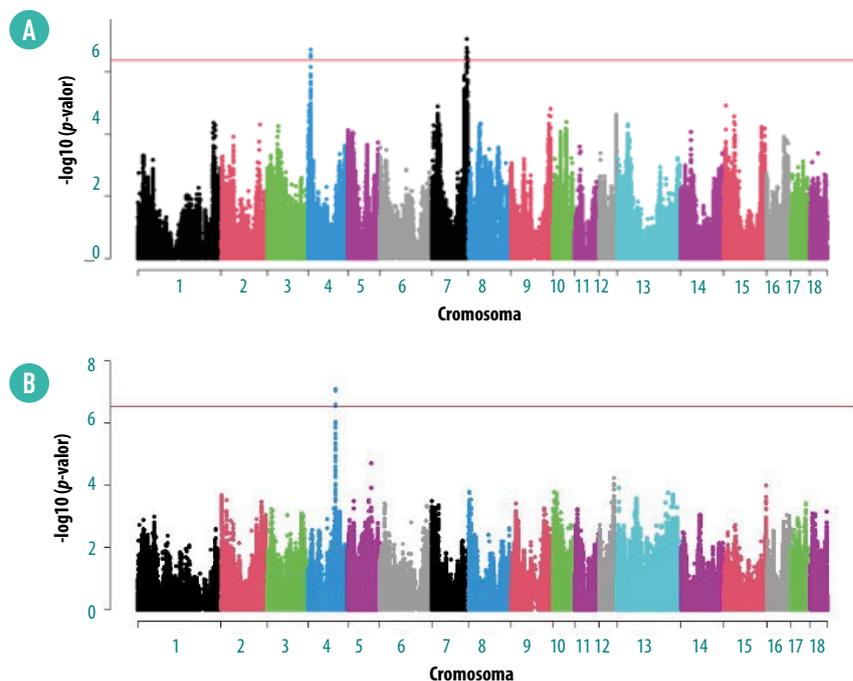


FIGURA 1
Gráficos Manhattan mostrando la asociación entre diversos fenotipos de inmunidad (A) IgG y (B) CRP y los SNPs distribuidos a lo largo del genoma porcino. La línea horizontal roja indica el umbral de significación ($FDR \leq 0,05$).

No obstante, antes de incorporar estos (bio)marcadores y fenotipos de salud en los esquemas de selección, es fundamental validar su utilidad para mejorar la inmunocompetencia de los animales mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes tipos de factores bióticos (patógenos, antígenos vacunales, etc).

En este artículo presentamos la **validación de varios fenotipos y (bio)marcadores de inmunidad** previamente identificados por nuestro grupo, a través de su **asociación con la supervivencia** de los animales tras una infección natural con el **virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV)**.

VALIDACIÓN DE FENOTIPOS Y (BIO)MARCADORES

Para la validación de los marcadores, se utilizaron un total de **129 lechones hembras en transición** de una línea comercial Duroc.

Los lechones se engordaron en seis corrales consecutivos y provenían del cruce de 61 hembras con 20 machos activos de la población comercial. Todos los animales provenían de una granja de reproductoras negativas y en el inicio del estudio estaban sanos, sin ningún signo de infección.

En la **Figura 2** se muestra un cronograma del estudio con los animales, muestras y técnicas utilizadas. A los $60 \pm 2d$ de vida se recogieron muestras de sangre para medir los **fenotipos de inmunidad**:

- 1** La **concentración de inmunoglobulinas IgG en plasma** mediante ELISA.
- 2** La **expresión del gen SOX13, un biomarcador de células T $\gamma\delta$** , mediante PCR cuantitativa.

Una semana después, los lechones se infectaron naturalmente con una cepa de alta patogenicidad del virus de PRRS (genotipo 1).

- Esta cepa del virus (Rosalia) es altamente virulenta y en 1-2 días todos los lechones mostraron signos de infección.

Una semana después se tomaron muestras de sangre de 88 animales para aislar el ARN viral, confirmándose que todos los animales contenían elevadas dosis del virus ($Ct < 25$ en el 90% de los animales).

LA INFECCIÓN DURÓ 6 SEMANAS Y RESULTÓ EN UNA TASA DE MORTALIDAD DE 47 LECHONES MUERTOS POR 82 ANIMALES VIVOS

A las 15 semanas de vida, las 82 hembras supervivientes se trasladaron a una nave de engorde. Los animales estaban aparentemente sanos, aunque 4 animales más murieron durante este período. Los 78 animales restantes se sacrificaron a un peso medio de 137 kg, entre 245 y 262 días de edad. Después del sacrificio, se midió:

- El peso de la canal en caliente.
- El porcentaje de magro de la canal y de sus principales componentes (jamón, lomo y hombro).
- La profundidad del lomo y el espesor de grasa dorsal y del jamón.

Las medidas de los animales en el matadero se promediaron por camada.

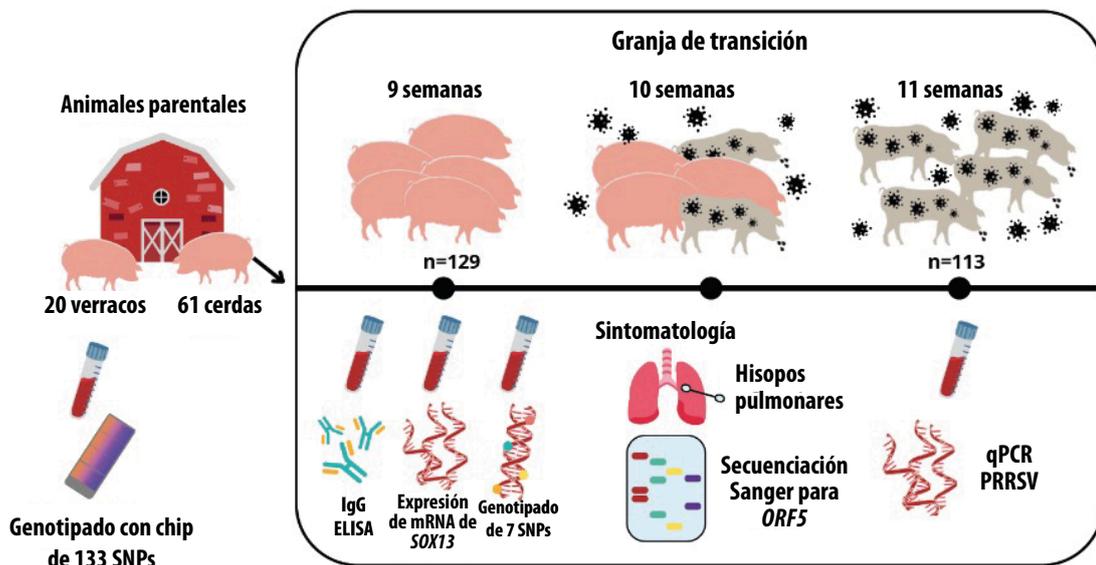


FIGURA 2
Evolución temporal del estudio incluyendo el número de animales usados, las muestras recogidas y las técnicas utilizadas.

Un primer análisis descriptivo de los datos mostró un importante efecto genético, ya que se observaron **diferencias en la supervivencia de los lechones al brote de PRRS en función del padre.**

- Prácticamente **no hubo mortalidad de las hijas de 8 de los 20 padres**, solo murieron 2 de sus 44 hijas. En cambio, hubo **5 padres a los que se les murió el 80% de las hijas**, 23 bajas de 28 hijas.

ESTAS 28 HIJAS TENÍAN NIVELES SIGNIFICATIVAMENTE MENORES DE IgG EN SANGRE Y MAYOR EXPRESIÓN DEL GEN SOX13 EN SANGRE QUE EL RESTO DE LA POBLACIÓN

MARCADORES DE RESISTENCIA AL PRRS

Los 20 padres estaban genotipados con un panel comercial de 128 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que se utiliza para controlar las paternidades, y se modificó para incluir también SNPs asociados con caracteres productivos y de salud animal identificados en el proyecto IMMUIGEN y METAPIGEN (Tabla 1).

Para completar el estudio genético, tanto los 20 padres como sus 129 hijas se genotiparon con SNPs específicos de resistencia a PRRS:

- **GBP5** (rs340943904).
- **CD163** (rs1107556229).
- **SGK1** (rs338508371).
- **MMRN1** (rs695254451).
- **MX1_c.-547ins+275**.

➔ Para cada uno de estos SNPs se hizo un test de asociación con el riesgo de morir en el brote de PRRS usando un modelo de riesgos proporcionales que corregía el efecto de la camada y del corral.

TABLA 1
Descripción de los marcadores asociados con los caracteres de inmunidad y resistencia a PRRSV junto con la frecuencia de sus alelos en la población analizada.

Alelo (Frecuencia alélica)				
SNP	Resistente ¹	Susceptible ²	Gen	Caracter
rs1107556229	A (0,61)	G (0,39)	CD163	Resistencia a PRRSV
rs340943904	T (0,15)	G (0,85)	GBP5	Resistencia a PRRSV
rs319560097	T (0,38)	C (0,62)		IgG
rs81233340, rs81285109	T (0,90)	G (0,10)		CRP
rs338661853	G (0,87)	A (0,13)		LYM_PHAGO_FITC
rs80904079	A (0,42)	G (0,58)		MCV, MCH*
rs80803525, rs80899023, rs80924885	T (0,70)	C (0,30)		Linfocitos
rs342727239	G (0,80)	A (0,20)		Células T γδ
rs323856019	C (0,75)	T (0,25)		Leucocitos
rs343667976	G (0,55)	A (0,45)		Leucocitos
rs81270251	T (0,70)	C (0,30)		Neutrófilos

¹ Los alelos resistentes están presentes en los genotipos con menor riesgo de morir y mayor supervivencia

² Los alelos susceptibles están presentes en los genotipos con mayor riesgo de morir y menor supervivencia

El estudio de asociación para los marcadores específicos de resistencia a PRRS se hizo comparando los genotipos de los animales para cada marcador.

Los animales con genotipos susceptibles tienen un mayor riesgo de morir y sobreviven menos durante el brote, mientras que los animales con genotipos resistentes tienen un menor riesgo de morir y sobreviven más.

Este estudio mostró que los marcadores rs1107556229 y rs340943904 estaban asociados con el riesgo de morir en el brote de PRRS.

➤ Estos marcadores se encuentran en los genes **CD163** y **GBP5** que están relacionados con la **entrada del virus en los macrófagos** y la posterior respuesta inmunitaria.

El resto de los marcadores específicos de resistencia a PRRS no resultaron significativamente asociados al riesgo de morir de los animales en nuestro brote.

MARCADOR rs1107556229

Los **macrófagos alveolares porcinos (MAPs)** son una **importante línea de defensa contra la infección por PRRSV** y son la **principal célula diana para la replicación del virus**.

EL GEN **CD163** CODIFICA UN RECEPTOR CELULAR PARA LA ENTRADA DEL PRRSV EN LOS MACRÓFAGOS

Nuestros resultados muestran que el **alelo mayor (A)** del marcador rs1107556229 está significativamente asociado con una **mayor supervivencia al brote de PRRS** y a una **mayor ganancia de peso posterior** a la infección que el alelo (G) (**Tabla 2**).

MARCADOR rs340943904

El otro marcador asociado con la resistencia a las infecciones de PRRSV es el rs340943904 del gen **GBP5**.

EL GEN **GBP5** SE HA DESCRITO COMO MARCADOR DE MACRÓFAGOS CLÁSICAMENTE ACTIVADOS INDUCIDOS POR INTERFERÓN GAMMA (INF- γ)

Nuestros resultados muestran que el **alelo menor (T)** para este marcador está asociado con **mayor supervivencia y crecimiento posterior a la infección con PRRSV** (**Tabla 2**).

Nuestro estudio también mostró una interacción significativa entre ambos marcadores (rs340943904 y rs1107556229) (**Figura 3**), lo que sugiere una **interacción biológica entre ambos genes (CD163 y GBP5)**.

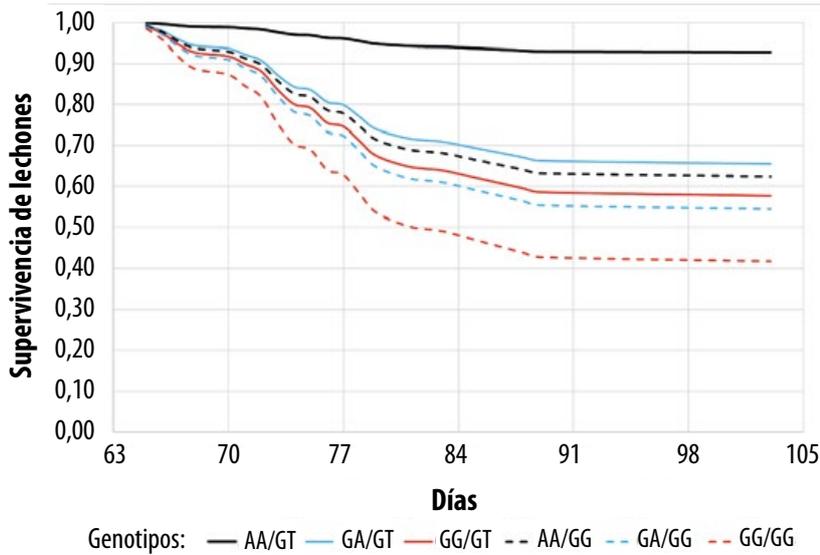


FIGURA 3

Supervivencia de los lechones hasta los 105 días (15 semanas) en función de su genotipo para los marcadores situados en los genes *CD163/GBP5*.

MARCADORES DE INMUNOCOMPETENCIA GLOBAL

En cuanto a los caracteres relacionados con la inmunocompetencia global, al no disponer de los genotipos de los animales, el estudio de asociación se hizo **comparando los genotipos de los padres para cada marcador (Tabla 1)**.

- Las hijas de los padres con genotipos susceptibles tienen un mayor riesgo de morir y sobreviven menos durante el brote, mientras que las hijas de los padres con genotipos resistentes tienen un menor riesgo de morir y sobreviven más.

En este estudio resultaron significativamente asociados con la supervivencia al brote de PRRSV los marcadores genéticos asociados a la variación de los:

- Niveles de IgG en plasma (rs319560097).
- Proteína C reactiva (CRP) en suero (rs81233340).
- Capacidad fagocítica de los linfocitos (rs338661853).
- Número total de leucocitos (rs323856019) y linfocitos (rs80803525).
- Porcentaje de células T $\gamma\delta$ (rs342772739).
- Volumen corpuscular medio (MCV) y hemoglobina corpuscular media (MCH) (rs80904079).

Estos polimorfismos están relacionados tanto con la inmunidad innata o no específica como con la inmunidad adaptativa o específica.

CRP

La proteína C reactiva (CRP), es una **proteína de fase aguda** que juega un papel importante durante las infecciones.

Dependiendo de su conformación, la CRP puede:

- Funcionar como una **molécula proinflamatoria** al activar las fases iniciales del sistema de complemento y regular la liberación de óxido nítrico y la síntesis de citoquinas.
- Actuar como un **agente antiinflamatorio** al regular el avance y gravedad de las etapas posteriores de la inflamación, así como al modular los procesos de apoptosis y fagocitosis.

En nuestro estudio, **el alelo T del SNP rs81233340**, localizado en el gen **CRP**, se asoció significativamente con una **mayor supervivencia de las hijas a PRRSV** y un **mayor nivel de CRP en sangre** (Figura 4).

CÉLULAS T $\gamma\delta$

La producción de INF- γ juega un papel importante en la protección frente a la infección por PRRSV. Además de los macrófagos, se ha descrito que otras células como las **células T $\gamma\delta$ producen INF- γ durante la infección por PRRSV**.

Estas células pueden clasificarse en diferentes poblaciones con diferentes capacidades para responder a patógenos específicos y generar respuestas de citoquinas. Las células WC1.1+ y WC1.2+ difieren en la expresión de citoquinas:

- Las **células WC1.1+** producen preferentemente **INF- γ** .
- Las **células WC1.2+** exhiben niveles más altos de interleucina-17 (**IL-17**).

SE HA OBSERVADO UNA MAYOR EXPRESIÓN DE SOX13 EN LAS CÉLULAS WC1.2+, LO QUE INFLUYE EN SU DIFERENCIACIÓN HACIA CÉLULAS T $\gamma\delta$ PRODUCTORAS DE IL-17

EXPRESIÓN DE *SOX13*

Nuestros resultados mostraron que **niveles más bajos de expresión de *SOX13* se asociaron con una mayor supervivencia durante un brote de PRRS**. Además, el marcador genético **rs342772739** estuvo relacionado con la expresión del gen ***SOX13*** en nuestro estudio.

Este SNP ha sido previamente asociado con el porcentaje de células T $\gamma\delta$.

- Los padres con el **alelo G** tenían hijas con **niveles más bajos de expresión de *SOX13*** en comparación con las hijas de padres con el alelo A.
- Se encontró que este alelo G estaba significativamente asociado con una **mayor supervivencia al PRRSV y un mayor peso al sacrificio**.

Además de la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células T, después de la infección por PRRSV se observa una respuesta humoral caracterizada por una producción inicial de anticuerpos no neutralizantes, seguida por la inducción tardía de anticuerpos neutralizantes.

EN NUESTRO ESTUDIO, LOS ANIMALES CON MAYORES NIVELES BASALES DE IgG EN PLASMA SE ASOCIARON CON UNA MAYOR SUPERVIVENCIA AL BROTE DE PRRSV

A este respecto, *Ballester et al. (2020)* describieron un SNP (**rs319560097**) en la región proximal del cromosoma porcino SSC4 que estaba asociado con **mayores niveles de IgG en plasma (Figura 4)** y que también está asociado con una mayor supervivencia en nuestro estudio.

CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LOS LINFOCITOS

Otro marcador interesante asociado con las células B es el **rs338661853**.

Muchos estudios en mamíferos han demostrado que las células B tienen capacidad fagocítica, siendo capaces de fagocitar partículas, incluidas bacterias, y presentar de forma más eficiente los antígenos particulados fagocitados a las células T CD4+, optimizando la inducción de la respuesta humoral.

En nuestro estudio, el **alelo mayor G**, previamente **asociado con una menor capacidad fagocítica (Figura 4)**, se asoció con **mayor supervivencia al brote de PRRSV**.

CANTIDAD DE LEUCOCITOS Y LINFOCITOS

Otros marcadores asociados con la cantidad de leucocitos (rs323856019) y linfocitos (rs80803525) en sangre también se identificaron como asociados a la supervivencia de las hijas tras el brote de PRRS.

Los **alelos mayores en nuestra población (C para rs323856019 y T para rs80803525)** asociados con una **mayor supervivencia al brote de PRRS** se han asociado previamente con una mayor cantidad de leucocitos y linfocitos en sangre (**Figura 4**).

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Finalmente, otros marcadores relacionados con los caracteres hematológicos, como el MCV y MCH (rs80904079), también resultaron asociados con la supervivencia al brote de PRRSV.

TABLA 2

Promedios de supervivencia de todas las hijas y de las medidas tomadas en las canales de las camadas que llegaron a matadero en función del genotipo del padre para los distintos SNPs relacionados con caracteres de inmunidad.

Genotipo del padre	Número de hijas	Supervivencia a las 15 semanas (%)	Peso de la canal (kg)	Porcentaje de magro de la canal	Espesor de grasa en 3ª-4ª costilla	Profundidad de lomo en 3ª-4ª costilla
rs340943904(GBP5)						
TT	2	87.0 ^a	113.23 ^a	35.10 ^a	40.71 ^a	42.28 ^a
GT	47	67.1 ^a	107.74 ^b	44.46 ^b	29.55 ^b	46.26 ^b
GG	80	56.3 ^b	102.21 ^c	43.84 ^b	29.66 ^b	44.60 ^b
rs1107556229(CD163)						
AA	38	54.1 ^{ab}	107.02 ^a	41.59 ^a	32.16 ^a	43.57 ^a
AG	72	86.2 ^a	102.92 ^b	43.86 ^b	29.91 ^b	44.63 ^a
GG	19	15.3 ^b	97.35 ^c	48.43 ^c	25.77 ^c	53.71 ^b
rs319560097						
TT	19	100.0 ^a	102.23 ^a	44.04 ^a	29.88 ^a	44.45 ^a
CT	61	58.6 ^b	106.28 ^a	41.92 ^a	32.19 ^a	44.98 ^a
CC	49	63.8 ^b	101.69 ^a	45.06 ^a	28.10 ^a	44.45 ^a
rs338661853						
GG	98	74.1 ^a	103.59 ^a	44.01 ^a	29.71 ^a	44.82 ^a
AG	31	36.4 ^b	106.36 ^a	40.51 ^a	33.52 ^a	44.39 ^a
rs81233340						
TT	105	69.7 ^a	104.67 ^a	42.88 ^a	30.87 ^a	44.21 ^a
TG	24	33.0 ^b	99.09 ^a	47.08 ^b	27.13 ^a	50.46 ^b
rs80904079						
AA	23	71.9 ^a	107.81 ^a	40.51 ^a	34.12 ^a	44.36 ^a
AG	63	45.2 ^b	101.77 ^b	45.35 ^b	28.64 ^b	46.68 ^a
GG	43	78.5 ^{ab}	104.40 ^{ab}	44.72 ^{ab}	29.10 ^b	45.41 ^a
rs342772739						
GG	98	68.9 ^a	105.50 ^a	42.81 ^a	31.02 ^a	44.20 ^a
AA	31	46.5 ^b	97.72 ^b	45.33 ^a	28.23 ^a	47.38 ^a
rs80803525						
TT	63	73.8 ^a	104.66 ^a	42.01 ^a	31.74 ^a	43.61 ^a
TC	54	79.0 ^a	103.79 ^a	44.37 ^a	29.54 ^a	45.88 ^a
CC	12	58.4 ^b	103.00 ^a	46.33 ^a	26.95 ^a	46.63 ^a
rs323856019						
CC	76	75.7 ^a	104.79 ^a	42.51 ^a	31.17 ^a	44.02 ^a
TC	53	55.8 ^b	103.38 ^a	44.25 ^a	29.70 ^a	45.71 ^a

^{a,b,c} Estimaciones con diferente letra dentro de cada SNP son significativamente diferentes con un p-valor P<0.05

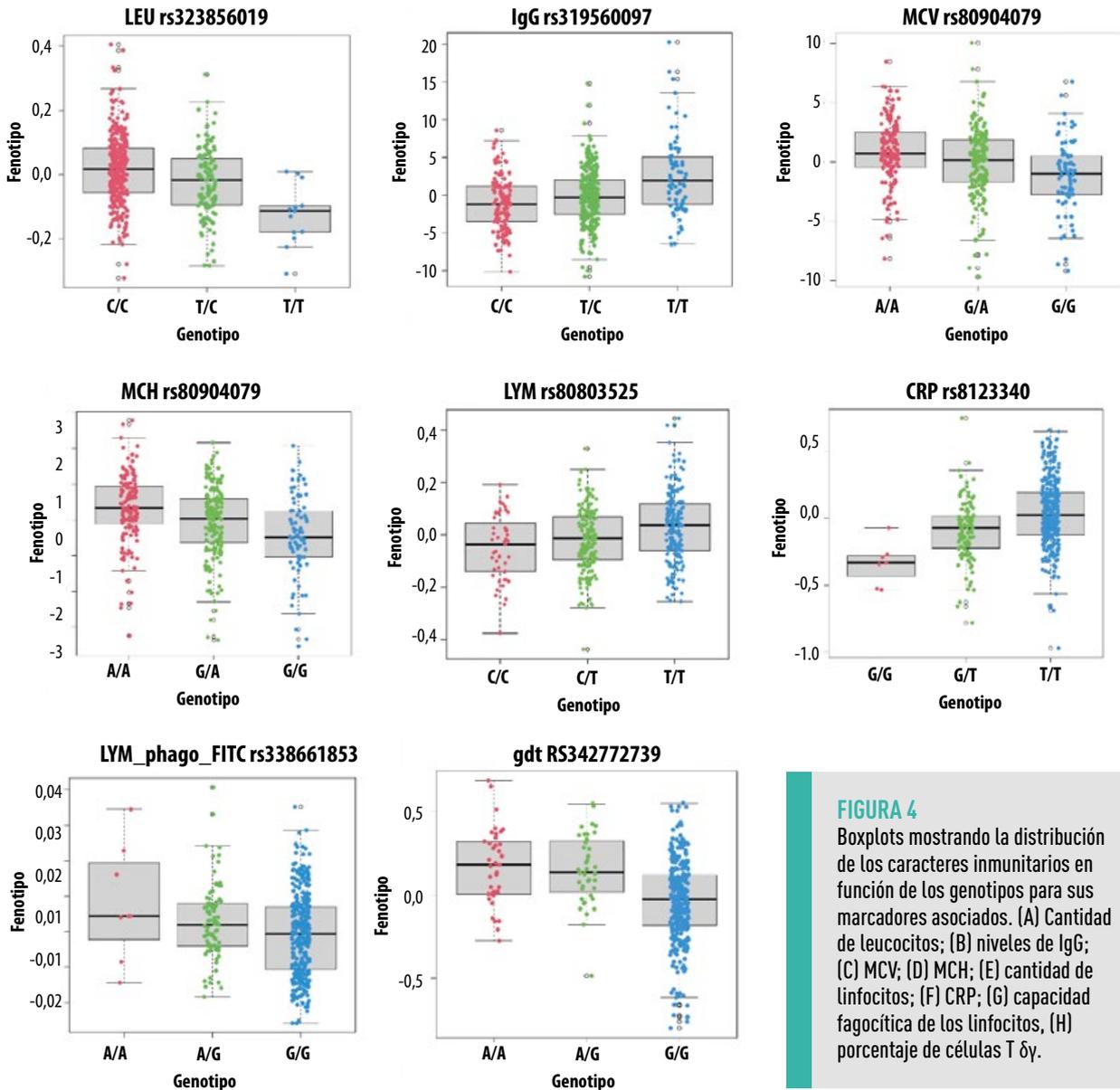


FIGURA 4
 Boxplots mostrando la distribución de los caracteres inmunitarios en función de los genotipos para sus marcadores asociados. (A) Cantidad de leucocitos; (B) niveles de IgG; (C) MCV; (D) MCH; (E) cantidad de linfocitos; (F) CRP; (G) capacidad fagocítica de los linfocitos, (H) porcentaje de células T $\delta\gamma$.

La selección de animales para **producir una buena respuesta inmunitaria frente al PRRSV** debe considerar tanto caracteres de inmunidad innata como adaptativa.

Los padres que acumulan más **alelos resistentes** para ambos tipos de caracteres tienen hijas con **mayores niveles de IgG en sangre, menor expresión del gen SOX13, mayor supervivencia ante los brotes de PRRSV** y un **crecimiento post-infección superior**, lo que se traduce en mayores pesos de canal en el matadero, con un mayor espesor de grasa dorsal y un menor porcentaje de magro.

En conclusión, nuestros resultados validan los fenotipos y (bio)marcadores analizados para supervivencia a PRRSV y respaldan la posibilidad de implementar programas de selección incorporando fenotipos y marcadores genéticos de inmunidad para mejorar la inmunocompetencia de los cerdos.

Artículo adaptado de: Tarres, J. et al. Genetic determination of piglet survival upon PRRSV outbreaks. 2024. doi: 10.21203/rs.3.rs-4503083/v1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bai X, Plastow GS (2022) Breeding for disease resilience: opportunities to manage polymicrobial challenge and improve commercial performance in the pig industry. CABI Agric Biosci 3. <https://doi.org/10.1186/S43170-022-00073-Y>
2. Visscher AH, Janss LL, Niewold TA, de Greef KH (2002) Disease incidence and immunological traits for the selection of healthy pigs. A review. Vet Q 24:29–34. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695121>
3. Ballester M, Ramayo-Caldas Y, González-Rodríguez O, et al (2020) Genetic parameters and associated genomic regions for global immunocompetence and other health-related traits in pigs. Sci Rep 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75417-7>
4. Ballester M, Jové-Juncà T, Pascual A, et al (2023) Genetic architecture of innate and adaptive immune cells in pigs. Front Immunol 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1058346>