

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**SINDROME DE ESTRÉS PORCINO:  
ACTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA A NIVEL NACIONAL Y  
ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN RYR1 EN CERDOS DE RAZA PAMPA  
ROCHA**

**por**

**Valentina Raquel CEDREZ CALERO**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Tecnología de los Alimentos**

**ENSAYO EXPERIMENTAL**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2013**

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Tesis de grado aprobada por:**

**Presidente de la mesa:**

\_\_\_\_\_

**Dra. Cristina López**

**Segundo miembro:**

\_\_\_\_\_

**Dra. Silvia Llambì**

**Tercer miembro:**

\_\_\_\_\_

**Dra. Rosa Gagliardi**

**Cuarto miembro:**

\_\_\_\_\_

**Dr. Gustavo Castro**

**Fecha: 11/10/2013**

**Autor:**

\_\_\_\_\_

**Valentina Raquel Cedrez Calero**

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mis tutores, Dra. Silvia Llambí y Dr. Gustavo Castro, por orientarme en este trabajo, por su esfuerzo y dedicación durante este tiempo.
- A la Lic. María Montenegro, por su paciencia y predisposición permanente e incondicional en aclarar mis ideas.
- A cada uno de los Veterinarios encuestados, por su colaboración y disponibilidad.
- A mis padres, por haberme brindado la oportunidad de estudiar la carrera, por su esfuerzo, dedicación y eterna confianza.
- A todos mis amigos y compañeros de la carrera, por su apoyo constante, compañía y amistad.
- También me gustaría agradecerle a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena en mi profesión.
- A los funcionarios de la Biblioteca, por su amabilidad y ayuda en la búsqueda de información durante estos años de estudio.
- Por ultimo, a Martín, por estar conmigo en este tiempo tan importante para mí.

¡Gracias!

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS.....	8
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Cadena Productiva Porcina del Uruguay.....	13
1.1 Características del sector.....	13
1.2 Cadena cárnica porcina del Uruguay.....	14
2. Síndrome de Estrés Porcino.....	17
2.1 Historia.....	18
2.2 Fisiopatología.....	19
2.3 Características del receptor de ryanodina.....	22
2.4 Diagnóstico.....	24
2.5 Efectos en la calidad de la carne.....	25
2.6 Prevalencia.....	28
3. Conservación de recursos zoogenéticos.....	31
4. Recursos zoogenéticos porcinos locales del Uruguay.....	32
5. Parámetros genéticos.....	35
6. Técnicas de Biología Molecular.....	36
6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	37
6.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	39
6.3 Secuenciación automática del ADN.....	40

HIPÓTESIS.....	42
OBJETIVOS.....	42
1. Objetivo General.....	42
2. Objetivos específicos.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1. Obtención de muestras.....	43
2. Aislamiento del ADN.....	43
2.1 Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre entera.....	43
3. Técnicas de Laboratorio.....	44
3.1 Condiciones básicas de la PCR.....	45
4. Planilla de encuesta.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	47
1. Análisis del gen RYR1.....	47
2. Variantes de la secuencia.....	53
3. Comparación del gen RYR1 de cerdos Pampa Rocha con el gen CRC1 de otras razas porcinas y otra especie(humano).....	54
4. Planilla de encuesta.....	58
4.1 Ayuno.....	59
4.2 Transporte.....	59
4.3 Descarga.....	62
4.4 Ante mortem.....	63
4.5 Insensibilización.....	65
4.6 Post mortem.....	66
4.7 Incidencia de carnes PSE.....	67
5. Buenas Prácticas de manejo antemortem en suinos.....	70
CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXOS.....	88

## LISTA DE TABLAS

### I. Introducción

<b>Tabla 1.</b> Faena de porcinos por establecimiento (Año 2012, en número de cabezas) (INAC, 2012).....	15
<b>Tabla 2.</b> Incidencia del SEP en diferentes razas de cerdos (Bonelli y Schifferli, 2001).....	29

### II. Trabajo Científico

<b>Tabla 3.</b> Frecuencias por razas de los genotipos para el SEP.....	48
<b>Tabla 4.</b> Secuencias elegidas para la comparación del gen RYR1 de Cerdos Pampa Rocha.....	55
<b>Tabla 5.</b> Características de la descarga eléctrica utilizada como método de insensibilización en Plantas de faenas de cerdos del Uruguay.....	65
<b>Tabla 6.</b> Incidencia de carne PSE en la faena anual del año 2012.....	67
<b>Tabla 7.</b> Espacio mínimo de alojamiento para descanso en corral de espera.....	74

## LISTA DE FIGURAS

### I. Introducción

- Figura 1.** Representación esquemática de la actividad del Ca<sup>2+</sup> en la membrana del retículo sarcoplásmico (Karp, G. 1996 Biología Celular y Molecular, Ed. Mc. Graw Hill, E.U).....20
- Figura 2.** Ejemplar de la raza Pampa Rocha (Centro Regional Sur, Progreso, Canelones, Uruguay, FAGRO-Udelar).....33
- Figura 3.** Unidad de Producción de Cerdos, centro de conservación ex-situ del cerdo Pampa Rocha.....33
- Figura 4.** Criadero de cerdos en la zona de los Bañados de Rocha, habitat natural del Cerdo Pampa Rocha .....34

### II. Trabajo Científico

- Figura 5.** Gel de agarosa al 2% teñido con GoodView.....47
- Figura 6.** Alineamiento de una región del fragmento secuenciado para el gen CRC1.....49
- Figura 7.** Patrón visualizado en los electroferogramas para los genotipos NN (individuos normales) y nn (individuos susceptibles al SEP).....50
- Figura 8.** Gráfico que representa todas las secuencias de la base de datos del Genbank que coinciden con la secuencia RYR1 de cerdos raza Pampa Rocha en estudio.....52
- Figura 9.** Listado de algunas de las secuencias que coinciden con la secuencia del gen RYR1 de cerdos raza Pampa Rocha.....53
- Figura 10.** Variantes de la secuencia del gen RYR1 en muestra de cerdos Pampa Rocha.....54
- Figura 11.** Alineamiento de la región del fragmento secuenciado que presenta la mutación del gen RYR1.....57

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS**

**HM.** Hipertermia Maligna

**PSE.** Pálida, blanda y exudativa

**SEP.** Síndrome de Estrés Porcino

**NN.** Individuos normales

**Nn.** Individuos portadores

**nn.** Individuos enfermos

**CRA.** Capacidad de retención de agua

**CRC.** Canal liberador da calcio

**L.** Luminosidad

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se realizó una actualización e investigación del Síndrome de Estrés Porcino (SEP) en Industrias Frigoríficas Porcinas del Uruguay, así como también se profundizó en conocimientos a nivel molecular sobre la región del gen RYR1 donde se encuentra la mutación en cerdos Pampa Rocha.

Con éste objetivo se estudió: 1) La presencia de diferentes factores ante mortem en cerdos faenados en ROU, que puedan contribuir a la incidencia del SEP, así como datos relevantes de su presencia en Industrias Frigoríficas de carne de cerdo, 2) análisis de la secuencia que flanquea la mutación del gen RYR1 con respecto a la secuencia del Genbank, a partir de un banco de ADN de 9 animales de cerdos de raza Pampa Rocha.

Para la investigación del SEP en Industrias Frigoríficas Porcinas del Uruguay, se realizó una planilla de encuesta destinada a Veterinarios de cuatro Industrias Frigoríficas de suinos encargadas de realizar el 91 % de la faena del país, según los datos de INAC de la faena anual del año 2012. En la misma se detalla sobre los datos más relevantes acerca de la problemática del SEP que los afecta. Puntos a destacar: características del transporte (densidad de animales, distancias, duración, tipo de carreteras, manejo de cerdos, condiciones climáticas), diseño de las instalaciones y manejo de cerdos ante mortem (desembarque, tiempo de ayuno, distribución de los animales), métodos de insensibilización utilizados, incidencia de muertes súbitas de cerdos ante-mortem, presencia de carnes PSE, manejo post mortem de carnes PSE, pruebas de laboratorio realizadas en carnes PSE, destino de carnes PSE.

Para el estudio molecular de la secuencia del gen RYR1 se utilizaron 9 muestras de ADN de cerdos de raza Pampa Rocha y 9 muestras de ADN de otras razas de cerdos (2 Landrace, 2 Large White, 2 Pietrain y 3 Híbridos); provenientes del Banco de ADN de cerdos del Laboratorio del Área de Genética de la Facultad de Veterinaria, Udelar. Se realizó la amplificación por técnica de PCR, se evidenció un amplicón de 659pb en gel de agarosa al 2% para luego realizar el genotipado en un centro de secuenciación automática (Macrogen-Corea del Sur). El análisis bioinformática de los datos se realizó en el Bioedit, comparando con las secuencias publicadas en el Genbank y Esembl. Con una de las secuencias de cerdos

de Pampa Rocha (PP10) se realizó un BLAST, para obtener datos sobre secuencias de igual similitud.

Analizando los resultados de las entrevistas con las diferentes investigaciones realizadas sobre los factores ambientales que pueden desencadenar el SEP, podemos decir que existen factores ante mortem en cerdos faenados en Plantas Frigoríficas de nuestro país, que pueden contribuir a su incidencia, considerándose los puntos más relevantes los siguientes: tiempo de transporte, uso frecuente de picana eléctrica, alta presencia de vocalizaciones (50-70%), características de la descarga eléctrica, falta de control de la pérdida de conciencia, presencia de lesiones en la canal.

En cuanto a la incidencia de carnes PSE correspondió de 3-5% en dos de los frigoríficos que realizaron el 79,14% de la faena de cerdos del 2012, y para los otros dos frigoríficos que realizaron el 11,79% de la faena anual del mismo año, la incidencia de carnes PSE fue de un 10%. Podemos concluir que la presencia de carnes PSE afecta la Industria de carne de cerdo con una incidencia aproximada del 4,34% en la faena anual del año 2012. Al igual que el resto del mundo, la raza Pietrain es considerada la de mayor incidencia en nuestro país. Los cortes en los cuales se ha constatado su presencia son: jamón, paleta y el lomo.

Para el análisis del gen RYR1, de los 18 animales estudiados, se obtuvieron frecuencias genotípicas de 77,78% para los homocigotos NN y 22,22% para el genotipo nn, no encontrándose individuos heterocigotos. Se encontró diferencias en 5 de las secuencias analizadas con respecto a los resultados de las mismas muestras realizadas mediante técnicas de PCR-RFLP, por Montenegro (2012). No se identificó la presencia del alelo mutante para el gen RYR1, en cerdos Pampa Rocha. En cuanto a los resultados de la búsqueda BLAST, se obtuvieron 62 secuencias que alinearon con la nuestra, dentro de las mismas se encuentran, la de humano, chimpancé, gorila, perro, gato, ratón, vaca, caballo, cebra, delfín, orca y elefante africano. El gen RYR1 receptor de ryanodina puede considerarse un gen conservado que se encuentra en animales vertebrados.

La secuencia del gen RYR1 en cerdos Pampa Rocha presentó gran homología con las secuencias de otras razas de cerdos presentes en nuestro país (Landrace, Large White, Pietrain e Híbridos).

Se encontraron diferencias en la región cercana a la mutación del gen RYR1 entre la secuencia de cerdos Pampa Rocha y secuencias de humano.

## **SUMMARY**

An updating and investigation of the Porcine Stress Syndrome (PSS) in the Porcine Refrigeration Industries of Uruguay, is presented in this work, apart from having besides deepen in knowledge at molecular level about the gene RYR1 region, where the mutation of Pampa Rocha pigs is found.

With this aim, the following was studied: 1) The presence of different ante mortem factors in pigs slaughtered in ROU, that may contribute in the incidence of (PSS), as well as relevant data of its presence in porcine meat Refrigeration Industries, 2) analysis of the sequence flanking the mutation of the gene RYR1 regarding the sequence of the Genbank, from a DNA bank of 9 animals of Pampa Rocha pigs breed.

For the investigation of PSS in Porcine Refrigeration Industries of Uruguay, a survey form designed to Veterinarians of four swine Refrigeration Industries in charge of performing more than 90% of the slaughter in the country, was done. In it, the most relevant data about the problem of PSS that affects them is detailed. Points to be highlighted: transport characteristics (density of animals, distances, duration, types of roads, management of the pigs, weather conditions), design of the facilities and ante mortem management of the pigs (disembarkation, fasting time, distribution of the animals), desensitization methods used, incidence of sudden death of pigs ante-mortem, presence of PSE meat, laboratories tests performed in PSE meat, PSE meat destiny.

9 samples of the DNA of pigs of Pampa Rocha breed and 9 samples of the DNA of other breeds of pigs (2 Landrace, 2 Large White, 2 Pietrain and 3 Hybrid); from the DNA Bank of pigs from the Laboratory of the Genetic Area at the Veterinary University, Udelar, were used for the molecular study of the gene RYR1 sequence. The PCR amplification technique was implemented, an amplicon of 659pb in agarose gel at 2% was made evident, to perform later the genotyping in a centre of automatic sequence (Macrogen-South Korea). The bioinformatics analysis of the data was done in the BioEdit, comparing with the sequences published in the Genbank and Esembl. With one of the sequences of the Pampa Rocha pigs (PP10) a BLAST was done, to obtain data of sequences of equal similarity.

By analyzing the results of the interviews with the different investigations done about the environmental factors that may trigger the PSS, we could say that there exist ante mortem factors in pigs that are slaughtered in Refrigeration Plants of our country, that may contribute to its incidence, considering the following points as the most relevant ones: transport time, the frequent use of electric prods, high presence of vocalizations (50-70%), characteristics of the electric shock, lack of control of the loss of consciousness, presence of channel injuries.

Regarding the incidence of PSE meat corresponded a 3-5% in two of the Refrigeration Plants that performed the 79,14% of the pigs slaughter of 2012, and for the other two Refrigeration Plants that performed the 11,79% of the annual slaughter during the same year, the incidence of PSE meat was of a 10%. We can conclude by saying that the presence of PSE meat affects the pork Industry with an approximate incidence of 4,34% in the annual slaughter of the year 2012. Like in the rest of the world, the Pietrain breed is considered the one of most incidence in our country. Cuts in which its presence has been found: ham, palette and the backbone.

For the analysis of the RYR1 gene of the 18 animals studied, genotypic presences of 77,78% for the homozygous NN and 22,22% for the genotype nn were obtained, not finding heterocygous individuals. Differences were found in 5 of the sequences analyzed regarding the results of the same samples performed through techniques of PCR-RFLP, by Montenegro (2012). The presence of the mutant allele for the gene RYR1, was not found in Pampa Rocha pigs. Regarding the results of the BLAST search, 62 sequences lining with ours were obtained, among them we have, the human one, chimpanzee, gorilla, dog, cat, mouse, cow, horse, zebra, dolphin, killer whale and African elephant. The RYR1 gene, ryanodine receptor, can be considered a conserved gene, which is found in vertebrate animals.

The RYR1 gene sequence in Pampa Rocha pigs showed great homology with the sequences of other breeds from our country (Landrace, Lague White, Pietrain and Hybrids).

Differences in the region near the mutation of the RYR1 gene were found, between the sequence of the Pampa Rocha pigs and the sequences of the human being.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Cadena Productiva Porcina del Uruguay**

En nuestro país la producción porcina ocupa un lugar secundario en comparación con otros rubros agropecuarios.

La declaración jurada de DICOSE del 2012 registró 4.654 productores y 168.020 cerdos. Casi la mitad de los productores (53,1%) se ubican en los departamentos de Canelones, Colonia, Rocha, San José y Soriano. Solamente para un 1% de los productores, los cerdos son el rubro primario o único, para el resto es un rubro complementario a la ganadería, lechería, agricultura, horticultura y avicultura. Sin embargo, la cría porcina tiene una importancia social para el sustento de familias de medianos y pequeños productores. Existe un considerable grado de informalidad en el sector, que se demuestra por la diferencia del número de productores y existencias entre estadísticas oficiales (DICOSE y Censos Generales Agropecuarios) y cuya arista más visible es la crianza de subsistencia (o traspatio) en el medio rural y en las zonas periféricas de los centros poblados.

Según la Encuesta Porcina de DIEA e INIA (2006), un 34% de los cerdos declarados en Uruguay, son híbridos de empresas comercializadoras de genética porcina, 29% cruza definidas, 28% cruza indefinidas y 9% razas puras. Dentro de éstas últimas, 37% corresponde a la raza Large White, 35% a Landrace, 25% a Duroc y 3% a otras razas (Pietrain, Landrace Belga, Spotted, entre otros).

#### **1.1 Características del sector**

La carne de cerdo es la carne más producida en el mundo, alcanzando a 110 millones de toneladas en 2010-2011, un 38% del total. Le siguen la carne de ave con 100 millones de toneladas (24%), la carne vacuna con 67 millones de toneladas (23%) y la carne ovina con 14 millones de toneladas (5%). Las 110 toneladas de carne de cerdo producidas anualmente se reparten en un 62% en los países en desarrollo y 38% en los países desarrollados (Errea et al.,

2013). Es importante destacar la presencia relevante de algunos actores regionales, en especial Brasil que abarca el 3% de la producción global y Chile el 0,5%.

En Uruguay la estructura de consumo de carnes es muy diferente a la del resto del mundo. En nuestro país la carne vacuna es la más consumida (65%) y la carne de cerdo ocupa el tercer lugar con una participación del 10%.

Sin embargo, según los datos del INAC, el consumo de carne de cerdo por persona ha aumentando en los últimos años, alcanzando un valor de 14 kg/persona/año en 2012.

La materia prima con que se abastece la industria de carne porcina es mayormente de origen extranjero (61%), proveniente principalmente de Brasil y Chile, mientras que la producción nacional representa el 39% de la materia prima utilizada por las industrias (DGSG e INAC, 2012).

Uruguay no presenta ningún tipo de restricción sanitaria para la comercialización de animales reproductores en pie, carne y subproductos de cerdos.

Por el lado de las exportaciones, éstas son muy escasas tanto en lo que se refiere a carne porcina como productos elaborados, lo que refleja que la producción industrial tiene como destino el mercado interno. Las exportaciones del año 2012 correspondieron a una cantidad total de 20 toneladas (carne de cerdo, grasas y otros productos), con destino a Vietnam (53%) y Rusia (47%) (DIEA, 2012).

El comercio uruguayo de carne de cerdo es básicamente interno y se comercializa principalmente en carnicerías y supermercados. Según los datos del INAC del 2011, la forma de consumo de carne de cerdo es mayormente a través de chacinados (76,8%), mientras que el consumo de carne fresca representa el resto (23,2%) (DICOSE, 2012).

## **1.2 Cadena cárnica porcina de Uruguay**

La estructura de la cadena porcina está compuesta por cuatro eslabones: Producción primaria, Intermediación, Industrialización y Comercialización.

En la producción primaria se encuentran las actividades de reproducción, cría y engorde. Se concentra mayormente en pequeños productores (88,67%), mientras que los productores

medianos y grandes tienen una participación del 10,49% y 0,84% respectivamente, según declaraciones de DICOSE del 2012.

La intermediación esta compuesta por comisionistas, intermediarios y ferias. Siendo las ferias el canal más utilizado por los pequeños productores especializados en la cría para la posterior venta de sus lechones.

La industrialización está compuesta por frigoríficos que se dedican exclusivamente a la faena, empresas que además de la faena elaboran productos chacinados, empresas que únicamente se dedican a la producción de chacinados -ya sea con carne importada o nacional- y por último empresas que venden carne porcina en fresco.

En cuanto a las empresas dedicadas a la faena, en el 2012 las 10 empresas habilitadas registraron faena por un total de 195.132 cabezas, superando el valor del año anterior (INAC, 2012) (tabla 1).

Dos establecimientos (MIRNABEL y ARDISTAR) concentraron en el 2012 el 84% de la faena de cerdos gordos y el 74% de la faena en total. Si se agrega RODANTEL se alcanza el 86% de la faena total en tres establecimientos (Errea et al., 2013).

**Tabla 1:** Faena de porcinos por establecimiento (Año 2012, en número de cabezas).

<b>ESTABLECIMIENTO</b>	<b>CERDOS</b>	<b>LECHONES</b>	<b>TOTAL</b>
MIRNABEL S.A	76.730	5.213	81.943
ARDISTAR S.A	69.094	3.404	72.498
RONDATEL S.A	10.274	3.322	13.596
ARROYAL S.A	5.178	7.570	12.748
SIDERCOL S.A	9.148	260	9.408
MATADERO LOS OLIVOS SOC.COL.	2.872	454	3.326
LA TABLADA SRL	220	618	838
LUCHASOL S.A	172	219	391
INTENDENCIA MPAL. DE ARTIGAS	220	56	276
MATADERO MERCEDES LTDA.	31	77	108
<b>TOTAL</b>	<b>173.939</b>	<b>21.193</b>	<b>195.132</b>

Fuente: INAC.

Cuatro de las plantas señaladas tienen a su vez actividad industrial de chacinería. Estas son MIRNABEL, ARDISTAR, LOS OLIVOS y MATADERO MERCEDES.

A su vez, en todos los frigoríficos además de la faena de producción propia se faenan para terceros.

La industria que procesa y elabora productos porcinos presenta una conformación relativamente heterogénea. Existen 37 establecimientos habilitados por el MGAP para realizar el procesamiento y elaboración de productos porcinos. Existen empresas que trabajan exclusivamente con productos importados junto a quienes lo hacen exclusivamente con materia prima nacional, o que se abastecen de ambos orígenes. Estas últimas son las predominantes (Errea et al., 2013).

Un trabajo elaborado por INIA en el año 2007, en el que se encuestaron 25 empresas del sector, se destaca que 9 de las mismas (37%) se abastecían solo con materia prima nacional, de las cuales 8 (casi el 90%) se abastecían exclusivamente con cerdos en pie y la restante también con medias reses y cortes nacionales. En términos de volumen, esa forma de abastecimiento que excluía la importación representaba sólo el 17% del total procesado por el universo encuestado (Echenique & Capra, 2007).

Las importaciones constituyen un porcentaje muy importante de la oferta de productos cárnicos porcinos, del orden del 61% y continúan creciendo. La carne de cerdo representa entre el 75 y 80% del total importado, y la grasa es el otro producto que le sigue en importancia en el comercio importador.

En cuanto al origen de las importaciones, Brasil es casi excluyente en las correspondientes al rubro carne, concentrando en 2012 el 86% de los volúmenes ingresados del exterior y el 89% total importado. Lo siguieron en orden de importancia Chile, USA y España (DICOSE, 2012). Casi la totalidad de la producción nacional se destina al mercado interno, resultando muy poco significativas las exportaciones.

El aumento del consumo ha sido el fenómeno más importante de los últimos 2 a 3 años, se estima que llegará este año a 14kg/hab./año (Errea et al., 2013).

En cuanto a la comercialización, en nuestro país se realiza a través de distintos canales, tales como carnicerías y supermercados, aunque de menor medida, también se encuentra la venta directa de carne en fresco y de productos chacinados.

## 2. Síndrome de Estrés Porcino

En los últimos treinta y cinco años el objetivo del mejoramiento ha sido la selección de cerdos magros. A partir de la década de los años sesenta este proceso se asoció en las razas Landrace Belga y Pietrain, inicialmente en Bélgica y Alemania, aumentando la aparición de desorden neuromuscular, alta mortalidad, canales con carne PSE por el síndrome de estrés porcino (SEP) o hipertermia maligna (HM) (Calvo et al., 1997). El aumento de la incidencia de este síndrome se observó relacionado a situaciones de ejercicio, destete, coito. Los resultados de selección implicaban un aumento de animales portadores de la enfermedad SEP, que transmitían a la descendencia el carácter.

Actualmente se reconoce que el Síndrome de la carne PSE, SEP y Síndrome de HM comparten el mismo defecto genético, determinado por un modelo de herencia mendeliana simple. La enfermedad está controlada por el alelo recesivo de un gen de efecto mayor llamado gen receptor de la ryanodina, RYR1 o CRC1 (Fujii et al., 1991), anteriormente denominado gen de Halotano, constituido por 15.105 nucleótidos, que determina dos variantes alélicas asociadas al SEP. El alelo normal es dominante sobre el alelo mutado identificándose al genotipo homocigoto dominante con la nomenclatura NN (individuos normales), al genotipo heterocigoto Nn (portadores de la mutación) y al genotipo homocigoto recesivo nn (individuos susceptibles al SEP) (Bonelli & Schifferli, 2001).

El gen hace parte de un trío de proteínas que forman parte de un canal liberador de calcio (CRC) y se expresa en el músculo esquelético y en las células cerebrales de Purkinje (Harrison, 1981).

La canal de los animales homocigotos recesivos manifiesta una disminución rápida e importante del pH post mortem como consecuencia del incremento del metabolismo causado por el estrés (transporte, faena, cópula, calor excesivo, etc.) (Pommier et al., 1998).

Por otro lado se ha visto la ventaja del efecto del gen sobre la producción y diversos autores encuentran que los animales Nn presentan una mejor conversión y ganancia diaria de peso frente a los NN (Puentes Martínez & Pérez Ede, 2007).

Podemos definir al Síndrome de estrés porcino, como una enfermedad genética que afecta a cerdos de crecimiento rápido, manifestándose con muerte súbita durante las acciones de manejo o al sacrificio, cómo carnes PSE.

Al reunir la susceptibilidad del estrés porcino a las condiciones ambientales desfavorables (calor húmedo, por ejemplo), a las instalaciones deficientes en su diseño y a la falta de conocimiento en el manejo de cerdos, se genera uno de los problemas más costosos para la industria porcícola mundial, la carne PSE (Velazco, 2000).

Por lo tanto, el manejo de los cerdos antes del sacrificio y la constitución genética, representan las determinantes de mayor importancia para la presentación de carnes PSE.

Estudios realizados por diferentes autores sobre el control de la enfermedad, se basan en la reducción del estrés impuesto sobre los cerdos, manejo apropiado de animales y selección en contra del alelo mutado, siendo los principales puntos a considerar: manejo de los cerdos durante la carga; densidad de animales, temperatura y ventilación durante el transporte, sistema de conducción del transporte; características de rampa de carga y descarga de los animales; así como también la alimentación y consumo de agua antes y durante el transporte. Todos estos factores tienen una considerable influencia positiva desde el punto de vista de reducir las pérdidas económicas como a la hora de aumentar el bienestar de los animales. Por otro lado, estudios indican que el control del SEP mediante la selección genética (eliminando animales homocigotos recesivos y heterocigotos) puede llegar a disminuir en un 65% la prevalencia de la enfermedad.

## **2.1 Historia**

La Hipertermia Maligna fue descrita por primera vez en humanos y se asociaba a una miopatía que se desarrollaba por la administración de ciertos fármacos anestésicos.

La primera descripción data de 1960 cuando se produjeron varias muertes anestésicas en una familia y es Gordon quien la denomina como síndrome de “Hipertermia maligna” (H.M) (King & Denborough, 1973).

La naturaleza hereditaria de la H.M no fue descrita sino hasta fines de los años cincuenta y no fueron reportadas hasta 1960 por Demborough y Lovell en Australia quienes describieron

el caso de un hombre de 21 años con una fractura abierta de pierna derecha. El paciente se mostraba más ansioso por la anestesia que por la cirugía, y refería la muerte de 10 familiares relacionados con la anestesia desde 1922. Durante la anestesia con halotano presentó fiebre, taquicardia, cianosis y diaforesis. Estudios posteriores de Demborough mostraron un mecanismo de transmisión autosómico dominante en esta familia.

Como modelo animal para el estudio de la HM, se encontró que ciertas razas de cerdos, con alto rendimiento en carne (Landrace, Pietrain, Poland China, Yorkshires) presentaban degeneración muscular dejándolos inservibles para hacer salchichas, demostrando una alteración genética que resultaba en un metabolismo acelerado y deterioro muscular de los cerdos susceptibles, produciendo la llamada carne PSE (Denborough et al., 1962).

La posibilidad de que crías de cerdos de ciertas razas puedan servir como modelo animal experimental para la HM del hombre fue sugerida por primera vez por Hall et al. y por Harrison et al., quienes observaron el rigor muscular asociado a una hipertermia fulminante en estos cerdos anestesiados. El informe de Hall hacía referencia a la reacción como respuesta a la administración de succinilcolina (precedida de halotano), mientras que Harrison informó de la misma reacción con el uso exclusivo de halotano (Harrison, 1981).

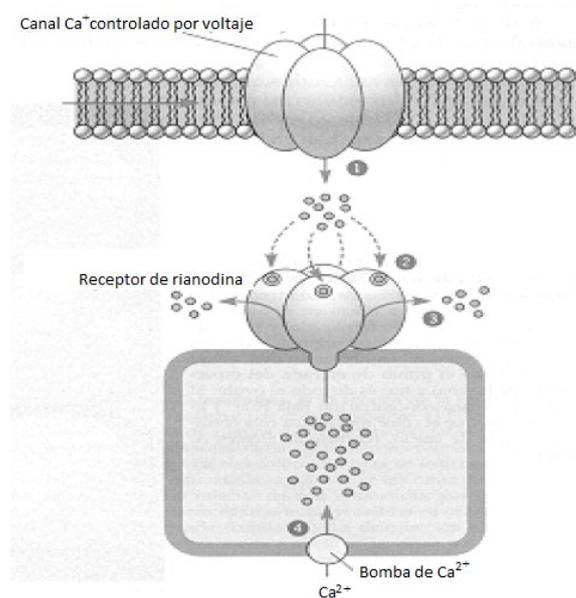
Desde entonces se han comunicado síndromes similares en otras especies (perro, gato, caballo, vaca, jirafa) pero son muy raras. Ambos, los humanos y los cerdos susceptibles responden a ciertas drogas anestésicas con un sorprendente aumento en el metabolismo aerobio y anaerobio, resultando en una intensa producción de calor, dióxido de carbono y lactato.

Estudios posteriores revelaron que el Síndrome de Stress porcino corresponde a la hipertermia maligna en humanos y puede ser desencadenada por drogas anestésicas; esto ha contribuido al progreso de la investigación en esta entidad (Miller, 1999).

## **2.2 Fisiopatología**

Normalmente la señal para realizar la contracción muscular llega mediante el nervio conector y es detectado por la superficie de la membrana plasmática, el estímulo es canalizado hacia el centro de la fibra muscular por el túbulo transverso, el cual se invagina hacia el interior de la superficie de la membrana plasmática. La membrana del túbulo transmite una señal hacia la

membrana del retículo sarcoplásmico resultando en una liberación de calcio hacia el sarcoplasma. El  $\text{Ca}^{2+}$  interactúa con las proteínas contráctiles para provocar la contracción del músculo (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana del retículo sarcoplásmico: **1)** Cambios en el voltaje de la membrana provocan la apertura de los canales permitiendo el ingreso del  $\text{Ca}^{2+}$ ; **2)** Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  se unen al receptor de rianodina; **3)** Se provoca así la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado; **4)** Concomitantemente los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se liberan al citoplasma por acción de una bomba localizada en la membrana.

**Fuente:** Karp, G. (1996) Biología Celular y Molecular, Ed. Mc. Graw Hill, E.U.

La concentración requerida de  $\text{Ca}^{2+}$  es de  $10^{-7}$  M, la relajación del músculo se promueve mediante la acción de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo disminuyendo la concentración a  $10^{-5}$  M (Martinossi, 1984).

Cuando los cerdos son sometidos a situaciones de estrés utilizan el glucógeno muscular como fuente primaria de energía disponible. Los cerdos sometidos a estímulos estresantes generan una respuesta excesiva de los receptores beta adrenérgicos de la epinefrina como resultado se produce una rápida glucólisis, síntesis de ATP y excesiva formación de lactatos. Esta actividad metabólica se asocia con un aumento súbito de la temperatura muscular a  $42.5^{\circ}$  C.

En el caso de cerdos susceptibles existe una hipersensibilidad del canal de calcio el cual permanece abierto y no permite el descenso de la concentración de calcio. Esta concentración provoca rigidez muscular además de promover una glicólisis aeróbica y anaeróbica provocando el incremento de lactatos musculares, los cuales a su vez promueven la liberación de catecolaminas produciendo más ácido láctico, conduciendo así a una acidosis metabólica (O'Brien et al., 1990).

Debido a que el calcio es el principal regulador de la concentración y el metabolismo muscular, se piensa que el efecto primario reside en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo esto evidente durante la relajación. En el proceso de contracción muscular participa la llamada bomba de calcio la cual depende de una ATPasa localizada en la membrana del retículo sarcoplásmico que facilita el transporte de calcio desde la troponina C al interior del retículo sarcoplásmico. El calcio captado se acumula en cisternas terminales y se fija a moléculas de calsecuestrina. Esta fijación permite al retículo sarcoplásmico alcanzar concentraciones 10,000 veces superiores al citoplasma. En el sarcolema está presente otra ATPasa calcio-dependiente que es regulada por la calmodulina, además existe un intercambiador de Na-Ca que favorecen la salida de calcio de las células (Mitchell & Heffron, 1982).

La acción de los mecanismos antes señalados reduce la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma a un valor aproximado de  $1 \times 10^{-5}$  M disminuyendo el  $\text{Ca}^{+2}$  unido a la troponina para inhibir la formación de enlaces cruzados y los filamentos delgados quedan libres de la interacción con los gruesos, provocando la relajación al restablecerse la posición de los filamentos. En el tejido muscular se ha reportado repetitivamente el papel del calcio extracelular como inductor de la liberación de calcio desde almacenes intracelulares (Martinossi, 1984).

El músculo esquelético de los vertebrados, el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{+2}$ , que depende del voltaje conduciendo a la contracción, comúnmente referido como acople excitación-contracción, se lleva a cabo con la apertura de dos tipos de canales: canales de calcio dependientes del voltaje de los túbulos transversos, también conocidos como receptores de dihidropiridina (DHP-R) por su afinidad a esta sustancia; y canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, llamados también receptores para la ryanodina (RYR1) debido a que la fijación de este alcaloide induce la apertura del canal. La despolarización del sarcolema estimula los receptores DHP-R y posiblemente por una interacción física los receptores RYR1 son activados, provocando la liberación de calcio intracelular. Cuando la onda de

despolarización del potencial de acción alcanza los túbulos T, se abren los receptores DHP-R permitiendo la entrada de calcio hacia el sarcoplasma y generando la interacción con receptores RYR1 que producen la liberación de calcio desde las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico. La disponibilidad de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular permite entonces la fijación de éste ión a la fracción C de la troponina y desencadena la contracción muscular.

### **2.3 Características del receptor de ryanodina**

En los músculos esqueléticos de pollos, rana y peces se expresan dos isoformas (alfa y beta) de canales de calcio o receptor de ryanodina (RYR1) del retículo sarcoplásmico, mientras que en los mamíferos solo se encuentra una (alfa). Sin embargo en el conejo se ha encontrado RNAm para las dos isoformas de RYR1. Se ha descrito una tercera isoforma en el músculo esquelético de vertebrados no mamíferos. En el músculo esquelético de mamífero, el receptor RYR1 es un homotetrámero con subunidades de 5037 aminoácidos que presenta dos sitios de enlace para la ryanodina, uno de alta y otro de baja afinidad, que al parecer está localizado entre el aminoácido 4475(arginina) y el grupo carboxilo terminal. La fijación de ryanodina y la liberación de calcio inducida por ella, puede ser modificada por factores tales como osmolaridad y resultan mayores cuando se aplica la cafeína. El dantrolene y el rojo rutenio, considerados clásicamente como inhibidores de la liberación de calcio se fijan a los receptores RYR1 y bloquean el enlace de la ryanodina (Otsu et al., 1991).

Algunos aniones como el perclorato, tiocinato, yoduro y nitrato potencian la contracción muscular al estimular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico. Se ha planteado que durante el ejercicio la acumulación en el músculo de otro anión, el fosfato, podría actuar como un regulador endógeno de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  ya que experimentalmente ha demostrado que incrementa la afinidad por el receptor de ryanodina y aumenta la actividad del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Fruen, 1994).

En los músculos de contracción rápida se ha encontrado una mayor densidad de receptores de ryanodina que en los músculos de contracción lenta; y aunque ambos receptores muestran las mismas propiedades, la modulación de la calsecuestrina parece ser distinta. Se han señalado variaciones en el número de receptores para ryanodina asociadas a la edad del animal, que podrían explicar la mayor dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en algunas etapas de desarrollo y

las diferencias en el mecanismo de acople excitación-contracción entre animales inmaduros y adultos (Damiáni & Margreth, 1994).

También se han reportado variaciones en el número de RYR1 en diferentes estados patológicos: disminución en el caso de la diabetes e isquemia experimental del miocardio; y aumento en la cardiomiopatía del hamster (Zucch, 1995).

El gen receptor a la ryanodina (RYR1), que codifica para un transportador muscular de  $Ca^{++}$ , ha sido implicado como candidato para la predisposición a la HM (Fujii et al., 1991). Los DNA complementarios (DNAC) al RNA mensajero del gen RYR1 del conejo y el humano han sido clonados y secuenciados. En el humano tiene un tamaño de 16 Kb, y codifican para una proteína con 5032 aminoácidos y 546 KDa (Otsu et al., 1991). La proteína RYR1 forma una estructura tetramérica que actúa tanto como un canal liberador de  $Ca^{++}$ , como un puente que conecta al retículo sarcoplásmico y el túbulo transversal (Brening & Brem, 1992).

El gen de la susceptibilidad al halotano en el cerdo se localiza en la región cromosómica 6q12q22, mientras que en el hombre en la 19q13.1 (MacLennan et al., 1990).

Al comparar la secuencia del ADN complementaria del gen de RYR1 en cerdos normales y susceptibles a HM, se encontró que existe una mutación en el nucleótido 1843 del gen, la cual cambia una citosina por una timina en los individuos susceptibles (Fujii et al., 1991).

Esta mutación, conduce a su vez a un cambio del aminoácido arginina por cisteína en la posición 615 de la proteína. La presencia de este receptor se ha correlacionado perfectamente con los animales susceptibles al halotano (Webb & Jordan, 1978). En estudios familiares, la mutación ha mostrado segregarse genéticamente con la susceptibilidad al halotano. Esta mutación ha sido captada en todas las razas de cerdo que se han estudiado, también está asociada con un haplotipo polimórfico de enzimas de restricción, permitiendo su análisis mediante técnicas de biología molecular (PCR-RFLP), lo que sugiere un origen común de la mutación, un efecto fundador y una reducida diversidad genética del cerdo en las poblaciones comerciales estudiadas (Hanset et al., 1983).

Estos estudios demuestran que la sustitución de citosina por timina en la posición 1843 (C-T 1843) en el gen RYR1 es la mutación responsable de la Hipertermia Maligna Porcina.

Este hallazgo proporciona la posibilidad de un método de diagnóstico directo a nivel del ADN, rápido, preciso, confiable, no invasivo y económico, capaz de implementarse y que permite identificar no sólo a los individuos susceptibles, sino también a los portadores (Houde et al., 1993).

## 2.4 Diagnóstico

La metodología primaria que se había utilizado para el diagnóstico de SEP, fue la prueba de halotano, la cual, tiene la capacidad de detectar más del 90% de cerdos homocigotos (nn) y menos del 10% de heterocigotos (Nn). Se sabe que en esta prueba el porcentaje de error puede llegar hasta el 15 %; tiene la ventaja de ser sencilla y rápida, de bajo costo y utilizada en campo; si esta se apoya con el uso de succinilcolina o asociada a pruebas de laboratorio, incrementa las posibilidades de detectar animales heterocigotos (Weeb & Jordan, 1978). Esta prueba consiste en desafiar cerdos de 7 a 11 semanas de edad, con una mezcla de halotano y O<sub>2</sub> del 3% al 6% durante un periodo de 3-5 minutos o hasta que la rigidez muscular se haga aparente. La función del O<sub>2</sub> es actuar como vehículo del halotano, los cerdos nn son reactores al halotano.

La identificación de individuos susceptibles al SEP puede lograrse por métodos farmacológicos o genéticos. Un método farmacológico consiste en medir *in vitro* la susceptibilidad del músculo al halotano o a la cafeína (Mitchen & Heffron, 1982).

Estos métodos son sumamente laboriosos, no muy confiables, y además no pueden detectar a los portadores heterocigotos. La detección de individuos portadores de esta enfermedad se basa en cruzamientos de prueba, apareando a los sementales en estudio con cerdas que han sido reconocidas como susceptibles al halotano y después con pruebas de exposición al halotano en la progenie (Gahane & Juneja, 1985).

Actualmente es posible detectar portadores utilizando marcadores moleculares de ADN, con técnicas como PCR-RFLP y por lo tanto permitir diseñar programas para eliminar o controlar al gen RYR1. Puede ser aplicada a cualquier edad o sexo y solo requiere de una muestra de sangre o de semen para extraer el ADN (O'Brien et al., 1993). El diagnóstico molecular se efectúa a partir del ADN, el cual en forma más práctica se obtiene de sangre, solo se requiere pocos microlitros para obtener suficiente material. Para detectar la presencia de la mutación T>C 1843 en el gen del receptor de ryanodina, primeramente se amplifica la secuencia nucleotídica que contiene esta mutación. Esto se logra por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (O'Brien et al., 1993).

Una vez que el segmento ha sido amplificado la presencia de la mutación puede ser identificada de varias formas. La más usada consiste en el empleo de enzimas de restricción (Bren & Brening, 1993).

Puesto que la mutación consiste en un cambio en la secuencia de nucleótidos, se observa que aparece un nuevo sitio de corte para la endonucleasa de restricción *Hhal*. Cuando el producto de la PCR se somete a digestión con esta enzima, se producen fragmentos de tamaños característicos, que permite distinguir la presencia de la mutación tanto en forma homocigota como heterocigota.

Como antecedente también se pueden emplear oligonucleótidos específicos marcados radiactivamente. En este caso los productos de la PCR son desnaturalizados y aplicados a un filtro, el cual es hibridado, de manera independientemente con dos oligonucleótidos específicos, los cuales han sido marcados radiactivamente. Unos de estos oligonucleótidos tienen la secuencia del alelo silvestre, mientras que el otro la del alelo mutante. Después de la hibridación, las membranas se levantan en condiciones que solo el oligonucleótido que posee la secuencia exacta del producto amplificado queda unido al filtro. Si la secuencia amplificada es homocigoto, solo uno de los oligonucleótidos se unen a la muestra del ADN, si el individuo es heterocigoto, ambos oligonucleótidos se unen (Houde et al., 1993).

Estas formas de diagnóstico se han examinado en individuos que previamente han sido identificados como susceptibles, portadores o normales, utilizando la prueba de exposición al halotano y pruebas en la progenie. Los ensayos moleculares a nivel de ADN han mostrado ser >99% específicos.

Actualmente, las técnicas de secuenciación automática permiten a través de un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas, determinar el orden de los nucleótidos en el ADN. De esta manera podemos determinar con exactitud una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base en una determinada secuencia del genoma.

## **2.5 Efectos en la calidad de la carne**

Unos de los grandes problemas que enfrentan los Médicos Veterinarios dedicados a trabajar en Industrias Frigoríficas porcinas representa la calidad de la carne. Para definir el término calidad de carne porcina debemos considerar la etapa de la cadena agroindustrial (producción,

industrialización, comercialización, etc.) que se considere. Es así que se puede hablar de una calidad higiénica, una calidad tecnológica, una calidad sensorial, una calidad nutricional y hasta una calidad de presentación de productos, ya que nuevas presentaciones de los cortes tradicionales pueden modificar en el consumidor la intención de compra.

La calidad tecnológica de la carne está determinada por los cambios bioquímicos que acontecen en el músculo tras el sacrificio de los animales. Dependiendo de éstos cambios, se podrá estar ante carnes normales, aptas para la obtención de productos de calidad o ante carnes problemáticas: pálidas, blandas y exudativas (PSE, por las siglas en inglés de Pale, Soft and Exudative) u oscuras, firmes y secas (DFD, por las siglas en inglés de Dark, Firm and Dry).

En la especie porcina, la calidad de la carne está muy influenciada por los factores genéticos y las condiciones del sacrificio de los animales. El material genético disponible ha mejorado considerablemente desde el punto de vista productivo. Las líneas utilizadas mediante cruzamientos ofrecen animales más grandes, menos engrasados, con mejor índice de conversión, con más lechones por camada y menor intervalo de partos. A pesar de esto, diferencias cualitativas entre líneas o razas (capacidad de retención de agua de la carne y grasa) son muy evidentes.

En lo concerniente a la relación existente entre el pH y la calidad de la carne, uno de los cambios más importantes en la conversión de músculo a carne es su acidificación, en este proceso el pH normalmente baja de 7,2 a 5,5 luego del sacrificio, siendo las propiedades estructurales de la carne las que dependen del pH (Warriss, 1995).

Tanto la carne PSE, como la carne DFD, causan variaciones en las tasas de declinación del pH postmortem.

Las carnes DFD aparecen en cerdos que en el momento del sacrificio, debido a fatiga y factores de estrés medioambientales, presentan bajos niveles de glucógeno muscular y alta actividad enzimática de los citocromos. La consecuencia es que el pH final (próximo a 6,2) queda por encima de lo normal. Este pH, alejado del punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares, favorece la cantidad de agua retenida físicamente entre éstas y hace que la carne luzca firme, sin exudar agua y oscura, dado que la dispersión interna de la luz es menor.

Por otra parte, las carnes PSE, presentan una muy rápida caída del pH, alcanzándose el pH final (5,5-5,7) en los primeros 45 minutos tras la faena, cuando la res se mantiene todavía

caliente. Esto provoca la desnaturalización de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas solubles y como resultado las carnes tienen una menor capacidad de retención de agua, lo que provoca pérdidas por goteo, falta de consistencia y un incremento de la cantidad de luz (palidez) (Echenique & Capra, 2013).

Mediante el uso del pHmetro (o potenciómetro) a los 45 minutos postmortem se puede determinar la presencia de la condición PSE y DFD (Velazco, 2001a).

Varios autores afirman que un pH<sub>45</sub> menor o igual a 5,8 indica la presencia de la condición PSE y un pH<sub>45</sub> mayor o igual a 6,3 determina la presencia de la condición DFD.

La carne PSE, no solo presenta condiciones anormales desde el punto de vista visual, sino que su funcionalidad proteica y sus características de palatabilidad son bastante afectadas (Velazco, 2000). Los productos hechos con carnes PSE tienen una disminución de rendimientos debido al incremento de pérdidas por goteo y a la pobre habilidad para ligar (disminución de la capacidad de retención de agua o CRA) (Alvarado, 2002). La CRA se define como la capacidad que tiene la carne para retener el agua libre durante la aplicación, tales como el corte, la trituración y el prensado. La CRA es particularmente importante en productos picados o molidos, en los cuales se ha perdido la integridad de la fibra muscular y, por lo tanto, no existe una retención física del agua libre. En los productos procesados es importante tener una proporción adecuada de proteína/agua, tanto para fines de aceptación organoléptica como para obtener un rendimiento suficiente en el peso del producto terminado. Por lo tanto, es de notar que la carne PSE es indeseable ya que afecta su calidad como consecuencia de la desnaturalización de la proteína muscular debido a un bajo pH y alta temperatura en los canales (Pond et al., 1991), además la baja capacidad de retención de agua reduce su vida útil y por lo tanto da como resultado un menor precio en el mercado.

La condición PSE es considerada el factor más importante que afecta la calidad de la carne de cerdo, el cual se presenta más comúnmente en el lomo y los jamones que representan cerca de una tercera parte de la musculatura total del cerdo. Estos cortes son utilizados en la industria procesadora de carne de cerdo para elaboración de jamón cocido.

Estudios realizados por diversos investigadores indican que las características que más afectan la calidad del jamón cocido elaborados con carne PSE, son el pH, capacidad de retención de agua y luminosidad.

La disminución del ph en el producto terminado se debe a que la carne representa una estructura muscular muy dañada debido a la condición PSE, requiere de una mayor cantidad de aditivos que aquella carne sin un daño estructural tan marcado, sin embargo es muy difícil que se recupere completamente aun bajo estas condiciones (Honkavara, 1990).

A medida que disminuye el ph de la materia prima cárnica, los valores de capacidad de retención de agua en el producto terminado también disminuye, siendo difícil que el jamón cocido cumpla con los requerimientos del estándar (Huang et al, 1997).

Diferentes autores han informado que a medida que disminuye el ph de la carne se incrementa su Luminosidad (L). Este comportamiento se explica con el hecho que a medida que aumenta el ph de la carne, se incrementa también CRA y en consecuencia, disminuye el valor de L y aumenta el color.

Por lo tanto, existe una relación directa entre la calidad de la materia prima cárnica y la calidad del jamón cocido, por lo que se recomienda la aplicación de medidas de calidad objetivas durante la recepción de materia prima, especialmente de pH y L, ya que son las variables más sensibles y difíciles de controlar con el proceso, esto con el fin de garantizar productos de calidad estándar (García, 2000).

## **2.6 Prevalencia**

El SEP ocurre en todo el mundo, pero existe una considerable variación en cuanto a la frecuencia en las razas (tabla 2) y regiones.

**Tabla 2:** Incidencia del SEP en diferentes razas de cerdos

Raza	Incidencia (%)
Pietrain	97
Poland China	80
Landrace	37
Large White	22
Duroc	22
Hampshire	22
Yorkshire	17

**Fuente:** Bonelli y Schifferli, 2001.

Así mismo se considera que existe una incidencia de 0.7% a 1.6 % de muertes durante el transporte de cerdos procedentes de granjas con alta incidencia de Síndrome de Estrés Porcino.

Las pérdidas por carne PSE varían en cada país, en el Reino Unido ascendían aproximadamente a 1.500 toneladas de carne (Armstrong, 1993). En España se demostró que de 1331 cerdos evaluados respecto a la presencia del gen halotano el 6,2% fueron nn, 51,7% Nn y 42,1% NN (Gispert et al., 2000). En Canadá se reporta una frecuencia de 12,3% de cerdos heterocigotos.

En la industria de la carne, se han reportado incidencias de un 16% de carnes PSE en Estados Unidos (Cassens, 1999) y un 25% de jamones PSE en España (Benlloch, 1999).

En algunos países de Europa la prevalencia de este síndrome ha aumentado durante los últimos años. Hoy constituye un problema importante en la producción porcina. Tal hecho ha dependido de la selección negligente o descuidada respecto a éste síndrome en los programas de selección basadas puramente en características de rendimiento y producción.

La enfermedad probablemente ocurra en todas las razas porcinas, pero es más frecuente en las seleccionadas por una fuerte musculatura, con escasa grasa dorsal y más carne. Es sobre todo frecuente en las razas Pietrain, Poland China y Landrace, para las cuales, se ha incluido en el índice de selección, un sistema de puntos en cuanto a la musculatura, ritmo de crecimiento, conversión de alimento y espesor de grasa dorsal.

Respecto al conocimiento del SEP en nuestro país en el año 2009 se realizó el “Primer diagnóstico molecular del Síndrome de Estrés Porcino en Uruguay” (mediante la técnica PCR-RFLP) (Montenegro et al., 2009).

Montenegro et al., (2010) investigan acerca de la frecuencia alélica del SEP en diferentes razas (14 muestras de cerdos criollos Pampa Rocha, 28 de Híbridos comerciales, 14 de Landrace, 5 de Large White y 3 de Duroc) encontrando un 40,62% de animales con genotipo heterocigoto (portadores de la mutación), de los cuales un 26,56% correspondieron a muestras de Híbridos, 12,50% de Landrace y 1,56% de Large White. Mientras que la presencia de animales con el genotipo homocigoto recesivo (afectados) correspondió a un 10,93%, de los cuales un 7,81% correspondieron a muestras de cerdos Landrace y 3,12% de Híbridos. La presencia del alelo mutante fue mayor en las razas Landrace, Large White e Híbridos, en un número total de animales estudiados (n=64). Para la raza de cerdos Pampa Rocha el 100% de los animales presentaron genotipo NN, no encontrándose la mutación en los cerdos Pampa Rocha.

Recientemente Montenegro (2012) encuentra la presencia de animales de la raza Pampa Rocha portadores del SEP, mediante la técnica PCR-RFLP. Además se encontró en la totalidad de los animales estudiados (n=80), el 38,75 % genotipo NN, 52,5% genotipo Nn y 8,75% nn. De acuerdo a la distribución de las razas para cada genotipo, la mayor presencia del alelo mutante n causante del SEP ocurre en las razas Pietrain, Landrace e híbridos.

Respecto a investigaciones realizadas en nuestro país en cuanto a la incidencia del Síndrome de Estrés Porcino y presencia de carnes PSE en Plantas Frigoríficas de faena de cerdos, estas son muy escasas. Hasta el momento, el único estudio fue realizado por INIA en el año 2006, donde se realizó el “Diagnostico de la situación de la carne porcina para consumo fresco en el Uruguay”. Una de las variantes de estudio fue la determinación del pH 45 a nivel del lomo y jamón, que involucró a reses pertenecientes a cinco agroindustrias que integran la cadena porcina en la fase de transformación y distribución de carne y productos elaborados. Los tipos genéticos predominantes fueron los híbridos comerciales de diferentes orígenes (brasileño, argentino, español), donde en total fueron muestreadas 250 reses representativas, a criterio de cada empresa. En dicha investigación se reveló que el 3,2% de los lomos y el 5,6% de los jamones presentaron a los 45 minutos postmortem valores de inferiores a 5,8, lo que está indicando la presencia de carnes PSE o potencialmente PSE (Echenique & Capra, 2006).

### **3. Conservación de recursos zoogenéticos.**

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) utiliza el término “recursos zoogenéticos para la alimentación y la agricultura” para describir especies avícolas y mamíferas que se utilizan, o tiene el potencial de ser utilizadas, para la agricultura y la producción de alimentos. Actualmente se incluye un total de 37 especies en el Banco Mundial de Datos para los Recursos Genéticos de los Animales de Granja, de la FAO (<http://fao.org/dad-is>). Los recursos zoogenéticos para la alimentación y la agricultura abarcan los individuos y poblaciones dentro de esas especies, así como el material genético (semén, oocitos, embriones, etc.)

Sin embargo, ha resultado difícil establecer una definición del término “raza” que sea aplicable en todo el mundo. La FAO utiliza la siguiente definición, que reconoce las ambigüedades inherentes al término: “Una raza es un grupo subespecífico de animales domésticos que poseen características externas definidas e identificables que permiten distinguirlos a simple vista de otros grupos definidos de la misma manera en la misma especie; también es un grupo sobre el que, debido a la separación geográfica y/o cultural con otros grupos fenotípicamente similares, existe un acuerdo general sobre su identidad separada”. Las razas son el resultado de la diversificación genética dentro de las distintas especies durante el proceso evolutivo y representan la de la especie (Montenegro, 2012).

Los recursos genéticos animales comprenden todas las especies, razas y estirpes que implican interés económico, científico y cultural para la agricultura, tanto en la actualidad como en futuro. Por lo tanto, los recursos locales determinan la biodiversidad de un país.

A lo largo de miles de años, las distintas funciones de los animales de cría y los diferentes ambientes productivos en los que han evolucionado indujeron el desarrollo de una gran diversidad genética animal en el mundo. La biodiversidad animal siempre ha sido dinámica, han surgido nuevas razas y otras han desaparecido a medida que hubo cambios en el ambiente y las sociedades. Sin embargo, en la actualidad los sistemas de producción están cambiando a un ritmo sin precedentes, provocado, entre otras razones, por el aumento de la demanda, la presión sobre los recursos naturales y el desarrollo tecnológico. Este cambio acelerado constituye una amenaza para la diversidad animal –un 20% de las razas están clasificadas como “en peligro de extinción”. También se destaca la importancia de conservar una cartera

bien amplia de recursos genéticos para facilitar la adaptación a nuevas problemáticas –como el cambio climático y enfermedades nuevas, entre las más prominentes. La necesidad de caracterizar y conservar los recursos genéticos locales se ha convertido en una prioridad a nivel mundial (FAO, 1996).

Se entiende a la conservación como el uso sostenible de los recursos naturales y la preocupación actual deriva de una mayor conciencia de la importancia que esto implica para el desarrollo de una agricultura sustentable (Armstrong, 2004-Tesis de Maestría). Los programas de conservación se basan en aplicar técnicas y métodos para contrarrestar las causas que provocan la pérdida de la diversidad, a la vez de mantener y maximizar dicha diversidad.

#### **4. Recursos zoogenéticos porcinos locales del Uruguay**

En nuestro país la cría de cerdos no se basa en recursos genéticos locales, como consecuencia fundamentalmente del desconocimiento de las características de los mismos y la buena adaptación de las razas extranjeras (Castro et al., 2004).

Se han descrito tres recursos de cerdos locales: Mamellados (presentan apéndices pendulosos o mamellas en la base de cuello), Casco de Mula (presentan la particularidad de sindactilia o fusión de los dedos), y Pampa Rocha (presentan manto negro con seis puntos variables de pelaje blanco, figura 2) (Castro, 2007; Vadell et al., 1994).

En 1994 una ONG ambientalista comenzó a trabajar en el departamento de Rocha (zona este del país) con pequeños productores de cerdos ubicados en un ecosistema de humedales (bañados, figura 4). Estos utilizaban animales producto del cruzamiento de recursos locales con razas introducidas al país hasta la década de 1950 (como Poland China y Berkshire) que por selección natural se fueron adaptando a producir en esas condiciones restrictivas y a los que se denominó Pampa Rocha. En el año 1996, se creó la Unidad de Producción de Cerdos (UPC) en el Centro Regional Sur (Juanicó, Canelones) (figura 3), estación experimental de Facultad de Agronomía, constituyéndose el plantel de esta raza.

**Figura 2:** Ejemplar de la raza Pampa Rocha



**Fuente:** Centro Regional Sur, Progreso, Canelones, Uruguay, FAGRO-Udelar

**Figura 3:** Unidad de Producción de Cerdos, centro de conservación ex-situ del cerdo Pampa Rocha



**Figura 4:** Criadero de cerdos en la zona de los Bañados de Rocha, hábitat natural del cerdo Pampa Rocha



Según la clasificación de la FAO, los dos primeros se encuentran en estado crítico a conservar (menos de 120 reproductores totales), mientras que los cerdos Pampa Rocha se encuentran en situaciones sin riesgo pero a preservar (más de 1200 reproductores totales) (Delgado, 2002).

A partir del año 2002 la posibilidad de extinción de estos animales ha aumentado debido a la disminución del número de pequeños productores en la región este del país (por reconversión hacia un trabajo zafra de la industria arrocera), además se le suma la ausencia de políticas de organismos especializados que se dediquen a la conservación de esta raza (Montenegro, 2012). Actualmente la mayor cantidad de reproductores de cerdos Pampa Rocha se encuentran ubicados en 2 núcleos: Centro Regional Sur en Progreso, Canelones (Facultad de Agronomía) y Fundación Quebracho en Cerro Largo (Vadell, 2011), siendo desconocido el número de animales ubicados en otras zonas.

Los estudios en cerdos Pampa Rocha a nivel productivo han sido muy bien caracterizados, es así que la Facultad de Agronomía está desarrollando investigaciones acerca de la caracterización lipídica y proteica de la carne de estos cerdos (Tesis Posgrado) así como

también realizó el estudio de los factores ambientales y genéticos en indicadores reproductivos en cerdos (Campagna et al., 2011). Desde el punto de vista genético, recientemente Montenegro (2012) realizó la caracterización genética y morfométrica de cerdos Pampa Rocha, en donde encuentra por primera vez, la presencia de la raza Pampa Rocha portadores del SEP (mediante la técnica PCR-RFLP).

## 5. Parámetros Genéticos

El genoma es la dotación de genes de un individuo (incluyendo el ADN mitocondrial).

El estudio de los genomas incluyendo: secuencias nucleotídicas, contenido de genes y su organización, se denomina: GENÓMICA.

La Genómica Estructural comprende la caracterización física del genoma, incluyendo el mapeo genético, el mapeo físico y la secuenciación de ADN.

La Genómica Funcional estudia la función biológica de los genes, su regulación y productos. Intenta entender los complejos mecanismos que describen la función que codifica el genoma (respuestas al ambiente, variación a distintos niveles, etc.) utilizando técnicas in silico, “in vivo” e “in vitro”.

La Genómica Comparativa utiliza la información obtenida de un genoma para ser comparada con la de otro relacionado, de manera de poder estudiar las relaciones evolutivas entre familias genéticas y las diferentes especies.

En la actualidad podemos obtener información de los diferentes genomas completos ya secuenciados, de forma libre y gratuita en diferentes sitios web de Internet. Es así que podemos encontrar la información de genomas de miles de especies de cepas y bacterias, cientos de especies de hongos, muchas especies de vegetales y animales, incluyendo animales domésticos: bovinos, caballo, perro, gato, conejo, abeja y cerdo

( <http://pig.genomics.org.cn/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=sus%20scrofa>).

La información de la secuenciación de todo el ADN (genoma), nos permite poder encontrar la ubicación de los genes (cromosoma, cercanía con otros genes), la estructura de los genes (exones, intrones, regiones reguladores), así como las variaciones detectadas en esas secuencias (mutaciones de nucleótido simple, deleciones, inserciones, etc.): polimorfismos.

Los polimorfismos a nivel del ADN generan alelos diferentes para el gen que estemos estudiando.

Los polimorfismos de un nucleótido simple (SNPs) consisten en una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base ( adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma. Una de estas variaciones debe darse al menos en 1% de la población para ser considerado ser un polimorfismo.

Los SNP se consideran una forma de mutación puntual que ha sido considerada lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie.

El Síndrome de Estrés Porcino (SEP), es causado por una mutación puntual en el gen que codifica el receptor de ryanodina (Ryr1 o CRC1), la mutación puntual (C/T) provoca un cambio aminoacídico (arginina por una cisteína) en dicha proteína la cual funciona como canal de calcio en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético.

El gen, anteriormente denominado gen de Halotano, se encuentra localizado en el par autosómico 6 y se ha identificado una mutación T-C en la posición 1843.

## **6. Técnicas de Biología Molecular**

Los marcadores moleculares de ADN constituyen un método seguro para la determinación genotípica de portadores de patologías hereditarias causadas por mutaciones moleculares (Montenegro, 2012).

Una de las técnicas más empleadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Mediante PCR podemos amplificar un fragmento de ADN (o reacción geonómica de interés), que generalmente presenta un cambio de nucleótido (Polimorfismo de nucleótido simple: SNP) u otras variaciones de secuencia de ADN (inserción y/o deleciones que implican más de un nucleótido). Para la posterior identificación de las variantes que incluyen la secuencia de ADN ya obtenida, pueden utilizarse marcadores RFLP (Polimorfismo en lo largo de los fragmentos de restricción), en los cuales el polimorfismo detectado consiste en diferencias en el largo de fragmentos de ADN después de la digestión de enzimas de restricción. Estas enzimas tienen sitios específicos de ADN y producen cortes endonucleotídicos, obteniéndose fragmentos de longitudes definidas, las cuales pueden ser relevadas por electroforesis en gel

de agarosa, separándose de acuerdo a su tamaño molecular. Diferencias en el largo de fragmentos particulares pueden deberse a diferencias en una o más bases, o en la pérdida de un sitio de restricción o en la formación de uno nuevo (Montenegro, 2012). Estas diferencias son reconocidas por un cambio en la movilidad de los fragmentos de restricción durante la electroforesis. La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas.

Sin embargo los SNP, no siempre pueden detectarse mediante enzimas de restricción y en esos casos debe emplearse técnicas de secuenciación (Padilla et al., 2010).

Las técnicas de secuenciación se aplican para poder reconocer el orden de las bases nucleotídicas en la molécula de ADN.

En el presente trabajo las amplificaciones de ADN provenientes de muestras de sangre de cerdos Pampa Rocha, fueron enviadas a un centro de secuenciación automática (Macrogen INC). El secuenciador automático permite por medio de un láser, reconocer las bases de dideoxiribonucleótidos (dd) según el fluorocromo (color) que presenten. Hay 4 dideoxiribonucleótidos: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddCTT, cada uno se marca con un fluorocromo diferente. El equipo posee un software específico para leer la señal del láser.

El análisis conjunto de todas estas cadenas ordenadas por tamaño (electroforesis) nos indicará la secuencia de bases de ADN en estudio.

Los análisis bioinformáticos de los datos (alineamiento de secuencias y búsqueda de polimorfismos SNP) se realizan con programas de acceso libre en Internet.

## **6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La PCR es una técnica de biología molecular que permite la rápida replicación de ADN.

Con la PCR, cantidades mínimas de material genético pueden ser amplificadas millones de veces en pocas horas. Podemos decir, que es una técnica “in vitro” que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN.

Uno de los prerrequisitos para la PCR es que se precisa de alguna información sobre la secuencia nucleotídica del ADN a amplificar. La información de la secuencia se utiliza para sintetizar dos cebadores oligonucleotídicos: uno para el extremo 5' y otro para el extremo 3' de la secuencia que se amplificará. Se añaden los cebadores a una muestra de ADN cuyas moléculas se han separado en cadenas sencillas. Los cebadores se unen a los nucleótidos

complementarios que flanquean la secuencia a clonar. Después de la hibridación se añade una ADN polimerasa resistente al calor (Taq polimerasa), y ésta sintetiza una segunda cadena de ADN (Klug et al., 2006).

En la práctica, la reacción de PCR implica tres pasos:

- a) Desnaturalización del ADN a clonar en cadenas sencillas. Ello se consigue incrementando la temperatura a unos 90-95°C para separar las cadenas que componen la doble hélice del ADN.
- b) Hibridación o apareamiento de los Primers o cebadores al ADN. Para ello se baja la temperatura de reacción, de forma que pequeñas secuencias de ADN de cadena sencilla (típicamente, entre 10 y 30 bases o menos) se unan a sus secuencias complementarias del ADN molde, de forma que sus extremos 3' OH apuntan el uno hacia el otro, delimitando la secuencia a amplificar. Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos (de 15 a 30 nucleótidos de longitud) complementarios a las secuencias que flanquean el ADN diana a copiar. Los cebadores sirven de punto de iniciación para la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementarias al ADN diana (Klug et al., 2006).
- c) Extensión. A la mezcla de reacción se le añade una ADN polimerasa resistente al calor (la polimerasa Taq). La síntesis de ADN se realiza a una temperatura de 70 a 75° C. La polimerasa Taq extiende los cebadores añadiendo nucleótidos en dirección 5'-3', haciendo una copia de doble cadena de ADN diana.

Cada grupo de tres pasos, desnaturalización del ADN de doble cadena, hibridación de los cebadores y extensión por la polimerasa, es un ciclo. La PCR es una reacción en cadena porque el número de cadenas nuevas de ADN se duplica en cada ciclo, y las nuevas cadenas, junto con las preexistentes, sirven de molde para el siguiente ciclo. Cada ciclo, que dura unos 5 minutos, puede repetirse, y en menos de 3 horas, en unos 25-30 ciclos, la cantidad de ADN aumenta más de un millón de veces. Este proceso está automatizado y lo realiza un equipo denominado termociclador, que se puede programar para que realice un número predeterminado de ciclos, produciendo grandes cantidades de segmentos específicos de ADN que se pueden usar para muchos propósitos, incluyendo la clonación de vectores plasmídicos, la secuenciación de ADN, diagnósticos clínicos y rastreos genéticos.

Para hacer una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se necesita:

- Muestra ADN genómico a estudiar
- Taq polimerasa (enzima)
- dNTPs nucleótidos sueltos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Cebadores o “primers”, para restringir la amplificación a la reacción genómica que interese
- Buffer, MgCl<sub>2</sub>, agua destilada (MQ)

## 6.2 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. «Electro» se refiere a la electricidad y «foresis», del griego phoros, significa «trasladar». En general, la electroforesis separa moléculas de una mezcla haciéndolas migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. Se coloca la muestra en una sustancia porosa (un trozo de papel de filtro o un gel semisólido), que a su vez se coloca en una solución conductora de electricidad. Si dos moléculas tienen aproximadamente la misma forma y masa, la que tenga una mayor carga neta migrará más rápidamente hacia el electrodo de polaridad opuesta (Klug et al., 2006).

Muchas macromoléculas biológicas importantes (por ejemplo, los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y, a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. Así, por ejemplo, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el lado positivo (el ánodo).

El uso de medios porosos como los geles de poliacrilamida o los geles de agarosa, permiten separar moléculas de diferentes tamaños debido a que pueden prepararse con distinto tamaño de poro. La clave de separación está en la matriz (los poros) del gel, que restringe más la migración de las moléculas grandes que de las moléculas pequeñas. El poder de resolución es tan grande que pueden separarse con claridad polinucleótidos que se diferencian por un solo nucleótido de longitud. Cuando finaliza la electroforesis, las bandas de las moléculas de

distinto tamaño se identifican por autoradiografía (si uno de los colorantes fluorescentes de la molécula es radioactivo), o mediante un colorante fluorescente que se une a los ácidos nucleótidos visualizándose mediante exposición a la luz ultravioleta en un aparato llamado transiluminador. El bromuro de etidio ha dejado de utilizarse como agente intercalante fluorescente por sus propiedades cancerígenas, siendo, actualmente utilizado el GoodView®.

Entre los factores que afectan la tasa de migración del ADN en los geles de agarosa se incluyen:

- a) El tamaño de los fragmentos: como ya se mencionó las moléculas lineales de ADN de doble cadena se desplazan en los geles de agarosa de una manera inversamente proporcional al log10 de sus tamaños moleculares, de modo que a menor tamaño, mayor velocidad de migración.
- b) Concentración agarosa: existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel, a mayor concentración menor rango de separación.
- c) Voltaje aplicado: a voltajes bajos la migración de las moléculas lineales de ADN es proporcional al voltaje aplicado.
- d) Amortiguador utilizado: la migración del ADN se ve afectado tanto por la composición como por la fuerza iónica del amortiguador empleado, de manera que se debe establecer un balance de iones que genere una fuerza iónica suficiente para lograr la conductancia eléctrica. Entre los más empleados se encuentran: Tris-acetato-EDTA (TAE), Tris-borato-EDTA (TBE) y Tris-fosfato-EDTA (TPE).

La separación electroforética de los ácidos nucleicos es el núcleo central de diversas técnicas de investigación a nivel de genética molecular, especialmente importante para los métodos de secuenciación de ADN.

### **6.3 Secuenciación automática del ADN**

En cierto sentido, un ADN clonado o un ADN cualquiera, desde un clon hasta un genoma, no está completamente caracterizado hasta que se conoce su secuencia nucleotídica. La capacidad de secuenciar ADN ha permitido grandes avances en el conocimiento de la

organización del genoma y de los genes, incluyendo su estructura, función y mecanismos de regulación.

La secuenciación del ADN consiste en un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas que nos permite determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G, T) en el ADN.

El método más utilizado para secuenciar ADN fue desarrollado por James Sanger y sus colaboradores.

A finales de la década de los 80, con la automatización de las etapas de secuenciación del ADN y el análisis computarizado de los genes obtenidos, gracias a la incorporación de ordenadores y láser en el proceso, apareció la secuenciación automática.

La secuenciación de ADN en los proyectos de secuenciación del genoma a gran escala se ha automatizado, y utiliza máquinas que pueden secuenciar varios cientos de miles de nucleótidos cada día. En este procedimiento, se marca cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos análogos con un colorante fluorescente de diferente color, de manera que las cadenas que terminan en adenosina están marcadas con un color, las que terminan en citosina con otro, etc. Si añaden los cuatro dideoxinucleótidos marcados a un mismo tubo, y tras la extensión del cebador realizada por la ADN polimerasa, los productos de la reacción se cargan en un carril de un gel. El gel es rastreado por un láser, lo que provoca que cada banda emita fluorescencia de un color diferente. La máquina de secuenciación tiene un detector que lee el color de cada banda, y determina si representa una A, una T, una C o una G. Estos datos se representan en forma de picos coloreados (electroferogramas), correspondiendo cada uno un nucleótido en la secuencia.

## **HIPÓTESIS**

El Síndrome de Estrés Porcino y una de sus manifestaciones, la carne PSE representa uno de los grandes problemas a nivel de Industrias Frigoríficas Porcinas del Uruguay.

El manejo de cerdos antes del sacrificio es una determinante de gran influencia en la presentación de la carne PSE en nuestro país.

Los cerdos de raza Pampa Rocha presentan diferencias a nivel de la secuencia que flanquea la mutación del gen RYR1.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Actualizar e investigar acerca del Síndrome de Estrés Porcino (SEP) en Industrias Frigoríficas Porcinas del Uruguay, así cómo también profundizar conocimientos a nivel molecular sobre la región del gen RYR1 donde se encuentra la mutación en cerdos Pampa Rocha.

### **2. Objetivos específicos**

Investigar acerca de la realidad que enfrentan las plantas de faenas de cerdos de nuestro país en relación a la presencia de carnes PSE.

Describir prácticas de manejo ante mortem en cerdos que ayudarían a disminuir la incidencia del SEP en nuestro país.

Analizar la secuencia que flanquea la mutación del gen CRC1 con respecto a la secuencia del Genbank, a partir de un banco de ADN de nueve animales de cerdos de raza Pampa Rocha.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Obtención de muestras**

Las muestras fueron obtenidas del Banco de ADN de suinos del Área de Genética de Facultad de Veterinaria. La extracción se llevó a cabo a partir de muestras de sangre entera. Éste banco está conformado por muestras de razas locales (Pampa Rocha y Mamellado) y razas comerciales (Large White, Landrace, Pietrain e híbridos). Las muestras pertenecen a establecimientos comerciales de cría de cerdos y cabañas de genética porcina de los departamentos de Canelones, Salto y Soriano.

### **2. Aislamiento de ADN**

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante la técnica de Fenol-Cloroformo.

#### **2.2 Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre entera. Técnica con Fenol cloroformo (John et al., 1991).**

Se mezclan 500  $\mu$ L de sangre (extraída con EDTA como anticoagulante) con 500  $\mu$ L de Solución de extracción I. Agitar por inversión durante 10 min. y centrifugar a 6000 rpm durante 10 min.

Solución I:

10 mM Tris-Cl, pH7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2. Se mantiene el sobrenadante y se agregan 120  $\mu$ L de detergente Nonidet P40 (lisis celular). Se mezcla con micropipeta y se pasa el contenido a tubos eppendorf (1.5 ml). Mezclar durante 10 min. y agitar con vortex hasta disgregar el pellets celular. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 min. para concentrar los núcleos descartando el sobrenadante (en esta etapa el material puede conservarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente continuar con la técnica de extracción).

3. Resuspender el pellet 2 min. en 800  $\mu$ L de solución de extracción II para lisar los núcleos celulares.

Solución de extracción II:

10 mM Tris-Cl pH7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0.5 M NaCl

0.5% SDS

2 mM Na<sub>2</sub>EDTA

4. Agregar 500  $\mu$ L de una mezcla de fenol cloroformo, alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1, mezclando por inversión. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 min.

5. Transferir con micropipeta la fase superior evitando aspirar material proteico de la interfase y colocar el sobrenadante en un tubo eppendorf.

6. Precipitar el ADN del sobrenadante con 2 volúmenes de etanol 95% frío.

Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos.

7. Eliminar el sobrenadante y lavar el ADN precipitado con 200  $\mu$ L de etanol 70%. Dejar que el ADN se deshidrate y se evapore el alcohol colocando en estufa o a temperatura ambiente.

8. Resuspender el ADN en 150  $\mu$ L de TE (10 mM Tris-Cl pH8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Dejarlo un día a temperatura ambiente hasta una completa resuspensión.

### **3. Técnicas de Laboratorio**

Para el estudio molecular de la secuencia del gen CRC1 se utilizaron 9 muestras de ADN de cerdos de la raza Pampa Rocha, así cómo también 2 muestras de ADN de cerdos de la raza Landrace, 2 muestras de ADN de cerdos de la raza Large White, 2 muestras de ADN de

cerdos de la raza Pietrain y 3 muestras de ADN de cerdos híbridos (Provenientes del Banco de ADN de cerdos del laboratorio del Área Genética de la Facultad de Veterinaria, UdelaR).

Se realizó la amplificación por la técnica de PCR de la secuencia del gen CRC1 que flanquea la región donde se encuentra la mutación.

Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos (Villareal et al., 2005):

F: 5' TCC AGT TTG CCA CAG GTC CTA CCA 3'

R: 5' GAG TCT CTG AGG TGA GGC CAC TTA 3'

Se utilizó un programa de PCR optimizado por Montenegro *et al.*, (2010) con una desnaturalización inicial de 94°C/5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/1 minuto, hibridización a 58°C/1 minuto y extensión a 72°C/1 minuto, con una extensión final a 72°C/5 minutos. Se esperó un amplicón de 659pb el cual fue evidenciado en gel de agarosa al 2% teñido con GoodView® bajo luz UV en transiluminador.

Para genotipar y secuenciar los amplicones de 659 pb las muestras se enviaron a un centro de secuenciación automática (Servicio de secuenciación MacroGen-Corea del Sur). El análisis bioinformático de los datos, alineamiento de secuencias y búsqueda de polimorfismos (SNP, inserciones, deleciones) se realizó con el programa de acceso libre BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) comparando con las secuencias publicadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=sus%20scrofa>) y en el Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

Con una de las secuencias de cerdos de raza Pampa Rocha (PP10) se realizó un BLAST (en inglés: Basic Local Alignment Search Tool), programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa compara la secuencia problema (PP10) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

### **3.1 Condiciones básicas de la PCR**

Tampón PCR 10X: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH=9, 1% Triton X-100

MgCl<sub>2</sub> 25 mM

Didesoxinucleósidos: dATP 25 mM, dCTP 25 mM, dGTP 25 mM, dTTP 25 mM

Cebador Directo 100 µM

Cebador Reverso 100  $\mu$ M

Taq DNA polimerasa: 5 U/  $\mu$ L

Muestra: DNA

Agua ultra pura

Termociclador MULTIGENE II-Labnet International, Inc.

#### **4. Planilla de encuesta** (ver anexo)

Se realizó una planilla de encuesta destinada a Veterinarios de Libre Ejercicio 4 frigoríficos habilitados encargados de realizar el 91% de la faena total nacional de porcinos, según los datos de INAC del año 2012. En la misma se detallarán los datos más relevantes del SEP que eventualmente los afecte.

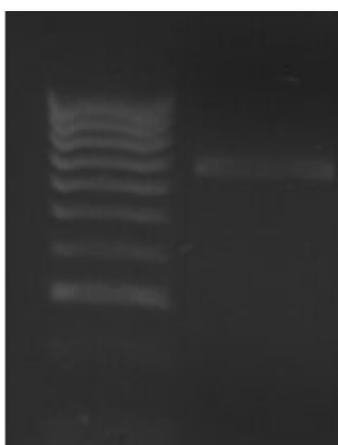
Puntos a destacar:

- Características de transportes destinados a plantas de faenas (densidad de animales, distancias, duración, tipo de carretera, manejo de cerdos, condiciones climáticas).
- Diseño de las instalaciones y manejo de cerdos ante-mortem (desembarque, tiempo de ayuno, distribución de animales).
- Métodos de insensibilización utilizados.
- Incidencia de muertes súbitas de cerdos ante-mortem.
- Presencia de carnes PSE ( categoría de carcasas afectadas: raza, edad, sexo, peso, cortes, ph)
- Manejo post mortem y carnes PSE
- Pruebas de Laboratorio realizadas para carnes PSE ( resultados)
- Destino de las carnes PSE

## **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **1. Análisis del gen CRC1**

Las muestras analizadas por la técnica de PCR revelaron un fragmento de amplificación de 659 pb, concordante con el tamaño esperado. En la figura 5 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% del amplicón.



**Figura 5:** Gel de agarosa al 2% teñido con GoodView. Electroforesis en gel de agarosa de producto de PCR del gen RYR1. Carril 1: marcador de peso molecular (bandas de 1013, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300/311, 200 y 100 pb.); carril 2: banda de 659 pb, tamaño esperado del amplicón del gen CRC1.

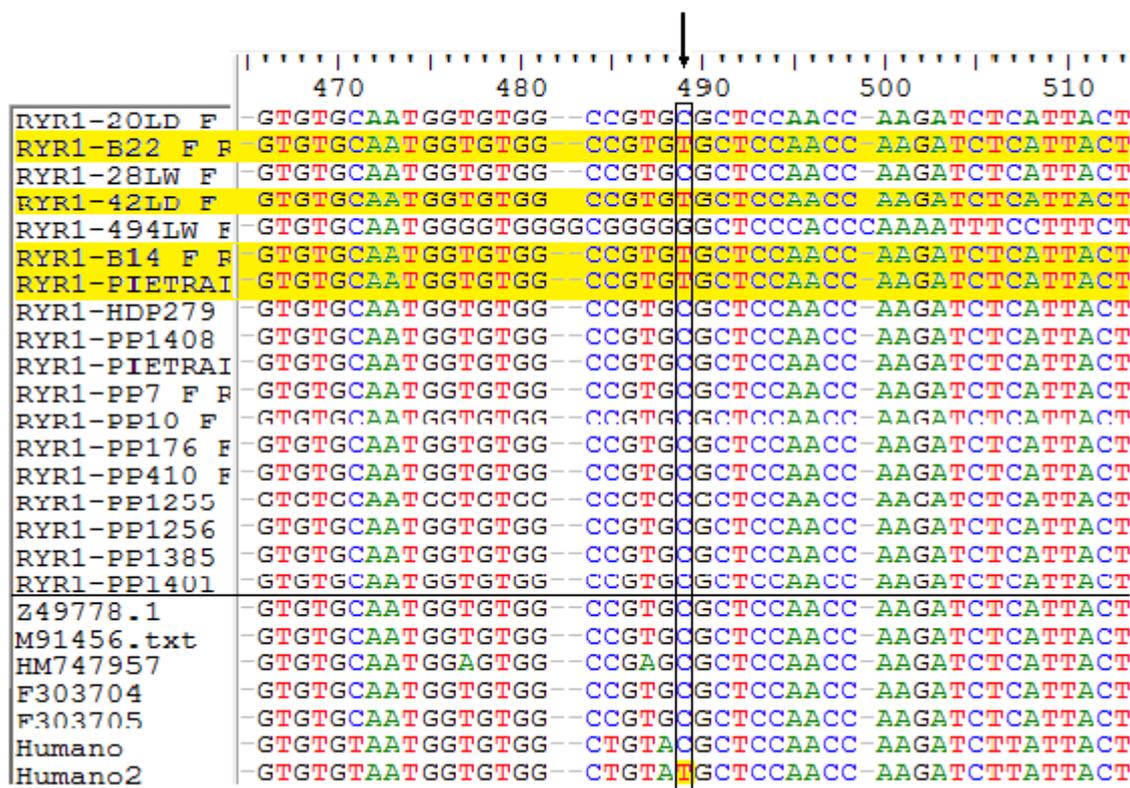
Para el análisis de los resultados obtenidos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas.

De los 18 animales estudiados, 77,78% presentaron genotipo NN, de los cuales un 50,01% pertenece a cerdos de raza Pampa Rocha, un 11,12% a Large White, 5,55% a Landrace, 5,55% a Pietrain y 5,55% a Híbridos. Para el genotipo nn la frecuencia presentó ser de 22,22%, siendo un 11,11 % perteneciendo a muestras de cerdos Híbridos, 5,55% Landrace y 5,55% para Pietrain. No encontrándose la presencia individuos heterocigotos. La distribución de las razas para cada genotipo se observa en la Tabla 3. Para la raza Pampa Rocha, el 100% de los animales estudiados presentaron genotipo NN. Las frecuencias alélicas

para el total de los individuos (n=18) fueron las siguientes: 77,78% para el alelo N y 22,22% para el alelo n. De acuerdo con la distribución de razas para cada genotipo (tabla 2) la presencia del alelo mutante causante del SEP ocurre en cerdos Pietrain, Landrace e Híbridos. Los últimos estudios realizados por Montenegro (2012) en razas Pampa Rocha, Landrace, Large White, Duroc, Pietrain e Híbridos (N=80), encontraron frecuencias genotípicas de 38,75% de NN, 52,5% genotipo Nn y 8,75% nn y frecuencias alélicas de 65 % para el alelo N y 35 % para el alelo n. Anteriormente, se encontraron frecuencias de 62% de NN, 26% Nn y 12 % nn, en estudios realizados en Híbridos comerciales (Castro Molina et al., 2011). A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis no se puede relacionar la prevalencia de la mutación con las diferentes razas debido al bajo número de individuos analizados. En la figura 6 se muestra el alineamiento de secuencias obtenidas por secuenciación automática (Bioedit) y en la figura 7 los electroferogramas.

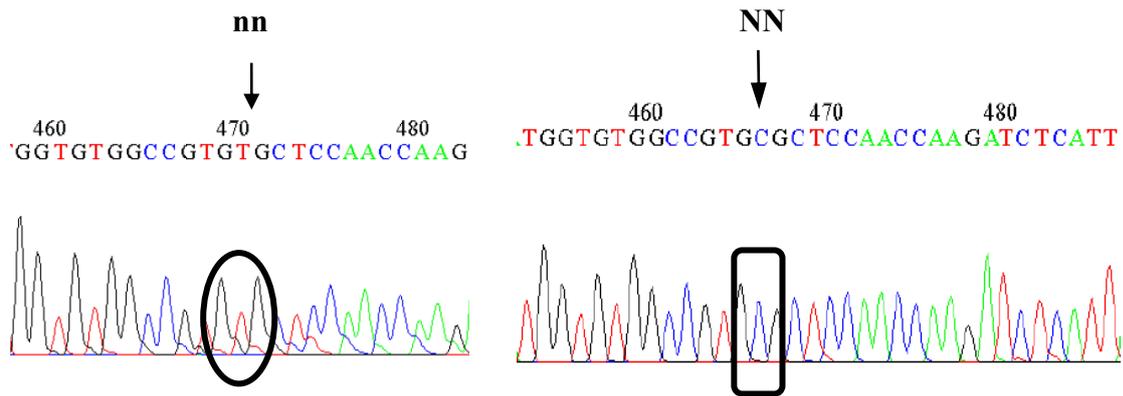
**Tabla 3:** Frecuencias por razas de los genotipos para el SEP

<b>Raza</b>	<b>Genotipo NN</b>	<b>Genotipo Nn</b>	<b>Genotipo nn</b>	<b>Nºtotal</b>
Pampa Rocha	9	0	0	9
Landrace	1	0	1	2
Large White	2	0	0	2
Pietrain	1	0	1	2
Híbridos	1	0	2	3
<b>Total (%)</b>	<b>14(77,78%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>4(22,22%)</b>	<b>18(100%)</b>



**Figura 6:** Alineamiento de una región del fragmento secuenciado para el gen RYR1.

El cuadro agrupa la región donde se encuentra la mutación, la flecha marca el lugar específico donde se observa el cambio de una timina por una citosina (T/C), en amarillo se marcan los animales susceptibles al SEP (muestras: B22, 42LD, B14 y PIETRAIN). La línea horizontal divide a las 18 muestras que fueron secuenciadas en el presente trabajo (región superior) con las demás que fueron extraídas del Genbank para compararlas (región inferior). La timina (T) que ha sido marcada con amarillo en la secuencia de humano 2, coincide con el mismo cambio de nucleótido que se encuentra en animales susceptibles al SEP. El alineamiento se realizó con el programa BioEdit.



**Figura 7:** Patrón visualizado en los electroferogramas para los genotipos NN (individuos normales) y nn (individuos susceptibles al SEP).

A la izquierda se observa el electroferograma de un Pietrain afectado genotipo nn, donde el pico de color rojo representa una timina (T) en lugar de una citosina (C). A la derecha el genotipo es homocigoto NN con un único pico de color azul (citosina). Las flechas indican el lugar donde se provoca el cambio del nucleótido (T/C) responsable de la mutación.

Es importante destacar que las 18 muestras analizadas en el presente trabajo fueron analizadas previamente por PCR-RFLP en la investigación de Montenegro (2012). Comparando ambos resultados, se encontraron diferencias en 5 de las muestras analizadas. Cuatro de ellas que por PCR-RFLP resultaron ser individuos portadores (Nn), con técnicas de secuenciación automática resultaron ser individuos normales (NN). La restante muestra, que presento ser heterocigoto (Nn) por la técnicas de PCR-RFLP, con técnicas de secuenciación resultó ser un individuo homocigoto recesivo (nn), susceptible al SEP.

Montenegro (2012) identificó por primera vez el alelo mutante en dos animales en el recurso local Pampa Rocha, esas mismas muestras no presentaron el mismo resultado por secuenciación automática, no encontrándose el alelo mutante en la raza Pampa Rocha en la presente investigación. Aunque los métodos de secuenciación automática son más seguros que el genotipado por RFLP, es importante destacar que la secuenciación automática del presente trabajo incluyó únicamente la secuenciación del primer forward y no del primer

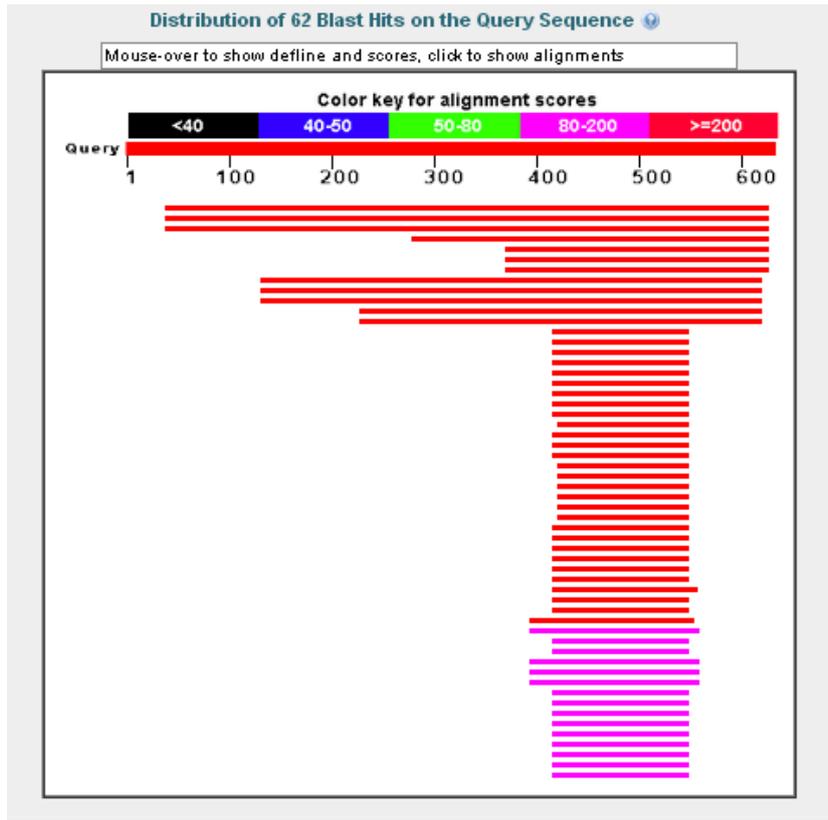
reverse. Sería necesario incluir ambos primers para confirmar los resultados encontrados en la presente tesis y un diagnóstico erróneo por técnicas de PCR-RFLP realizado por Montenegro (2012).

La identificación de la mutación por la técnica de PCR-Secuenciación automática en un futuro, permitiría detectar de forma fácil y rápida a individuos enfermos y portadores, con la finalidad de eliminarlos como reproductores, pudiendo asesorar en cruzamientos dirigidos aplicados a mejorar la producción porcina.

La secuencia del gen RYR1 de una de las muestras de cerdos de raza Pampa Rocha (PP10) fue comparada con las secuencias publicadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=sus%20scrofa>). En la figura 8 se muestra el gráfico que representa el resultado de la búsqueda BLAST con la secuencia de nucleótidos RYR1. Debajo de la imagen además obtenemos una tabla de todas las secuencias que se han encontrado que alinean con la nuestra (figura 9).

Se obtuvo como resultado 62 secuencias que alinearon con la nuestra, dentro de las mismas se encuentran la de humano, chimpancé, gorrilla, perro, gato, ratón, vaca, caballo, cebra, delfín, orca y elefante africano.

El gen RYR1 receptor de la ryanodina puede considerarse un gen conservado que se encuentra en animales vertebrados.



**Figura 8:** Gráfico que representa todas las secuencias de la base de datos del Genbank que coinciden con la secuencia RYR1 de cerdos raza Pampa Rocha en estudio.

La primer línea roja es la secuencia problema (PP10) y las demás son aquellas secuencias de la base de datos que presentan homología con la nuestra.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">S.scrofa gene for skeletal muscle ryanodine receptor</a>	1085	1085	92%	0.0	99%	<a href="#">Z49778.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sus scrofa strain Yorkshire ryanodine receptor (RYR1) gene, partial cds</a>	1085	1085	92%	0.0	99%	<a href="#">M91466.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">S.scrofa CRC (RYR1) gene for calcium release channel (partial)</a>	1079	1079	92%	0.0	99%	<a href="#">X68247.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">S.scrofa rvr1 gene for ryanodine receptor, exon (pRYR66-15.9.2/9.1)</a>	627	627	54%	5e-176	99%	<a href="#">X65504.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sus scrofa breed HampshireXAssam Local halothane (RYR) gene, RYR-N allele, partial cds</a>	466	466	40%	1e-127	99%	<a href="#">JF303705.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sus scrofa breed Niang Msqha halothane (RYR) gene, RYR-N allele, partial cds</a>	465	465	40%	2e-124	98%	<a href="#">JF303704.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sus scrofa breed Chungroo halothane (RYR) gene, RYR-N allele, partial cds</a>	438	438	40%	2e-119	97%	<a href="#">HM747957.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pan troglodytes BAC clone CH251-437D11 from chromosome 19, complete sequence</a>	272	272	77%	3e-69	77%	<a href="#">AC193038.3</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Homo sapiens ryanodine receptor 1 (skeletal) (RYR1), RefSeqGene on chromosome 19</a>	267	267	77%	1e-67	77%	<a href="#">NG_008866.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-475D23, complete sequence</a>	267	267	77%	1e-67	77%	<a href="#">AC011469.6</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human skeletal muscle ryanodine receptor gene (RYR1), exons 17 and 18</a>	259	259	61%	2e-65	79%	<a href="#">U48467.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human ryanodine receptor (RYR1) gene, exons 17 and 18</a>	259	259	61%	2e-65	79%	<a href="#">M91465.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sus scrofa skeletal muscle ryanodine receptor mRNA, partial cds</a>	250	250	21%	1e-62	100%	<a href="#">U15985.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">S.scrofa mRNA for calcium release channel (CRC)</a>	250	250	21%	1e-62	100%	<a href="#">X62880.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sus scrofa ryanodine receptor 1 (skeletal) (RYR1), mRNA &gt;gbIM91462.1 PIGRYRN Sus scrofa Yorkshire ryanodine receptor (RYR1) mRNA, c</a>	244	244	21%	6e-61	99%	<a href="#">NM_001001534.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sus scrofa Belgisch Landras/Pietrain ryanodine receptor (RYR1) mRNA, complete cds</a>	244	244	21%	6e-61	99%	<a href="#">M91461.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Tursiops truncatus ryanodine receptor 1-like (LOC101330523), partial misc. RNA</a>	228	228	21%	6e-56	97%	<a href="#">XR_185935.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris ryanodine receptor 1 (skeletal), transcript variant 2 (RYR1), mRNA</a>	228	228	21%	6e-56	97%	<a href="#">XM_003638835.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Canis lupus familiaris ryanodine receptor 1 (skeletal), transcript variant 1 (RYR1), mRNA</a>	228	228	21%	6e-56	97%	<a href="#">XM_003638834.1</a>

**Figura 9:** Listado de algunas de las secuencias que coinciden con la secuencia del gen RYR1 de cerdos raza Pampa Rocha, de mayor a menor porcentaje de similitud (Query coverage).

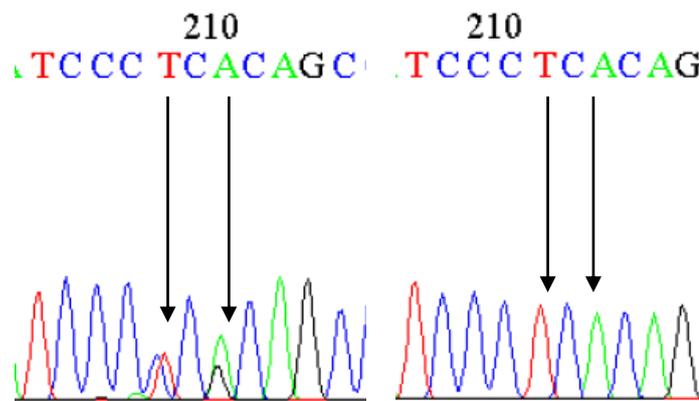
## 2. Variantes de la secuencia

Para la búsqueda de variantes de la secuencia del gen RYR1, se analizaron los 18 electroferogramas obtenidos mediante la secuenciación automática. Fueron encontradas 2 variantes en las secuencias.

Las variantes ubicadas en la posición aproximada al 210 dentro del amplicón, incluyen 2 mutaciones, una T/C y una A/G. Separadas por 1 pb, la primera se encuentra a 259 pb de la mutación causante del SEP y la segunda a 257 pb respectivamente. Las mismas fueron encontradas en 5 muestras de cerdos Pampa Rocha (PP1255, PP1256, PP10, PP176 y PP1385) (figura 10). Ambas variantes, anteriormente descritas en el Ensembl (<http://www.ensembl.org>) caen dentro de un intrón (secuencia no codificante), por lo cual ese cambio de nucleótido no supone cambio de aminoácido.

Las mutaciones simples que tienen lugar en ADN no codificante intragénico son silenciosas, excepto cuando afectan a una región intrónica adyacente a los exones, o zonas de splicing, que participan en el correcto procesamiento de la molécula de ARNm inmadura. Mutaciones en los puntos de corte-empalme de exones (splicing mutation), pueden suponer que la molécula de ARNm madura carezca de algunos de sus exones, o presente secuencias

intrónicas que deberían ser eliminadas, con lo que el producto proteico se verá alterado. Además, las mutaciones pueden afectar a otras regiones reguladoras como los promotores, con lo que puede ocurrir que un gen, a pesar de tener su secuencia codificante intacta, no se exprese correctamente por no poder ser transcrito a ARNm, o bien no lo sea a los niveles adecuados por su falta de respuesta a los elementos que regulan su expresión. En sí, no podemos saber si las variantes encontradas en la presente investigación se encuentran en una región de splice ya que no hay nada descrito, por más que estén dentro de un intrón, si esas variantes caen dentro de una región involucrada en la eliminación de los intrones, podrían tener un efecto.



**Figura 10:** Variantes de la secuencia del gen RYR1 en muestra de cerdos Pampa Rocha. En la izquierda se observa el cambio de una timina por una citosina (T/C) y de una arginina por una guanina (A/G) (muestra PP1256). A la derecha se observa la misma región de la secuencia del gen CRC1 sin presencia de dichas variantes (muestra 20LD).

### 3. Comparación del gen RYR1 de cerdos Pampa Rocha con el gen RYR1 de otras razas porcinas y otra especie (humano).

Se realizó la comparación de la secuencia del gen RYR1 de cerdos Pampa Rocha con las 9 secuencias de las demás razas de cerdos (Landrace, Large White, Pietrain e Híbridos) que fueron enviadas a secuenciar. Además se la comparó con 7 de las secuencias obtenidas en el alineamiento realizado en el Genbank. La alineación y análisis de los datos fueron realizados en el Bioedit (figura 2). Fueron elegidas 5 secuencias de las siguientes razas de cerdos: Yorkshire, Ghungroo, Nang Megha y cruce Hampshire x Assam; y 2 secuencias de humanos. En la tabla 3 se observa el % de identidad que obtuvieron las secuencias elegidas en comparación con la secuencia del gen RYR1 de cerdos Pampa Rocha (PP10).

**Tabla 4:** Secuencias elegidas para la comparación del gen RYR1 de Cerdos Pampa Rocha

<b>Secuencias</b>	<b>Especie /raza</b>	<b>% identidad</b>
Z49778.1	Cerdo/ Duroc	99
M91456	Cerdo, Yorkshire	99
HM747957	Cerdo, Ghungroo	97
F 303704	Cerdo, Niang Megha	98
F 303705	Cerdo, Hampshire x Assam	99
Humano 1	Humano 1	77
Humano 2	Humano 2	94

Las raza de cerdos Yorkshire, de origen Europeo, es utilizada en cruces como línea materna por poseer altos valores de prolificidad. Sin embargo, se encuentra junto con la Duroc, entre las que presentan una mayor velocidad de crecimiento e índice de conversión.

Las demás razas Ghungroo, Nang Megha y cruce Hampshire x Assam son razas de cerdos locales ubicadas en Indonesia.

En cuanto a la comparación de la secuencia del gen RYR1 en cerdos raza Pampa Rocha y las demás secuencias de razas de cerdos que fueron mandadas a secuenciar, se observó gran homología a lo largo de todo el fragmento de la secuencia en estudio. La secuencia del individuo 494LW (Large White), presentó grandes diferencias con las demás, a lo largo de toda la secuencia lo cual se lo relaciona con algún error en el secuenciado, no siendo tomado en cuenta para la comparación (figura 6).

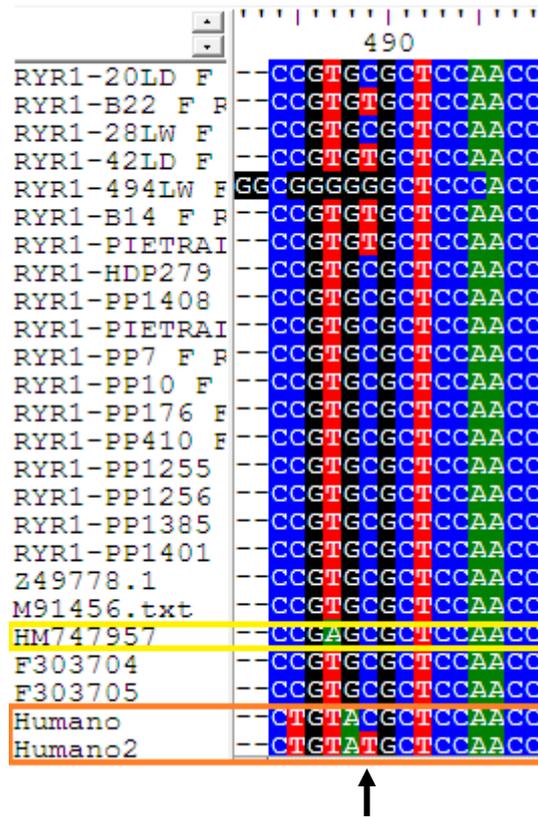
De esta manera, podemos afirmar que no existen diferencias en la secuencia del gen RYR1 entre los cerdos de raza Landrace, Large White, Pietrain, Híbridos y Pampa Rocha.

Al comparar la secuencia del gen RYR1 de cerdos Pampa Rocha con las 5 secuencias de otras razas de cerdos extranjeras extraídas del Genbank, éstas presentaron gran homología de las secuencias en las cercanías del sitio que se presenta la mutación del gen RYR1, causante del SEP. A excepción de la secuencia de cerdo de raza Ghungroo (HM747957) que se observó la presencia de una adenina en la posición 1841, en lugar de una timina presente en esa región en las demás secuencias (figura 11).

El primer caso de Hipertermia maligna (HM) fue descrita en el hombre (1960), posteriormente se utilizó a el cerdo como modelo animal para numerosos estudios fisiopatológicos y farmacológicos.

En el hombre se asocia a un cuadro que sin tratamiento tiene una alta mortalidad anestésica en pacientes jóvenes y aparentemente sanos. Afecta a 1:50000 pacientes adultos y 1:25000 pacientes jóvenes sometidos a anestesia general. Más del 50% de los casos se transmite de forma autosómica dominante. También existen formas hereditarias, recesivas y mutaciones, es decir cerca de 40 defectos genéticos han sido asociados a la Hipertermia Maligna. Dos genes se conocen relacionados con la susceptibilidad a la HM y por lo menos cuatro más están en proceso de identificación positiva. La mutación asociada con el gen RYR1 en el locus cromosómico 19q13.1(MHS1), es la más frecuente descrita en más del 50% de los casos de HM en el hombre y la mutación presente en el locus cromosómico 1q32 asociada a la subunidad alfa1 del receptor de dihidropiridina, presente en el 1% de los casos de HM.

Comparando la región de la secuencia del gen RYR1 cercana a la mutación en cerdos Pampa Rocha con la de humanos, se encontró en ambas muestras, diferencias en 2 nucleótidos. La presencia de una Adenina en la posición 1842 (en lugar de una guanina en la secuencia del cerdo) y una timina en la posición 1839 (en lugar de una citosina en el cerdo) (figura 11). Además se identifica en la secuencia de humano 2, la existencia de una timina en el lugar de la mutación (1843), causante del SEP en cerdos (figura 11).



**Figura 11:** Alineamiento de la región del fragmento secuenciado que presenta la mutación del gen RYR1.

En amarillo se señala la secuencia de cerdo de raza Ghungroo (HM747957), podemos observar la presencia de una adenina (verde) en la posición 1841. En naranja se marca las secuencias de humano, donde se observa la presencia de timina y adenina a diferencia con la secuencia de cerdos. La flecha señala la presencia de una timina en la posición 1843 en la secuencia de humano 2.

Gillard et al. (1991) realizó un estudio con 35 familias Norteamericanas susceptibles a la HM, encontrando en 1 de ellas la presencia de la mutación del gen RYR1 similar a la de los cerdos, que explicaría la presencia de dicha enfermedad.

La presencia de la timina en la posición 1843 en la muestra de humano 2 en la presente investigación, podría ser la mutación que desencadena la HM en ese individuo.

Cabe destacar el análisis y comparación por primera vez de la secuencia del gen RYR1 en cerdos en nuestro país.

#### **4. Planilla de encuesta**

Hay factores estresantes en el manejo antes del sacrificio de cerdos, que dependiendo de la duración o severidad, son capaces de alterar la calidad de la carne. Uno de los factores considerado crítico para el bienestar es el movimiento inadecuado de los animales. Así, dependiendo de la forma de conducir los cerdos, pueden observarse que malos tratos, miedo, esfuerzo y excesiva utilización del bastón eléctrico, resultan en pérdidas económicas, en función de la reducción de la calidad obtenida.

Entendemos que reduciendo el estrés en el manejo de los cerdos, disminuiríamos la presencia de lesiones en la canal, hematomas, contusiones y principalmente la incidencia de defectos de calidad, como la carne PSE.

Investigaciones han descubierto que la causa predominante de carne PSE es debido a factores ambientales y no genéticos.

Dentro de los factores estresantes que pueden desencadenar el SEP, los podemos clasificar en:

- Estresantes físicos: transporte a temperatura ambiente y/o ambiental alta, ejercicio físico durante la carga y descarga, privación de comida y agua, alojamiento y transporte prolongado (Sei & Brandom, 1992).
- Estresantes psicológicos: mezcla de animales, ambiente nuevo, manejo brusco previo, durante y posterior al transporte de los animales y apareamiento.
- Estresantes farmacológicos: anestésicos como halotano, metoxifurano, cloroformo, enflurano y fluroxeno. Los relajantes musculares despolarizantes, como la succinilcolina y los agonistas alfa-adrenérgicos también pueden iniciar o potenciar el síndrome (Sei & Brandom, 1992).

A continuación se detallan los resultados de las entrevistas realizadas a 4 Veterinarios de 4 Industrias frigoríficas habilitadas de nuestro país, que realizaron el 91 % de la faena total nacional de porcinos en el año 2012. La idea fue obtener datos de los factores más estresantes en el manejo previo a la faena, así cómo también investigar acerca de la incidencia de carnes PSE a nivel de la Industrias Frigoríficas de carne de cerdo.

## **4.1 Ayuno**

Los resultados fueron muy variables, dos de los frigoríficos recomiendan a los productores realizar ayunos de 8 a 12 horas antes del sacrificio, mientras que los otros dos, ayunos de 4 horas y más de 12 horas respectivamente.

La influencia del tiempo de ayuno previo a la faena es determinante sobre la calidad de la carne. Un tiempo de ayuno prolongado es considerado un factor estresante para los cerdos. Trabajos realizados en Brasil por Dalla Costa (2006), verificaron que los cerdos sometidos a un largo tiempo de ayuno (15 a 18 horas) presentaron mayor estrés y aumentaron las peleas, lo que resultó en alta frecuencia de lesiones en la piel y valores de pH final inadecuado de la carne ( $\text{pH} \leq 5,55$ ). Diversos investigadores sugieren que 12 horas de ayuno son suficientes, aunque trabajos recientes sugieren la posibilidad de que el consumo de una cantidad reducida de pienso, podría tener efectos beneficiosos. Por otra parte los animales deberían tener acceso al agua hasta inmediatamente antes del transporte. De acuerdo con la Comunidad Europea, no deben transcurrir nunca más de 24hs sin que los animales sean alimentados y abrevados.

Podemos decir que solo 1 frigorífico no cumplen con las normativas internacionales, siendo considerado un factor de estrés para los cerdos.

## **4.2 Transporte**

El transporte y su manipulación asociada pueden causar importantes pérdidas en la industria del ganado (Grandin, 2000). Webster (1998) resume las causas de estrés durante el transporte en: a) miedo y dolor asociado al manejo y mezcla de animales, b) la temperatura o el movimiento por exceso de la velocidad durante el viaje, c) hambre, sed y agotamiento, y d) el malestar causado por los procesos infecciosos. Por otro lado, la experiencia práctica demuestra que las causas más comunes de lesiones, muertes y golpes durante el transporte son el manejo brusco y la sobrecarga de los camiones (Grandin, 2004).

En cuanto a la duración del transporte, en nuestro país las distancias recorridas son cortas, con un mínimo de 50km y un máximo de 150km, los animales son transportados en tiempos de 30 hasta 120 minutos en las distancias más largas. Kusina et al. 2003 informaron que animales

transportados a menos de 100km de distancia, exhibieron más contusiones en comparación con los transportados más de 100km. Abraham et al. (2005) analizaron los niveles de cortisol plasmáticos de cerdos libres del gen halotano y hallaron que aumentó significativamente ( $P < 0,001$ ) como un efecto del transporte. Leheska et al. (2002) informaron que los tiempos de transporte largos reducen el SEP y mejoran la calidad de la carne, al ser comparados con viajes cortos de 30 minutos. También existe evidencia de que un viaje en un vehículo es más estresante que permanecer el mismo tiempo a bordo si está estacionado (Geverink, 1998).

Nuestros resultados nos indican que los tiempos de transporte de corta duración en nuestro país, puede ser considerado un factor de estrés que contribuye a la incidencia del SEP.

Según nuestros resultados, existe conocimiento por parte de los productores acerca de la importancia del manejo de los animales durante su carga. El conocimiento por parte del productor en cuanto al comportamiento del cerdo es importantes para la armonía de la interacción hombre-animal (Hemsworth, 1999).

Los resultados de la planilla de encuesta indicaron que tanto el tipo de carreteras y el estado de los vehículos que trasladan cerdos son buenos, no considerándose un problema.

La sobrecarga de los camiones es la mayor causa de incremento del estrés y de pérdidas por muertes. Warris (1998) informó que la sobrecarga de camiones resulta en una clara evidencia de estrés físico, cuando cerdos de 100kg se cargan con una relación de 322kg/m<sup>2</sup>. Con esta relación no podría haber espacio suficiente para que todos los cerdos se acuesten (Warris, 1998). A su vez el porcentaje de cerdos que permanece de pie durante el transporte es menor cuando se manejan densidades bajas (0,39m<sup>2</sup>/100kg peso vivo (PV)) que altas o medianas (densidad de carga alta, 0,31 m<sup>2</sup>/100kg PV; mediana, 0,35 m<sup>2</sup>/100kg PV) (Lee y col., 2004). Grandin (1997) señala que hacia el final de un viaje largo por carretera, los animales tienden a echarse durante las últimas horas ante cualquier densidad de carga. El diseño del camión es igualmente importante y se deben utilizar sistemas de compartimentación que permitan transportar los animales en grupos de 6 a 8 animales. El Instituto Americano de la Carne (American Meat Institute, 1991) recomendó para cerdos de 90kg una densidad de 0,32 m<sup>2</sup> en

invierno y 0,37 m<sup>2</sup> en verano; y para cerdos de 113 kg una densidad de 0,40m<sup>2</sup> en invierno a 0,46 m<sup>2</sup> en verano.

En días calurosos y húmedos, los cerdos deben transportarse durante la noche o muy temprano en la mañana. Grandin (2004), ha señalado que la combinación de alta temperatura con alta humedad es especialmente peligrosa para los cerdos. De acuerdo con Grandin (1994) factores como el transporte durante el verano (transportes mayores a 30 minutos), hacinamiento de animales y mezcla de cerdos de distintas procedencias, producen un incremento en la incidencia de carnes PSE, por lo que recomienda que cada animal de alrededor de 100kg de peso debe disponer de al menos 0,35m<sup>2</sup> durante el transporte.

Normalmente la densidad en el transporte, es comprometida por la presión económica, provocando el aumento de la densidad, para maximizar la ganancia en un único viaje (cuanto más cerdos transportados, menor es el costo). La decisión de cuantos cerdos serán transportados puede ser definida por el productor y el transportista contratado, que son directamente influenciados por el factor económico.

Los resultados del presente trabajo determinaron que en el 100% de los datos obtenidos por la planilla, los cerdos son distribuidos en compartimientos de más de 10 animales en los vehículos durante su transporte, lo cual corresponde a una densidad de transporte alta, esto podría indicar un punto crítico causante de estrés en cerdos. Sin embargo, en días de altas temperaturas y humedad la densidad es controlada colocando menor cantidad de animales por metro cuadrado.

Es muy frecuente el uso de picanas eléctricas durante el manejo de los animales para tres de los frigoríficos entrevistados. Solamente en una Planta de Faena no es común el uso de picanas eléctricas, correspondiendo al Frigorífico de menor faena (4,82%), dentro del total de los entrevistados (91%).

Los cerdos que se mueven usando picanas eléctricas, tienen un ritmo cardíaco mayor que los que se mueven incentivados por/con un panel. Un estudio de Benjamín (2001) indica que, estimulando a los cerdos muchas veces con picanas eléctricas, resulta un significativo aumento en el número de animales con estrés que se convierten en ambulatorios. Las picanas eléctricas también aumentan la temperatura del animal, lo mismo que el lactato en sangre.

El porcentaje de animales caídos en el transporte corresponde menos del 1% para 3 de las plantas de faena y de 1-3% para la restante, en los días calurosos y de mayor humedad la presencia de animales caídos es mayor. Sin embargo el porcentaje de animales muertos que llegan en el transporte es variable, dos de las plantas de faena consideran que reciben menos de 3 cerdos muertos/año, mientras que en las otras dos aproximadamente 60 cerdos llegan muertos en el transporte cada año.

Un aspecto importante que influye en los traumatismos durante el transporte son las elevadas densidades de carga que resultan en inconvenientes como estrés, mayor número de contusiones y animales caídos. Esto podría explicar nuestros resultados obtenidos en cuanto a animales caídos y muertos durante el transporte. Aunque no representa un gran número, tomando ciertas medidas se podría disminuir dichos valores.

A su vez, la presencia del gen de estrés incrementa las pérdidas por muerte durante el transporte. Murray & Jonson (1998) encontraron que el 9,20% de los cerdos que eran homocigotos positivos por el gen de estrés murieron durante el transporte. Los porcentajes de pérdidas por muerte llegaron al 0,27% en portadores del gen de estrés heterocigoto y 0,05% en cerdos que estaban libres del gen del estrés.

### **4.3 Descarga**

Se realiza en un tiempo promedio de 15 a 20 minutos, a excepción de un frigorífico donde la descarga de los cerdos puede alcanzar los 45 minutos.

Para el total de los frigoríficos encuestados, la rampa de desembarque presenta un ángulo menor a 20°.

Durante la descarga los animales van bajando en grupos de más de 10 animales (75% de los datos), así como también bajan todos juntos (25%).

Es frecuente el uso de picana eléctrica durante el manejo ante mortem de los cerdos en el total de los frigoríficos entrevistados, siendo su uso más común en la etapa previa a la entrada de cajón de noqueo.

Solamente uno de los frigoríficos considera que la presencia de animales lesionados durante la descarga corresponde a menos del 1 %, mientras que el resto niega su existencia.

Está demostrado que el estrés asociado durante la carga y descarga, puede aumentar la incidencia de animales caídos y muertos, además de tener efectos adversos sobre la calidad de la canal y la carne. Idealmente la inclinación de la rampa no deberá exceder 20 grados para una rampa no ajustable y 25 grados para una ajustable (Grandin, 1987). El ritmo cardíaco de un cerdo se incrementa a medida que el ángulo de la rampa se incrementa. Debe evitarse en lo posible el tratamiento brusco de los animales durante la carga y descarga. Las normas de Bienestar Animal recomiendan arrear los animales en pequeños grupos de 2-6 cerdos, de forma silenciosa, evitando silbidos y/o gritos constantes. Los cerdos permanecen más calmos si hay menos ruidos. Spensley (1995) informó que ruidos nuevos de 80-90 decibeles aumentaban la velocidad del corazón de los cerdos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo referente a la descarga de cerdos en plantas frigoríficas relevaron que el grado de la rampa de desembarque se encuentra dentro de los valores adecuados. Sin embargo, el arreo de los animales durante la descarga y hacia los corrales de espera, así como el uso de picana eléctrica para el manejo de animales, no son realizadas de forma adecuada, considerándose prácticas de manejo inadecuadas que pueden contribuir a mayor estrés de los cerdos.

#### **4.4 Ante mortem**

El tiempo de ayuno de los animales en las plantas de faena corresponde a 12 horas (100%).

La superficie de los corrales de espera es variable en los diferentes Frigoríficos, siendo de 0,9m<sup>2</sup> (en 2 de ellos), 1m<sup>2</sup> y 1.5m<sup>2</sup> por animal. Los cerdos son divididos en grupos de más de 15 animales/corral de espera. No se mezclan animales de diferentes orígenes. La presencia de cerdos agitados o caídos durante la espera en dichos corrales corresponde a un 1% y varía según la época del año, para el total de los Frigoríficos encuestados.

En cuanto a cursos de capacitación de buenas prácticas para el personal que maneja cerdos, son dictados en dos de los Frigoríficos, que corresponden a los de mayor producción (79,14%), mientras que el resto no los realizan.

Las instalaciones de los frigoríficos, no presentan mangas curvas ni tampoco rejillas en los pasillos que dirigen los cerdos hacia la caja de noqueo. Tampoco existe presencia de salientes en dichas estructuras.

La presencia de vocalizaciones de los cerdos desde su llegada hasta su insensibilización corresponde entre un 50-70% para la totalidad de los frigoríficos.

Se han efectuado varios estudios para determinar cuanto toma a los cerdos recuperarse del estrés del transporte, después que han sido desembarcados en la planta de faena. Tanto por razones de calidad de carne como de bienestar, los cerdos deberían descansar durante dos horas antes de ser faenados (Milligan et al., 1998). Nuestros resultados indican que el tiempo de espera en los corrales es de aproximadamente 12 horas (100%) y en ellos no son mezclados cerdos de diferentes orígenes, ambos factores contribuyen a evitar el estrés en los cerdos. Los cerdos en general no pelean durante el transporte, sino que principalmente establecen dominancia social en el orden que toman lugar en los corrales de espera (Genverink et al., 1998). Los individuos en grupos mezclados luchan con frecuencia para establecer nuevas jerarquías de dominancia, lo cual origina laceraciones de la piel ubicadas en el hombro (Warris, 1998).

Los resultados obtenidos sobre la densidad de los cerdos en los corrales de espera evidencian una densidad apropiada para los animales, encontrándose dentro de los límites correctos.

Como regla general, un novillo o vaca de 540 kilogramos de peso vivo debería contar con 2 m<sup>2</sup>, y un cerdo, la tercera parte de esa superficie.

Según las reglamentaciones internacionales de Bienestar Animal, cada cerdo dispondrá de espacio suficiente para levantarse, acostarse y darse vuelta. En los Estados Unidos, grandes grupos de 150 a 200 cerdos se mezclan en grandes corrales de encierro y la mayoría de ellos se acuestan y duermen. El problema radica en un espacio suficiente acorde con la cantidad de animales que es colocado en dichos corrales.

La existencia de cursos de capacitación de buenas prácticas para el personal que maneja cerdos, es fundamental. Grandin, señala que para un adecuado bienestar de los cerdos durante su transporte y faena, deben ser manejados por personal adiestrado. La capacitación de los operarios que manejan los animales es muy importante y contribuye directamente en el bienestar animal, pudiendo llegar a ser un factor de estrés importante.

Los resultados del porcentaje de vocalizaciones durante el manejo ante mortem de los cerdos fue alto (50-70%) para la totalidad de los frigoríficos. Investigaciones realizadas en plantas de

faena de porcinos indican que la intensidad de los chillidos en la zona de la manga de insensibilización se correlaciona con medidas fisiológicas de estrés y con calidad inferior de la carne (White et al., 1995). Grandin considera un nivel de problema grave de bienestar animal, la existencia de un 5% o más de vocalizaciones, por cualquier causa. Las causas de la vocalización en el área de conducción hacia el aturdimiento pueden ser debidas a una incorrecta utilización de varillas eléctricas, molestias causadas en el brete de aturdimiento por bordes afilados, por mala condición corporal del animal, por presión en el brete, por los movimientos a diferentes velocidades por parte del aturridor, y al golpear al animal en el brete (Grandin, 2007).

En cuanto a las instalaciones en las plantas de faena, se recomienda el uso de corrales largos y angostos (Grandin, 1980). Es esencial que todas las instalaciones cuenten con pisos no resbalosos. Los pisos húmedos son una causa muy común para que los animales se caigan siendo indispensables pisos donde los animales no resbalen.

Los resultados sobre los datos de las instalaciones de los Frigoríficos encuestados indican que no existe presencia de rejillas en el piso de los pasillos, las mismas se podrían usar para evitar que los cerdos se caigan, sin embargo se ha estudiado que los cerdos se mueven más fácilmente en superficie pareja.

#### 4.5 Insensibilización

El método de insensibilización utilizado es la descarga eléctrica (100%).

Las características de la descarga varían en cada planta frigorífica (Tabla 5).

**Tabla 5:** Características de la descarga eléctrica utilizada como método insensibilización en Plantas de faenas de cerdos del Uruguay.

Voltios	Ampers	Duración(seg/cerdo)
160-180	1,5	6
> 250	1,25	1-10
220	1,3	5

El aturdimiento eléctrico debe inducir un estado epiléptico pasando una corriente eléctrica a través del cerebro. Para inducir epilepsia en cerdos, el amperaje requerido es de 1,25 amperes (Hoenderken, 1976). Debe haber así mismo suficiente voltaje para utilizar la corriente eléctrica necesaria. El mínimo voltaje recomendado es de 250 volts (Troeger y Woltensdort, 1989). Estos amperajes deben mantenerse durante tres segundos para inducir una insensibilidad instantánea. Los resultados obtenidos indican que solo un frigorífico cumple con las reglamentaciones internacionales (min. 1,25ampers/ >220 voltios/min. 3 segundos). Investigaciones han demostrado que esos valores inducen la insensibilización instantánea en cerdos de peso adecuado para la faena. A todo esto se le suma que el control de la pérdida de la conciencia se realiza a veces (50%) y nunca (50%) para los resultados obtenidos en nuestra encuesta.

#### **4.6 Post mortem**

La presencia de lesiones en la canal de los cerdos faenados es considerada leve. Las regiones más afectadas son la región media y posterior (50%); los miembros anteriores y la cabeza (25%), o ambas regiones (25%).

Está claro que el manejo estresante de los animales, causa aparición de lesiones en las canales. Faucitano et al. (1998), optimizaron las condiciones en el manejo de los cerdos previo al sacrificio, no utilizando bastón eléctrico y constataron reducciones del 50% de las lesiones en la canal. Cerdos mal manejados durante el embarque y desembarque en los camiones, con bastón eléctrico reaccionaron empujándose unos contra otros y muchas veces perdieron el equilibrio cayéndose, como resultado, aumentando la incidencia de lesiones en la canal. Aunque los resultados obtenidos relevaron que las lesiones en la canal de los cerdos faenados son leves, las mismas se encuentran mayormente en la región posterior y media (50%). La presencia de lesiones localizadas en las regiones del medio para posterior, se las relacionan con el uso excesivo del bastón eléctrico o por la acción de los cerdos de subir sobre los animales del frente durante la fila india, en una tentativa de escapar, provocando arañones (Faucitano, 2000).

#### 4.7 Incidencia carnes PSE

Solamente un frigorífico reveló que el porcentaje de canales que presentan un  $\text{ph} \leq 5,8$  corresponde a 3-5% de las canales faenadas. El resto no registró datos del mismo.

El porcentaje de mermas corresponde a un 2,5% aproximadamente para los frigoríficos que se incluyeron en el presente trabajo.

La incidencia de carnes PSE es de 3-5% en dos de los frigoríficos. Los mismos realizaron un 79,14% de la faena de cerdos en el año 2012. Para los otros dos frigoríficos que realizaron un 11,79% de la faena anual del mismo año, la incidencia de carnes PSE corresponde a un 10%. Esto indicaría que el porcentaje de carne PSE en el año 2012 correspondió a un 4,34% (aproximadamente) de la faena de ese año (tabla 6).

**Tabla 6:** Incidencia de carne PSE en la faena anual del año 2012

	Frigorífico		Total
	1 y 2	3 y 4	
% Faena	79,14	11,79	90,93
Incidencia carnes PSE (%)	3 a 5(4)	10	
% Carne PSE	3,16	1,18	<b>4,34</b>

Los cortes en los cuales se ha constatado su presencia son: jamón, paleta y el lomo, ocurriendo con mayor frecuencia en jamón y paleta. En cuanto a razas, los Veterinarios han constatado presencia de carne pálida, blanca y exudativa en Pietrain (para el total de los entrevistados), y Hampshire (para uno de ellos).

No se realiza ningún tipo de prueba de laboratorios para la carne PSE. Su destino es exclusivamente para emulsiones y salames.

En lo referente a la incidencia de carnes PSE a nivel de plantas frigoríficas de cerdos del Uruguay, el único trabajo realizado en el año 2006 determinó la presencia de un 3,2% de los jamones y 5,6% de los lomos con un  $\text{ph}$  inferior al 5,8 a través de la medición del  $\text{ph}_{45}$  post mortem, indicando la presencia de carne PSE. Dicha investigación involucró a cinco agroindustrias perteneciente a la cadena cárnica porcina y fueron muestreadas un total de 250 reses representativas a criterio de cada empresa. (Echenique y Capra, 2006).

En cuanto a la mayor presencia de carnes PSE en cerdos de mejor conformación y animales de mayor peso, diversas investigaciones han observado la misma relación. Este hecho explica la razón por la cual la incidencia del SEP aumentó con el cruzamiento de razas de rápido crecimiento, buen rendimiento en conversión alimenticia y masa muscular (Pietrain, Landrace Belga), ocurriendo con mayor frecuencia en este tipo de canal.

Aunque nuestros resultados son sobre hechos subjetivos por parte de los Veterinarios entrevistados, nos dan idea de la problemática que nos genera ésta enfermedad a nivel de la Industria de carne de cerdo.

La raza Pietrain es considerada la de mayor incidencia de carne PSE en todo el mundo, ocurriendo lo mismo en nuestro país. El SEP es frecuente en las razas en las cuales se ha incluido en el índice de selección, un sistema de puntos en cuanto a la musculatura, ritmo de crecimiento, conversión de alimento y espesor de grasa dorsal. Sin embargo la presencia de carne PSE en la raza Hampshire en nuestro país se discute. Los datos sobre cantidad de animales de raza Hampshire son pocos. Según los registros genealógicos de ARU, hace más de 15 años que no se inscriben cerdos de raza Hampshire. Según la Encuesta Porcina del 2006 (último estudio de la situación de la producción porcina en Uruguay), un 9% de los productores tienen razas puras y dentro de éstos un 3% posee otras razas que no son Duroc, Large White o Landrace. En definitiva no se sabe concretamente que cantidad de ese porcentaje pertenece a cerdos de raza Hampshire. Los cerdos que llegan a la faena con características externas de la raza Hampshire son en su mayoría cruza, siendo igualmente muy poco frecuente la existencia de éstos animales en una faena normal. Lo cual no podemos afirmar que la presencia de cerdos de ésta raza contribuya a la mayor incidencia de carne PSE en nuestro país, ya que puede haber sido un error del entrevistado.

La utilización de pruebas de laboratorio que incluyan determinación de pH, CRA, color, luminosidad, pérdidas de goteo; serían útiles para poder diferenciar este tipo de carnes, así poder clasificarlas como de peor calidad, y poder destinarla para productos cárnicos porcinos de menor calidad. De esta forma se podrían disminuir los costos que implican los mayores procesos tecnológicos utilizados para la posterior elaboración de chacinados con carnes PSE.

La presencia de la condición PSE en cortes de lomo, jamón y paleta, se explica por el hecho que los mismos representan más de una tercera parte de la musculatura total del cerdo.

Tanto los cortes de lomo y jamón fueron anteriormente considerados de elección para poder determinar el pH y determinar la incidencia de PSE (Echenique y Capra, 2006).

Es bien conocido que más del 50% de la carne de cerdo se destina a la producción de embutidos, en donde la exigencia en cuanto a los estándares de calidad y rendimiento es aún mayor.

Tanto los cortes de lomo y jamón, son considerados los de mayor valor para la elaboración de productos chacinados, lo cual podemos decir que indudablemente la incidencia de carne PSE contribuye a grandes pérdidas económicas en la Industria Porcina Uruguaya.

La principal razón por la que éste gen ha sido propagado es el incremento muscular y la magreza; diferentes investigaciones reportan un incremento en el porcentaje muscular del 2,7% al 4% (Sterle, 2000), así como una disminución en el consumo de alimento para carne magra, sin embargo hace unos años la industria ha considerado la importancia de la calidad de la carne, y observando que los efectos del gen RYR1 sobre la calidad de la carne son severos, la recomendación es remover al gen de todos los aspectos del sistema de producción porcina.

Actualmente, en países industrializados se han implementado programas de aseguramiento de calidad en el sector de la producción; por ende, auditorías en las granjas, plantas de sacrificio y procesamiento de carne de cerdos son realizadas con frecuencia con la finalidad de detectar defectos de calidad y mejorar los procesos de producción. En Estados Unidos y Europa, por ejemplo, estas auditorías han permitido determinar que las pérdidas económicas asociadas con la baja calidad de carne de cerdo oscilan entre 3 y 24% (Hambrecht et al., 1996); en términos monetarios, se ha determinado que las pérdidas asociadas a los defectos de calidad son mayores a 213 millones de dólares al año en los Estados Unidos, siendo sólo por contusiones alrededor de \$8 millones anualmente.

La determinación de animales portadores del gen RYR1 por técnicas de laboratorio para la selección contra el alelo mutado y la implementación de prácticas de manejo apropiado de los cerdos, podrían ser útiles para poder controlar la incidencia de la enfermedad en nuestro país. La detección de animales enfermos o portadores del SEP implicaría a futuro el apoyo de recursos tecnológicos así como económicos, sin embargo la reducción del estrés impuesto

sobre los cerdos tanto a nivel de campo hasta la planta de faena depende fundamentalmente de la interacción hombre-animal.

## **5. Buenas Prácticas de manejo antemortem en suinos.**

Uno de los objetivos de la presente tesis es investigar y definir las especificaciones técnicas mínimas que deben ser consideradas en la elaboración de un programa de buenas prácticas para el bienestar animal desde la carga al desangrado.

A continuación se detallan la descripción de buenas prácticas de manejo en cerdos previo al sacrificio que ayudarían a reducir el estrés de los animales, de manera de poder disminuir la incidencia de defectos de calidad en la carne de cerdo, particularmente la carne PSE.

### **a) Planificación de la faena**

- Implica la necesidad de someterlos a un ayuno con el fin de conseguir el vaciado del tubo digestivo.
- Se debe disponer de al menos un responsable que esté a cargo de la preparación de los cerdos antes del proceso de carga y traslado.
- El encargado deberá revisar el “Programa de faena” para determinar el tiempo de ayuno de los cerdos tomando en cuenta el tiempo de traslado y el tiempo de espera en la planta de faena, antes del sacrificio.
- El tiempo máximo de ayuno no debe sobrepasar las 18hs totales entre carga y sacrificio.
- Debe existir un ayuno mínimo previo a la carga de 4 horas.
- Coordinar con los camiones y el personal encargado del arreo y carga, que estén presentes a la hora correspondiente, para evitar retrasos y la prolongación del ayuno en cerdos.

### **b) Arreo**

- Se requiere al menos un responsable que esté a cargo del proceso. El personal involucrado deberá estar debidamente capacitado.
- Utilizar instrumentos de arreo como: plumeros, paletas, banderines.
- Todo instrumento de arreo debe estar desprovisto de puntas o salientes.

- No se debe manipular a los cerdos de estructuras sensibles como cabeza, morro, genitales, cola, orejas, extremidades, etc.
- Evitar el empleo de elementos punzantes para el arreo de los cerdos (palos, clavos, etc.).
- Evitar el uso de instrumentos que administren descargas eléctricas. Sólo usarse en porcinos adultos que se rehúsen al movimiento y cuando tengan espacio suficiente para avanzar. Las descargas no deben durar más de un segundo, se espaciaron convenientemente aplicándose únicamente en los músculos de los cuartos traseros. No aplicarse de forma repetida si el animal no reacciona.
- Arrear los animales en grupos pequeños de 2 a 6 cerdos, cuidando siempre no obstruirles la vía de paso.
- Evitar los gritos repetitivos de alta intensidad, movimientos bruscos y silbidos constantes para que los cerdos se muevan.
- Las mangas de arreo deben ser construidas evitando en lo posible los ángulos cerrados.
- Las zonas de desplazamiento deben estar libres de obstrucciones y distracciones, ejemplo: ropa colgada, artículos brillantes, etc.
- Para estimular el avance de los cerdos se recomienda contar con una mayor intensidad luminosa en la rampa de carga e interior del camión con respeto a las demás infraestructuras.
- El piso debe ser de tipo no deslizante.
- Arrear los cerdos siempre que las vías hacia adelante estén despejadas y haya espacio suficiente para avanzar.
- Los anteriores puntos son recomendados para el arreo de los cerdos en la playa de faena.

### **c) Carga**

- Debe existir un encargado, debidamente capacitado.
- La rampa debe estar debidamente alineada al camión, para evitar separaciones que puedan lesionar los animales durante la carga.
- La rampa no debe presentar superficies o bordes irregulares y contar con piso antideslizante.

- El ángulo de inclinación de la rampa no debe ser superior a 20 grados con respecto a la línea horizontal.

#### **d) Transporte**

- El conductor del vehículo debe estar capacitado.
- Programar la hora de carga, para que el transporte tenga lugar en horario nocturno o bien durante las horas más frescas del día.
- La densidad de carga debe ser de 0,32 m<sup>2</sup> (invierno) y 0,37m<sup>2</sup> (verano), para cerdos de 90 Kg. Y 0,42m<sup>2</sup> (invierno) y 0,46m<sup>2</sup> (verano) para cerdos de 113kg.
- Evitar mezclar animales de pabellones o corrales distintos. Si no es posible, tomar medidas necesarias, separar los animales agresivos.
- Los camiones deben ser seguros, lisos, sin salientes puntiagudas.
- Los camiones deben entregar protección de luz solar directa, de condiciones meteorológicas desfavorables y permitir una ventilación para el recambio de aire.
- Deben permitir una fácil limpieza y desinfección e impedir en lo posible la filtración de excrementos y orina durante el trayecto.
- Los conductores deben estar debidamente capacitados, conocer el tipo de carga que transporta, instruyéndosele para que eviten en lo posible maniobras bruscas, frenadas violentas, etc.
- Evitar paradas innecesarias del camión a objeto de minimizar el estrés de los cerdos.
- Establecer un POE (Procedimiento Operativo Estandarizado), que dé cuenta de las tareas asociadas a las citaciones de emergencia durante el traslado de los animales.

#### **e) Descarga**

- Contar con un encargado de Bienestar Animal de los cerdos en la planta de faena, debidamente capacitado.
- El camión cargado al ingresar a la planta faenadora debe dirigirse directamente a la rampa de descarga, evitando demoras.
- En caso de retrasos en la recepción de camiones, contar con instalaciones acondicionadas para la espera.
- En la zona de espera, evitar la generación de ruidos de alta densidad (no mayor a 95 decibeles).

- Los cerdos deben ser alimentados si el periodo de ayuno en planta faenadora se prolonga por más de 24 horas.
- Acoplar la rampa de descarga al camión de forma alineada y debe contar con protecciones laterales que eviten lesiones y caídas durante la descarga.
- La rampa no debe presentar superficies o bordes irregulares.
- La inclinación de la rampa no debe ser superior a 20 grados con respecto a la horizontal.
- Instrumentos para el arreo: arreadores de aire comprimido, plumeros, paletas y banderines.
- Arrear los animales en pequeños grupos de 2 a 6 cerdos, dejando libre las vías de paso.
- Las mangas de arreo o corrales deberán estar construidas de manera tal que los animales no sean capaces de ver hacia los costados.
- No descargar animales cuando los corrales estén ocupados.
- El arreo debe efectuarse en forma silenciosa, evitando silbidos y/o gritos constantes.
- Los pisos se construirán y mantendrán de forma que se reduzca al mínimo el riesgo de que los animales resbalen.
- Evitar el uso de instrumentos que administren cargas eléctricas.

#### **f) Descanso**

- Los corrales deben ser de superficies lisas y sin salientes que puedan provocar lesiones a los animales.
- Evitar la generación de ruidos de alta intensidad los cuales generen una sobrerreacción de los animales.
- Los corrales deberán ser construidos de acuerdo al número de animales que se pretenden alojar (Tabla 7).

**Tabla 7:** Espacio mínimo de alojamiento para descanso en corral de espera

<b>Peso Vivo (kg)</b>	<b>Área de Descanso (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Total (m<sup>2</sup>)</b>
10	0.10	0.15
30	0.30	0.30
50	0.47	0.47
70	0.61	0.61
90	0.715	0.715
110	0.80	0.80

Fuente: RSPCA, 2012

- Cada cerdo dispondrá de espacio suficiente para levantarse, acostarse y darse vuelta.
- Los animales deben tener libre acceso al agua durante el descanso en los corrales.
- Los corrales deben ser construidos de manera tal que los cerdos no puedan ver hacia los costados, que entreguen protección a la luz solar directa, protegidos de condiciones meteorológicas desfavorables y que además permitan una ventilación para el recambio de aire.
- Si es necesario disponer de un medio de ventilación mecánica para mejorar el Bienestar Animal de los cerdos.
- Se recomienda una temperatura de 13-21°C para animales de 100-120 Kg. PV, en los corrales de espera.

#### **g) Insensibilización**

- Controlar cada 2 horas desde el inicio del proceso el funcionamiento correcto de los equipos.
- Se debe contar con un procedimiento documentado de mantención y/o calibración del equipo de insensibilizado.
- La planta faenadora debe contar con un equipamiento de insensibilizado auxiliar en caso de falla del equipo principal, de manera de evitar la insensibilización incorrecta de un animal.
- Evaluar periódicamente en línea de faena la eficiencia del insensibilizado, mediante 3 pruebas de conciencia, como mínimo.

- Para verificar que el insensibilizado se ha realizado correctamente, debe existir ausencia de: respiración rítmica, contracciones musculares voluntarias, reflejo corneal (se acepta hasta un 5% de animales positivos a este signo), vocalización.
- Para la electronarcosis:
  - La corriente utilizada no debe ser menor a 1,25 amperes.
  - Realizarse por un mínimo de 3 segundos.
  - Los electrodos deben colocarse entremedio del ojo y la oreja, con presión para reducir la resistencia eléctrica.
  - Se recomienda que el equipo cuente con un amperímetro y voltímetro de fácil lectura.
  - Limpiar los electrodos cada 20-25 animales.
  - El sector de insensibilizado deberá contar con piso antideslizante.
- En el caso que queden animales parcialmente insensibilizados, estos se deben re insensibilizar inmediatamente.
- Se recomienda un plazo máximo de 20 segundos entre la electronarcosis y el desangrado.

## **CONCLUSIONES**

Se estudió por primera vez la secuencia del gen RYR1 mediante técnicas de PCR-Secuenciación Automática en cerdos de raza Pampa Rocha, no encontrándose la presencia del alelo mutante causante del SEP. Se realizó su posterior análisis e identificación de variantes similares a las reportadas en la literatura.

La secuencia del gen RYR1 en cerdos Pampa Rocha presentó gran homología con las secuencias de otras razas de cerdos presentes en nuestro país (Landrace, Lague White, Pietrain e Híbridos).

Se encontraron diferencias en la región cercana a la mutación del gen RYR1 entre la secuencia de cerdos Pampa Rocha y secuencias de humanos.

Existen prácticas de manejo ante mortem en cerdos faenados en Plantas Frigoríficas de nuestro país, que son consideradas como factores estresantes y pueden contribuir a la incidencia del SEP.

La presencia de carnes PSE afecta la Industria de carne de cerdo con una incidencia del 4,34% en la faena anual del año 2012.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Abraham C., Weber M., Balogh K., Mezes M., Huszenicza G., Febel H. (2005). Effect of transport and lairage on some physiological and meat quality parameters in slaughter pigs. *Magyar Allatorvosok Lapja*; 127(3): 139-145.
2. Alvarado C. (2002). Current issues in the poultry industry: meta quality and moisture retention. *Nutritional Biotechnology in the feed and food Industries. Proceedings of Alltech Eighteenth Annual Symposium*. Nottingham, UK, p. 13-20.
3. American Meat Institute (1991). Recomendaciones para el manejo de animales en las plantas de faena, Washington, DC. Disponible en: <http://www.grandin.com/spanish/Recomendaciones.html> Fecha de consulta: 27/05/2013.
4. Armstrong E. (2004). Análisis de la diversidad genética del bovino criollo Uruguayo mediante microsatélites. Tesis de Maestría, PEDECIBA, Uruguay, Universidad de la República, 188 p.
5. Armstrong H. (1993). Halothane free hallmark signifies better quality. *Pigs Misset*. Jul- Aug: 36-37.
6. Benjamin M.E., Gonyou H.W., Ivers D.L., Richardson L.F., Jones D.J., Wagner J.R. Seneriz R., Anderson D.B. (2001). Effect of handling method on the incidence of stress response in market swine in a model system. *J. Anim. Sci.*; 79 (Supl. 1): 279(Abstract).
7. Bonelli A., Schifferli R. (2001). Síndrome Estrés Porcino. *Arch. Med. Vet.* 33(2):125-135.
8. Brem G., Brening B. (1993). Use of molecular genetic diagnosis of malignant hyperthermic syndrome (MHS) in pig breeding. *Genetika*; 29(6): 1009-1013.

9. Brening B., Brem G. (1992). Genomic organization and analysis of the 4' end of the porcine ryanodine receptor gene (ryr1). *FEBS letters*; 298: 277-279.
10. Calvo J., Osta R., Garcia E., Zaragoza P. (1997). Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. *Medicina Veterinaria* 14(2): 110-113.
11. Campagna D., Dichio L.; Ausilio A.; Besson P.A., Silva P., Spinollo L. (2011). En: Barlocco N., Vadell A. (eds), *Producción de Cerdos a Campo. Aportes para el desarrollo de tecnologías apropiadas para la producción familiar*. Montevideo, Facultad de Agronomía, 132 p.
12. Cassens R.G. (1999). *New Developments in guaranteeing the optimal sensory quality of meat*. New Jersey, Fisher, 8p.
13. Castro G., Mc Manus C., Llambí S., Rezende S., Fernández G., Pena B., Gagliardi R. (2007). Caracterización Genética preliminar del cerdo mamellado Uruguayo. *Memorias VIII Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos*, Univ. Técnica Estatal Quevedo-Ecuador, p 193-197.
14. Castro G., Fernández G., Delgado J., Rodríguez D. (2004). Contribución al estudio racial del cerdo Mamellado Uruguayo. *Veterinaria (Montevideo)*; 39 (155-156): 11-14.
15. Castro-Molina S., Ariza M., Ríos M., Moreno D., Guerrero G. (2011). Detección del Polimorfismo 1843 en el Gen Receptor de Ryanodina Mediante la Técnica de PCR-SSCP. *Orinoquia* 15(2):192-200.
16. Dalla Costa O. A. (2006). *Efeitos do manejo pré-abate no bem-estar e na qualidade de carne de suínos*. Tesis, Universidad Estatal Paulista, Facultad de Ciencias Agrárias y Veterinárias, 162 p.

17. Damián E., Margreth A., (1994). Characterization study of the ryanodine receptor and calsequistrin isoforms of mammalian skeletal muscles in relation to fibre types.: J.Musc. Res. Cell. Motil; 15:86-102.
18. Delgado J. (2002). Gestión genética de las poblaciones. Jornadas Iberoamericanas sobre la Mejora y Conservación de Razas Ganaderas Locales para el Desarrollo Rural Sostenible. Antigua, Guatemala; p. 12-37.
19. Denborough M., Forster J., Lovell R. (1962) Anesthetic deaths in a family. Br J Anaesth; 34: 395-6. Disponible en: <http://www.medynet.com/elmedico/biblio/rbcn35.htm> Fecha de consulta: 15/02/2013.
20. DGS, INAC. (2012). Datos de la Cadena Productiva Porcina del Uruguay. Disponible en: [http://www.aupcerdo.com/uploads/files/Uruguay\\_2011\\_Datos\\_de\\_la\\_Cadena\\_Productiva\\_Porcina\\_1.pdf](http://www.aupcerdo.com/uploads/files/Uruguay_2011_Datos_de_la_Cadena_Productiva_Porcina_1.pdf) Fecha de consulta: 23/03/2013.
21. DIEA (MGAP), 2012. Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Anuarios Estadísticos, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy> Fecha de consulta: 11/02/2013.
22. DICOSE (MGAP). (2012). Declaraciones juradas de suinos. Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/dicose.htm> Fecha de consulta: 25/04/2013.
23. DIEA, INIA (2006). Encuesta Porcina 2006, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,109,O,S,0,877%3BS%3B4%3B120> Fecha de consulta: 12/11/2012.
24. Echenique A., Capra G. (2007). Caracterización de los requerimientos de calidad de carne de cerdo por parte de las Industrias Cárnicas Porcinas del Uruguay. INIA, Serie FPTA (Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria) n° 220, 36p.

25. Echenique A., Capra, G. (2006). Diagnóstico de la situación de la calidad de carne porcina para consumo fresco en el Uruguay. INIA, Serie FPTA (Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria) n° 160, 34p.
26. Ensembl Genome Browser. Sistema de software que produce y mantiene anotaciones automáticas de los genomas eucariotas. División del Laboratorio Europeo Biología Molecular. Disponible en: <http://www.ensembl.org> Fecha de consulta: 13/03/2013.
27. Errea E., Ruiz M.I., Souto G. (2013). CADENA PORCINA: Análisis de competitividad y temas tecnológicos prioritarios. INIA, Informe de consultaría, 92p. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/online/site/publicaciones.php> Fecha de consulta: 28/04/2013.
28. FAO (1996). Plan de acción Mundial para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/016/aj631s.pdf> Fecha de consulta: 3/12/2012.
29. Faucitano L. (2000). Effects of preslaughter handling on the pig welfare and its influence on meatquality. Proceedings of the 1st International Virtual Conference on Pork Quality. Concordia, Brasil, p. 52-71.
30. Faucitano L., Marquardt L., Oliveira M. S., Sebastiany Coelho B. H., Terra N. N. (1998). The effect of two handling and slaughter systems on skin damage, meat acidification and colour in pigs. Meat Sci.; 50:13-19.
31. Fruen B. (1994). Amons potentate excitation-contraction coupling may mimic effects of phosphate on Ca<sup>++</sup> release channel. Amer. J. Physiol; 266 (6): 1729-1735.
32. Fuji J., Otsu K., Zorsato F., De Leon S., Khanna V., Weiler J., O'Brien P., MacLennan D. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science, 253: 448-451.

33. Gahne G., Juneja R.K. (1985). Prediction of the halothane (Hal) genotypes of pigs by deducting Hal, Phi, Po2 haplotypes of parents and offspring: results from a large-scale practice in Swedish breeds. *Anim. Blood Groups Biochem. Gen.*; 16:265-283.
34. García J., Ruiz C., Ortega, J., Nuñez F. (2000). Efectos de la materia prima y de las características del proceso en la calidad del jamón cocido. *Invest. Agr.: Producción Animal, Facultad de Zootecnia, México*; 15:1-12.
35. Genbank. Base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BioEdit/bioedit.html>  
Fecha de consulta: 11/03/2013.
36. Geversink N.A., Kappers A., Van de Burgwal T.A., Lambooij E., Blokhuis H.J., Wiegant V.M. (1998). Effects of regular moving and handling on the behavioral and physiological responses of pigs to pre-slaughter treatment and consequences for subsequent meat quality. *J. Anim. Sci.*; 76:2080-2085.
37. Gillard E.F., Otsu K., Fujii J., Khanna V.K., DeLeon S., Derdemezi J., Britt B.A., Duff C.L., Worton R.G., MacLennan D.H. (1991). A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 1, 1:751-755.
38. Gispert M., Faucitano L., Oliver M.A., Guardia M.D., Coll C., Siggers K., Harvey K., Diestre A. (2000). A Survey of pre-slaughter Conditions, Halothane Gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Sci.*; 55: 97-106.
39. Grandin T. (2007) Recommended Animal Handling Guidelines and Audit Guide for Cattle, Pigs, and Sheep. American Meat Institute Foundation; p 61-73. Disponible en [http://www.meatami.com/Template.cfm?Section:Animal\\_Welfare&CONTENTID=5242&TEMPLATE=/ContentManagement/ContentDisplay.cfm](http://www.meatami.com/Template.cfm?Section:Animal_Welfare&CONTENTID=5242&TEMPLATE=/ContentManagement/ContentDisplay.cfm)  
Fecha de consulta: 23/05/2013.

40. Grandin, T. (2004). Elementos de manejo y transporte. En: Galindo F., Orihuela A., (Eds.) *Etología Aplicada*. México. Universidad Autónoma de México, p. 311-331.
41. Grandin, T., (2000). Introduction: management and economic factors of handling and transport. En: Grandin T. (ed.): *Livestock Handling and Transport*. 2ª ed. Wallingford, UK: CAB; p.14.
42. Grandin T. (1997). Assesment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.*; 75:249-257.
43. Grandin T. (1994). Solving livestock handling problems. *Vet. Med.*; 89:989-998.
44. Grandin T. (1987). Animal handling, *Vet. Clin. North America Food Anim. Pract.*; 3:323-338.
45. Grandin T. (1980). Livestock behavior as related to handling facility design. *International J. Study Anim. Prob.*; 1:33-52.
46. Hambrecht E., Eissen J.J., Verstegen M.W.A. (2003). Effect of processing plant on pork quality. *Meat Sci.*; 64:125-131.
47. Hanset R., Leroy P., Michaux C., Kintaba K.N. (1983). The hal locus in the Belgian pietrain pig breed: *Tierzuchtg Zuchtgsbiol.*; 100:123-133.
48. Harrison G. (1981). La Hiperemia maligna porcina. *Int. Anesth. Clin.* 17(4): 19-47.
49. Hemsworth P. H., Coleman G. J. (1999). Human-Livestock Interactions: The stockperson and the productivity and welfare of intensively farmed animals. En: *Human-Animal Interactions and Animal Productivity and Welfare*. Wallingford: CABI Publishing; 3:39-61.

50. Hoenderken R. (1976). Improved system for guiding pigs for slaughter to the restrainer, *Fleischwirtsch.*, 56(6):838-839.
51. Honkavara M. (1990). Effect of PSE pork on the processing properties of cooked meat products. *Fleischwirtsch.*, 2: 43-44.
52. Houde A., Pommier A.S., Roy R. (1993). Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in pure bred swine populations. *J. Anim. Sci.*; 71: 144-1418.
53. Huang C.Y., Mikel W.B., Jones W.R. (1997). Carrageenan influences on the characteristics on restructure normal and pale, soft and exudative hams. *J. Muscle Foods*, 8(1): 85-93.
54. INAC (2012). Instituto Nacional de Carnes (Uruguay). Anuarios estadísticos. Disponible en: [http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/7713/1/agricola\\_con\\_tapa\\_frente\\_y\\_dorso.pdf](http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/7713/1/agricola_con_tapa_frente_y_dorso.pdf) Fecha de consulta: 23/03/2013
55. King J., Denborough M. (1973). Anesthetic-induced malignant hyperpyrexia in children. *J. Pediatr.*, 83: 37-40.
56. Klug W., Cummings M., Spencer C. (2006). *Conceptos de Genética*. 8ª ed., Madrid. Pearson; 920 p.
57. Kusina N.T., Sachikonye S., Kusina J., Ndiweni P., Waran N. (2003). Effect of on-farm treatment, transport and lairage times on bruising in slaughter pigs in Zimbabwe. *Pig J.*; 52:91-97.
58. Lee C.Y., Kim D.H., Woo J.H. (2004). Effects of stocking density and transportation time of market pigs on their behaviour, plasma concentrations of glucose and stress-associated enzymes and carcass quality. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*; 17(1):116-121.

59. Leheska J.M., Wulf D.M., Maddock R.J. (2003). Effects of fasting and transportation on pork quality development and extent of post mortem metabolism. *J. Anim. Sci.*; 80 (12):3194-3202.
60. MacLennan D.H., Duff C., Zorzato F., Fujii J., Philips M., Korneluk R.G., Frode W., Brit B.A., Worton R.G. (1990). Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*; 343 (6258): 559-561.
61. Martinossi, A. (1984). Mechanism of Ca release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle *Physiol Rev.* 64: 1240-1320.
62. Miller J. (1999) Hyperthermia and hypothermia. En: Ettinger S., Feldman. W.B. (ed.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia, Saunders, p. 6-9.
63. Milligan S. D., Ramsey C. B., Miller M. F., Kaster C. S., Thompson L. D. (1998). Resting of pigs and hot fat trimming and accelerated chilling of carcasses to improve pork quality. *J. Anim. Sci.*; 76: 74–86.
64. Mitchell G., Heffron, A. (1982). Porcine stress syndromes. *Adv, Food Res.*; 28: 167-230.
65. Montenegro (2012). Caracterización genética de los Pampa Rocha del Uruguay. Tesis de Mestría. Uruguay, Universidad de la República. PEDECIBA, 118p.
66. Montenegro M., Castro G., Barlocco N., Llambí S. (2010). Frecuencia alélica del Síndrome de Estrés Porcino en Uruguay (análisis por PCR-RFLP). *Veterinaria*, Montevideo, 46(177-178-179-180): 23-26.
67. Montenegro M., Artigas R., Gagliardi R., Castro G., Llambí S. (2009). Primer diagnóstico molecular del síndrome de estrés porcino en Uruguay (técnica de PCR-RFLP). 6as Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay, 128 p.

68. Murray A.C., Johnson C.P. (1998). Impact of halothane gene on muscle quality and preslaughter deaths in Western Canadian pigs. *Canadian J. Anim. Sci.*; 78:543-548.
69. O'Brien P., Shen H., Cory R., Zhang X. (1993). Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) on 10,000 breeding swine. *JAVMA*; 203:842-851.
70. O'Brien P., PooK H., Klip A., Brito B., Kalow B., McLaughlin R., Scout E., Elliott M. (1990). Canine stress syndrome/malignant hyperthermia susceptibility: calcium/homeostasis defect in muscle and lymphocytes. *Res. Vet. Sci.*; 48(1): 124-128.
71. Otsu K., Khanna V., Archibald L., MacLennan D. (1991). Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. *Genomics*; 11:744-750.
72. Padilla J., Portilla F., Salazar J., Parejo J., Martínez-Tracón M., Rabasco A., Sansiforiano M., Corral J., Izquierdo M., Hernández-García F. (2010). Detección múltiple de SNPs relacionados con crecimiento y calidad de carne en porcino. *Arch. Zootec*; 59:1-12.
73. Pommier S., Pomar C., Godbout D. (1998). Effect of the Halothane genotype and stress on animal performance, carcass composition and meat quality of crossbred pigs. *Can J. Anim. Sci.*, 78: 257-264.
74. Pond W., Haner J., Harris D. (1991). *Pork as Human food. Pork Production systems Efficient use of Swine and Feed Resources.* New York, Reinhold, 41 p.
75. Puentes Martínez, Pérez Ede. T. (2007). Canalopatías en veterinaria: dos ejemplos de interés. *Rev. Compl. Cienc. Vet.* 1(2): 603-611.

76. RSPCA, 2012. Welfare standards for pigs. Disponible en la web: <http://www.rspca.org.uk/ImageLocator/LocateAsset?asset=document&assetId=1232729716304&mode=prd> Fecha de consulta: 2/08/2013
77. Sei Y., Brandom B. (1992). Papiers with malignant hyperthermia demonstrate an altered calcium, *Science*; 8:789-94.
78. Spensley J.C., Wathes C.M., Waron N.K., Lines J.A. (1995). Behavioral and physiological responses of piglets to naturally occurring sounds. *Applied Anim. Behav. Sci.*; 44:277.
79. Sterle J. (2000). Elimination of the porcine stress gene. Disponible en la web: <http://animalscience-extension.tamu.edu> Fecha de Consulta: 20/05/2013.
80. Troeger K., Woltersdorf W. (1989). Measuring stress in pigs during slaughter, *Fleischwirtsch*; 69(3):373-376.
81. Vadell A. (2011). Los cerdos criollos en el ecosistema de los palmares de Rocha. En Situación y conservación de recursos zoogenéticos porcinos. Curso-taller de Posgrado. Facultad de Veterinaria-UdelaR, Montevideo, Uruguay; p. 27-30.
82. Vadell A., Barlocco N., Methol R., Vaselli M., Castillos A. (1994). Diagnóstico de la producción porcina en el departamento de Rocha. Uruguay, Universidad de la República, PROBIDES (Programa de la biodiversidad y desarrollo sustentable de los humedales del este), 44 p.
83. Velazco J. (2001a) Aspectos importantes en la medición del pH. *Carnetec Jul-Ago*: 48-51.
84. Velazco J. (2001). Prevención de PSE en carne de cerdo. *Carnetec Nov-Dic*: 28-34.
85. Velazco, J. (2000) Problemas de Calidad en el Sacrificio de Porcinos. *Carnetec Mar-Abr*: 22-25.

86. Warriss P. (1995). Métodos para evaluar la calidad de la carne de cerdo. Carnetec Sep: 18-24.
87. Warriss P.D. (1998). Choosing appropriate space allowances for slaughter pigs transported by road: A review. *Vet. Rec.*, 142: 449-454.
88. Warriss P.D. (1987). The effect of time and conditions of transport and lairage on pig meat quality. En: Tarrant PV, Eikelenboom G, Monin G (Eds.). *Evaluation and Control of Meat Quality in Pigs*. The Netherlands: Martinus Nijhoff Pub., p. 245-264.
89. Webb A.J., Jordan C. (1978). Halothane sensitivity as a field test for stress susceptibility in the pig. *J. Anim. Prod.*; 26:157-158.
90. Webster A.J.F. (1998). Assessment of Welfare State: The "Five Freedoms". *Naturwissens-chaften*; 85:262-269.
91. White R.G., DeShazer J.A., Tressler C.J., Borchert G.M., Davey S., Warninge A., Parkhurst A.M., Milanuk M.J., Clems E.T. (1995). Vocalizations and physiological response of pigs during castration with and without anesthetic. *J. Anim. Sci.*; 73:381-386.
92. Zucch R. (1995). Effect of Ischemia and reperfusion on cardiac ryanodine receptor sarcoplasmic reticulum Ca<sup>++</sup> channels. *Cir Res.*; 74(2): 271-280.

## ANEXOS

### Planilla de encuesta

- Su objetivo es investigar acerca de la realidad que enfrentan las plantas de faena de nuestro país en relación a la presencia de carnes PSE, para ser parte del desarrollo de una tesis de grado, por lo que resulta primordial que los datos obtenidos sean un reflejo de la realidad.
- Está destinada a los Veterinarios de las Industrias Frigoríficas de suinos que realizan más del 90% de la faena total de cerdos del país.
- **Los resultados obtenidos serán confidenciales.**
- Desde ya, estamos muy agradecidos por su colaboración.

## 1-Ayuno en la granja

1.1) El mayor porcentaje de animales presenta un ayuno previo a la carga de:

- más de 12 hs
  - de más de 8 hs a 12 hs
  - de 4 a 8 hs
  - menor a 4 hs
  - no se realiza ayuno
- |  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

1.2) ¿Existe conocimiento por parte de los productores de la importancia del manejo de los animales durante su carga?

- si
  - no
- |  |
|--|
|  |
|  |

## 2-Transporte

2.1) La distancia promedio recorrida por los vehículos que llegan a la planta de faena es:

- < a 50 km
  - entre 50 y 100 km
  - más de 100 hasta 150 km
  - > a 150 km
- |  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |

2.2) La duración promedio del transporte es de:

- < de 30 min
  - entre 30-60min
  - más de 60 hasta 120 min
  - > de 120 min
  - no existe un control de la duración
- |  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

2.3) En el camión la mayoría de los cerdos son distribuidos en compartimientos en grupos de:

- 4-5 animales
- más de 5 a 10 animales
- > de 10 animales
- no vienen divididos en grupos


2.4) ¿Usted piensa que la densidad de los animales durante el transporte no es una variante que se controla en nuestro país?

- si
- no


En caso de responder NO, la densidad promedio es de: .....  
m<sup>2</sup>/100kg

2.5) ¿En días de altas temperatura y humedad se modifica la densidad de los animales cargados?

- si
- no


Si la respuesta es SI, ¿de que forma?

.....

.....

.....

.....

2.6) En general, el tipo de carreteras que recorren los transportistas son consideradas:

- muy buenas
  - buenas
  - malas
  - muy malas
- |  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |

2.7) El uso de picanas eléctricas o palos por parte de los transportistas es:

- Muy frecuente
  - poco frecuente
  - ausente
- |  |
|--|
|  |
|  |
|  |

2.8) El porcentaje de animales caídos o agitados que llegan al frigorífico es:

- < a 1%
  - entre 1-3%
  - más de 3 a 6%
  - más de 6 a 10%
  - > a 10%
- |  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
- Otro (indicar %)......

2.9) En días calurosos y de mayor humedad la presencia de animales caídos o agitados es:

- mayor
  - igual
  - menor
- |  |
|--|
|  |
|  |
|  |

2.10) Los animales muertos durante el transporte representan una cantidad de:

..... animales/año

2.11) En general, el estado de los vehículos que transportan cerdos hacia las plantas de faenas son consideradas:

- Excelente
- Bueno
- regular
- muy malo


### 3-Descarga

3.1) Se realiza en un tiempo promedio de: ..... minutos

3.2) La rampa de desembarque presenta un ángulo de:

- < a 20°
- 20°
- > a 20°
- no existe un control del mismo


3.3) Durante la descarga los animales van bajando en grupos de:

- 4-5animales
- más de 5 a 10 animales
- > 10 animales
- bajan a todos a juntos


3.4) ¿Se usan picanas eléctricas durante alguna etapa del manejo de los cerdos en el frigorífico?

- si
- no

En caso de contestar SI, se usan picanas eléctricas en la/s etapas de.....  
.....

3.5) Durante la descarga ¿es común la presencia de cerdos lesionados?

- si
- no

En caso de contestar si, el porcentaje de cerdos que presentan lesiones corresponde a: ..... %

#### 4-Ante mortem

4.1) El tiempo de ayuno de los animales en las plantas de faena es:

- < a 12hs
  - 12-16hs
  - más de 16 a 24hs
  - > a 24hs
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 

4.2) La superficie de los corrales de espera corresponde a:.....m<sup>2</sup>.

4.3) En los corrales de espera los cerdos son divididos en grupos de:

- < a 10 animales
- 10-15 animales
- > a 15 animales

4.4) ¿Se mezclan cerdos de diferentes orígenes?

- si
- no

4.5) La presencia de cerdos agitados o caídos durante los corrales de espera representa una cantidad de..... %

4.6) ¿Existen cursos de capacitación de buenas prácticas para el personal que maneja los cerdos?

- si
- no

4.7) En referencia a las instalaciones del frigorífico, ¿el piso presenta rejillas en todo el recorrido que realizan los cerdos hasta la caja de noqueo?

- si
- no

¿Las mangas son curvas?

- si
- no

¿Existe la presencia de salientes?

- si
- no

4.8) La existencia de vocalizaciones de cerdos desde su llegada hasta la insensibilización corresponde a un porcentaje de: ..... %

4.9) La presencia de muertes súbitas en cerdos durante el manejo ante mortem corresponde a un porcentaje de.... %

### 5-Insensibilización

5.1) ¿Se utiliza la descarga eléctrica como método de insensibilización?

- si   
- no

5.2) En caso que su respuesta anterior sea positiva, ¿Qué característica posee la descarga?

..... voltios  
..... amperes

Duración: .... segundos/cerdo

5.3) ¿Se realiza un control riguroso de la pérdida de conciencia de cada cerdo luego del método de insensibilización realizado?

- siempre   
- a veces   
- nunca

## 6-Post mortem

6.1- La existencia de lesiones en la canal de los cerdos faenados se considera:

- leve
- moderada
- severa
- no existen lesiones


6.2- La región que más lesiones presentan las canales afectadas es:

- los miembros anteriores y la cabeza
- la región media y posterior de la canal
- ambas


6.3) En un día de faena común, ¿qué porcentaje de canales corresponde a cada rango de pH?

- pH  $\leq$  a 5.8.... %
- Ph 5.9-6.2.... %
- pH  $\geq$  a 6.3.... %

6.4) El porcentaje de mermas corresponde a:

- < a 2.5%
- 2.5-3%
- > a 3%


6.5) La presencia de carnes PSE se da con mayor frecuencia en cerdos:

- machos
- hembras
- animales con mejor conformación
- animales con mayor conformación
- animales de mayor peso
- animales de menor peso
- adultos
- jóvenes


6.6) ¿En cuales cortes se ha constatado la presencia de carnes PSE?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

6.7) ¿En cual/es cortes es más frecuente la presencia de carne PSE?

.....  
.....

6.8) La incidencia de carnes PSE en cerdos faenados es de.... %.

6.9) En que raza/s se presenta con mayor incidencia la presencia de carnes PSE?

.....  
.....  
.....  
.....

6.10) ¿Qué manejo realiza el frigorífico con las carnes PSE?

6.11) ¿Se realiza algún tipo de pruebas de Laboratorio en este tipo de carnes? ¿Qué tipo y cuáles son sus resultados?

6.12) ¿Cuál es el destino de las carnes PSE?