

DetECCIÓN DEL POLIMORFISMO 1843 EN EL GEN RECEPTOR DE RYANODINA MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR-SSCP

Using PCR-SSCP for detecting polymorphism 1843 in the ryanodine receptor gene

Susan L. Castro-Molina¹, Manuel F. Ariza-Botero^{2*}

Marcela Ríos-Rodríguez^{3*}, Diana J. Moreno^{4**}, Germán H. Guerrero-Castillo⁵

¹Bacterióloga y Laboratorista clínico, ²MV, MSc, PhD, ³Lic. Biología, MSc. ⁴Bacterióloga y Laboratorista clínico ⁵Zootecnista profesor ocasional

*Grupo Genética Molecular Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia sede Bogotá Universidad Nacional de Colombia.

**Estudiante de doctorado. Universidad de Antioquia, Medellín.
Email: mfarizab@unal.edu.co

Recibido: Octubre 20 de 2010. Aceptado: Junio 22 de 2011

RESUMEN

El síndrome de estrés porcino (PSS), es una enfermedad genética causada por una mutación puntual dentro del gen que codifica para el receptor de la Rianodina (RYR-1), considerándose una anomalía autosómica recesiva. El PSS, también conocido como hipertermia maligna, se caracteriza por causar la muerte de los animales y una disminución de la calidad de sus productos cárnicos, produciendo canales pálidas, suaves y exudativas (PSE). En los animales genéticamente susceptibles el síndrome se presenta cuando son expuestos a anestésicos como el halotano o bajo condiciones que generen estrés, como el transporte, hacinamiento o la copula. En Colombia es muy poca la información que existe acerca de la incidencia y presencia de este síndrome.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia del alelo mutado T en una población de la granja Marengo perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia con el fin de identificar aquellos individuos susceptibles al síndrome. Un total de 50 cerdos (27 machos y 23 hembras) fueron seleccionados por un muestreo no probabilístico por conveniencia. Para los machos la frecuencia genotípica para el genotipo C/C fue 0.59, 0.37 para el genotipo C/T y de 0.04 para el genotipo T/T, y para las hembras 0.65 para el genotipo C/C, 0.13 para C/T y de 0.22 para T/T. Un total de 31 (62 %) individuos fueron considerados sanos (C/C), 13 (26 %) portadores (C/T) y seis susceptibles (12 %) (T/T). Las frecuencias alélicas para C y T fueron de 0,75 y 0,25 respectivamente. El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg mostró que la población se encuentra en desequilibrio genético ($p \leq 0.05$). Los resultados obtenidos mostraron la presencia del alelo responsable por el síndrome, factor de gran importancia para ser tenido en cuenta para el establecimiento de los correspondientes programas de mejoramiento animal, mediante el empleo de la selección asistida por marcadores de ADN.

Palabras claves: Mutación, PCR-SSCP, RYR1, síndrome de estrés.

ABSTRACT

Pig stress syndrome (PSS) is a genetic disease caused by a nucleotide mutation in the RYR-2 gene encoding the ryanodine receptor (RYR-1), considered an autosomal recessive condition. PSS, or malignant hyperthermia, is characterised by the lowering of meat quality and animal death, leading to a pale, smooth and exudative (PSE) carcass. The syndrome is triggered in genetically-susceptible individuals either by anaesthetic agents, like halothane, or stress conditions, such as transport, crowding and mating. Information about this syndrome's incidence and presence in Colombia is currently quite scarce.

This study was aimed at determining the presence of the RYR-I T-allele in a porcine population from the Universidad Nacional de Colombia's Marengo farm to identify individuals which were more susceptible to the syndrome. A total of 50 pigs (27 males and 23 females) were selected at random. CC genotype frequency for males was 0.59, 0.37 for the CT genotype and 0.04 for the TT genotype; in females this was 0.65 for the CC genotype, 0.13 for CT and 0.22 for TT. A total of 31 (62 %) individuals were considered healthy (CC), 13 (26 %) were carriers (CT) and six (12 %) were susceptible (TT). C and T allele frequency was 0.75 and 0.25, respectively. Hardy-Weinberg equilibrium comparison tests revealed that the population was in genetic disequilibrium ($p \leq 0.05$). The results did show the presence of the allele responsible for the syndrome; this is a very significant factor to be considered when establishing an appropriate animal breeding programme by using marker-assisted selection.

Key words: Porcine stress, mutation, PCR-SSCP, ryanodine receptor gene.

INTRODUCCIÓN

Una mutación puntual ha sido descrita en el gen que codifica para el receptor de rianodina tipo 1 (RYR1), la cual es la causante del desorden hipermetabólico y fisiopatológico del músculo esquelético conocido como síndrome de estrés porcino (PSS) o hipertermia maligna (HM) (Fujii *et al.*, 1991), esto se refleja en características asociadas con la calidad de la carne y sus subproductos, caracterizándose por una disminución del pH, deficiente retención de agua, afectando la desnaturalización proteica en el músculo postmortem, dándole una apariencia a la carne pálida y una consistencia suave y exudativa (PSE), lo que en términos productivos representa grandes pérdidas económicas ya que en el proceso de comercialización estas carnes son decomisadas (Bonelli & Schifferli, 2001).

El gen RYR1 se encuentra ubicado en el cromosoma 6 porcino donde se ha identificado un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la posición 1843 remplazando una Citosina por una Timina C/T, alterando la secuencia de aminoácidos

Arginina (Arg) por Cisteína (Cys) (Beja-Pereira, Bento, Ferrand, & Brenig, 2001; Fujii *et al.*, 1991; MacLennan & O'Brien, 1995). La contracción del músculo estriado depende de la liberación de Ca^{++} de las cisternas terminales (TC) del retículo sarcoplásmico (SR) a través de los canales de liberación de calcio del receptor de rianodina (RyR) la sustitución de Arg 615 por Cys es responsable del síndrome de HM en todos los cerdos susceptibles (Gallant, Curtis, Pace, & Dulhunty, 2001), ocasionan un aumento descontrolado de los niveles de calcio intracelular del músculo esquelético dando lugar a una hiperactividad del músculo, agotamiento de las reservas de ATP y glucógeno y la excesiva formación del dióxido de carbono, ácido láctico y de calor. Esta termogénesis, conjuntamente con la vasoconstricción periférica, conduce a la expulsión de cantidades grandes de potasio del músculo y del hígado en el compartimiento vascular. La hipercalcemia resultante contribuye a la presentación de la distrofia cardíaca y el subsecuente paro cardíaco (Riojas Valdés *et al.*, 2005). Esta anomalía hereditaria es considerada como autosómica recesiva donde el

alelo normal es dominante sobre el mutado de manera que la enfermedad implica la expresión de los dos alelos homocigotos recesivos y en los heterocigotos el alelo que presenta el SNP, establece el estado de portador (Aranda, 2002).

Antiguamente, el diagnóstico de esta enfermedad se realizaba con la prueba del halotano, el cual es un anestésico volátil capaz de desencadenar los síntomas característicos del PSS (Rempel *et al.*, 1993) Cuando este anestésico es aplicado en un cerdo homocigoto recesivo el animal habitualmente muestra un temblor rápido de la cola, rigidez general, acompañada de incremento en la rigidez muscular, y disnea hasta el punto de respirar por la boca, elevación de la temperatura corporal, piel con palidez y eritema (Gallant *et al.*, 2001; Neira, 1993). Sin embargo, por este método no era posible identificar los individuos heterocigotos pues estos no presentaban síntomas (Houde, Pommier, & Roy, 1993). Posteriormente, con el adelanto en el uso de técnicas de ADN recombinante los investigadores implementaron su uso con la técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismo de longitud de fragmentos de digestión (PCR-RFLP) método de diagnóstico que logro identificar la variación de secuencias de ADN (un simple cambio nucleotídico C/T) mediante la utilización de endonucleasas de restricción (Fujii *et al.*, 1991), método confiable pero muy costoso. Luego entre otras técnicas aparece, la detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple, (SSCP), método diagnostico más económico, fácil y rápido que no requiere enzima de restricción ni gel de agarosa. La diferenciación de los fragmentos es debida a la distinta conformación que adoptan las cadenas de ADN en función de su secuencia de nucleótidos (Hayashi, 1991). Estas técnicas permiten la detección de animales sanos, enfermos y portadores con una seguridad del 100 % (Nakajima *et al.*, 1996; Savov, Angelicheva, Jordanova, Eigel, & Kalaydjieva, 1992; Sunnucks *et al.*, 2000).

El PSS se presenta en todo el mundo, encontrándose una diferenciación en cuanto a la frecuencia en las razas y naciones. En algunos

países de Europa este síndrome se ha incrementado durante los últimos años. La enfermedad posiblemente está presente en todas las razas porcinas, pero es más frecuente en animales que poseen una gran masa muscular, crecimiento más acelerado y más carne magra (Ta & Pessah, 2007). La mayoría de estos animales pertenecen a las razas Landrace, Pietrain, Poland China, Yorkshires, se cree que estas razas propagaron la mutación entre otras razas domesticas (P. J. O'Brien, 1995). En el estudio realizado por (P. O'Brien, Shen, Cory, & Zhang, 1993) en Estados Unidos, Inglaterra y Canadá encontraron que la prevalencia de la mutación fue de 35 % en Landrace, 19 % en Yorkshire y Large White, 15 % en Duroc, 14 % en Hampshire y 97 % en Pietrain En Colombia es muy poca la información que existe acerca de la incidencia del síndrome; en un estudio realizado por Trujillo *et al* (2001) detectaron un solo animal homocigoto para la mutación en una población de 29 cerdos en dos explotaciones porcícolas cercanas a la ciudad de Medellín mediante la técnica de PCR-RFLP y (Hernández, Terranova, & Flórez, 2008) identificaron la presencia de 3 animales homocigotos para la mutación entre los 135 cerdos criollos Colombianos analizados mediante la técnica de PCR-SSCP y PCR-RFLP.

En Colombia el ganado porcino es una de las especies ganaderas que ha sufrido una mayor transformación en los últimos años, según el estudio de la FAO (2009). El consumo de carne de cerdo registró un crecimiento importante del 45 % durante el período comprendido entre los años de 1997 al 2007. Los progresos conseguidos en los aspectos de crecimiento, eficiencia alimentaria y en la calidad de la canal han sido muy importantes (Tibau y Soler, 1999). Actualmente el sector porcícola Colombiano tiene como objetivo la búsqueda de mejorar su competitividad, para esto se pretende crear la cultura exportadora, donde los porcicultores se encuentran trabajando arduamente con el fin de cumplir con las necesidades del consumidor, ofreciendo excelentes productos cárnicos, cumpliendo con normas de calidad e implementando programas de diagnostico genético

indispensables para alcanzar mejores niveles de competitividad y ponerse a la vanguardia de la industria porcina a nivel mundial.

El objetivo de la presente investigación consistió en identificar las frecuencias alélicas de la mutación puntual 1843 en el gen receptor de la rianodina asociado al síndrome de estrés porcino, mediante el uso de la técnica de PCR-SSCP como método

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

En el presente estudio fueron seleccionados 50 lechones de un cruce comercial (Duroc x Pietran x Landrace), por medio de un muestreo no probabilístico por conveniencia entre los 23 y 60 días de nacidos, cuyo peso aproximado fue de 1.4 a 30 kg, provenientes de la granja Marengo, Mosquera, Cundinamarca ubicada a 2543 msnm, con una temperatura media anual de 14.1°C una precipitación media de 637 mm/año y humedad relativa del 70 %.

Condiciones de PCR

La extracción de ADN fue realizada a partir de sangre de acuerdo a los protocolos propuesto por el Laboratorio de Genética Veterinaria de la Universidad de California, Davis, CA 95616, modificado por Yves Amigues, INRA, Jouy-en-Josas

Un fragmento de 659-pb perteneciente al gen RYR1 (accesión Number [X69465.1](#)) fue amplificado por medio de la técnica de PCR, empleando los siguientes iniciadores: RYR1-pf5-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3'y RYR1-pr5'TTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAGT-3(Nakajima et al., 1996; Paraksa, Wajjwalku, Saelim, Kessank, & Meksongsee, 1996). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µL. Las reacciones consisten en 1X de Buffer de PCR, MgCl₂ a una concentración final de 2.5 mM y 1.25mM de concentración para cada uno de los dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) más 0.3 unidades de ADN polimerasa Tth (*Thermus thermophilus*) y 0.2 mM de cada cebador (delantero y marcha atrás) así como 50 ng de ADN genómico porcino. Las muestras

diagnostico molecular alternativo en una población de cerdos comerciales pertenecientes a la Granja experimental de Marengo de la universidad Nacional de Colombia sede Bogota. Permitiendo brindar el servicio diagnostico a la granja y así identificar los animales portadores del alelo mutado y eliminarlos de los programas de selección genética y programas de crianza, y de esta manera contribuir con el mejoramiento de las condiciones actuales de producción y productividad de la piara.

fueron amplificadas bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95°C por 3 min; 30 ciclos de denaturación de 95°C por 30 seg; anillamiento 60°C por 1 min y 30 seg; extensión 72°C por 1 min y 1 ciclo de extensión final 72°C por 10 min y 1 ciclo de estabilización de 30°C por 30 segundos en un termociclador Omnigen (USA). Los fragmentos amplificados fueron evaluados en agarosa al 2.0 % y visualizadas usando bromuro de etidio el corrido se realizo a 80V por 40 minutos en buffer TBE1X.

Genotipificación

Se realizo mediante el uso de la técnica de PCR-SSCP. Una vez amplificadas las muestras se les adiciono buffer de carga que contiene azul de bromofenol al 1 %, xilen cyanol al 1 %, y glicerol al 50 %. La mezcla se desnaturizo a 95 °C por 5 minutos y -20 °C por 5 minutos. Posteriormente, 12ul de la mezcla fueron corridas en geles de poliacrilamida al 5 % (49:1 acrilamida-bisacrilamida) a una temperatura 3 °C, 25W por 5 horas en buffer TBE1X. Los fragmentos fueron visualizados por medio de tinción de plata.(Hayashi, 1991; Nakajima et al., 1996; Savov et al., 1992) tres de las 50 muestras con corridos diferentes en acrilamida, fueron confirmados sus genotipos mediante PCR-RFLP con la enzima de restricción Alw21I. Los productos de PCR digeridos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y visualizados usando bromuro de etidio evidenciándose los tres genotipos buscados CC, CT, TT estas muestras fueron usadas como controles para los PCR-SSCP.

Análisis Estadístico

La estimación de las frecuencias, alélicas, genotípicas y la evaluación del equilibrio de Hardy-

Weinberg (HW) se realizaron usando el programa GenAlEx versión 6.3 (Peakall, R. *et al.*, 2006)

RESULTADOS

Un fragmento de 659 pb correspondiente al gen receptor de la Rianodina fue amplificado a partir de las muestras de ADN de los 50 individuos (figura 1).

Estos productos de PCR fueron genotificados con el método de PCR-SSCP, identificándose tres genotipos C/C, C/T y T/T. (figura 2).

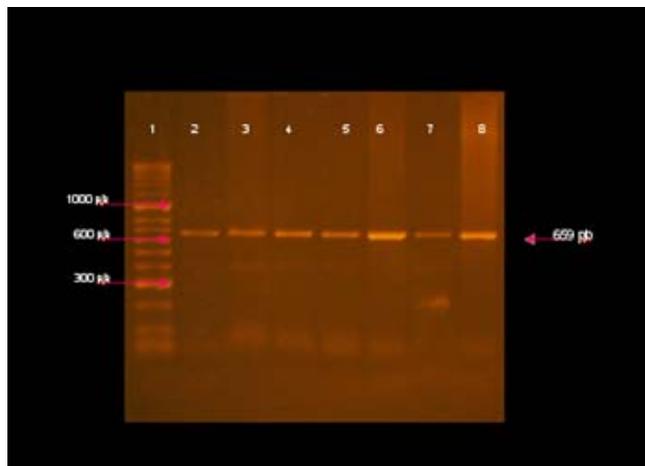


Figura 1. Visualización del producto de PCR en gel de agarosa. Carril 1: marcador de peso HiperLadder II, carriles 2 a 8: producto de amplificación de 659 pb, correspondiente al gen receptor de la Rianodina

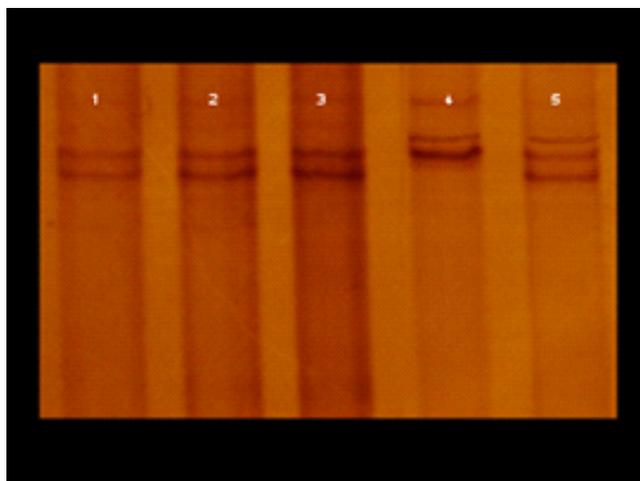


Figura 2. Gel de acrilamida Genotipos en el gen RYR1. Carriles 1,2 y 3 genotipo C/C, Carril 4 genotipo T/T y Carril 5 genotipo C/T.)

En los machos (27) la frecuencia genotípica fue: homocigoto dominante (C/C), 0.59; homocigotos recesivos (T/T), 0.04; heterocigoto (C/T), 0.37. En las hembras (23) la frecuencia genotípica fue: homocigoto dominante (C/C), 0.65; homocigotos

recesivos (T/T), 0.22; heterocigoto (C/T), 0.13. Para un total de 31 animales sanos (0,62), 13 portadores (0,26) y seis afectados (0,12). De acuerdo con el sexo, el alelo mutado T se presentó más frecuentemente en los machos (41 %) que en las

hembras (38 %), como consecuencia del gran número de machos portadores, no obstante, se presentaron más hembras afectadas que machos (Tabla 1).

Tabla 1. Número y frecuencia genotípica del síndrome de estrés porcino según el sexo

Genotipo	MACHOS			HEMBRAS			TOTAL		
	Numero	Frecuencia	%	Numero	Frecuencia	%	Numero	Frecuencia	%
C/C	16	0,59	59	15	0,65	65	31	0,62	62
C/T	10	0,37	37	3	0,13	13	13	0,26	26
T/T	1	0,04	4	5	0,22	22	6	0,12	12
TOTAL	27	0,54	54	23	0,46	46	50	1,00	100

Tabla 2. Frecuencia génica del síndrome de estrés porcino de acuerdo al sexo

	Machos		Hembras		Total	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
C	0,775	77,5	0,715	71,5	0,75	75
T	0,225	22,5	0,285	28,5	0,25	25

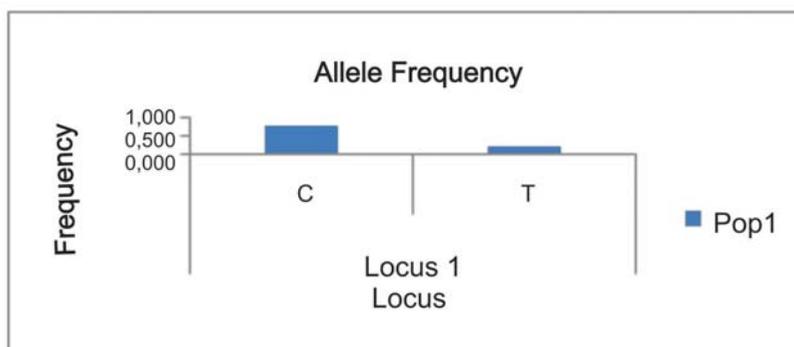


Figura 3. Frecuencia génica del síndrome de estrés porcino

Los valores estimados de la heterocigosis observada y esperada para el Gen RYR1 evaluado en cada uno de los animales se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Estimación de los valores de heterocigidad para polimorfismos del Gen RYR1

	<u>R</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>1</u>
<u>H</u> <u>o</u>	<u>0,26</u>
<u>H</u> <u>e</u>	<u>0,375</u>

Ho = Heterocigidad observada

He= Heterocigidad esperada

En el análisis de los valores de FIS (índice de fijación), se determinó que este valor para este locus

(RZR1) y para la presente población es significativo para el déficit de heterocigóticos (Tabla 4)

Tabla 4. Valores de FIS para el locus RZR1

RZR1	
FIS	0,307*

* significativa ($p \leq 0.05$)

DISCUSIÓN

En la presente investigación, se identificaron dos alelos para el locus RZR1. La frecuencia del genotipo C/C en los individuos sanos fue 0.62, en los portadores (C/T) fue de 0.26 y en los susceptibles (T/T) de 0.12. Estos hallazgos coinciden con los reportados en estudios como en el de Trujillo *et al* (2001) y el de Hernández *et al.*, (2008) en donde encontraron que en los animales sanos la frecuencia del genotipo C/C estuvieron entre el 0,62 y 0,67. En cuanto a los valores reportados para los portadores (C/T) los datos de este estudio concuerdan con los valores reportados por Hernández *et al.*, (2008) que fue entre 0,24 y 0,26 para razas criollas. Para el genotipo T/T los datos no concuerdan con lo reportado por Trujillo *et al* 2001 que encontraron una muy baja frecuencia (0,034).

Por otra parte es importante conocer la frecuencia de la mutación tanto en machos como en hembras, con el fin de llevar a cabo un eficiente programa de cruzamientos ya que estos animales podrían ser incluidos en programas de reproducción en la misma granja. Según el sexo, el alelo mutado T se presentó con más frecuencia en los machos (41 %) que en las hembras (38 %) teniendo en cuenta que el número de hembras fue menor muy probablemente la frecuencia del alelo mutado sea igual en ambos sexos. Cabe destacar que en la granja las hembras presentaron mayor frecuencia del genotipo TT (0,22) siendo más susceptibles a desarrollar el HM que los machos (0,04). Estos resultados concuerdan con el trabajo reportado por Riojas y col., 2005 quienes trabajaron con una población de 77 animales, 39 machos y 38 hembras de razas cruzadas para producción en Nuevo León México.

La frecuencia génica total para el alelo C fue del 75 % y un 25 % para el alelo recesivo T. Por lo tanto, los individuos enmarcados dentro de este 25 % deben ser excluidos de los programas de reproducción ya que muy posiblemente transmitirán a sus descendencias el alelo T, así que se reitera la introducción de animales portadores (CT) y susceptibles al síndrome (TT).

Los valores estimados tanto para la heterocigosidad observada como para la esperada fueron de 0,26 y 0,37 respectivamente, indicando un déficit de los heterocigotos ($p \leq 0.05$), lo que se confirma con el coeficiente denominado Fis, el cual mide el déficit o exceso de heterocigotos de una población. El Fis en la presente investigación fue de 0.31, cuando el Fis es cercano a cero implica que la población se encuentra en equilibrio de HW, pero con el resultado obtenido, la población no se encuentra en desequilibrio de HW esto puede deberse posiblemente a un alto grado de endogamia ya que en la granja en algunas ocasiones se realizan autoreemplazos lo que genera un alto grado de consanguinidad, además se utiliza un bajo número de parentales machos, lo que no permite un intercambio génico, provocando una desviación de las frecuencias genotípicas, incrementando la frecuencia de homocigotos y un descenso paralelo en la frecuencia de heterocigotos.

Los resultados encontrados indican la presencia del alelo T de susceptibilidad al síndrome de estrés porcino en las piaras objeto del presente estudio, por lo que se recomienda no incluir los animales portadores ni susceptibles en los programas de

reproducción y además establecer una prueba de rutina para los nuevos machos y hembras reproductores que ingresen a la granja.

Aunque el número de animales analizados en los estudios hasta ahora hechos en Colombia Trujillo *et al*/2001 (29 animales), Hernández *et al*/2008 trabajo con 100 Zungos, 21 San Pedreño y 14 Casco de Mula, y los 50 de este estudio es pequeño para estimar la frecuencia del gen del halotano, estos

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado por el laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ de la Universidad Nacional y la Universidad Colegio

REFERENCIAS

Davalos AG. (2002). Detección de QTLs de importancia económica y análisis de genes candidatos en poblaciones porcinas comerciales españolas. Trabajo de Grado. Departamento de Ciencias Animales y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona España.

Beja Pereira A, Bento P, Ferrand N, Brenig B. Genetic polymorphism of the 17th exon at porcine RYR1 locus: a new variant in a local Portuguese pig breed demonstrated by SSCP analysis. *J Anim Breed Genet.* 2001;118(4):271-274.

Bonelli A, Schifferli R. Síndrome Estrés Porcino. *Arch med vet.* 2001;33(2):125-135.

FAO. 2009. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estado mundial de la agricultura y la alimentación.

Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, MacLennan DH. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science.* 1991;253(5018):448.

Gallant EM, Curtis S, Pace SM, Dulhunty AF. Arg615Cys Substitution in Pig Skeletal Ryanodine Receptors Increases Activation of Single Channels by a Segment of the Skeletal DHPR II-III Loop.

resultados confirman la presencia del gen mutado en algunas de las razas usadas en el país; con este tipo de estudios se demuestra la bondad en la aplicación de pruebas genéticas específicas, sensibles y de bajo costo, las cuales le garantizan al productor un respaldo por parte del laboratorio de diagnóstico para implementar un plan de mejoramiento genético en el cual se facilitaría la eliminación tanto los animales portadores como los susceptibles.

Mayor de Cundinamarca se agradece a todas las personas que colaboraron en su realización.

Biophysical Journal, 80(4), 1769-1782. doi: 10.1016/s0006-. 2001;3495(01):76147-4

Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Res.* 1991;1(1):34.

Hernández DY, Terranova AMP, Flórez JEM. Detección de una mutación puntual en el gen receptor Ryanodina (Ryr 1) en cerdos criollos colombianos. *Acta Agron.* 2008;57(4):275-278.

Houde A, Pommier SA, Roy R. Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in purebred swine populations. *J Anim Sci.* 1993; 71(6):1414.

MacLennan D, O'Brien P. Diagnosis for porcine malignant hyperthermia. *Biotechnology Advances.* 1995; 13(4): 752-752.

Nakajima E, Matsumoto T, Yamada R, Kawakami K, Takeda K, Ohnishi A, Komatsu M. Technical note: use of a PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) for detection of a point mutation in the swine ryanodine receptor (RYR1) gene. *J Anim Sci.* 1996;74(12):2904.

Neira V. Hipertermia maligna. Estado del arte. *Rev Col Anest.* 1993;21(349).

- O'Brien P, Shen H, Cory C, Zhang X.. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. *JAVMA*, 1993;203(6):842.
- O'Brien PJ. (1995). The causative mutation for porcine stress syndrome. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*.
- Paraksa S, Wajjwalku W, Saelim S, Kessank P, Meksongsee L. (1996). Malignant hyperthermia in swine I. Detection comparing between PCR and halothane technique. *Witthayasan Kasetsart*, 30.
- Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6:288-295.
- Rempel W, Lu M, El Kandelgy S, Kennedy C, Irvin L, Mickelson J, Louis C.. Relative accuracy of the halothane challenge test and a molecular genetic test in detecting the gene for porcine stress syndrome. *J Anim Sci* 1993;71(6):1395.
- Riojas Valdés V, Canales J, Gómez de la Fuente J, Dávalos G, Hernández G, Salinas J.. Frecuencia alélicas del síndrome de estrés Porcino en Nuevo León, mediante análisis PCR-RFLP. *Vet Méx* 2005;36(3): 261-267.
- Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic acids research*. 1992; 20(24): 6741-6742.
- Sunnucks P, Wilson A, Beheregaray L, Zenger K, French J, Taylor A. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 2000; 9(11):1699-1710.
- Ta T, Pessah I. Ryanodine receptor type 1 (RyR1) possessing malignant hyperthermia mutation R615C exhibits heightened sensitivity to dysregulation by non-coplanar 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95). *Neurotoxicology*, 2007;28(4):770-779.
- Trujillo E, Camargo M, Noriega D. Búsqueda molecular de mutantes en el gen RYR-1 que predisponen al síndrome del estrés porcino, en Antioquia (Colombia). *Actual Biol* 2001;23(75):47-52.