

1. INTRODUCCIÓN

La eficiencia en la industria porcina está relacionada directamente con la productividad de las piaras y esta a su vez depende en gran parte de la superioridad genética de sus reproductores. Así, aquellos animales con un mayor valor genético estimado propician una mayor eficiencia productiva en la pira. Esta superioridad de los animales, manifestada en características reproductivas económicamente importantes, que generalmente se asocia con los progenitores machos (sementales), ha sido producto de intensos programas de manejo y selección, que han permitido identificar de forma clara y precisa a los mejores reproductores, los cuales son utilizados como padres de las siguientes generaciones (Duarte, 2001; Herrera *et al.*, 2003).

Los sementales (verracos) tienen mayor impacto que las hembras en la eficiencia y productividad de la pira debido a que se pueden aparear con un mayor número de ellas, ya que su influencia es multiplicada con el uso de la inseminación artificial. Debido a que los cerdos presentan una amplia variabilidad en las características de importancia económica para el productor, es necesario cuantificar la magnitud de esas diferencias entre los sementales, a manera de seleccionar a los que tienen mayor probabilidad de transmitir mejores características a su descendencia (Long, 1991; Rosas y Ávila, 1999; San Primitivo, 2001).

Los programas de mejoramiento genético que se realizan en diferentes granjas buscan de manera prioritaria modificar el patrón hereditario de las poblaciones, incorporando nuevos genes, para garantizar que el pie de cría seleccionado tenga

una mejor respuesta que el promedio de la población de la cual provienen, maximizando el número de lechones nacidos totales y destetados por animal; al mismo tiempo que satisface las necesidades y preferencias de la cadena porcina y del consumidor, lo cual se verá reflejado en una mejor economía de la empresa (Lush, 1961; Warwick y Legates, 1979).

La prolificidad de la cerda (número de lechones nacidos vivos) es una de las características reproductivas con mayor importancia económica en la producción porcina que depende de distintos factores con un efecto sucesivo limitante y de baja heredabilidad (Buxadé, 2000; Lemus *et al.*, 2005). Por ello, en la actualidad las investigaciones para hacer más eficiente la industria porcina comercial se apoyan en el análisis de la genómica molecular y en la selección asistida con marcadores (MAS), la cual ofrece la oportunidad de identificar genes relacionados con la superioridad reproductiva de la pira, permitiendo escoger en forma más precisa a los animales superiores, mismos que contribuirán significativamente a la variación dentro y entre las poblaciones de interés para el productor (Cunningham y Meghen, 2001; Romero, 2003).

Con el uso de marcadores moleculares se han logrado identificar genes asociados con características económicamente deseables para el criador de animales, permitiendo la selección de reproductores, con un mérito genético superior, en forma más precisa. Una vez identificados los alelos asociados con un carácter de interés, es posible trazar cual de los dos alelos de un progenitor será transmitido a su descendencia. Esta posibilidad de estimar la probabilidad de transmisión de alelos “favorables” o desfavorables” puede permitir en el futuro seleccionar o descartar

animales antes que ingresen a una unidad de producción (Canul *et al.*, 2005; Yáñez *et al.*, 2005), abriendo nuevas avenidas tecnológicas en la selección de cerdos.

Esta capacidad de identificar genes asociados con características de interés económico permite que la selección de reproductores se realice en una etapa temprana de la vida del animal, acortando el intervalo entre generaciones y maximizando el progreso genético por generación. La posibilidad de seleccionar sementales de líneas genéticas maternas, con un mérito genético positivo para una característica específica, sin la necesidad de medir la característica por sí misma (Cunningham y Meghen, 2001), como es el caso de la prolificidad que solo es expresada en las hembras, proporciona una nueva perspectiva en la selección de sementales como padres de futuras generaciones.

La selección de animales tradicionalmente ha utilizado técnicas de genética cuantitativa, basadas en la evaluación fenotípica individual y en genealogía de los reproductores, estimando con la información generada el mérito genético de los animales (Warwick y Legates, 1979). En la actualidad, aunado a estos métodos, se incorporan los marcadores moleculares basados en la técnica de PCR que consiste en la amplificación de una secuencia específica de un fragmento de ADN en una simple reacción enzimática a través de la enzima ADN polimerasa (taq polimerasa) y dos cebadores de extensión (primers), los cuales sintetizan el fragmento de ADN específico a partir de un ADN molde, constituyendo así una prueba de diagnóstico sensible y rápida (Henríquez *et al.*, 2002; Manson, 2003).

Actualmente existen diversos métodos de extracción de ADN que han sido desarrollados para diferentes especies algunos rápidos, eficientes y útiles en el aislamiento de ADN de alta calidad como los Kits de extracción comerciales; sin embargo, la mayoría de ellos son costosos y solo para un reducido número de muestras, por ello la necesidad de establecer metodologías de extracción de ADN rápidas, sencillas y de bajo costo que permitan la obtención de ADN genómico de buena calidad, libre de compuestos secundarios, proteínas y polifenoles, los cuales inhiben la reacción de amplificación de ADN (Romero, 2003; Molina *et al.*, 2006).

La tipificación y polimorfismo a partir de muestras de sangre y suero de porcinos, sigue siendo el estándar internacional para la obtención de ADN. Sin embargo, existen restricciones dentro de las diferentes regiones del país para la movilización de plasma sanguíneo, establecidas en la Norma Mexicana (NOM-007-ZOO-1994; NOM-037-ZOO-1995 y NOM-046-ZOO-1995), con el objeto de evitar la transmisión de enfermedades de zonas contaminadas a zonas libres, lo que imposibilita el traslado de muestras de sangre de un estado de la república a otro. En el caso de semen, es posible obtener muestras, pero en la práctica el criador de cerdos se niega a proporcionarlas, debido a que se requiere entrenar los animales para su extracción o por desconfianza en el uso de ese germoplasma, además de que dicho semen en ocasiones resulta ser una mezcla de dos o más sementales. Dado lo anterior, se plantea la necesidad de desarrollar una metodología alternativa que permita extraer ADN a partir de un tejido poco usual, como lo es el pelo del cerdo con su folículo piloso, técnica base de la presente investigación.

1.1. Objetivo general

El objetivo de la presente investigación consistió en estandarizar y perfeccionar la metodología (técnica) de extracción y purificación de ADN a partir de sangre, semen y pelo en sementales porcinos, valorar la eficiencia de cada una de las tres técnicas y evaluar la frecuencia de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP.

1.2. Objetivos específicos

- 1) Estandarizar técnicas de extracción de ADN a partir de sangre, semen y pelo de sementales porcinos.
- 2) Evaluar la pureza y calidad del ADN obtenido del pelo de sementales porcinos para su uso en estudios posteriores como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- 3) Evaluar la frecuencia de los genes ESR y PRLR, relacionados con la prolificidad, en sementales porcinos, utilizando técnicas de PCR-RFLP.

1.3. Hipótesis

La estandarización de técnicas de extracción de ADN en sementales porcinos permite evaluar su pureza y calidad, así como determinar la frecuencia de los genes ESR (estrógeno receptor) y la PRLR (prolactina receptor) asociados con la prolificidad de la pira por medio de la técnica PCR-RFLP.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

La aplicación de la genética cuantitativa en el mejoramiento de los animales domésticos, ha permitido obtener reproductores sobresalientes en características de importancia económica de interés al criador. Así, en la mayoría de las granjas porcinas mexicanas se evalúan y seleccionan hembras y sementales de reemplazo utilizando la información derivada del comportamiento individual del animal y de sus parientes cercanos. La calidad genética de un animal, expresada fenotípicamente es el resultado de diferentes combinaciones genotípicas y del ambiente en que se desarrollan (Falconer, 1981; Curtís *et al.*, 2001). La estimación del valor genético de un animal se realiza siguiendo procedimientos estadísticos basados en modelos mixtos, los cuales al incorporar información genealógica a la matriz de datos dan origen a diferentes modelos (Herrera *et al.*, 2003).

Las granjas porcinas incorporan a su base de datos información productiva, reproductiva, económica y de manejo general de la piara, además de pedigrí, la cual es capturada en programas diseñados ex profeso como el Pig Champ, mediante el cual se procesa la información, agregándola en índices como la tasa de concepción, tasa de fertilidad, tamaño de camada, % de retornos a estro y mortalidad, además de estimaciones del valor genético de todos los individuos en la piara, lo cual junto con los criterios de cada porcicultor definen los candidatos aptos a la selección, para finalmente elegir los mejores reproductores y realizar cruces entre ellos a fin de obtener una mejor progenie (Álvarez *et al.*, 2001; Theilgaard *et al.*, 2005).

Tradicionalmente la evaluación genética de reproductores, basado en la biotecnología de la reproducción porcina, ha estado representada en forma casi exclusiva por el empleo de la inseminación artificial, la criopreservación de gametos y embriones, la transferencia de embriones, la determinación del sexo de los espermatozoides y de los embriones, la producción *in vitro* de embriones, la transferencia nuclear vía microinyección, entre otros (Rodríguez, 2005). Sin embargo, durante los últimos 10 años, la genética molecular ha propiciado un avance muy importante en la evaluación de reproductores, mediante el desarrollo y aplicación de técnicas de análisis de ADN que han ayudado a identificar de forma eficiente las diferencias a nivel de secuencias nucleotídicas entre individuos (Davis y DeNise, 1998). Entre las técnicas básicas se incluyen la separación de los ácidos nucleicos de otros componentes celulares, caracterización de la secuencia de ADN, estudio de la expresión de los genes, manipulación genética, clonación de genes y otros como el análisis del genoma, desde la secuenciación, mapeo y determinación de polimorfismos (Manson, 2003).

Rothschild y Plastow (1999) señalan que la selección de animales sobresalientes esta actualmente relacionada con tecnologías de genética molecular apoyadas en la genética cuantitativa. Así, en la industria comercial porcina la selección asistida por marcadores genéticos (MAS) es una de las técnicas que se ha incorporado de manera activa en el diagnóstico e identificación de características de importancia económica en la producción de cerdos, como aquellas relacionadas con la reproducción, identidad genética, biodiversidad y genética funcional (San Primitivo, 2001). Existen otras técnicas como la transgénesis que se encuentra en sus inicios y

aunque ya se ha logrado tener descendencia viva a partir de ellas su aplicación comercial inmediata es limitada, debido a que la mayoría de las técnicas de genética molecular afrontan problemas en la obtención de suficiente cantidad de ácidos nucleicos para estudio y para la identificación de secuencias específicas de una mezcla compleja de secuencias (Manson, 2003).

Para efectuar un cambio genético en una población animal, con el fin de mejorar la producción y hacerla más rentable, el productor o criador de animales cuenta con dos herramientas: la selección adecuada de los progenitores, basándose en registros individuales, así como de sus parientes, y el diseño de cruzamientos de líneas puras o híbridas que optimicen la obtención del producto destinado al consumo (Falconer y McKay, 1996).

La selección porcina aprovecha la variabilidad genética de las poblaciones, seleccionando líneas maternas y paternas que incluyen a los mejores animales en función de objetivos predefinidos y adecuadamente valorados (Cañón y Muñoz, 1989). Las características motivo de selección no siempre son fáciles de medir, razón por la cual, es común utilizar otros caracteres asociados, los cuales deben ser económicos y fáciles de medir, además de estar correlacionados con los objetivos de selección (San Primitivo, 2001).

La elección de los objetivos de selección se realiza en función del impacto económico y la heredabilidad del carácter. La heredabilidad se define como la proporción de la variación fenotípica de un carácter que puede atribuirse a la variación genética aditiva (Falconer y McKay, 1996). Entre los objetivos de selección

se encuentran aquellos que influyen en las explotaciones de cría, como la prolificidad, ritmo reproductivo, longevidad y consumo de alimento (Tocagni, 1979).

2.1. Razas porcinas

Las razas más utilizadas en la industria porcina de acuerdo a sus aptitudes productivas, se pueden dividir en tres grupos principales (Tibau, 1992). El primer grupo caracterizado por su prolificidad y conversión alimenticia, esta compuesto por las razas; Large White, Landrace y Yorkshire. Estas razas se utilizan para producir hembras híbridas y machos finalizadores para mejorar calidad en la carne. El segundo grupo lo forman las razas Landrace, Belga y Pietrain, los cuales son menos prolíficas que las anteriores pero poseen una eficiente conversión alimenticia hasta llegar a 95 kg, poseen un porcentaje mayor de carne magra; sin embargo, son más sensibles al síndrome del estrés porcino. El tercer grupo lo integran las razas Duroc y Hampshire, que se caracterizan por su rusticidad, buena conformación, bajo consumo alimenticio y un elevado porcentaje de grasa intramuscular en la canal, pero presentan un desarrollo más lento a partir de los 45 kg, con tendencia al engrasamiento, motivo por el cual son utilizadas en cruzamientos con Large White y Landrace (Buxadé, 2000).

Raza Yorkshire. Desarrollada en Inglaterra, considerada la de mayor población y más difundida a nivel mundial. Es un animal largo, ancho y profundo, de buena alzada, con aspecto macizo, de cabeza menuda, cuello corto y con papada. Fácilmente reconocible por ser de piel totalmente blanca, con pelo del mismo color, sin ninguna mancha o marca sobre la piel, que es fina sin pliegues y con las orejas

erguidas. Es un animal con excelente instinto materno por lo que sus lechones tienen una buena supervivencia, la raza es considerada superior a todos los restantes tipos por su rapidez en el crecimiento, superada únicamente por la Meishan en cuanto a tamaño de camada. Los sementales de esta raza han supuesto el fundamento de la mayoría de los conjuntos de cerdos blancos y como raza es fundamental para la mayoría de los programas de cruzamiento orientados hacia la producción de las actuales hembras híbridas. En muchos países del mundo se usa ampliamente el macho para cruzamiento heterosanguíneo (Warwick y Legates, 1979; Haandel, 2004).

Raza Landrace. Es originaria de Dinamarca, su desarrollo comenzó alrededor de 1895, cuando fueron importados una serie de ejemplares de la raza "Large White" de Inglaterra, que al cruzarse con cerdos nativos de ese país originaron su variedad. Las bondades fueron tantas que se le crió en forma intensiva, convirtiéndose Dinamarca en un importante exportador de productos porcinos. En 1943 se exportó a Estados Unidos, por iniciativa del Departamento de Agricultura, en donde fue utilizada en sus estaciones experimentales, convirtiéndola en tronco generador de nuevas cruces porcinas. Son animales de piel blanca, cuerpo largo (entre 16 o 17 pares de costillas), flancos aplanados, orejas grandes caídas que cubren gran parte de la cara, cabeza alargada y un tanto angosta, cuartos traseros rellenos (algunos ejemplares poseen las patas traseras débiles), pezuñas largas y débiles. Las hembras son prolíficas y muy buenas madres, con gran producción de leche (alcanzan su máxima producción después de 5 semanas de lactancia). Este tipo de

cerdos blancos con orejas caídas, es la raza con mayor número de nacionalidades (Tocagni, 1979; Warwick y Legates, 1979; Haandel, 2004).

2.2. Factores que inciden en la mejora porcina

La mejora genética porcina se basa en el aprovechamiento de la variabilidad existente entre y dentro de los tipos genéticos, mediante la aplicación de distintos métodos de selección de caracteres productivos, cuya naturaleza depende del destino de los animales dentro del cruzamiento (San Primitivo, 2001). En la selección porcina ha sido posible observar grandes avances debido al corto intervalo generacional de la especie y al elevado número de crías producidas por camada. Los índices de herencia de los caracteres productivos seleccionados tienen magnitudes de media a alta y en su mayoría están altamente correlacionados en forma positiva (Soler *et al.*, 1999). Los programas de selección pueden ocasionar un incremento en la tasa de consanguinidad, como consecuencia de un reducido tamaño efectivo de la población, razón por la cual, los programas de mejora deben de iniciarse partiendo de un grupo numeroso de familias de un tipo genético determinado, ya que cuanto más pequeño sea el núcleo de selección, mayor será la tasa de consanguinidad (Falconer y McKay, 1996).

Las diferentes razas y líneas genéticas de porcinos actualmente en el mercado presentan aptitudes productivas que han sido diferenciadas en función de las estrategias de selección que se han aplicado en sus respectivos programas de mejora. De forma que una raza puede poseer características productivas con amplia variabilidad al momento de hacer la selección de los caracteres a mejorar, mientras

que otra puede poseer características muy definidas y por consecuencia su mejoramiento será menor, pero más preciso (Botstein *et al.*, 1980; San Primitivo, 2001). En ciertas razas se observan líneas portadoras de genes que pueden afectar de forma significativa la eficiencia en la transformación de alimento a carne magra.

2.3. Prolificidad de la piara

La prolificidad es un indicador de importancia económica en una piara que puede ser identificado en los sementales mediante marcadores genéticos moleculares y estar relacionado a la capacidad reproductiva de los mismos. Esta medida por el tamaño de camada al nacimiento cuya heredabilidad (h^2) oscila entre 0.05 a 0.15. Una de las causas de esta baja heredabilidad es la gran variabilidad del tamaño de camada (amplitud de 0 a 20), que es un carácter muy sensible a las condiciones ambientales. Su variabilidad fenotípica es 2 a 3 veces más elevada que la de los caracteres de crecimiento y de la canal (Tocagni, 1979; Falconer, 1981; Rotschild, 2003b).

2.4. Parámetros genéticos

2.4.1. Heredabilidad (h^2)

En el sentido estrecho, es considerada como el porcentaje de la varianza fenotípica de un carácter que puede atribuirse a la variación aditiva de genes. Los valores de los índices de herencia o heredabilidad para cada carácter oscilan entre 0 y 1 y son diferentes entre poblaciones y ambientes, por lo cual, los resultados no se pueden aplicar en otros estudios (Warwick y Legates, 1979; Falconer y McKay, 1996).

Cuadro 1. Heredabilidad de los caracteres económicamente importantes del cerdo.

Carácter	Heredabilidad promedio	
Edad de la pubertad	Media	30 a 40
Número de ovulaciones, 2o. estro	Media a Alta	40 a 50
Tamaño de camada al nacer	Baja	5 a 15
Tamaño de camada al destete	Baja	5 a 15
Peso de la camada al destete	Baja	10 a 20
Peso de cada cerdo al destete	Baja	10 a 20
Peso del cerdo a 140 y hasta 180 días de edad	Media	20 a 30
Tasa de aumento de peso posterior al destete	Media	25 a 40
Alimento por unidad de aumento	Media	30 a 40
Registros de la conformación y el tipo:		
Dentro de razas	Media	25 a 35
Entre razas	Alta	>40
Espesor de la capa de grasa en los animales vivos	Alta	40 a 60
Características de la canal		
Porcentaje de cubierta	Media	25 a 35
Longitud	Alta	40 a 60
Espesor de la capa de grasa	Alta	40 a 60
Espesor del vientre	Alta	40 a 60
Área del <i>longissimus dorsi</i>	Alta	40 a 60
Rendimiento de cortes magros	Media a alta	40 a 60
Rendimiento de jamón y lomo	Media	30 a 40
Color carne sin cocinar	Media	25 a 40
Número de tetas	Media	20 a 40

2.4.2. Repetibilidad (r)

La repetibilidad en el tamaño de la camada también es baja (0.15), es decir, que el parecido genotípico entre camadas sucesivas, de una misma cerda, es poco elevada. La utilización de verracos hiperprolíficos permite flanquear el inconveniente de los efectos maternos negativos que se expresan vía madre-hija y transmitir, por consiguiente, la superioridad genética a sus hijas. De esta forma verracos que tienen una superioridad genética de +1.2 lechones producirán hijas con una superioridad de +0.6 lechones (Warwick y Legates, 1979; Rodríguez, 2005).

2.4.3. Correlaciones genéticas

El coeficiente de correlación (r_{xy}) expresa el grado de asociación por efectos genéticos comunes a dos características, las cuales pueden variar entre poblaciones y estudios. Las correlaciones genéticas son explicadas principalmente por efectos pleiotrópicos de genes y ligamiento y son muy importantes en la mejora genética de una población, ya que indican que caracteres fenotípicos deben tomarse en cuenta para estimar los valores de otros caracteres estrechamente relacionados con ellos. Estas correlaciones se han estudiado en porcinos desde los años sesenta mediante pruebas efectuadas en lotes porcinos seleccionados (Warwick y Legates, 1979; Falconer y McKay, 1996).

2.5. Genes relacionados con prolificidad en cerdos

El énfasis actual de la biotecnología en la industria porcina se orienta a la necesidad de identificar de genes importantes que afectan el crecimiento y desarrollo,

comportamiento reproductivo, lactación y características de resistencia a enfermedades en los animales. Por ello, la identificación de variantes alélicas de genes que afectan caracteres cuantitativos, bien sea de una manera positiva o negativa, pueden usarse para maximizar el potencial genético de producción. La importancia de estas investigaciones es la de acelerar la tasa de progreso genético vía selección asistida por marcadores (Haley y Archibald, 1998; Da *et al.*, 1999).

Actualmente se conocen diversos genes cuya segregación de alelos esta estrechamente relacionada con caracteres productivos del ganado porcino, como los genes candidatos para tamaño de camada (ESR y PRLR).

2.5.1. Receptor de la prolactina (PRLR)

La prolactina (PRL) es una hormona hipofisaria, la cual, es la principal responsable del desarrollo de la glándula mamaria y la lactación. Sin embargo, tiene otras funciones reproductivas, especialmente en animales. En la glándula mamaria, la prolactina estimula la expresión de genes de la proteína de leche, para aumentar la transcripción genética y la vida media del RNAm. Su acción está involucrada en diferentes actividades endocrinas y es mediada por la unión a su receptor (PRLR). Se encuentra regulada en diferentes tejidos como en el hígado de la rata que es uno de los tejidos con alta unión a prolactina, siendo los niveles de receptor variables durante el ciclo del estro, incrementándose durante la preñez, estando marcadamente estimulados por los estrógenos (Houdebine *et al.*, 1985; Kelly *et al.*, 1989; Alonso, 2003).

En el cerdo, el gen PRLR se encuentra en el cromosoma 16 (Kelly *et al.*, 1989; Vincent *et al.*, 1997). Su locus esta ligado a 3 marcadores S0006 (LOD-10.29), GHR (6.35), S0077 (3.23), con una asignación regional de 16q1.4 o 16q2.2-2.3. Se ha descrito un polimorfismo en el exón 10 del gen PRLR que se ha asociado a un mayor número de lechones nacidos (Vincent *et al.*, 1998a; Tomas *et al.*, 2005). Además de su efecto en el tamaño de camada, se han descrito otros efectos de esta mutación en el número de tetinas, la edad a la pubertad y la tasa de ovulación (Birgitte, 2003); sin embargo, aun no se ha estudiado el efecto de PRLR en la viabilidad de los lechones al momento del nacimiento. En humanos, bajos niveles de prolactina sérica durante las semanas 31.5 - 37 de gestación se hallan asociados al síndrome de estrés respiratorio neonatal. También ha sido detectado en varios tejidos, incluyendo el cerebro, ovarios, placenta y útero de diversas especies domésticas (Tomas *et al.*, 2005).

Este gen se analizó mediante el método de mapeo por medio de la técnica PCR-RFLP para la detección del alelo, se descubrió un fragmento de 457 pb en PCR digerido con la enzima de restricción AluI. Los tamaños de los fragmentos generados fueron: 124, 110, 79, 77 y 67 pb. El polimorfismo fue dialélico (alelo A y alelo B), este se asoció con número de lechones nacidos totales, número de lechones nacidos vivos, mayor ovulación y aumento del número de células del cuerpo lúteo. Kelly *et al.* (1989) y Vincent *et al.* (1997) coinciden en que el alelo A es el favorable para obtener mayor tamaño de la camada. Vincent *et al.* (1998a) reportan que los animales con genotipo AA tienen +0.66 lechones por camada que el genotipo BB en las razas

Large White, Meishan y Landrace (Vincent *et al.*, 1998b; Ciubanu *et al.*, 2001; Birgitte *et al.*, 2003; Korwin *et al.*, 2003; Tomas *et al.*, 2005).

2.5.2. Estrógeno receptor (ESR)

Otro gen candidato para tamaño de camada es el gen Estrógeno Receptor (ESR); se localiza en el cromosoma 1p2.4-p2.5. Diversos investigadores han amplificado fragmentos de ESR con PCR y cortado con la enzima de restricción PvuII, localizando un polimorfismo dialélico con los alelos A y B (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997; Drogemuller *et al.*, 2001; Linville *et al.*, 2001; Isler *et al.*, 2002; Noguera *et al.*, 2003). Los resultados muestran que el alelo B aumenta el número de lechones nacidos vivos y totales (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997) y el peso de los lechones nacidos vivos y totales (Isler *et al.*, 2002). Además informan que la frecuencia del alelo B aumenta después del primer parto (Short *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que un alelo específico del gen receptor de estrógeno (ESR) está asociado con aumento del tamaño de camada (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997). Los estimados de efectos alélicos varían desde 1.15 lechones/camada en cerdas 50% Meishan hasta 0.42 lechones/camada en cerdas de líneas Large White. Estos resultados no han sido confirmados en análisis de QTL utilizando cerdas Landrace o Duroc (Drogemuller *et al.*, 2001; Noguera *et al.*, 2003) y en hembras de cruzamientos divergentes que involucraron las razas Meishan y Large White se han observado efectos opuestos en dirección y diferentes estadísticamente a los publicados previamente (Omelka *et al.*, 2005). Esto pudiera ser producto del

muestreo, o del hecho que los alelos del gen ESR no estuviesen segregando en la población analizada.

2.6. Otros genes de importancia económica en la industria porcina

Avances en el campo de la genética molecular y la genómica, han permitido el desarrollo del mapa genético del cerdo (Rothschild, 2004). Recientes investigaciones exploran y analizan importantes regiones de los cromosomas, así como, la coexpresión de cientos de genes con características de interés económico que han sido plenamente identificados como: el gen del síndrome del estrés porcino (HAL o RYR1) y el de desorden de carne acida (RN) para la calidad de carne. Los genes candidatos para tamaño de camada (ESR, PRLR, RBP4), crecimiento y grasa dorsal (MCR4), calidad de carne (hFABP, aFABP), resistencia a enfermedades (FUT1, SLA, NRAMP) y color de la canal (KIT, MC1R). La industria comercial porcina usa activamente esta información para mejorar la producción de cerdos y realizar las selecciones por medio de marcadores de selección asistida (MAS) (Rothschild, 2003a).

2.7. Genoma nuclear porcino

El genoma del cerdo doméstico esta compuesto por 18 pares de autosomas y los cromosomas sexuales (X e Y) (Warwick y Legates, 1979). Schimitz *et al.* (1992) han estimado que el tamaño aproximado del genoma haploide del cerdo es de 2,62-2,72 millones de pares de bases (pb). Dicha medida concuerda con la estima de tamaño (1650 centimorgan (cM) para machos y 2150 cM para hembras, se define como la distancia entre genes en donde uno de cada 100 productos meióticos es

recombinante) realizada por mapeo de ligamiento (Archibald *et al.*, 1995). Aunque no se ha realizado ninguna estimación del número de genes expresados en el cerdo, pero por analogía con la especie humana (Lander *et al.*, 2001) puede esperarse que dicho número oscile entre 30,000-40,000 genes. Del total de la secuencia de ADN, un 40 a 60% es repetitivo y se estima que del 2 al 3% es codificante (Moran, 1998). En el genoma humano, existen aproximadamente un 5% de secuencias codificantes y al menos un 50% de secuencias repetitivas (Lander *et al.*, 2001). En el cerdo se han descrito 3 familias distintas de secuencias repetidas del tipo *SINE* (*short interspersed nucleotide element*); *PPRE-1* o *porcine repetitive element-1* (Singer *et al.*, 1987), cuya abundancia es de 50.000-25.000 copias/genoma, *ARE-1P*, o *artiodactyl repetitive element-1 porcine* y *ARE-2P* (Alexander *et al.*, 1995).

Dentro del genoma de especies relacionadas filogenéticamente, existen regiones que son muy similares, debido a que contienen secuencias que provienen de un mismo gen ancestral. Asimismo, existen mutaciones puntuales y otros tipos de polimorfismos, algunos de los cuales pueden tener un gran efecto sobre la variación buscando aumentar la frecuencia de genes deseables. (Fujii *et al.*, 1991; Nicholas, 1998).

Aunque los mapas de mayor resolución son aquellos que implican la secuenciación completa del genoma de una especie, este objetivo no parece realizable a corto plazo en porcinos. Los estudios genéticos en cerdos actualmente consideran más importante localizar un elevado número de genes y marcadores genéticos distribuidos uniformemente en el genoma. El posicionamiento de dichos marcadores permite identificar regiones que contienen genes responsables de la variación de

caracteres de interés productivo (Haley y Archibald, 1998; Kinghorn y Van der Werf, 2000).

2.8. Marcadores genéticos

Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Sin embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de efectos epistáticos o ambientales limitaban su uso.

La revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores iso-enzimáticos; el número de marcadores genéticos disponibles fue ampliado y la aplicación de técnicas se expandió prácticamente a todas las especies de animales (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Con la llegada de las técnicas modernas de Biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismos genéticos directamente a nivel de ADN y los llamados marcadores moleculares, que en general, pueden maximizar los programas de mejoramiento genético (Ellegren *et al.*, 1994).

2.8.1. El uso marcadores genéticos en el área animal

Un marcador molecular se define como una región del genoma, generalmente de posición conocida, que presenta polimorfismo (Álvarez, 2001). El posicionamiento en

el mapa de marcadores moleculares tiene importantes aplicaciones en el mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL), pruebas de paternidad y estudios de ligamiento. Los distintos marcadores genéticos se han clasificado de acuerdo al método de selección de polimorfismos.

Los marcadores genéticos permiten saber si determinados genes están presentes o no en un animal, sin tener que observar directamente su expresión fenotípica (la característica visible que confiere el gen o los genes que se traten) que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia mendeliana (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Valadez y Günter, 2000). Tienen como principal objetivo maximizar el material genético acelerando la selección de sementales al viabilizar características deseables en animales jóvenes cuyo sexo no permite la expresión de características deseadas (Martínez, 1998; Haandel, 2004).

Estos marcadores genéticos se usan directamente para la selección de los mejores animales, en base a su genotipo, desde una edad temprana y sin esperar a que se manifieste la característica de interés al llegar a la edad reproductiva. En investigaciones recientes se ha demostrado que muchos genes se asocian con características de interés económico y que el uso de marcadores genéticos tiene valor para medir relaciones entre las razas (Rothschild y Plastow, 1999; Ramos *et al.*, 2003; Rothschild, 2003b).

2.8.2. Comparación entre marcadores nucleares y marcadores morfológicos

Ferreira y Grattapaglia (1998) describen algunas razones que evidencian la superioridad de los marcadores moleculares, mismos que se mencionan textualmente a continuación:

- a) El nivel de polimorfismo de los marcadores moleculares es generalmente alto para cada locus estudiado facilitando la construcción de mapas genéticos. A diferencia del gran esfuerzo y planificación que son necesarios para construir mapas genéticos a partir de marcadores morfológicos, puesto que el número reducido de marcadores restringe la cobertura total del genoma.
- b) En general, son neutros con relación a los efectos fenotípicos, con efectos epistáticos o pleiotrópicos mínimos o nulos.
- c) Son codominantes y contienen mayor cantidad de información genética por locus que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría, son dominantes o recesivos.
- d) Pueden utilizarse en cualquier fase del desarrollo del animal. Mientras que los marcadores morfológicos presentan la desventaja de ser identificados, a nivel de animal joven o adulto.

La identificación de genotipos en fases iniciales del desarrollo de los animales, abre la posibilidad de acelerar el proceso de selección y recombinación de los individuos deseados, reduciendo el tiempo para la obtención de nuevos genotipos.

2.9. Pedigrí familiar

Para la elaboración de un mapa de ligamiento, es necesario contar con cruzamientos informativos que puedan ser utilizados para analizar la segregación de los alelos. Para lograrlo en porcinos, es necesario contar con información genealógica de dos o tres generaciones. Para detectar el desequilibrio de ligamiento y obtener una mayor uniformidad, se pueden realizar cruzamientos de razas divergentes con fondo genético distinto, que hayan sido previamente seleccionados basándose en sus características fenotípicas. Generalmente se asume que los alelos en los grupos parentales, para los caracteres que distinguen una raza de la otra, están en homocigosis para los alelos alternativos. Una vez obtenida la F_1 , en la cual la mayoría de los loci estarán en heterocigosis, esta se puede cruzar con alguno de sus parientes (retocruzamiento o *backcross*) o efectuar cruzamientos entre los mismos animales F_1 (entrecruzamiento o *intercross*). Un retrocruzamiento es preferible para mapeo de locis dominantes, mientras el entrecruzamiento permitirá obtener una F_2 en la que estarán presentes todos los genotipos posibles, proporcionando mayor número de meiosis informativas (Beckmann *et al.*, 1988; Ron *et al.*, 1995).

2.10. Mapa genético porcino

La construcción de los mapas genéticos porcinos requiere de modelos estadísticos complejos que consideren todas las variantes genotípicas. Para ello, se requiere de innovaciones constantes en los métodos utilizados para la realización de un gran número de genotipados en el menor tiempo posible, así como de diseños estadísticos y de programas informáticos potentes, capaces de procesar un gran

volumen de datos. Actualmente los *softwares* más utilizados son el *LINKAGE* (Lathrop y Lalouel, 1988) que asocia caracteres fenotípicos con las diferencias entre los genotipos de animales individuales, detectados por medio de marcadores moleculares, y el *CRIMAP* (San Primitivo, 2001), que utiliza la información de dos marcadores (*Two-point*) o de todos los marcadores (*Multi-point*) para la elaboración de los mapas genéticos, ubicando nuevos marcadores en el mapa con relación a los marcadores previamente posicionados, obteniendo medidas de máxima verosimilitud o *Lod Score*.

2.11. PigMap Consortium

El proyecto Europeo *Pig Gene Mapping (PiGMap)* fue iniciado mediante la colaboración de 16 grupos Europeos, un grupo Australiano y un grupo de USA. La finalidad de este consorcio fue la construcción de un mapa genético de ligamiento del genoma del cerdo. Para el desarrollo del *PiGMap* se utilizaron tres generaciones producto de cruces de razas divergentes (F_0 , F_1 y F_2), donde la F_2 se obtuvo mediante entrecruzamiento de la F_1 . Dentro de los grupos que participaron en la realización de este mapa se encuentran: *AFRC Institute of Animal Physiology and GenetiCs Research, Edimburg, U.K., and Cambridge U. K., The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark., National Institute of Animal Science, Foulum, Denmark, Universit, Hohenheim, Stuttgart, F.R.G., Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden., INRA, France., Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands., State University, Utrecht, The Netherlands., Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Norway*, entre otros.

Los grupos Escocés, Holandés y Francés, participaron con pedigríes producto de cruces de razas puras Meishan con Large White. El grupo Sueco participó con un pedigrí producto del cruzamiento inicial de jabalí con hembras producto del cruce de Large White con Yorkshire sueco. El pedigrí del grupo Alemán fue diseñado mediante el cruce de jabalí con hembras Pietrain.

Se analizaron 239 marcadores moleculares mediante análisis de segregación, de los cuales 81 corresponden al tipo I y 158 al tipo II. Sesenta y nueve de los marcadores en el grupo de ligamiento habían sido posicionados con anterioridad en el mapa físico, proporcionando una valiosa herramienta para dar mayor confiabilidad a los resultados. Los datos genotípicos de los laboratorios fueron incluidos en la base de datos (*ResPig*) del instituto Roslin, obteniendo análisis de dos puntos y multipuntos con el paquete *software CRIMAP* versión 2.4. Distintos grupos de ligamiento fueron asignados para todos los 18 autosomas, y los cromosomas sexuales. Como en otras especies, el mapa genético del macho, fue significativamente más corto (~16.5 Morgans) que el de la hembra (~18 Morgans de longitud) (Archibald *et al.*, 1995). Actualmente el proyecto PiGMaP involucra 18 laboratorios Europeos y un total de 7 laboratorios de U.S., Japón y Australia.

2.12. Estructura y función del ADN

Los ácidos nucleicos son polímeros de cuatro nucleótidos. Cada nucleótido está constituido por un grupo fosfato y un nucleósido. El nucleósido está formado por la molécula de un azúcar pentosa, una base nitrogenada (bases púricas: adenina y guanina o pirimidicas: citosina, timina y uracilo). Los nucleótidos están unidos por

enlaces fosfodiéster 3'-5' entre el grupo hidroxilo 3' del azúcar con el grupo 5' del grupo fosfato para formar una cadena. Se conocen dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y el ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena doble; este último contiene la información genética de la célula. Las diferencias entre ADN y ARN son básicamente: 1) la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 2 del azúcar en el ARN (ribosa) y su ausencia en el ADN (desoxirribosa); 2) presencia de la base nitrogenada uracilo en lugar de timina en el ARN. El ADN puede considerarse como un libro de cocina con todas las recetas para hacer proteínas y ARNt y ARNr en la célula, mientras el ARNm copia las recetas y con la ayuda de los ribosomas traduce la información del ADN a proteínas.

Debido a que el ADN es la molécula que almacena la información precisa para que un ser vivo pueda llevar a cabo todas las funciones que necesita, para poder estudiar y manipular los ácidos nucleicos *in vitro*, su aislamiento de células y tejidos es el primer paso en todas las investigaciones, para esto existen diferentes metodologías.

Las diferentes metodologías de extracción de ácidos nucleicos varían de acuerdo a la composición celular de donde se extraen. El método específico de extracción depende del origen (células procariotas o eucariotas, o bien animales o vegetales), el tamaño y la estructura de los ácidos nucleicos, así como, el uso que se pretende dar a las moléculas purificadas.

No obstante, independientemente de las diferencias que pueda haber entre las células, los métodos de extracción de ácidos nucleicos deben consistir de principios básicos.

2.13. Pasos de la extracción y purificación de ADN

2.13.1. Extracción

Lisis celular. La ruptura de la célula se consigue mediante métodos físicos o químicos. Los métodos físicos involucran el uso de calor, maceración u homogenización con perlas de vidrio. Ejemplos de ello son: la extracción de ADN plasmídico por ebullición, el ADN cromosómico se mantiene unido a la membrana celular, mientras que el ADN plasmídico se mantiene en suspensión, y la separación de cada fracción se realiza mediante centrifugación diferencial (Maniatis *et al.*, 1982). En los métodos químicos se tiene el uso de diferentes sales como: NaCl y NaOH; detergentes: deodecil sulfato de sodio (SDS) y laurel sarcosina (sarcosil); y solventes orgánicos: fenol-cloroformo (Ausubel *et al.*, 1991; Farell, 1998).

2.13.2. Componentes de la solución de lisis

1) Un detergente (generalmente SDS), cuya función es romper las bicapas lipídicas de las membranas y unirse a las cargas positivas de las proteínas cromosómicas liberando el ADN a la solución acuosa. La concentración final en la solución de lisis es del 1%. Es posible utilizar un detergente comercial para lavar los platos como sustituto del SDS en la misma concentración final.

2) Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que se encarga de secuestrar los cationes Mg^{2+} de las enzimas que degradan el ADN y lo utilizan para llevar a cabo su actividad. La concentración final es de 0.3%.

3) Cloruro sódico, mantiene la doble hélice del ADN y actúa sobre las histonas liberándolas del ADN. La concentración final en la solución es de 0.9%.

La lisis con sales como NaCl y NaOH, denominada lisis alcalina, se ha empleado en la extracción de ADN plasmídico, en donde el NaOH junto con el detergente SDS rompen las células. Con la adición posterior de acetato de potasio se logra mantener unido el ADN plasmídico, mientras que el ADN cromosómico y las proteínas son atrapadas en un complejo formado entre el potasio y el SDS. Este método se utiliza para pequeños plásmidos (20 kb, aproximadamente) como *E. coli* (bacteria Gram negativa) (Davis *et al.*, 1986; Ausubel *et al.*, 1991).

Los solventes orgánicos como el fenol y el cloroformo dañan la membrana celular y la de los organelos, remueven proteínas y lípidos y simultáneamente inactivan enzimas nucleasas tales como la ADNasa y ARNasa y otras macromoléculas aisladas en el proceso de extracción (Ausubel *et al.*, 1991; Farrell, 1998).

Por otro lado, la extracción de ARN de células con un alto contenido de ribonucleasas (ARNasas), resulta complicado por la actividad de dichas enzimas, por lo que es necesaria una rápida recuperación de ARN de los organelos y vacuolas. La mayoría de las metodologías hacen uso de potentes agentes caetrópicos, tales como: sales de guanidina (isotiocinato y clorhidrato de guanidina), además de los

detergentes y solventes orgánicos ya señalados (Maniatis *et al.*, 1982; Slater, 1984; Beger, 1987; Farrell, 1998).

La integridad de los ácidos nucleicos se conserva manteniendo el sustrato (las células o tejidos) sobre hielo o congelándolo antes de comenzar el proceso de extracción.

2.13.3. Remoción de contaminantes

Una vez que se han lisado las células para la extracción del ADN o ARN, y éste se ha hecho disponible, es necesario separarlo del resto de la célula, ya que la calidad y cantidad de la molécula puede ser modificada por la actividad enzimática de nucleasas como la ADNasa o ARNasa y de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de purificación.

El problema de las nucleasas es la remoción de cationes como el magnesio, que es necesario para la actividad de las mismas. Agentes como EDTA (ácido etilendiamino-tetracético) y fenantrolina quelan cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} , previniendo de esta forma la actividad de la ADNasa y ARNasa (Farrell, 1998; Valadez y Kahl, 2000).

Es común remover la mayoría de las proteínas por digestión con enzimas proteolíticas como es la proteinasa K, antes de la utilización de solventes orgánicos como el fenol y cloroformo, los cuales son frecuentemente utilizados también para la desproteínización, usados en forma simultánea son más eficientes, además al final de la remoción de contaminantes se usa solo cloroformo para eliminar residuos de

fenol en los ácidos nucleicos (Maniatis *et al.*, 1982; McGookin, 1987; Farrell, 1998). La mayoría de proteínas son más solubles en fenol durante la fase orgánica (es la fase inferior, puede ser más densa o menos densa que la fase acuosa) que en la fase acuosa (es la fase superior o el sobrenadante); mientras que los ácidos nucleicos son más solubles en la fase acuosa, tales fases son separadas por centrifugación. La fase orgánica se queda en la parte inferior y contiene a las proteínas; la fase acuosa se queda en la parte superior y tiene al ADN o ARN. En el paso de la extracción de ADN es importante considerar el pH, ya que valores menores o iguales a 5 o 6, el ADN puede ser retenido en la fase orgánica y en la interfase, dejando el ARN en la fase acuosa, así que para la extracción de ADN se requieren pH de 7.5 a 8, con este pH tanto ADN como ARN son retenidos en la fase acuosa, por lo que se debe cuidar el pH antes de llegar a la utilización de fenol (Maniatis *et al.*, 1982; Farell, 1998).

Un reactivo utilizado en varios procedimientos para la extracción de ADN es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), el cual se pega fuertemente al ADN, desplaza a las proteínas y previene la degradación. El CTAB se remueve mediante extracciones con cloroformo y el ADN permanece en la fase acuosa (Valadez y Günter, 2000).

2.13.4. Precipitación o concentración

Se logra precipitar los ácidos nucleicos con el uso de diferentes alcoholes o la combinación de sales de cationes monovalentes en concentraciones moderadas y alcohol a bajas temperaturas (-20°C) y recuperados por centrifugación. El método

más ampliamente utilizado en la extracción de ADN es precipitado con etanol en presencia de concentraciones moderadas de cationes monovalentes. El isopropanol en una relación de un volumen al 100% puede ser usado en lugar del etanol al 70% (dos volúmenes) para precipitar el ADN, con la ventaja de manejar un volumen menor, pero el isopropanol es más volátil que el etanol y es más difícil de remover. Sin embargo, con solutos como sucrosa o cloruro de sodio se coprecipitan con el ADN más fácilmente cuando se utilizan isopropanol, especialmente a -70°C (Maniatis *et al.*, 1982).

El método más ampliamente utilizado en la extracción de ARN es precipitar con etanol en presencia de concentraciones moderadas de acetato de sodio. La precipitación del ARN es mucho más refinada que la del ADN, y requiere períodos más largos a -20°C (Farrell, 1998).

2.13.5. Lavado

Para remover cualquier soluto que se haya quedado en el precipitado, la pastilla con los ácidos nucleicos puede ser lavada con etanol a diferentes concentraciones, regularmente se emplea etanol al 70%, se agita con un agitador vortex y se centrifuga.

2.13.6. Resuspensión

Los ácidos nucleicos se resuspenden en algún amortiguador de baja astringencia iónica como es el TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), agua destilada estéril o agua libre de RNAsas.

2.13.7. Electroforesis

Una vez que se ha hecho la extracción de los ácidos nucleicos, la forma más común de verificar su estado físico, es mediante electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se depositan dentro de los pozos que forman los peines en el gel de agarosa y migran a través de él. Este proceso separa las moléculas de los ácidos nucleicos por tamaño, las cuales se hacen visibles mediante tinción con bromuro de etidio.

2.13.8. Cuantificación del ADN (opcional)

Una vez extraído y purificado el ADN de una muestra biológica, la mayoría de las técnicas que se emplean para su posterior caracterización, clonaje o secuenciación, requieren conocer la concentración de la solución de partida. Por eso se han desarrollado diversos métodos de medida siendo el más utilizado la obtención de la absorbancia en un espectrofotómetro con luz ultravioleta. Dado que se conoce que una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 mg/ml de ADN, se puede calcular la concentración del ADN de una muestra problema midiendo la absorbancia a 260 nm.

2.13.9. Determinación espectrofotométrica

Los ácidos nucleicos tienen la habilidad de absorber la luz ultravioleta, con un máximo, a una longitud de onda de 260 nm. Esta absorción se debe a las bases púricas y pirimidicas. La lectura en esta longitud de onda permite el cálculo de la

concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de A_{260} corresponde, aproximadamente, a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de doble cadena, 40 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de cadena sencilla y de ARN y 20 $\mu\text{g/mL}$ de oligonucleótidos de cadena sencilla.

La cuantificación basada en la absorbancia a 260 nm provee poca información acerca de la calidad y pureza de los ácidos nucleicos, en relación a la contaminación con proteínas, fenol o sales. La relación de A_{260} a A_{280} (A_{260} / A_{280}) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Una muestra pura de ADN tiene una relación A_{260} / A_{280} de 1.8 ± 0.15 , y una muestra pura de ARN tiene una relación A_{260} / A_{280} de 2.0 ± 0.15 (Farell, 1998; Valadez y Günter, 2000).

2.14. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado en forma exponencial, con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo, utilizando una polimerasa termoestable (Taq Polimerasa), (Edel, 1998; Giovambattista, 2000, Rojas, 2004).

La PCR es una técnica de la biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un acierto de ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención. La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformado cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrogeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C , por un minuto. Este

paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético ce hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante una formula, pero generalmente, oscila entre 50 y 60 °C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena actual como molde.

Para realizar la PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearan a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro dNTPs en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua destilada para complementar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 μ l) y finalmente, la enzima ADN polimerasa termoestable (White *et al.*, 1998; Jiménez y Collada, 2000; Giovambattista, 2001; Rojas, 2004).

Magnesio. Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila entre 0.5 y 2.5 mM. La concentración de $MgCl_2$ debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en especificad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de Mg^{+2} dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

dNTPs. Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN. La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta la fidelidad de la reacción, el uso de concentraciones desbalanceados de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales entre 0.2 a 1 mM.

Los DNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de Mg^{+2} sea 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs (Valadez y Günter, 2000).

Cebadores o iniciadores. Son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G + C de 40-75%. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR esta en el intervalo de 0.1 – 0.5 μ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN. Los cebadores ideales deben carecer, lo más posible, de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre si. El extremo 3' induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores entre si, para que la polimerasa los extienda y genere así, pequeños amplicones referidos como dímeros de cebadores. Estos dímeros son productos cortos que se amplifican eficientemente, reduciendo la cantidad de cebadores disponibles en la reacción,

provocando un menor rendimiento del amplicón de interés (Olive, 1999; Vaughan, 2000; Abd-Elsalam, 2003).

ADN polimerasa. Proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, su temperatura óptima de catálisis oscila alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorpora aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas, incluso por encima de 92° C. Esta enzima es una proteína que consta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 95 kDa, cuenta con una actividad de exonucleasa 5' – 3'. Su fidelidad de replicación depende de la concentración del ión Mg^{+2} y de los dNTPs, así como de que exista o no balance en la concentración de estos últimos (Maniatis, 1982; Valadez y Günter, 2000; García, 2002).

Agua. Se usa como solvente del resto de los ingredientes y de preferencia debe ser destilada (Rojas, 2004).

ADN. Puede ser de un ng en el caso de material genético clonado o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, siempre y cuando se elimine en lo más posible la presencia de inhibidores de la polimerasa.

Precauciones. El hecho de que existan contaminantes en la reacción de amplificación, tales como esporas o ADN proveniente de otros organismos en los tubos o puntas que se utilizarán para preparar la reacción, tiene importantes implicaciones tanto para su aplicación en investigación como para el diagnóstico.

Debido a que el ADN original puede permitir la síntesis de millones de copias mediante PCR; la contaminación en la muestra de reacción con productos de una reacción previa, o con material proveniente de una fuente exógena, es un problema de contaminación potencial. En general, el procedimiento cuidadoso de laboratorio en este sentido, consiste principalmente en separar físicamente a los reactantes y utilizar material nuevo y estéril (hacer alícuotas), éstas son algunas de las precauciones que evitarán una posible contaminación (Valadez y Günter, 2000; Vaughan, 2000; Fraga, 2004).

Adyuvantes de la PCR. Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. El adyuvante más extendido y utilizado es el BSA, a concentraciones mayores de 0.8 µg/µl; el BSA incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa (Cartwright, 1994; Vaughan, 2000; Álvarez *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004; Rojas, 2004).

Debido al complejo de interacciones entre los componentes de la PCR y la amplia variedad de aplicaciones en las que esta técnica se ha usado, no hay un listado único de condiciones que puedan ser las óptimas para todas las posibles reacciones.

2.15. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Su principio es basado en la utilización de enzimas de restricción (endonucleasas) para fragmentar la molécula de ADN, detectando polimorfismos a través del número y tamaño de los fragmentos. El ADN digerido se verifica en geles de agarosa o poliacrilamida, visualizados mediante tinción con bromuro de etidio teniendo como

resultado una separación continua de diferentes fragmentos de ADN de acuerdo con su tamaño, los cuales dan origen a polimorfismos (Drinkwater y Hetzel, 1991; Sambrook *et al.*, 1994; Jiménez y Collada, 2000; Valadez y Günter, 2000).

Posteriormente, se realiza la transferencia de ADN del gel a una membrana (Southern blotting), normalmente de nylon o nitrocelulosa, donde el siguiente paso es la hibridación con una sonda, es decir, un fragmento de secuencia conocida, marcado mediante radiactividad, luminografía o quimioluminiscencia (dependiendo del tipo de marcaje), hará visible un fragmento de ADN específico, que puede ser comparado con el fragmento resultante de otros genomas tratados de la misma forma; la sonda se une a los fragmentos de ADN fijados en la membrana que posea una secuencia complementaria, y estos se revelan a través de una autorradiografía (Sambrook, *et al.*, 1994; Mondragón, *et al.*, 2000; Valadez y Günter, 2000; Rojas, 2004).

Al separar los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa, puede deducirse que el “mapa” de los sitios de restricción, es específico de cada molécula de ADN. Las sondas de ADN para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque la RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso (García, 2002). Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica.

Generalmente los RFLP sirven como marcadores moleculares, proporcionando marcadores codominantes que se han utilizado para construir mapas genéticos (de

ligamiento) con selección asistida por marcadores, para la clonación de genes basados en mapas para la identificación de genotipos, identificación de cultivares en el caso de plantas, para ayudar a resolver problemas de índole taxonómica o filogenético, estudios de segregación, recombinación, paternidad, entre otros. La técnica molecular RFLP, es altamente confiable y de fácil estandarización en laboratorios universitarios o comerciales con baja inversión, por lo que se facilita su uso en el diagnóstico de mutaciones identificadas (García, 2002; Mondragón *et al.*, 2000; Baldeviano *et al.*, 2003).

Sin embargo, para otros laboratorios se trata de una técnica costosa y muy laboriosa, que precisa de una gran cantidad de ADN y una información previa sobre la secuencia, por lo que está siendo desplazada por otros marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Los marcadores RFLP cubren todo el genoma de un organismo, su uso aporta la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre marcadores y genes. Los marcadores RFLP, poseen una expresión co-dominante, que torna positiva al identificar en cada locus estudiado genótipos heterocigotos y homocigotos, generando más información a nivel genético, permitiendo, con ello, un análisis detallado de la interacción génica e interacción entre alelos en estudios de mapeo y características cualitativas (Ferreira y Grattapaglia, 1995; García, 2002; Rojas, 2004).

Los marcadores RFLP han mostrado variación génica en la secuencia de nucleótidos en regiones que codifican productos génicos. El número de marcadores RFLP es prácticamente ilimitado, ya que marcadores basados en ADN tienen una alta

estabilidad, pudiendo ser extraído, conservado y reutilizado por largos periodos de tiempo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.16. Uso de la técnica PCR-RFLP

La Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo del Tamaño de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP). Es una técnica que combina la amplificación mediante PCR y la digestión posterior con enzimas de restricción, en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos. El material de partida es el ADN que se amplifica mediante el empleo de primers específicos antes de proceder a la digestión de los mismos mediante distintas enzimas de restricción (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Mondragón *et al.*, 2000; Manson, 2003; Kopecny *et al.*, 2004).

Para la técnica PCR-RFLP primero se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que sirve para amplificar fragmentos pequeños de ADN (<2kb empleando métodos estándares) (Mondragón *et al.*, 2000; Giovambattista *et al.*, 2001; Godoy *et al.*, 2001).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) es uno de los métodos más específicos y rápidos, pero también, el más caro (Watson *et al.*, 1992; Ferreira y Grattapaglia, 1998; Manson, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se desarrolló la estandarización de tres protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de sangre, semen y pelo de sementales porcinos de línea materna Yorkshire y Landrace. La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular del Colegio de Postgraduados, Campus-Montecillo.

3.1. Colección y manejo de muestras

El estudio utilizó los datos de producción de las granjas porcinas: Monterrey (Monterrey, Nuevo León), Tepatlaxco (Tepatlaxco, Edo. de México), Avipor (Acatic, Jalisco), Modulo de cerdos de la U.A.Ch. (Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de México), Los Okles (La Barca, Jalisco), Prosemen (Abasolo, Irapuato, Guanajuato), de las cuales se tomaron los datos de los reportes de control del pie de cría. En las Granjas; Atenco (Toluca, Edo. de México), Nupropec (Los Reyes la Paz, Edo. de México), Los Chávez (Atotonilco, Jalisco), San Antonio (Capilla Guadalupe, Jalisco), Porcicultura integral (Janamutato, Michoacán) y Posta el Cuatro (Acatic, Jalisco), los datos provinieron directamente del desempeño de los sementales registrados en el programa PigCHAMP, se muestreó un total de 35 sementales porcinos de las razas Yorkshire y Landrace puros, cuya información de la granja incluía las siguientes características: padre, número de camadas, total de lechones por camada (LNT), lechones nacidos vivos (LNV), lechones nacidos muertos (LNM) y lechones destetados (LDEST).

3.2. Extracción de ADN a partir de sangre

La metodología desarrollada basada en el protocolo de extracción de ADN con muestras de sangre, estuvo basada principalmente en la propuesta de Sambrook *et al.* (1994) siguiente:

Colección de muestras

Los sementales fueron identificados y se sujetaron con un trompero. Para la toma de muestras de sangre, se lavó previamente con jabón neutro el área a sangrar y se colectaron 5 ml de sangre periférica utilizando tubos vacutainer estériles con EDTA. Las muestras se transportaron en termos a temperatura ambiente, en un tiempo no mayor de 4 h., si el tiempo era mayor se usaban refrigerantes hasta el momento de ser procesadas las muestras en el laboratorio.

3.2.1. Procesamiento de las muestras de sangre

Se colocaron 300 µl de sangre con anticoagulante EDTA en tubos Eppendorf de 2 ml; a cada tubo se le añadió 2000 µl de agua destilada fría, se mezcló en vortex (Modelo MS1 Minishaker, Marca IKA®) durante 5 minutos, se centrifugó a 13000 rpm por 8 min a 4°C. Se decantó quedando únicamente el sedimento al que se le agregó agua destilada hasta llegar a 1500 µl mezclando con vortex, se centrifugó (Modelo Spectrafuge 16M, Marca Labnet®) a 13000 rpm por 5 min, nuevamente se decantó, dejando únicamente la parte sólida (este paso se repitió en un máximo de 3 veces, hasta quedar limpia). Se agregaron 1000 µl de solución Lisis (Tris HCl pH 8, NaCl 5 M, EDTA .5 M pH 8, SDS, H₂O), posteriormente se agitó con un vortex (hasta

obtener una completa disolución de la pastilla). A los tubos se les adicionó 5 µl de proteinasa K y se incubaron a 65° C durante una hora, posteriormente se agitó con un vortex hasta deshacer la pastilla, se adicionó un volumen final de NaCl 2M, se agitó durante 15 segundos centrifugando a 13000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo de 1.5 ml, se precipitó con Isopropanol frío durante 2 h. a -20°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante. Con el propósito de obtener la pastilla más limpia, ésta se lavo resuspendiéndola en 300 µl de etanol al 70%, se agitó hasta disolverla, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar en la incubadora (Boekel Scientific; BOEKEL®) a 37°C por 12 h. Finalmente, se resuspendió en 200 µl de agua libre de RNasas y se guardaron a -20° C para su uso posterior.

3.3. Extracción de ADN a partir de semen

Una vez eyaculado el semental se obtuvo en promedio 15 ml de semen fresco por animal en envases de plástico previamente rotulados, se transportaron a temperatura ambiente y conservaron en refrigeración a 4°C, si el tiempo de procesamiento era de 2 horas, en caso contrario (tiempo superior), se usaron dosis que contenían diluyentes, al ser transportadas y las muestras se congelaron hasta su procesamiento a -20°C.

3.3.1. Procesamiento de las muestras de semen

En el Laboratorio de Biología Molecular, las muestras se trataron con una liofilizadora (Freezw dry system/Freezone 4.5 LABCONCO®), colocando toda la dosis de semen

en cada uno de los frasco de la liofilizadora. El semen se mantenía de 1 día y medio a 2, hasta que por completo se le extraía la parte líquida y el semen quedaba completamente deshidratado. Para su posterior procesamiento, se almacenaba en pequeños frascos de vidrio esterilizados, sellados con tapas de papel aluminio, conservados a temperatura ambiente.

El semen liofilizado se colocó en un mortero previamente esterilizado y congelado a -20°C , se maceró con un pistilo agregando nitrógeno líquido (al gusto). Una vez pulverizado, se procedió a realizar la extracción de ADN utilizando pK/SDS/TEC (proteínasa K, dodecil sulfato de sodio, Tris/EDTA). Que consistió en agregar 0.03 g. de semen pulverizado a un Eppendorf estéril agregando 1 500 μl de TEC, 10 μl de pK y 200 μl de SDS al 10%, incubándose durante 2 horas a 56°C . Se centrifugó en una centrifuga Mod. Spectrafuge 16M, Marca Labnet a 13000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió nuevamente en pK/SDS/TEC agregando 10 μl de DTT (ditiotretol), dejándose incubar a 56°C durante 12 horas. Posteriormente, se procedió a lavar dos veces con un volumen de fenol saturado y dos con un volumen de cloroformo/Isoamílico 24:1 recuperándose cada vez la fase acuosa. Este procedimiento permitió extraer las proteínas y lípidos que impurifican el material genético.

3.3.1. Precipitación de ADN

Para efectos de precipitar el ADN se agregaron 1/10 de volumen de NaCl 3M y dos volúmenes de etanol absoluto centrifugando a 10000 rpm. Los precipitados fueron resuspendidos en agua libre de RNAsas.

3.4. Extracción de ADN a partir de pelo

Se recolectaron muestras de pelo en cerdos, para ello se jalo fuertemente con los dedos pulgar, índice y medio, se procuro extraer el bulbo piloso de aproximadamente 50 pelos por cerdo, mismas que fueron etiquetadas, transportadas y conservadas en bolsas de plástico a temperatura ambiente hasta el momento de ser procesadas.

3.4.1. Procesamiento de las muestras de pelo

Para la extracción de ADN en cada una de las 50 muestras se realizó la combinación de varias técnicas de protocolos preestablecidos y modificados (Sambrook *et al.*, 1994; Maniatis, *et.al.*, 1982). Se lavaron 20 pelos por semental con agua desionizada estéril, se secaron sobre una toalla absorbente y cada pelo se corto a una distancia de 5 a 10 mm del folículo; posteriormente se colocaron dentro de un tubo tipo Eppendorf previamente esterilizado, se agregaron 1000 µl de solución lisis (Tris HCl pH 8, NaCl 5 M, EDTA .5 M pH 8, SDS, H₂O), 50 µl de dithiothreitol (DTT) 1M y 50 µl de proteinasa K agitando durante 5 minutos en vortex (Modelo MS1 Minishaker, Marca IKA). Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 12 h a 50°C. Transcurrido el tiempo se agitaron en vortex durante 5 minutos y se colocaron en la centrifuga (Modelo Spectrafuge 16M, Marca Labnet) por 10 minutos a 14000 rpm. Se recuperó el sobrenadante en un tubo esterilizado y se adicionó nuevamente, en cada tubo 50 µl de DTT y 50 µl de proteinasa K y se incubó durante 1 hora a 65°C con agitación alternada; con vortex durante 5 minutos y baño María durante 10 minutos a 90°C. Transcurrido el tiempo se adicionó a cada tubo un

volumen de fenol cloroformo (1:1) agitando con vortex durante 5 minutos y centrifugando por 10 minutos a 14000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó un volumen de cloroformo alcohol/Isoamilico (24:1) se agitó por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm.

Se recuperó la fase acuosa y precipitó con un volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de cloruro de sodio (NaCl, 0.2 M), agitando por inversión e incubando durante 4 horas a -20°C. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos y la fase acuosa se decantó. Posteriormente se procedió a lavar la pastilla agregando 300 µl de etanol al 70% agitando por inversión y centrifugando a 14000 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla fue secada a 37°C. Finalmente, se resuspendió a cada muestra con 35 µl de agua libre de RNAsas.

Una vez extraído el ADN se procedió a verificar la calidad de la extracción del ADN de todas las muestras en geles de agarosa al 1% (0.03 g de agarosa y 30 µl de buffer TBE 1X (Tris Borato-EDTA), por medio de una electroforesis, para lo que se usó una cámara modelo horizon 58, (Life Technologies®). En cada pozo se depositó un volumen final de 7.5 µl (2.5 µl de colorante Naranja G y 5 µl de ADN), usando como buffer de corrida TBE. Las condiciones de la electroforesis fueron de 25 minutos a 86 voltios. Transcurrido dicho tiempo los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de (1 µg/ml) durante 10 minutos. Se evaluaron los resultados en el fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, Marca Bio Rad) de luz ultra violeta (UV) y se capturaron las imágenes por computadora en el programa Quantivone, según la calidad del ADN se seleccionó únicamente a las bandas

nítidas que mostraban buena intensidad y buen peso molecular para proceder a realizar la técnica de PCR.

3.5. Amplificación de ADN por PCR

Cuando la presencia de ADN era claramente visible se procedía a realizar la amplificación por medio de la técnica de PCR que consistió en colocar dentro de un tubo Eppendorf la mezcla de determinado número de reacciones (según el número de muestras que se decidía amplificar). Para cada muestra de ADN la mezcla se compuso por 2.5 µl de buffer 10X (Promega), 1.25 µl de Mg, 0.5 µl de dioxinucleótidos (DNTPs) de biogénica, 1 µl de primer Forward, 1 µl de primer Revers, 16.25 µl de agua y 0.5 µl de Taq polimerasa (Amplificasa®) 500U biogénica). Una vez hecha la mezcla se tomaron 23 µl del tubo Eppendorf para depositarlos dentro un tubo de PCR más 2 µL de ADN en cada tubo, para tener un volumen final de 25 µl. En el termociclador (Modelo Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer ®), se colocaron los tubos con las siguientes condiciones de temperaturas para el gen Estrógeno Receptor (ESR) F 5'CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3' y R 5'CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3': desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 31 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por un minuto, con una extensión final a 72°C por 8 minutos. Para el gen Receptor de la Prolactina (PRLR) F 5'CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG 3' y R 5'GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA 3'; el programa consistió de 93 °C 3 minutos, 35 ciclos de 93 °C, por 30 segundos, 60°C por un minuto, 72°C por un minuto y una extensión final de 72°C por tres minutos. Para la detección del producto se verificaron las amplificaciones de los dos

genes por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2%, preparado en amortiguador TBE 1X, la electroforesis se corrió durante una hora a 75 voltios. Para visualizar los productos de amplificación los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de (1 µg/ml) durante 10 minutos. Se evaluaron los resultados en el fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, Marca Bio Rad) de luz UV y se capturaron las imágenes por computadora en el programa Quantityone.

3.6. Genotipificación mediante polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Para la identificación de los genes ESR y PRLR de los sementales se realizaron RFLP's, cuyos pasos son los siguientes:

Se suma la mezcla para determinado número de reacciones (9.8 µL de H₂O, 2 µL de Buffer, 8 µL del producto de PCR, 0.2 µL de enzima); una vez hecha la mezcla, en tubos de PCR previamente rotulados se colocaron 12 µL de buffer y 8 µL de ADN hasta llegar a un volumen final de 20 µL, los tubos se sellaron con parafilm para evitar evaporaciones y se colocaron en baño maría a 37°C durante 24 h. Las enzimas de restricción que se utilizaron fueron: Pvull para ESR y Alu1 para PRLR.

Para observar los patrones de restricción, generados por las enzimas de restricción, se depositaron 10 µL del producto digerido en geles de acrilamida al 8%, se corrió una electroforesis por cuatro horas a 100 voltios, los polimorfismos obtenidos se visualizaron en el fotodocumentador de rayos UV. Cada fragmento obtenido se comparó con patrones estándar de los genes ESR y PRLR para realizar la

genotipificación de cada animal; buscando la frecuencia genotípica de ESR y PRLR y en base a ello, decidir la selección de los sementales.

3.7. Análisis estadístico

Con la información de las granjas se obtuvieron los estadísticos descriptivos para las características de número de lechones totales (LNT), vivos (LNV), muertos (LNM) y destetados (LDEST). Con el análisis molecular de los sementales se obtuvieron las frecuencias génicas y fenotípicas para el polimorfismo de los receptores de estrógeno (ESR) y prolactina (PRLR) y probando el equilibrio de Hardy – Weinberg con una prueba de Chi-Cuadrada. Para cada gen, se realizó un análisis de varianza, con un modelo de un solo criterio de clasificación en el cual las variables de respuesta fueron LNT, LNV, LNM y LDEST y como variable independiente los genotipos (AA, AB, BB). Los datos fueron analizados con PROC GLM (SAS, 1999).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cabe hacer mención que a pesar de que se hizo la estandarización de la extracción de ADN a partir de sangre, debido a las Normas establecidas en el Diario Oficial de la Federación NOM-007-ZOO-1994, la NOM-037-ZOO-1995 y NOM-046-ZOO-1995, fue casi imposible tomar muestras de sangre en la mayoría de los sitios muestreados y movilizarlas de un estado de la república a otro. Dado las normas anteriores, lo único que podía ser transportado era el ADN, lo cual resultaba difícil de obtener debido a que era necesario hacer las extracciones en las granjas y en los centros de inseminación donde se muestrearon a los sementales. En la región de estudio los porcicultores no cuentan con un laboratorio de Biología molecular, mucho menos con el equipo necesario para poder trabajar las muestras y realizar las extracciones de ADN. Así mismo, fue difícil obtener el permiso para muestrear sementales ya que los propietarios o encargados de las granjas probablemente pensaban que se pretendía revisar la situación zoonosanitaria y temían que fueran objeto de alguna denuncia o investigación.

4.1. Estandarización de ADN usando sangre

Para estandarizar la técnica, se usaron 3 muestras de sangre periférica, que se conservaron con anticoagulante EDTA y fueron congeladas a -20°C , hasta su posterior procesamiento. Giovambattista *et al.* (2001) mencionan que la tipificación y polimorfismo a partir de muestras de sangre y suero es el estándar internacional para la obtención de ADN. Por ello, en esta investigación se estandarizó la técnica de extracción para la muestra de sangre, encontrándolo como uno de los métodos con

mayor eficiencia para obtener un alto rendimiento y pureza de ADN genómico, comprobado en las corridas electroforéticas de las bandas de ADN integro, como las que se pueden apreciar en la fig. 1, carriles 1 y 2.

La técnica se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Sambrook *et al.* (1994), la cual resultó altamente satisfactoria, rápida y sencilla, permitiendo la obtención de un ADN genómico de buena calidad, puro, no degradado y libre de ARN, aunque hubo algunas variaciones en la eficiencia de la lisis, el rendimiento y calidad del ADN no afectó los resultados de la metodología estandarizada.

Se uso el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) y la proteinasa K (Fraga *et al.*, 2004), que es una solución de lisis, la cual lisa rápidamente a las células y desnaturaliza proteínas, permitiendo la precipitación de ADN y posteriormente la purificación total a través de la remoción de productos de degradación, obteniendo una mayor recuperación del acido nucleico.

El ADN extraído de sangre evidenció una alta especificidad, debido a que no requirió de un tiempo prolongado de incubación, ni tampoco una serie de pasos que es donde surge la contaminación por manipulación o degradación del ADN, esto corroborado en geles de agarosa al 1%.

Gustafson *et al.* (1987) mencionan que el ADN extraído de sangre posee una elevada concentración, un mejor rendimiento y una buena calidad, además de obtenerse en un solo evento con respecto a las otras dos técnicas estandarizadas (semen y pelo), lo cual coincide con este estudio. Este método da la posibilidad de obtener ADN con calidad y pureza suficiente para que a partir de este se hubieran

realizado todas las extracciones y amplificaciones e identificar los genes PRLR y ESR relacionados con prolificidad, pero por razones mencionadas anteriormente se descartó el uso de esta metodología que no requiere de muchos pasos.

4.2. Estandarización de ADN usando semen

Para realizar la estandarización de semen, se obtuvo ADN por medio de dosis comerciales que fueron compradas y otras donadas por los dueños de las granjas que fueron muestreadas. La metodología estandarizada para extraer ADN de buena calidad a partir de semen, al igual que la de sangre también fue eficiente. Ello se comprobó al obtener como resultado bandas integrales, bien definidas y con buena concentración, reflejadas por una fluorescencia intensa a la hora de exponer el gel de agarosa a la luz UV. (Fig. 1, carriles 3 y 4).

Antes de proceder a la extracción de ADN del semen, las dosis se deshidrataron. La extracción se realizó por congelación y maceración seguida por digestión con solución de lisis compuesta por sodio dodecilsulfato y proteinasa K, que sirvió para eliminar los contaminantes que causan pérdida del ADN por degradación o por absorción. Se siguió el protocolo descrito por VonBeroldingen *et al.* (1989) que indica una segunda digestión en la que se usó dithiothreitol (DTT) para destruir y permeabilizar la cubierta de los espermatozoides, aunado a esto se usó el método estándar de extracción con fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al.* (2004), procedimiento que permitió extraer las proteínas y lípidos que impurifican el material genético. Los resultados obtenidos en la calidad y cantidad de ADN extraído a partir de semen demostraron que es una metodología confiable en casi la totalidad de las

muestras. Esto quizá sea debido a la facilidad con la que se deshidrata el semen lo cual con la ayuda de nitrógeno líquido permite que la eficiencia de la extracción sea mayor con respecto a otro tipo de tejidos.

Al igual que para la extracción de ADN a partir de sangre solo se pudo estandarizar la técnica, se recomienda utilizar esta metodología en diversos estudios de genotipificación (Pääbo *et al.*, 2004). En este estudio fue imposible continuar con esta metodología debido a que se tenía que comprar cada dosis de semen, resultando en un costo total alto. Además de esto, al solicitar a propietarios de las granjas la posibilidad de muestrear los sementales para obtener un semen sin diluyentes, fue denegado y cuando los dueños aceptaban proporcionar semen de los sementales con registro, únicamente proporcionaban dosis comerciales, que la mayoría de las veces contenían una combinación de dos o más sementales (existieron dosis con mezcla de hasta 3 sementales).

Esta metodología es conveniente cuando se tienen un buen conocimiento de los individuos que se desea muestrear, teniendo la rigurosa certeza de que el semen pertenece al semental señalado.

4.3. Estandarización de ADN usando pelo

El método de extracción estandarizado fue eficiente produciendo un ADN integro en buena cantidad y calidad (Fig. 1, carriles 5 y 6). Hukkelhoven *et al.* (1981) señalan que la mayor parte del ADN que se puede obtener de los pelos procede concretamente de las células localizadas alrededor del folículo. Esto indica que la calidad de la muestra también afecta la calidad y productividad del ADN extraído, por

ello, al inicio de cada extracción solo se elegían pelos que tenían folículo perfectamente visible, aunque ello no garantizaba una buena obtención de ADN como ocurrió en este estudio, ya que cuando los pelos tenían folículo nulo o ligeramente palpable, en las corridas electroforéticas se observaban bandas de ADN nítidas, confirmando con esto, lo descrito por Higuchi *et al.* (1988) quienes mencionan que también es posible obtener ADN de pelos sin folículo.

Por su parte, Suenaga y Nakamura (2005) sugieren no elegir este tipo de muestra si se puede optar por otras más eficientes (sangre, semen, uñas, saliva etc.), ya que aseguran que extraer ADN a partir de pelo tiene una eficiencia muy baja, que en ningún caso llega al 100%, lo cual coincide con lo reportado por Yoshii *et al.* (1994), pero no con la eficiencia de casi el 100% obtenido en este estudio.

En la estandarización de este protocolo basado en pelo, se buscó desarrollar una técnica que permitiera obtener muestras no-invasivas, dejando de lado técnicas de muestreo que frecuentemente implicaban la captura o estrés de los animales al momento de obtener las muestras.

Es ampliamente conocido que la toma de muestras constituye una de las principales limitaciones en estudios moleculares y sobre todo en animales de línea materna. Sin embargo, emplear una técnica de muestreo no-invasiva resultó ser de gran utilidad, ya que permitió obtener muestras de pelo sin necesidad de perturbar o manejar directamente los animales. La opción anterior abrió puertas para muestrear granjas a las que nadie antes había podido ingresar por razones de bioseguridad. Con esta técnica de extracción de ADN basada en pelo se logró convencer a los dueños y

médicos veterinarios de conceder el permiso para obtener una muestra de aproximadamente 40 pelos por cada semental, sin estresar a los animales. Muchas veces únicamente bastó con acariciarlos y obtener un aproximado de 100 pelos. La técnica de extracción de ADN a partir de pelo se estandarizó casi al 100%, a pesar de estar catalogado como un protocolo difícil desde el punto de vista de los métodos de extracción de ADN. En esta investigación las electroforesis de los geles teñidos en TBE 1X con 1 µg/ml de bromuro de etidio muestran la especificidad de la técnica de extracción de ADN del pelo de los sementales porcinos empleados en este estudio.

Se realizó como primer paso la lisis celular a través del detergente SDS y posteriormente, para la purificación del ADN total, se aplicó el método de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico que permitió la remoción de los productos de degradación, lo que conservó el ADN por un mayor período de tiempo. También se requirió de un tiempo prolongado de incubación y de un esmerado cuidado en la serie de pasos a seguir durante su manipulación, ya que muchas veces se pierde el ADN en el transcurso del procesamiento de las muestras, atribuida quizá a la escasez de células nucleadas que contienen los pelos, algunas localizadas en el bulbo piloso y su cubierta epidérmica o por los contenidos de metabolitos secundarios como polifenoles y al efecto inhibidor de las melaninas hidrosolubles que se generan y causan problemas, frecuentemente, al momento de la extracción del ADN, formando un complejo inactivo constituido por dos moléculas de melanina.

Los resultados de esta técnica revelaron que es altamente reproducible y confiable “casi perfecta”, demostrado con la amplificación de PCR y digerido con enzimas de

restricción (RFLP). Las muestras de los 35 sementales fueron amplificadas y digeridas satisfactoriamente; estos análisis se realizaron con el objetivo de encontrar una metodología que permitiera muestrear sementales de línea materna, sin restricción alguna para ser obtenidas.

Se evidenció una alta especificidad de la técnica (100%) debido a que el ADN extraído del pelo de los sementales amplificó con los primers: F 5' CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG 3' y R 5' GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA 3' las bandas de 427 pb para el gen PRLR y 120 pb para el gen ESR usando los primers F 5' CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3' y R 5' CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3', demostrando así la especificidad de la técnica estandarizada (Fig. 2 y 3).

La alta sensibilidad de la PCR a partir de ADN de pelo fue demostrada con la generación de los diferentes fragmentos del producto amplificado y digerido con enzimas de restricción; Alu1 para el gen PRLR generando fragmentos de 124, 110, 79, 77 y 67 pb (Vincent *et al.*, 1997) (Fig. 4) y Pvull para generar fragmentos de 120, 65 y 55 pb del gen ESR (Short *et al.*, 1997) (Fig. 5).

Aunque generalmente no recomiendan este tipo de muestra para realizar la extracción por la baja eficiencia que es observada en el análisis de pelos, se logró estandarizar la técnica con muestras no-invasivas (pelo) para realizar estudios a nivel molecular en sementales de línea materna que en la mayoría de las granjas su muestreo se encuentra restringido. Por lo que para mayor seguridad se recomienda arrancar y no cortar los pelos destinados al estudio genético.

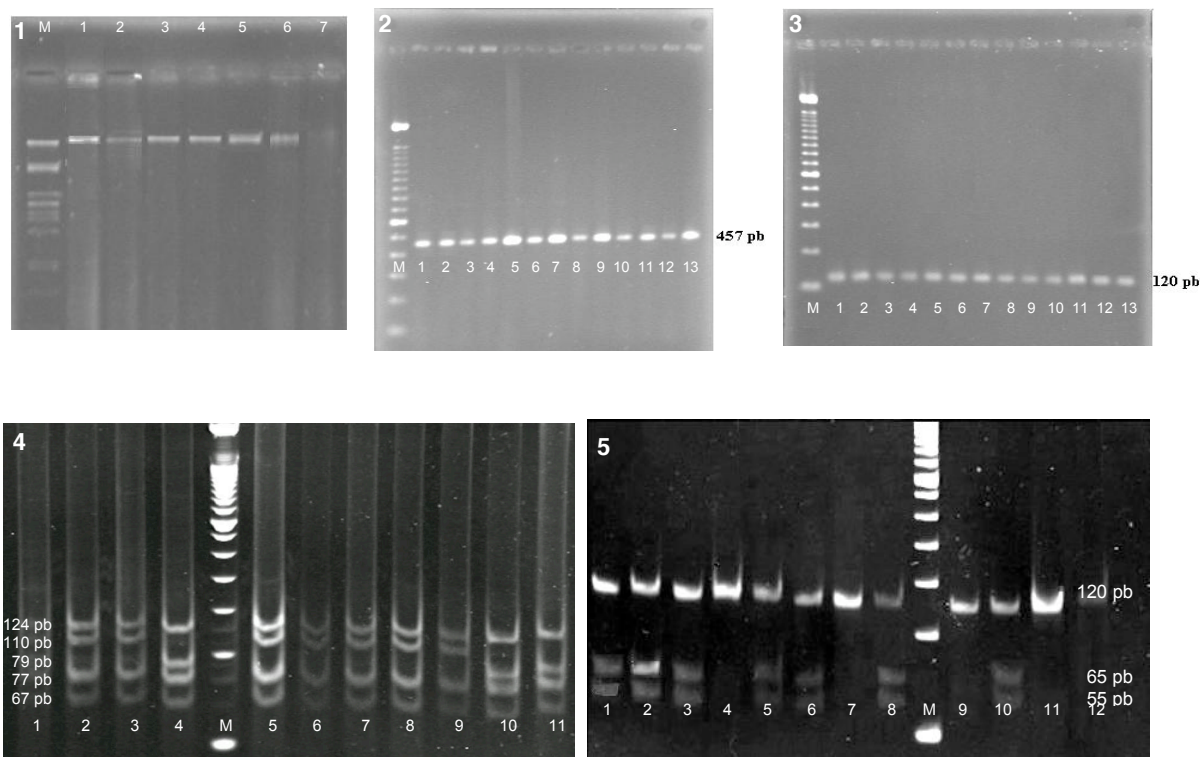


Figura 1. Gel de agarosa al 1%; (M) marcador 1kb; (1 y 2) AND proveniente de sangre (3 y 4) ADN de semen (5 y 6) ADN de pelo. **Figura 2.** Amplificación del gen PRLR (457 pb) en gel de agarosa al 2%; (M) marcador 1kb (Promega Corporation). **Figura 3.** Amplificación del gen ESR (120 pb) en gel de agarosa al 2%; (M) marcador 1kb (Promega Corporation). **Figura 4.** Digestión del gen PRLR en acrilamida; (M) marcador de 50 pb; (1) sementales con genotipo AB; (4, 10 y 11) sementales con genotipo AA y (2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9) sementales con genotipo BB. **Figura 5.** Digestión del gen ESR en acrilamida; (M) Marcador de 50 pb; (1, 2, 3, 5, 6, 8 y 10) sementales con genotipo AB; (4, 7, 9, 11 y 12) sementales con genotipo AA.

Es importante tener en cuenta el buen uso de las muestras, por lo que estas deben ser manipuladas con extremo cuidado y en condiciones de máxima limpieza, Pääbo *et al.* (2004) mencionan que es aconsejable esterilizar todos los materiales y reactivos antes de su uso, además de usar material exclusivo para cada tipo de muestras, ya, que muchas veces conllevan a una serie de inconvenientes, como la baja cantidad y el alto nivel de degradación del poco ADN extraído, así como la

presencia de inhibidores de la PCR y la contaminación con otro ADN exógeno durante el proceso de extracción y su posterior amplificación. De esta forma al optimizar las condiciones de preservación y los protocolos de extracción, se podrá obtener un ADN de buena calidad minimizando el riesgo de contaminación y la presencia de inhibidores de la PCR. A pesar de que se han publicado algunas revisiones extensas que recogen distintos métodos de preservación de muestras y protocolos de extracción de ADN a partir de distintos tipos de muestras, es necesario adaptar los protocolos a cada nuevo estudio y es preciso realizar un estudio piloto para optimizar todos los parámetros en cada experimento que se pretenda realizar.

4.4. Características relacionadas con prolificidad y polimorfismos PRLR y ESR

Los estadísticos descriptivos para las características relacionadas con la prolificidad de las piaras, obtenidas con una muestra de 35 sementales de línea materna (18 Yorkshire y 17 Landrace) se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Número de camadas, medias y errores estándar para diferentes características relacionadas con prolificidad de líneas maternas de cerdos.

Característica	Número de camadas	Media	Error Estándar
Lechones nacidos totales	644	9.92	0.16
Lechones nacidos vivos	640	9.24	0.11
Lechones nacidos muertos	635	0.58	0.05
Lechones destetados	383	8.30	0.11

En este cuadro, se puede notar la importancia del semental a la contribución genética de la piara, ya que cada uno es responsable de un promedio de 18 camadas, lo que significa que cada semental en promedio fue padre de 183 lechones. También se puede observar que la progenie de los sementales es cerca de 10 lechones nacidos en total, 9 nacidos vivos y 8 destetados por camada, los cuales son buenos indicadores en este tipo de piaras.

La amplificación y digestión del gen PRLR mostró fragmentos polimórficos de 90 y 110 pb, en geles de acrilamida al 8%, se detectaron sementales con genotipos AA (homocigotos para los fragmentos de 124, 90 y 79 pb), AB (heterocigotos presentando fragmentos de 124, 110, 90 y 79 pb) y BB (homocigotos para los fragmentos de 124, 110 y 79 pb). En el cuadro 2, para el gen PRLR se muestra las frecuencias genotípicas de PRLR, de 0.14% de AA, 0.14 de AB y 0.72 de BB. Vincent *et al.* (1998b) reportan que el alelo A es el favorable para obtener mayor tamaño de camada, en esta investigación se encontraron sementales homocigotos para el genotipo AA con una frecuencia de 0.14.

En el gen ESR para el alelo A no hubo sitio de restricción, resultando el fragmento completo de 120 pb para el genotipo AA y tres fragmentos de 120, 65 y 55 pb para el genotipo AB (Figura 5). Hernández *et al.* (2006) reportaron en un estudio realizado con 300 hembras porcinas una mayor frecuencia del alelo B, pero ningún homocigoto para el alelo B. Como se puede observar en el cuadro 2, el alelo B mostró una frecuencia baja de 0.14., lo cual se explica por el tamaño de población con que se trabajó, caso contrario ocurrió con el alelo A que alcanzó la mayor frecuencia de 0.86 para el gen ESR. En varias investigaciones se ha reportado que el alelo para

aumentar el tamaño de camada es el B (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997). En esta investigación tampoco se encontraron sementales homocigotos para el genotipo BB del gen ESR, justificado esto en lo descrito por Rothschild *et al.* (2004) quienes señalan que el alelo B del ESR está presente únicamente en grupos selectos de razas de cerdos, con lo que se explica la ausencia de sementales homocigotos BB en este estudio.

Cuadro 3. Frecuencias génicas y genotípicas de sementales porcinos de línea materna Yorkshire y Landrace.

Gen	N	Frecuencias génicas		Frecuencias genotípicas			Equilibrio de H-W
		Alelo A	Alelo B	AA	AB	BB	
ESR	35	0.86	0.14	0.72	0.28	0.0	No
PRLR	35	0.21	0.79	0.14	0.14	0.72	No

PRLR= Receptor de prolactina ESR= Estrógeno receptor H-W= Hardy – Weinberg

Los resultados obtenidos (cuadro 3) mostraron que los genotipos asociados con tamaño de camada como los genes PRLR y ESR, no están en equilibrio Hardy-Weinberg (X^2 , $p < 0.05$). La comparación entre genotipos de los dos genes ocurrió en mayor frecuencia para los alelos que no son deseables en los dos genes, PRLR mostró frecuencia de 0.79 y 0.86 para ESR. El Análisis de Varianza permitió comparar los genotipos asociados a los genes candidatos PRLR y ESR, no encontrando diferencias entre ellos ($p > 0.05$) en las variables LNT, LNV, LNM Y LDEST. Esto se explicaría por el tamaño finito poblacional, la deriva genética o

selección y el tipo de apareamientos en cada una de las granjas, por lo que solamente se establece su importancia basada en los hallazgos de diferentes investigadores.

5. CONCLUSIONES

Existe abundante bibliografía sobre la extracción y purificación de ácidos nucleicos de sangre, semen y pelo; no obstante, los protocolos estándares y métodos comerciales disponibles en la actualidad no presentan patrones de rendimiento homogéneos. En consecuencia, es fundamental determinar el sistema para cada tipo de muestra de extracción y purificación de ácidos nucleicos más adecuado.

La estandarización de la técnica de extracción de ADN a partir de pelo, es una técnica de muestreo no-invasiva que ofrece la oportunidad de muestrear sementales, sin ser perturbados o incluso difíciles de muestrear y aunque, esta técnica presenta una serie de inconvenientes cuando se están procesando las muestras en el laboratorio, con solo optimizar las condiciones del protocolo establecido es posible usar pelo para extraer ADN.

Los métodos de selección asistida por marcadores, conjuntamente con métodos de selección tradicional pueden ser utilizados para potencializar, acelerar y mejorar características de interés económico en sementales, donde los genes receptor de la prolactina (PRLR) y estrógeno receptor (ESR) pueden ser utilizados para seleccionar a los mejores animales para elegir o descartar a los mejores sementales desde edades tempranas, sin necesidad de esperar a que se manifieste la característica de interés al llegar a la edad reproductiva.

6. LITERATURA CITADA

- Abd-El Salam, K. A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr. J. of Biotechnol.* 2 (5):91-95.
- Alexander, L. J., G. A. Rohrer, R. T. Stone and C. W. Beattie. 1995. Porcine SINE Associated microsatellite markers: evidence for new artidactiyl sines. *Mamm Genome* 6:464-469.
- Alonso, V., A. B. Santana, W. Pirage-Junior, L. R. Goulart, H. da S. Diniz, M. F. Machaim and G. S. N. Borges. 2003. Efeito do gene receptor de prolactina sobre características quantitativas de interesse econômico em suínos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 40:366-372.
- Álvarez, S., M. S. Mesa, F. Bandrés, and E. Arroyo. 2001. C282Y and H63D mutation frequencies in a population from central Spain. *Disease Markers.* 17:111–114.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. 1991. *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley-InterScience, New York.
- Archibald, A. L., C. S. Haley, J. F. Brown, S. Cuoperwhite, H. A. McQueen, D. Nicholson, W. Coppieters, A. Van de Weghe, A. Stratil, A. K. Wintero, M. Fredholm, N. J. Larsen, V. H. Nielsen, D. Milan, N. Woloszyn, A. Robie, M. Dalens, J. Riquet, J. Gellin, C. J. Caritez, G. Burgaud, L. Olliver, P. J. Bidanel, M. Vaiman, C. Renadrd, H. Geldermann, R. Davoli, D. Ruyter, E. M. J. Veerstege, M. A. M. Groenen, W. Davies, B. Hoyheim, A. Keiserud, I. Andersson, H. Ellegren, M. Johansson, I. Marklund, J. R. Miller, D. D. V.

- Anderson, E. Singer, A. J. Jeffreys, P. C. Moran, Le Tissier, Muladno, M. F. Rothschild, C. K. Tuggle, D. Vaske, J. Helm, H. C. Liu, A. Rahman, T. P. Yu, R. G. Larson and C. B. Schmitz. 1995. The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm Genome* 6:157-175.
- Baldeviano, V. C., T. N. Quispe, A. C. Bonilla, D. Gastiaburu, C. J. Pro y L. Z. F. Llanos. 2003. Perfiles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas en Aislamientos de *M. Tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del Callao, Perú. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica.* 20 (2):321-332.
- Beger, S. L. 1987. Preparation and Characterization of RNA. Overview. pp: 215-219. *In: L. S. Berger and R. A. Kimmel, (eds). Guide to Molecular Cloning Techniques. Academic Press.*
- Beckmann, J. S. and M. Soler. 1988. Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses segregating populations. *Theor Appl Genet.* 76:228-236.
- Birgitte, T. T. M., v. Rens, G. J. Evans and T. van der Lende. 2003. Components of litter size in gilts with different Prolactin Receptor genotypes. *Theriogenology; Elsevier.* 59:915-926.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. H. Genet.* 32:324-331.
- Buxadé, C. C. 2000. Producción Porcina. 2a. ed. Ediciones Mundi-Prensa. Mexico, D.F. 215 p.

- Canul, S. M., V. A. Sierra, M. A. Martínez, O. J. Ortiz, J. V. Delgado, J. L. Vega-Pla y G. F. Pérez. 2005. Caracterización genética del cerdo pelón mexicano Mediante marcadores Moleculares. Arch. Zoot. 54: 267-272.
- Cañón, J. y A. Muñoz. 1989 Aspectos genéticos para la mejora del porcino. Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca, D. L. ISBN 84-87154-01-8 Murcia España.
- Cartwright, C. P. 1994. Techniques and diagnostic applications of in vivo nucleic acid amplification. J. Clin. Microbiol. 16:33-40.
- Ciubanu, C. D., E. A. Day, A. Nagy, R. Wales, M. F. Rothschild and G. S. Plastow. 2001. Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DNA markers. Genet. Sel. Evol. 33:417-432
- Cunningham, E. P. y C. M. Meghen. 2001. Sistemas de identificación biológica: marcadores genéticos. Rev. ci. tech. Off. int. Epiz. 20 (2):491-499.
- Curtis, H., N. S. Barnes, A. Scanner y G. Flores. 2001. Biología. 6ª edición. Editorial Panamericana. Madrid, España. 320 p.
- Da, Y., P. M. VanRadem, M. Ron, J. E. Beever, A. A. Paszek, J. Song, G. R. Wiggins, R. Ma, J. I. Weller and H. A. Lewin. 1999. Standarization and conversión of marker polymorphism measures. Anim. Biotechnol.10: 25-35.
- Davis, G. P., D. M. Dibner and F. J. Battey. 1986. Basic Methods in Molecular Biology. J. Anim. Sci. 70 (6):1405-1420.
- Davis, G. P. and S. K. DeNise. 1998. The Impact of Genetic Markers on Selection. J. Anim. Sci. 76 (3):2331-2339.

- Ding, C., E. Maier, A. Roscher, A. Braun and C. R. Cantor. 2004. Simultaneous quantitative and allele-specific expression analysis with real competitive PCR. BMC Genetics. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/5/8>.
- Drinkwater, R. D. and J. S. D. Hetzel. 1991. Application of molecular biology to understanding symposium on nuclear techniques in animal production and health. IAEA, FAO. Viena, 15-19 April. 437-452.
- Drogemuller, C., H. Hamann and O. Distl. 2001. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. J. Anim. Sci. 79: 2565-2570.
- Duarte, O. A. 2001. Aplicación de técnicas moleculares en el mejoramiento genético del ganado. Memorias del 3er. Congreso de Egresados de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAM-X. México, D. F. pp. 128-142.
- Edel, V. 1998. Polymerase Chain Reaction in Mycology in Overview. CAB International. Applications of PCR in Micology. 357 pp. New York.
- Ellegren, H., B. P. Chowdhary, M. Johansson and I. Andersson. 1994. Integrating the porcine physical and linkage map using cosmid-derived markers. Ani Genet. 25:431-439.
- Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics. 2a. Ed. Longman Ltd. Londres.
- Falconer, D. S. y T. C. F. McKay. 1996. Introducción to genetics. 4ª edición. Ed. Harlow Longman.
- Farrell, R. E. 1998. RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Academic Press. 531 p.
- Ferreira, M. E. y D. Grattapaglia. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. CENARGEN / EMBRAPA. Brasília. 220 p.

- Ferreira, M. E. y D. Grattapaglia. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA. 220p.
- Fraga, N. J., J. Rodríguez, O. Fuentes, M. Castex y C. A. Fernández. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. Rev. Cubana Med. Trop. 56(3):208-13.
- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de León, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. OBrien and D. H. MacLennan. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 253: 448-451.
- García, G. 2002. Polimorfismo proteico: electroforesis de proteínas, polimorfismos, marcadores moleculares en estudios poblacionales. Sección Genética Evolutiva – Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.
- Giovambattista, G., M. V. Ripoli, J. P. Lirón, M. E. Kienast, C. E. E. Villegas, F. N. Dulout y G. P. Peral. 2001. Aplicación de las Técnicas de Polimorfismo de DNA en la Resolución de Casos de Abigeato, Identificación Individual y Determinación de Paternidad. Analecta vet. 21(1):5 – 11.
- Godoy-Lutz, G., J. R. Steadman, K. Powers and B. Higgins. 2001. Genetic relationship among isolates of the web blight pathogen on common bean based on PCR-RFLP and sequence analysis of the ITS- rDNA region. San Juan de la Maguana, Dominican Republic, Dept. of Plant Pathology, Univ. Nebraska-Lincoln 68583-0722. Publication no. P-001-0002-CRA.
- Gustafson, S., J. A. Proper, E. J. Bowie and S. S. Sommer. 1987. Parameters affecting the yield of DNA from human blood. Anal Biochem. 165 (2): 294-299.

- Haandel, B. V. 2004. Selección genética de verracos para conseguir mayor uniformidad y facilitar el manejo de machos finalizadores. *Hypor. Avance técnico*. Regina, Canadá. 108 p.
- Haley, C. S. and A. Archivald. 1998. Genetic factors contributing to variation in litter size in British Large White Abstracts. 56:317-332.
- Henríquez, C., B. Infante, J. Merello, M. Gal'ino, L. Santivañez, V. C. Maguiña, A. H. Guerra, R. Birtles y P. Ventosilla. 2002. Identificación de *Bartonella bacilliformis* por métodos moleculares. *Rev. Med. Her.* 13(2): 128-131.
- Hernández, L. S. H., C. Lemus., M. R. Alonso y J. G. H. Herrera. 2006. Efecto de genes candidatos sobre características reproductivas, en hembras porcinas. *Revista Científica, FCV-LUZ.*, 16 (6):648-654.
- Herrera, H. J. G., C. Lemus y A. Barreras. 2003. *Mejoramiento Genético Animal. Un enfoque aplicado*. 1ª edición. Ganadería IREGEP. Texcoco, Edo de México. 151 p.
- Higuchi, R., C. H. Von Beroldingen, G. F. Sensabaugh and H. A. Erlich. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature*. 332:543-546.
- Houdebine, L. M., J. Djiane, I. Dusanter-Fourt, P. Martel, A. Kelly, E. Devinoy and L. Servely. 1985. Hormonal action controlling mammary activity. *J. Dairy Sci.* 68:489-500.
- Hukkelhoven, M. W. A. C., E. Vromans, A. M. G. Markslag and A. J. M. Vermorken. 1981. A simple fluorimetric microassay for DNA in hair follicles or fractions of hair follicles. *Anticancer Res.* 1:341-344.

- Isler, B. J., K. M. Irvin, S. M. Neal, S. J. Moeller and M. E. Davis. 2002. Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive traits in swine. *J. Anim. Sci.* 80:2334-2339.
- Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest. Agr. Sist Recur. For.* 3:253-268.
- Kelly, P. A., J. M. Boutin, C. Jolicoeur, H. Okamura, M. Shirota, M. Edery, F. I. Dusanter and J. Djiane. 1989. Purification, Cloning, and Expression of the Prolactin Receptor. *Biol Reprod.* 40:27-32.
- Kinghorn, B. and J. Van der Werf. 2000. Identifying and incorporating genetic markers and major genes in animal breeding programs. *J. Dairy Sci.* 72:2606-2614.
- Kopecny, M. A., M. Stratil, Van Poucke, H. Bartenschlager, H. Geldermann and L. J. Peelman. 2004. PCR-RFLPs, linkage and RH mapping of the porcine TGFB1 and TGFBR1 genes. *Ani Genet.* 35:245–264.
- Korwin, K. A., M. Kamyczek, D. Cieslak, M. Pierzchala and J. Kuryl 2003. Candidate gene markers for reproductive traits in polish 990 pig line. *J. Anim. Breed. Genet.* 120(3):181-191.
- Lander, E. S., M. I. Liron, B. Birren and C. Nusbaum. 2001. Initial sequencing and analysis. *Am. J. H. Genet.* 117 (6): 361-373.
- Lathrop, G. M. and M. J. Lalouel 1988. Efficient computations in multi-locus linkage analysis. *Am. J. H. Genet.* 42:489-505.
- Lemus, F. C., R. Alonso, S. H. Hernández, MC. y LG. Muñoz. 2005. Frecuencia y relación molecular de genes candidatos para producción en vientres

- porcinos. En memorias “XL Congreso Nacional de Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC)”. León Guanajuato, México. 189 p.
- Linville, R. C., D. Pomp, R. K. Johnson and M. F. Rothschild 2001. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *J. Anim. Sci.* 79:60-67.
- Long, S. E. 1991. Reciprocal translocations in the pig (*Sus scrofa*): a review. *Vet Rec.* 128:275-278.
- Lush, L. J. 1961. Operación carnes. Publicación 6 técnica. Mejoramiento animal. CAFADE. Presidencia de la Nación. Buenos Aires Argentina. 80 p.
- Manson, A. L. 2003. Lo esencial en célula y genética. 2ª edición. Elsevier. Madrid, España. 232 p.
- Maniatis, T., F. E. Frittsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Martínez, G. R. G. 1998. Principales factores que afectan la reproducción en el cerdo. *Ciencia Veterinaria. FMVZ. UNAM. México, D. F.* 222 p.
- McGookin, R. 1987. RNA Extraction by the Proteinasa K Method. 1984. pp: 109-112. *In: Walker, J.M. Methods in Molecular Biology vol. 2, Nucleic Acids. The Humana Press Inc.USA.*
- Molina, N. B., D. Polverino, C. M. Minvielle, M. Apezteguía, M. Aguilar y A. J. Basualdo. 2006. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitol. Latinoam.* 61(3-4):133-137.

- Mondragón, B. M., A. C. C. Vázquez, C. R. Barrón, P. B. Acosta, C. K. Jost, S. Balandrazo and H. D. Olivera. 2000. Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública Méx.* 42(6):58-68.
- Moran, C. 1998. Molecular Genetics, p 135-161. In M. F. Rothschild and Ruvinsky (ed). *The Genetics of the pig*. CAB International.
- Mullis, K. F. A. R. and Gibbs. 1994. *The Polimerase Chain Reaction*. Birkhauser Boston. 458 p.
- Nicholas, F. W. 1998. Genetics of Morphological Traits and Inherited Disorders, p 91-104. In M. F. Rotchschild and Ruvinsky (ed). *The Genetics of the pig*. CAB INTERNATONAL.
- Noguera, J. L., L. Varona, L. Gomez- Raya, A. Sánchez, D. Babot, J. Estany, I. A. Messer, M. F. Rothschild and M. Perez-Enciso. 2003. Estrogen receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance. *Livest. Prod. Sci.* 82:53-59.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-ZOO-1994. Campaña Nacional contra la enfermedad de Aujeszky. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995. Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Olive, M. D. and P. Bean. 1999. Minireview. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *American Soc. Microbiol.* 37(6):1661-1669.

- Omelka, R., M. Bauerova, J. Mlynek, B. Buchova, D. Peskovieova and J. Bulla. 2005. Effect of the oestrogen receptor (ESR) gene on reproductive traits of Large White, White Meaty and Landrace pigs. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (6):249–253.
- Pääbo, S., H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Duch, J. Krause, L. Vigilant and M. Hofreiter. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Rev. Genet.* 38:645-679.
- Ramos, A. M., R. Mestre, S. Gouveia, G. Evans, Y. Zhang, A. Cardoso, M. F. Rothschild, G. Plastow and F. Rangel. 2003. Use of type DNA markers for initial genetic characterization of two Portuguese swine breeds. *Arch. Zoot.* 52:255-264.
- Rodríguez, M. H. 2005. Avances de Inseminación artificial en ganado porcino. Monografías de actualidad (Tratado de ganado porcino). No 85. 82 p.
- Rojas, M. R. I. 2004. Introducción a la Biología Molecular. Manual de Curso FIT-624. Introducción a la Biología Molecular. Colegio de Postgraduados. México. 80 p.
- Romero, P. J. M. 2003. Teoría del mejoramiento genético con ayuda de marcadores moleculares y construcción de un índice apoyado en marcadores ligados. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 135 p.
- Ron, M., H. Lewin, M. D. Band, A. Yanai, Y. Blank, E. Feldmesser and I. J. Weller. 1995. Prediction of informativeness for microsatellite markers among progeny of sires used for detection of economic trait loci in dairy cattle. *Anim. Genet.* 26:439-441.

- Rosas, G. M. y A. J. Ávila. 1999. Mejoramiento animal, Genética, cerdos. 1ª edición. Editorial UNAM. México. 361 p.
- Rothschild, M. F., C. Jacobson, D. Vaske, C. Tuggle, L. Wang, T. Shorts, G. Eckardt, S. Sasaki, A. Vincent, D. McLaren, O. Southwood, H. Van Der Steen, A. Mileham and G. Plastow. 1996. The Estrogen Receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Genet.* 93:201-205.
- Rothschild, M. F. and G. S. Plastow. 1999. Advances in pig genomics and industry applications. *Ag. Biotech.* CAB International.
- Rothschild, M. F. 2003a. Use of biotechnology and molecular genetics in swine selection programs. *Allattenyesztes es Takarmanyozas* 52 (Supplement). 91-99.
- Rothschild, M. F. 2003b. Approaches and challenges in measuring genetic diversity in pigs. *Arch. Zoot.* 52:129-135.
- Rothschild, M. F. 2004. Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. *Genetical Res.* 83(1):1-6. CAB International.
- Sambrook, J., F. E. Fritsch and T. Maniatis. 1994. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. E. U. A.
- San Primitivo, T. F. 2001. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo XX. *Arch. Zootec.* 50:517-546.
- SAS Institute, Inc. 1999. *SAS User's Guide. Statistics, Statistical Versión 8.* Cary, North Carolina. 956 p.

- Schimitz, A., B. Chaput, P. Fouchet, N. M. Guilly, G. Frelat and M. Vaiman. 1992. Swine chromosomal DNA quantification by bivariate flow karyotyping and karyotype interpretation. *Cytometry*. 13:703-710.
- Short, T. H., M. F. Rothschild, I. O. Southwood, G. D. McLaren, A. de Vries, H. Van der Steen, R. G. Eckardt, K. C. Tuggle, J. Helm, A. D. Vaske, J. A. Mileham and G. S. Plastow. 1997. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J. Anim. Sci.* 75:3138-3142.
- Slater, R. J. 1984. The extraction of total RNA by detergent and phenol method. Pp: 101-112. *In: Walker, J.M. Methods in Molecular Biology vol. 2, Nucleic Acids.* The Humana Press Inc. U.S.A.
- Singer, D. S., J. L. Parent, and R. Ehrlich. 1987. Identification and DNA sequence of an interspersed repetitive DNA element in the genome of the miniature swine. *Nucleic Acids Res.* 15:2780-2792.
- Suenaga, H. and Nakamura H. 2005. Evaluation of the three methods for effective extraction of DNA from human hair. *J. Chromatography B.* 820:137-141.
- Theilgaard, P., P. J. Sánchez, J. J. Pascual y C. N. Friggens. 2005. Efecto de la condición corporal de la selección por prolificidad sobre la longevidad de conejas reproductoras. *J. Anim. Breed. Genet.* 121:186-196.
- Tocagni, H. 1979. *Porcinos Landrace.* Editorial Albatros, SRL. Buenos Aires Argentina. 179 p.
- Tomás, A., J. Casellas, O. Ramírez, G. Muñoz, M. Pérez-Enciso, L. J. Noguera y A. Sánchez. 2005. Polimorfismo del Exon 10 del Receptor de la Prolactina

- (PRLR) y efectos sobre caracteres de supervivencia de lechones en un cruce Iberico X Meishan. *J. Anim Sci.* 82:1919-1924.
- Vaughan, P. 2000. DNA Repair Protocols. Prokaryotic Systems (Methods in Molecular Biology). Humana Press. Vol 152.
- Valadez, M. E. y K. Günter. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Editorial Mundi-Prensa. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 147 p.
- Vincent, A. L., L. Wang, K. C. Tuggle, A. Robic and M. F. Rothschild. 1997. Prolactin receptor maps to pig Chromosome 16. *Mamm Genome* Vol 8: 793-794.
- Vincent, A. L., L. Wang, K. C. Tuggle and M. F. Rothschild. 1998a. Linkage and physical mapping of prolactin to porcine chromosome 7. *Anim. Genet.* 29:27-29.
- Vincent, A. L., G. Evans, T. H. Short, O. 1. Southwood, G. S. Plastow, C. K. Tuggle and M. F. Rothschild. 1998b. The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. In 6th World Congress Genetic. Appl. Livest., prod., Armidale, NSM. Australia. 27:15-18.
- VonBeroldingen, C. H., E. T. Blake, R. Higuchi, G. F. Sensabaugh and H. Erlich. 1989. Applications of PCR to the analysis of biological evidence. pp. 209-223.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1998. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. CAB International. 357 p.
- Warwick, J. E. and Legates. 1979. Breeding and Improvement of farm Animals. Seventh edition. Mc Graw-Hill. Book Company. United States of America. pp. 450-507.

- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller. 1992. Recombinant DNA. 2^a ed. Scientific American Books. New York, USA.
- Yáñez, L., J. Trompiz and H. Vecchionacce. 2005. Introducción de razas de cerdos hiperprolíficas chinas en las occidentales: Una revisión. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 13 (2):70-80.
- Yoshii, T., K. Akiyama, K. Tamura and I. Ishiyama. 1994. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis Adv. in For. Haem. 5:393-396.

7. APÉNDICE

Cuadro 4. Apéndice. Polimorfismos asociados con los ESR y PRLR

ID. PADRE		CAMADAS		POLIMORFISMOS ESR			POLIMORFISMOS PRLR		
		N	%	LNT	LNV	LNM	AA	BB	AB
1	Y16	117	18.25	AA	BB	AB	0	117 18.25	0
2	LINZE	93	14.51	0	0	117 18.17	0	93 14.51	0
3	L10	87	13.57	0	0	93 14.44	0	0	87 13.57
4	TIGRE	44	6.86	87 13.51	0	0	0	44 6.86	0
5	Y12	29	4.52	0	0	44 6.83	0	29 4.52	0
6	LEON	25	3.90	0	0	29 4.50	0	25 3.90	0
7	LAVIPOR	25	3.90	0	0	25 3.88	0	25 3.90	0
8	MARFIL	21	3.28	25 2.88	0	0	0	21 3.28	0
9	TARZAN	19	2.96	21 3.26	0	0	0	19 2.96	0
10	KING	18	2.81	19 2.95	0	0	18 2.81	0	0
11	29YB	16	2.5	0	0	18 2.80	0	16 2.5 %	0
12	73YA	16	2.50	0	0	16 2.48	0	16 2.5 %	0
13	QUERET	16	2.50	16 2.48	0	0	0	16 2.50	0
14	59YA	15	2.34	16 2.48	0	0	0	15 2.3 %	0
15	LEO	14	2.18	15 2.33	0	0	0	14 2.18	0
16	Y17	14	2.18	14 2.17	0	0	0	0	14 2.18
17	WILL	12	1.87	0	0	14 2.17	12 1.87	0	0
18	LEWIN	11	1.72	12 1.86	0	0	0	0	11 1.72
19	CHAPIN	9	1.40	11 1.71	0	0	0	9 1.4 %	0
20	OROBLAN	9	1.40	9 1.40	0	0	0	9 1.40	0
21	ELIO	7	1.09	9 1.40	0	0	0	0	7 1.09
22	ALF	5	0.78	7 1.09	0	0	5 0.78	0	0
23	POPEYE	5	0.78	5 0.78	0	0	0	5 0.78	0
24	L10	5	0.78	0	0	5 0.78	0	0	5 0.78
25	LAWINS	2	0.0	5 0.78	0	0	0	0	0
26	OTRO			0	0	2 0.31	--	--	--

Cuadro 5. Apéndice. Caracteres de prolificidad de los genes ESR y PRLR

ID. PADRE		CAMADAS		CARACTERES DE PROLIFICIDAD			
		N	%	LNT	LNV	LNМ	LDEST
1	Y16	117	18.25	9.23	8.92	0.32	--
2	LINZE	93	14.51	11.12	10.66	0.46	8.56
3	L10	87	13.57	8.74	8.37	0.32	--
4	TIGRE	44	6.86	10.32	9.77	0.55	8.07
5	Y12	29	4.52	9.45	8.59	0.90	--
6	LEON	25	3.90	11.32	11.00	0.32	8.84
7	LAVIPOR	25	3.90	9.40	8.80	0.63	8.04
8	MARFIL	21	3.28	7.90	7.43	0.48	6.86
9	TARZAN	19	2.96	10.63	9.84	0.79	8.53
10	KING	18	2.81	11.72	11.05	0.66	10.05
11	29YB	16	2.5	9.43	8.31	1.13	8.25
12	73YA	16	2.50	9.69	8.68	1.0	8.44
13	QUERET	16	2.50	9.13	8.63	0.50	7.63
14	59YA	15	2.34	8.53	7.67	0.86	7.47
15	LEO	14	2.18	12.43	11.29	1.14	9.14
16	Y17	14	2.18	9.50	8.21	0.57	--
17	WILL	12	1.87	11.50	10.50	1.00	9.58
18	LBWIN	11	1.72	10.82	10.09	0.73	9.09
19	CHAPIN	9	1.40	8.56	7.33	1.22	6.22
20	OROBLAN	9	1.40	8.33	7.89	0.44	7.11
21	ELIO	7	1.09	10.57	9.86	0.71	9.71
22	ALF	5	0.78	8.80	8.20	0.60	7.80
23	POPEYE	5	0.78	8.00	7.00	1.00	7.00
24	L10	5	0.78	8.60	8.20	0.40	--
25	LAWINS	2	0.0	9.95	8.70	--	--
	OTRO	--		17.30	10.28	4.43	5.09

