

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NAYARIT**

**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**



**"DIFERENCIAS GENICAS, GENOTIPICAS Y DISTANCIAS GENETICAS PARA  
LOS GENES ESR, FUT1 Y RBP4 EN POBLACIONES DE RAZAS DE CERDOS  
YORKSHIRE, PELON MEXICANO Y CUINOS"**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS,  
BIOLOGIA DE LA PRODUCCION AGROPECUARIA  
EN EL AREA DE REPRODUCCION**

**PRESENTA:**

**M.V.Z. MAURO ANTONIO CORTES IBARRA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**



**SISTEMA DE BIBLIOTECAS**

**TUTOR: DR. CLEMENTE LEMUS FLORES  
ASESORES: M.C. JAVIER GERMAN RODRIGUEZ CARPENA  
M.C. SILVIA HORTENCIA HERNANDEZ LOPEZ**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
UNIDAD ACADÉMICA DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA

---

Compostela, Nayarit; 03 de Octubre del 2006

**M.C. JUAN ANTONIO HERNÁNDEZ BALLESTEROS**  
**DIRECTOR DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**  
**VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**P R E S E N T E**

Los suscritos C. Dr. Clemente Lemus Flores, M. en C. Javier Germán Rodríguez Carpena, M. en C. Silvia Hortencia Hernández López; Integrantes del Consejo Tutelar para revisar, ordenar y asesorar la Tesis de Maestría en Ciencias del Posgrado en Biología de la Producción Agropecuaria, titulada: "Diferencias genéticas, genotípicas y distancias genéticas para los genes ESR, FUT1 y RBP4 en poblaciones de razas de cerdos yorkshire, pelón mexicano y cuino".

Que presenta ante el Honorable jurado calificador C.M.V.Z

**MAURO ANTONIO CORTES IBARRA**

Comparecemos para manifestar que después de revisar su presentación y contenido, no existe inconveniente para continuar con los trámites legales de este proceso de obtención de Maestría en el área de Reproducción, por estar de acuerdo en los aspectos de forma y contenido.

ATENTAMENTE  
CONSEJO TUTELAR

  
\_\_\_\_\_  
DR. CLEMENTE LEMUS FLORES

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. JAVIER GERMAN RODRIGUEZ  
CARPENA

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. SILVIA HORTENCIA HERNANDEZ  
LOPEZ

## AGRADECIMIENTOS

### **A mis padres y hermanos:**

Quien con su ejemplo, disciplina y consejos, me han ayudado a labrar un porvenir y llegar a estos niveles. para ellos con todo mi amor.

### **A mi esposa e hijas:**

Por su impulso, paciencia y comprensión durante todo este tiempo de la maestría. Con todo mi amor.

### **A mis maestros:**

Con profundo respeto y admiración por proporcionarme de sus conocimientos y experiencias con excelencia. Con gran reconocimiento.

### **A mis compañeros:**

Con quien compartimos el aula, las experiencias y que en los momentos difíciles nos dimos ánimos.

### **A mi tutor Dr. Clemente Lemus Flores.**

Que con su tenacidad incansable es un vivo ejemplo para todo alumno que tiene la fortuna de estar cerca de él. Con sincero reconocimiento.

**A mis asesores:**

M.C. Javier Germán Rodríguez Carpena y M.C. Silvia Hortencia Hernández López.  
Por sus conocimientos y valiosos consejos y sugerencias para el logro del presente trabajo de investigación. Con especial agradecimiento.

**A mis amigos: Gabriela Torres y Carmen Muñoz.**

Por su gran apoyo en forma desinteresada sobre todo en el laboratorio de genética molecular. Por esos tiempos aplicados con esmero y dedicación a mi trabajo de investigación.

**A mi Universidad Autónoma de Nayarit:**

Por abrirme las puertas nuevamente y luchar por la excelencia académica proporcionándome el postgrado, para luchar por nuevos retos en la vida profesional. Con todo para ti. Por lo nuestro a lo universal.

**A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria:**

Por darme la oportunidad de prepararme más, proporcionándome los tiempos requeridos para que esto fuera posible, sobre todo al personal del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 107 de Xalisco, Nayarit.

**A dios nuestro señor:**

Por darme la oportunidad de obtener esta vivencia que creí no fuera a culminar.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN .....	vii
SUMMARY .....	viii
I. INTRODUCCION .....	1
HIPOTESIS .....	3
OBJETIVO.....	3
II. REVISION DE LITERATURA .....	4
2.1. Importancia del potencial productivo en la porcicultura.....	4
2.2. Generalidades de las razas Yorkshire, Cerdo Pelón Mexicano y Cuino.....	5
2.3. Selección asistida por marcadores de ADN.....	10
2.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	14
2.3.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	16
2.4. Genes candidatos relacionados con características reproductivas en cerdos.....	18
2.5. Genes candidatos relacionados con resistencia a enfermedades en cerdos	25
III. MATERIALES Y METODOS .....	28
3.1. Localización.....	28
3.2. Animales experimentales.....	28
3.3. Extracción y purificación de ADN genómico.....	29
3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	31
3.5. Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).....	32
3.6. RFLPs generados.....	33
3.7. Análisis estadístico.....	36

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
4.1. Frecuencias génicas y genotípicas.....	38
4.1.1. Gen ESR.....	38
4.1.2. Gen FUT1.....	39
4.1.3. Gen RBP4.....	41
4.2. Distancias genéticas y árboles filogenéticos.....	42
4.2.1. Gen ESR.....	42
4.2.2. Gen FUT1.....	44
4.2.3. Gen RBP4.....	45
V. CONCLUSIONES.....	47
VI. LITERATURA CONSULTADA .....	48

## RESUMEN

Fueron examinados los efectos de genes candidatos para reproducción, el Receptor estrogénico (ESR), Alpha 1,2 fucosyltransferasa (FUT1) y Retinol-binding Protein 4 (RBP4) en el desempeño de tres diferentes razas de cerdos. Un número total de 29 cerdos Yorkshire, 46 Cerdos Pelón Mexicano (CPM) y 28 Cuinos fueron genotipificados con el método de PCR-RFLP y analizados para establecer diferencias génicas, genotípicas y distancias genéticas entre razas. Se utilizaron pruebas de Chi cuadrada para analizar las frecuencias génicas y genotípicas y se calcularon distancias genéticas para construir árboles filogenéticos. La raza Yorkshire se asoció con mayor frecuencia al alelo B del gen ESR ( $p < 0.05$ ) y no se encontraron animales homocigotos B en los CPM y Cuinos. En el gen FUT1 la frecuencia del alelo G y genotipo GG fue mayor en la raza Yorkshire, mientras que el alelo A y genotipo AA en los cerdos Cuinos. Las frecuencias génicas y genotípicas del gen RBP4 no mostraron estar relacionadas ( $p > 0.05$ ) con las razas de cerdos y no se detectaron animales con genotipo BB. Los árboles filogenéticos obtenidos mediante el análisis Neighbor-Joining presentaron una topología similar, se observó una clara separación entre la raza Yorkshire y los Cuinos con los genes ESR y FUT1, en el gen RBP4 las distancias genéticas fueron similares entre las tres razas. En el presente trabajo se concluye que la influencia de estos genes fue diferente dependiendo de la raza, los alelos benéficos en la reproducción de los genes ESR y FUT1 se asociaron con la raza más prolífica (Yorkshire) y el alelo que confiere resistencia a diarreas causadas por *E. coli* se asoció con la raza más resistente a enfermedades (Cuinos).

## SUMMARY

The effects of the candidate genes for reproduction, the Estrogen Receptor (ESR), alpha 1, 2 fucosyltransferase (FUT) and Retinol-binding Protein 4 (RBP4) genes, on the performance of three different breeds have been examined. A total number of 46 Mexican Hairless Pigs (MHP), 27 Yorkshire pigs and 29 Cuino Pigs (CP) were genotyped with PCR-RFLP method and analyzed to establish alleles, genotypic differences and genetics distances between breeds of pigs. Chi-Square tests were used to analyze the alleles, genotypic frequencies and genetics distances were calculated to build phylogenetic trees. The Yorkshire breed was associated with a higher frequency of B allele of ESR gene ( $p < 0.05$ ) and no homozygous BB animals were meet in MHP and CP. In the FUT1 gene the G allele and GG genotypic frequency was higher in the Yorkshire breed while A allele and AA genotypic in CP. The alleles and genotypic frequencies of RBP4 gene no showed to be related ( $p > 0.05$ ) with the breeds pigs and no animals with BB genotype were detected. The phylogenetic trees obtained by Neighbor-Joining analysis showed a similar topology, a evident separating was seen among Yorkshire breed and CP with the ESR and FUT1 genes, in the RBP4 gene the genetics distances were similar between the three breeds. In this study we concluded that the influence of these genes was different depending of the breed, the benefic alleles for reproduction of the ESR and FUT1 genes were associated with the most prolific breed (Yorkshire) and the allele that confer resistance to diarrheas causing by *E. coli* was associated with the most resistant breed to diseases (CP).

## I. INTRODUCCION

La producción eficiente es esencial para que los productores de cerdos sean competitivos, buscando siempre una mayor productividad de sus explotaciones. Los cerdos poseen características económicamente importantes que contribuyen a la eficiencia productiva de las empresas porcinas; sin embargo, no todos los cerdos tienen el mismo potencial genético, por lo cual es muy importante identificar las diferencias entre animales y entre razas.

El potencial genético de un animal esta en función de muchos pares de genes y para mejorarlo se debe incrementar la frecuencia de aquellos relacionados con características deseables para el productor. El mejoramiento genético considera introducir nuevos genes y aumentar la frecuencia de los genes favorables y de sus combinaciones dentro de una raza, línea o familia (Rosas y Ávila, 1999).

Los métodos de selección de características cuantitativas, se basan en la evaluación de animales a través de sus propios registros y de sus parientes cercanos, para ello se generan bases de datos con mediciones de características de interés y mediante un riguroso análisis y procedimientos de evaluación genética se selecciona al pie de cría (Rosas y Ávila, 1999; Sánchez, 2003).

En la actualidad, con los avances tecnológicos de la biología molecular e ingeniería genética, han surgido otros métodos más precisos para identificar a

los animales más productivos. La capacidad de generar mapas genéticos de las diferentes especies permite que su genoma completo sea evaluado (Sánchez, 2003); de esta manera se identifican marcadores moleculares, los cuales son regiones de ADN capaces de identificar en los cromosomas los genes que codifican para características cuantitativas.

Existen técnicas moleculares apoyadas en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como: Fragmentos de restricción polimórfica (RFLP), amplificados polimórficos de ADN al azar (RAPD), polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismos de base simple (SNPs) y Microsatélites, con las cuales se pueden identificar genotipos y relacionarlos con su comportamiento productivo, de esta manera la respuesta a la selección usando marcadores moleculares es mayor e incrementa su confiabilidad. Al identificar genótipicamente a los reproductores, se puede planear sistemáticamente los apareamientos, evitando cruzamientos indeseables y fomentando los deseables.

Algunos investigadores han encontrado relaciones entre las variantes de genes y el comportamiento fenotípico de los animales, por lo cual proponen que el uso de la selección asistida por medio de marcadores moleculares puede ser más eficaz en conjunto con el uso de selección tradicional (Vincent *et al.*, 1997; Montaldo y Meza, 1998; Korwin *et al.*, 2003; Drogemüller *et al.*, 2001; Rothshild, 2003b).

En el caso de los cerdos se ha demostrado que los genes Receptor Estrogénico (ESR), Retinol-binding Protein 4 (RBP4) y Alpha 1,2 fucosyltransferasa (FUT1) tienen alelos que participan en rasgos económicamente importantes; sin embargo, estos alelos han influido de manera diferente entre grupos raciales.

## **HIPOTESIS**

Existen diferencias en las frecuencias génicas, genotípicas y una elevada distancia genética entre poblaciones de las razas de cerdos Yorkshire, Pelón Mexicano y Cuinos que se pueden identificar con los genes Receptor Estrogénico, alpha 1,2 fucosyltransferasa y Retinol-Binding Protein 4.

## **OBJETIVO**

Establecer diferencias génicas, genotípicas y distancias genéticas entre las razas de cerdos Yorkshire, Pelón Mexicano y Cuinos por medio de los genes Receptor Estrogénico, alpha 1,2 fucosyltransferasa y Retinol-Binding Protein 4 relacionados con comportamiento reproductivo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT.



## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Importancia del potencial productivo en la porcicultura

La producción eficiente de cerdos se basa en diversos factores zootécnicos como son manejo, sanidad, nutrición, genética y reproducción (Rosas y Ávila, 1999; Trujillo *et al.*, 2002). Otro aspecto trascendental, es la sustentabilidad económica de la explotación que garantice un retorno económico para el productor (Martínez *et al.*, 2003). Por ello es importante mejorar las características de importancia económica que poseen los cerdos y que contribuyen a la eficiencia productiva de las empresas porcinas.

Los cerdos domésticos han cambiado bastante desde finales del siglo pasado hasta el presente, especialmente en sus funciones zootécnicas, pasando de ser productores primarios de manteca a productores de carne, incrementando el tamaño de la camada y la producción láctea de la cerda. Esto permite cumplir en parte las metas de los sistemas de producción intensivos, en los cuales se espera el mayor tamaño posible de camada al nacimiento y al destete, el mayor peso al destete de los lechones a edad más temprana y una rápida presentación de un celo fértil después del destete. Existen una serie de componentes fisiológicos del proceso reproductivo que son los responsables de lograr dichas metas, entre ellos se pueden citar la edad a la pubertad, la tasa de ovulación, la tasa de fertilización, la sobrevivencia embrionaria y fetal, el proceso de parto y la sobrevivencia de las crías (Trujillo *et al.*, 2002). Sin embargo, existen diferencias entre cerdos y entre razas; es decir, no todos los

cerdos tienen el mismo potencial genético para incrementar la producción por lo cual se hace importante identificar esas diferencias.

## **2.2. Generalidades de las razas Yorkshire, Cerdo Pelón Mexicano y Cuino**

Una vez establecido el proceso de domesticación, se empezaron a fijar características definidas en los cerdos, estas características respondían a necesidades comerciales, adaptación al medio ambiente, a diferentes formas de alimentación e incluso a preferencias de los criadores como color, alzada, perfil o forma de las orejas, dando origen a tipos regionales (Brent, 1991).

El establecimiento de cruzas de los cerdos que hoy conocemos es el resultado de cambios en la frecuencia de los genes, resultantes tanto de la selección de individuos dentro de poblaciones indígenas como de la incorporación de individuos con otro origen dentro de esas mismas poblaciones o migraciones. Es importante conocer los factores históricos que han intervenido en la formación de cada una de las razas de cerdos que hoy se utilizan, para poder entender tanto sus atributos como sus problemas y así ser capaces de elegir cada raza con base en lo que se espera de ella dentro de un sistema de cruzamiento. Dentro del listado de razas que existen, se sabe que algunas son provenientes de variaciones locales en las que se han fijado características productivas específicas; sin embargo, la lista se complementa con una gran cantidad de razas autóctonas o criollas. Por tal motivo es importante conocer las razas para saber el potencial del que son capaces (Brent, 1991; Buxade, 1999).

## Raza Yorkshire

La raza Yorkshire o Large White se origina en el condado inglés del mismo nombre y en condados vecinos como Lincoln y Leicester; inicialmente existían tres variedades de Large o Grande, la Middle o Mediana de la cual se encuentran muy pocos animales en pequeñas granjas de tipo familiar en Inglaterra y la Small o pequeña, esta última considerada como extinta hoy en día. Se argumenta que los Large White se derivan de los cerdos Old English y que en su formación intervino el criador Robert Bakewell, al que algunos atribuyen parte de la formación de la raza. Posteriormente durante finales del siglo XVIII y principios del siglo XIX la raza se vio enriquecida por la incorporación de animales Chinos y Napolitanos (*Sus mediterraneus*) que disminuyeron el tamaño original y aceleraron la madurez de los animales. Durante el siglo XIX la raza se importó a una gran cantidad de países por todo el mundo, en algunos se les denominó Yorkshire y en otros Large White; en cada país se dieron patrones de selección diferentes con base en las necesidades del mercado local, aunque esas variaciones que inicialmente dieron origen a variedades o razas locales, tienden a desaparecer por la constante migración que se lleva a cabo actualmente. Se considera la raza más difundida en el mundo y se pueden citar un gran número de razas nacionales derivadas del Yorkshire o Large White inglés, como: el Yorkshire canadiense, Yorkshire Americano, Yorkshire Danés, Yorkshire Alemán y el Large White Francés, entre otros muchos (Brent, 1991; Trujillo *et al.*, 2002).

Los Yorkshire son animales de color blanco, algunos ejemplares pueden presentar pequeñas manchas negras del tamaño de una moneda en la región posterior del lomo. Son animales largos, de gran aizada, con el perfil subcóncavo, las orejas grandes y completamente erectas. Tienen una buena estructura ósea, aunque el espesor de los huesos en sus patas no es muy grande. Los machos tienen un excelente comportamiento reproductivo además de excelentes características en el eyaculado. Las hembras son extremadamente prolíficas, con un muy buen instinto materno y elevada producción de leche. Durante los últimos 20 años se han identificado líneas de hembras Yorkshire consideradas como hiperprolíficas, debido a una mayor tasa de ovulación. Las cerdas de esta raza se emplean principalmente en la producción de cerdas híbridas comerciales cruzándolas con la raza Landrace. Lo anterior no demerita en nada su velocidad de crecimiento y las características de la canal en su progenie, por lo que si bien se considera una raza de tipo materno, recientemente se están empleando sementales de ciertas líneas de Yorkshire como machos terminales, tanto en raza pura como en la formación de machos híbridos comerciales (Brent, 1991; Buxade, 1999; Trujillo *et al.*, 2002).

### **Cerdo Pelón Mexicano (CPM)**

El CPM es probable que se haya formado a partir de cerdos Célticos, Ibéricos y Napolitanos que introdujeron los españoles a México, en combinación con animales de raza asiática, introducido por el comercio con China después de la

conquista. Estos cerdos se volvieron salvajes esparciéndose por el territorio nacional (Lemus y Alonso, 2005).

Los CPM tienen la cabeza y cara rectilínea, orejas de tamaño mediano, semirrectas, dorso un tanto rectilíneo con ancas completamente caídas, el cuerpo está parcial o totalmente desprovisto de pelo, su color es grisáceo o combinado con blanco y son de talla mediana (Castellanos y Gómez, 1984).

El CPM no es prolífico y no está capacitado genéticamente para aprovechar una buena alimentación pero tiene la ventaja de su resistencia en patas y hocico. También se han reportado valores productivos de acuerdo a diversos investigadores, lo que es importante en la caracterización productiva del CPM al compararse con razas comerciales modernas, ya que estos cerdos criollos pueden representar recursos genéticos valiosos, porque son reservorios de diversidad genética única que podrían enriquecer y renovar en un futuro la variabilidad genética de las líneas comerciales de cerdos, igualmente puede ser una base importante para la mejora de razas comerciales que se deseen introducir a condiciones tropicales mediante la creación de razas sintéticas porcinas. Los intentos de incrementar la productividad de los cerdos indígenas se han enfocado a sus características de prolificidad y precocidad como condiciones primarias, para lo cual se ha empleado como herramienta de estudio la heterosis, introduciendo material genético de razas mejoradas en diferentes sistemas de cruzamientos; sin embargo, lo anterior ha ido en detrimento de algunas características valiosas de los cerdos criollos, como la rusticidad, fertilidad o habilidad materna (Rojas, 1994; Lemus y Alonso, 2005).

En la actualidad, la información publicada no es consistente y es escasa, en particular la relacionada con el efecto del cruzamiento del CPM con diferentes genotipos sobre el comportamiento productivo; la poca información existente está restringida a animales criollos en ciertas regiones y no indica evidencia de heterosis; además, éstos datos se basan en pocos animales y sus resultados son contradictorios y se concretan a descripciones generales, sin implementar variantes en los sistemas de producción; por lo que es necesario estudiar su importancia en el crecimiento para establecer programas estratégicos de cruzamientos que conduzcan a mejorar la producción (Lemus y Alonso, 2005).

### **Cuínos**

Este biotipo criollo fue traído por los españoles, o venía también en la famosa Nao de China que atracaba en Acapulco, Guerrero y San Blas, Nayarit. Se originó del cerdo asiático, confirmado mediante estudios de DNA mitocondrial. Aunque antiguamente se le encontraba en abundancia, en la actualidad está casi extinto. Posee pelo sumamente erizado pero puede estar desprovisto de él. El color más frecuente es el negro, aunque los hay rojos e incluso pintos. Se caracteriza por ser dócil. Su cuerpo es pequeño con tendencia a acumular grasa, presentan un tipo de cara cóncava y hocico corto, con una pronunciada abundancia de depósito de grasa en maceteros y son poco prolíficos (Lemus y Alonso, 2005).

Por lo anterior, podemos concluir que las diferencias raciales no solo se deben al fenotipo sino también al genotipo, debido a la evolución y selección que se



ha establecido en las diferentes razas. Por un lado, en las razas comerciales se ha llevado a cabo la selección artificial encaminada al mejoramiento de características productivas con valor económico como son la prolificidad, resistencia a enfermedades y calidad de la carne y por otro lado en las razas criollas solo ha habido selección natural en donde los animales han sobrevivido a condiciones ambientales diversas y cambiantes lo cual ha permitido a estas razas ser más resistentes a enfermedades y a condiciones adversas en el medio ambiente (Lemus y Alonso, 2005).

### **2.3. Selección asistida por marcadores de ADN**

Los avances relevantes de algunas de las características económicamente importantes se han alcanzado basándose en el funcionamiento fenotípico; sin embargo, varias limitaciones de estos métodos de mejora basados en genética de la población solamente son evidentes con el tiempo y su eficacia disminuye cuando las características son difíciles de medir. Además, la selección se ha limitado a esas características que se pueden medir correctamente en una gran cantidad de animales (Schwerin *et al.*, 1995).

En la actualidad, con los avances tecnológicos de la biología molecular e ingeniería genética, han surgido métodos más precisos para realizar la selección genética de los animales más productivos. La capacidad de generar mapas genéticos de las diferentes especies permite que su genoma completo sea evaluado; de esta manera se identifican marcadores moleculares (Sánchez, 2003).

Un marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida. Dado que los segmentos del ADN que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce. Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. Los marcadores se usan para el mapeo genético como el primer paso para encontrar la posición e identidad de un gen (Rosas y Ávila, 1999; Silió *et al.*, 2000; Valadez y Günter, 2000; Jiménez y Collada, 2000; Sánchez, 2003).

Los avances de la biología molecular durante la década de los 80s, han aportado una clase de marcadores genéticos que permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homologas del ADN de los organismos. Estas diferencias resultan de cambios entre los pares de bases que conforman esta molécula. Este tipo de marcadores detecta variaciones directas a nivel de ADN y tienen ventajas tales como el hecho de ser dominantes o codominantes, de desarrollarse de manera estable, de carácter de efectos pleiotrópicos y de no estar sujetos al ambiente en donde se desarrolla el organismo en estudio (Jeffreys *et al.*, 1986; Hagelberg *et al.*, 1991; Valadez y Günter, 2000).

La mayor parte de estos marcadores se han desarrollado a partir de la estrategia de genes candidatos (en la que se conoce previamente la función del gen y en consecuencia resulta previsible su influencia en el carácter estudiado) (Silió *et al.*, 2000).

Algunos estudios han demostrado relaciones entre las variantes de genes y el comportamiento fenotípico en varias características y en diferentes especies animales (Beever *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1994; Georges *et al.*, 1995; Haley, 1995; Ashwell *et al.*, 1997).

Estos estudios han alentado la idea de agregar la información genotípica a la información fenotípica para aumentar o acelerar la respuesta a la selección de los métodos tradicionales, lo cual se conoce como selección asistida por medio de marcadores moleculares (Ramos *et al.*, 2003; Rothschild y Plastow, 1999; Rothschild, 2003a).

Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos). Varios QTLs examinan y analizan genes candidatos que han identificado regiones importantes en el cromosoma y genes individuales asociados con rasgos de características económicas importantes. Así, QTLs para crecimiento y grasa, calidad de carne y caracteres reproductivos han sido identificados en diversas regiones del genoma porcino (Rothschild, 2003b).

Montaldo y Barria (1998) ilustran la respuesta a la selección cuando se asiste con marcadores moleculares, en la siguiente figura:

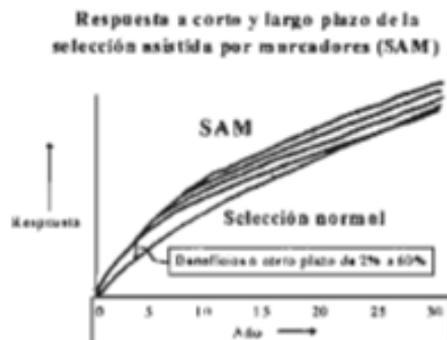


Figura 1. Respuesta a corto y largo plazo de la selección asistida por marcadores de ADN (SAM), las líneas rojas muestran el avance posible usando SAM comparada a selección convencional en una característica cuantitativa. El efecto de la SAM será incrementar la respuesta a corto plazo (Reproducido con autorización de: Kinghorn, B.P. (1998). Managing genetic change under operational and cost constraints. 36th National Congress of the South African Association of Animal Science. University of Stellenbosch 5-8 April. pp 9-16).

Algunos de los genes candidatos que se han identificado para crecimiento y grasa dorsal son el receptor 4 del melanocortin (Ciobanu *et al.*, 2001), Leptina y receptor de la leptina (Vincent *et al.*, 1997). También se dispone de información sobre genes candidatos y sus mutaciones, que pueden influir sobre determinados caracteres cuantitativos: genes del receptor de estrógenos (ESR)

(Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997; Linville *et al.*, 2001), prolactina (PRL) y receptor de la prolactina (PRLR) (Korwin *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 1998; Drogemuller *et al.*, 2001; Birgitte *et al.*, 2003) o de la proteína de unión al retinol (RBP4) (Linville *et al.*, 2001; Rothschild, 2003b) para parámetros reproductivos o genes relacionados con los niveles de grasa intramuscular (FABP) (Rothschild, 2003b). En el ámbito de la resistencia genética a enfermedades se han obtenido recientemente resultados esperanzadores cómo la caracterización del gen de la fucosiltransferasa (FUT1) asociado al receptor de algunas cepas de *Escherichia coli* (Vögeli *et al.*, 1996; Meijerink *et al.*, 1997) o el gen NRAMP relacionado con la resistencia a la infección por *Salmonella* (Tuggle *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998).

Para obtener marcadores moleculares se utilizan diferentes métodos. La elección de los mismos debe hacerse pensando en la información que se quiere obtener. Las técnicas que permiten la detección de la variabilidad genética directamente al nivel del ADN son los polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), los amplificados polimórficos de ADN al azar (RAPD), los microsatélites y los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Sambrook *et al.*, 1994; Valadez y Günter, 2000; Rothschild, 2003a). Todas estas técnicas moleculares implican la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

### **2.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Esta técnica fue patentada en 1985 y se ha venido utilizando con bastante

éxito en diferentes campos del conocimiento, ha invadido de tal forma la Biología Molecular, que hoy en día es muy difícil imaginar esta ciencia sin ella. En 1993, Kary Mullis recibió por este descubrimiento el Premio Nóbel de Química (Boom, 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece una alternativa a la clonación basada en vectores como medio de generar numerosas copias de ADN a partir de una muestra simple. Esta técnica imita la forma en la que el ADN se replica de forma natural en el interior de la célula. Esta tecnología se utiliza para sintetizar *in-Vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo (Arredondo, 1993; Valadez y Günter, 2000; Soberon, 2000).

La PCR tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas primers, una enzima ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado (Sambrook *et al.*, 1994).

La PCR consiste de tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización y sirve para separar mediante temperatura (94°C) la molécula doble de ADN a cadenas sencillas, que servirán como moldes para la síntesis del fragmento respectivo. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el

alineamiento (o reconocimiento) de las moléculas iniciadoras a la secuencia blanco del ADN molde. Las moléculas iniciadoras pueden variar en longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para parearse con la secuencia blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar desde 25°C a 65°C. En el tercero se lleva a cabo el alargamiento o extensión de la molécula iniciadora mediante la enzima ADN polimerasa a 72°C. La mas recomendable es la ADN polimerasa seleccionada para que tolere la temperatura de desnaturalización y se mantenga activa durante el número de ciclos que se requieran. En muchas investigaciones se utiliza la ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, debido a que tolera la temperatura de desnaturalización sin alterar la función de polimerización. Estos tres ciclos se repiten en el termociclador, permitiendo obtener de manera exponencial el fragmento sintetizado a partir del molde de ADN (Innis *et al.*, 1990; Arredondo, 1993; Sambrook *et al.*, 1994; Valadez y Günter, 2000; Soberon, 2000; Boom, 2004).

### **2.3.2. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)**

Los marcadores de ADN son secuencias genómicas localizadas en un mismo locus pero que difieren en su secuencia de bases nitrogenadas. Esas variaciones son consecuencia de varios eventos de mutaciones que se manifiestan en los genomas que se comparan. Para detectar alguna de estas mutaciones se utiliza la técnica de RFLP (Valadez y Günter, 2000). Esta tecnología utiliza enzimas de restricción (endonucleasas) para fragmentar la

molécula de ADN, detectando el polimorfismo a través del número y tamaño de los fragmentos (Drinkwater and Hetzel, 1991; Sambrook *et al.*, 1994; Valadez y Günter, 2000; Jiménez y Collada, 2000; Sánchez, 2003; Rothschild, 2003a).

Cada una de las endonucleasas (actualmente se conocen más de 1500) reconocen y cortan solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando estas no estén protegidas (metiladas). El propio cromosoma bacteriano está protegido con dicho proceso de metilación en los sitios que reconocen las endonucleasas que la misma bacteria produce, por lo que no es afectado. Cualquier otro ADN que no estuviera metilado, podría ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Günter, 2000).

Para la detección de RFLPs, en primer lugar es necesario aislar el ADN del organismo de interés, purificarlo y cortarlo con una o más endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes se separan en un gel de agarosa por electroforesis. El fragmento específico de ADN se hará visible con autorradiografía, luminografía o quimioluminiscencia (Valadez y Günter, 2000; Sambrook *et al.*, 1994).

Una vez amplificado y digerido el ADN, los fragmentos resultantes son separados en función de su tamaño por medio de un proceso denominado electroforesis (Sambrook *et al.*, 1994; Rothschild, 2003a), que consiste en separar fragmentos de ADN en función de su tamaño al aplicar una corriente

eléctrica a un gel en el interior del cual se ha introducido una mezcla de fragmentos (Anderson *et al.*, 1994). Éstos comienzan a moverse desde el polo negativo al polo positivo de tal modo que los fragmentos más pequeños se mueven más rápido que los más grandes. Cuando la corriente cesa, los fragmentos de ADN se han distribuido a lo largo del gel, situándose los más pequeños más cerca del polo positivo, adoptando una apariencia similar a un código de barras. Cada barra contiene un fragmento de ADN de un tamaño determinado. Adicionalmente puede utilizarse una secuencia complementaria de un ADN como sonda para buscar un fragmento específico en el patrón de bandas.

#### **2.4. Genes candidatos relacionados con características reproductivas en cerdos**

En rasgos que se expresan tarde en la vida de los cerdos, con heredabilidades bajas, como tamaño de la camada, se pueden utilizar marcadores genéticos que identifiquen a machos y hembras que tengan los alelos benéficos para la característica de interés y que se pueda detectar a edad temprana (Drogemuller *et al.*, 2001).

Los genes candidatos analizados para reproducción han mostrado un mérito considerable. Algunos resultados han demostrado claramente que el ESR, PRL y PRLR se asocian significativamente con tamaño de la camada en algunas razas comerciales (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997; Linville *et al.*, 2001; Rothschild, 2003b).

## Receptor Estrogénico (ESR)

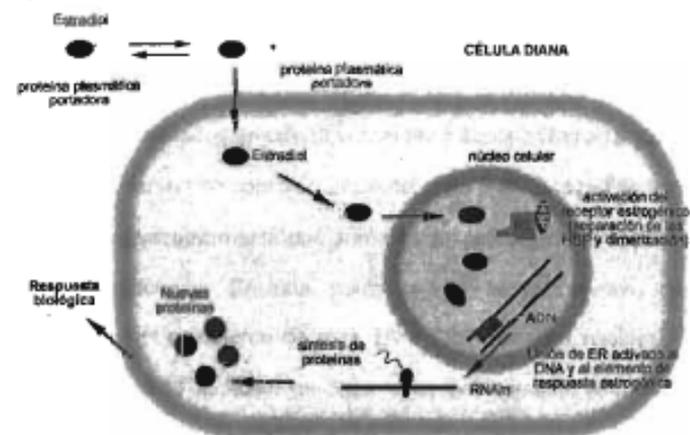
Los estrógenos son hormonas esteroideas que junto con la progesterona hacen posible la fertilidad de las hembras al liberar el óvulo y regular el ciclo sexual; además, los estrógenos determinan el fenotipo de las hembras, haciendo que los órganos sexuales alcancen su desarrollo completo, en el tracto genital, los estrógenos tienen el siguiente efecto: el ovario resulta inhibido en su función por dosis elevadas de estrógenos; por el contrario, cantidades pequeñas de estrógenos actúan estimulando. Bajo la influencia de los estrógenos, el oviducto aumenta en longitud y diámetro, éstos actúan en el útero en la fase de la pubertad, así como lo relativo a los fenómenos de desarrollo del ciclo uterino, revisten particular importancia en la preparación del endometrio para el anidamiento del óvulo fecundado, la vagina experimenta una serie de alteraciones de la mucosa, las cuales sirven principalmente para la producción de un acondicionamiento adecuado para el apareamiento. En sinergismo con otras hormonas, los estrógenos ayudan el desarrollo de las glándulas mamarias e inducen el comportamiento típico del celo en las hembras (Smidt y Ellenforff, 1972; Hershman, 1981; Jubiz, 1996).

Sin embargo, todas las funciones de los estrógenos están mediadas por sus receptores (ESR), que han sido importantes reguladores en los procesos reproductivos. Por esta razón, el gen del receptor de los estrógenos se ha estudiado como un gen candidato para tamaño de la camada en cerdos

(Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997; Linville *et al.*, 2001; Drogemuller *et al.*, 2001; Isler *et al.*, 2002; Noguera *et al.*, 2003).

Los estrógenos actúan a nivel intracelular en las células diana que contienen los receptores estrogénicos. Al llegar a dichas células, los estrógenos se separan de sus proteínas portadoras y se internalizan en la célula hasta llegar al núcleo en donde se encuentran los receptores estrogénicos. Al unirse a estos se activan, separándose de las llamadas HSP (Heat Shock Proteins), dimerizándose y uniéndose al elemento de respuesta estrogénica. Este complejo se une al ADN y en último término, todos estos eventos se traducen en la síntesis de nuevas proteínas por los ribosomas del retículo endoplásmico. Estas proteínas, son las responsables de los efectos estrogénicos en los órganos diana. En la figura 2 se puede observar el mecanismo de acción de los receptores estrogénicos (McDonnell, 2004).

Figura 2. Mecanismo de acción del Receptor Estrogénico



El gen del ESR se localiza en el cromosoma 1p2.4-p2.5. Es de herencia autosómica codominante (Rothschild *et al.*, 1991). Una mutación de una timina por una guanina en la posición 1665 en la raza Meishan y Large White ha sido asociada con características reproductivas, principalmente tamaño de la camada (Rothschil *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997).

Para su estudio, diversos investigadores han amplificado fragmentos de ESR con la metodología de PCR y cortado con la enzima de restricción PvuII, encontrando polimorfismo dialélico, con alelos denominados A y B (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997; Linville *et al.*, 2001; Drogemuller *et al.*, 2001; Isler *et al.*, 2002; Noguera *et al.*, 2003).

Diversas investigaciones han demostrado que el alelo favorable para aumentar el número de lechones nacidos vivos y totales (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Goliasova y Wolf, 2004) y el peso de la camada al nacimiento (Isler *et al.*, 2002) es el alelo B. Horogh y colaboradores (2005) también encontraron que el genotipo BB fue superior al genotipo AB y AA para las características número de lechones nacidos totales, lechones nacidos vivos y lechones destetados en cualquier paridad y aunque Noguera y colaboradores (2003) reportaron una baja frecuencia del alelo B en la raza Landrace, éste fue asociado significativamente con aumento del tamaño de la camada del tercer parto en adelante. En una población de cerdos chinos los animales homocigotos B produjeron de mas 1.4 a 3.37 lechones nacidos totales y de mas 0.63 a 3.58 lechones nacidos vivos por camada que las cerdas con genotipo AA (Chen *et al.*, 2000).

Los alelos para ESR se reportaron primeramente en las razas Meishan y Yorkshire (Rothschild *et al.*, 1996); sin embargo, en el estudio de Short y colaboradores, (1997) no detectaron el alelo B en la raza Duroc al igual que Linville y colaboradores (2001), quienes tampoco lo detectaron en la línea sintética Landrace/Large White.

Por otro lado, Drogemuller y colaboradores (2001), comentan que el polimorfismo para ESR desafortunadamente no fue observado en la raza Landrace y Duroc, todos los animales de esas razas fueron homocigotos AA y en la línea Duroc/Large White la frecuencia para el alelo A fue de 0.90 y del alelo B de 0.10 y no se detectaron animales homocigotos BB.

Otros reportes de la frecuencia del alelo B en diferentes razas del gen ESR son las siguientes: 0.17 en una línea sintética  $\frac{3}{4}$  Duroc, 0.51 en tres líneas sintéticas con una base común de Large White (Short *et al.*, 1997), 0.48 en la raza Yorkshire, 0.40 en la raza Large White (Isler *et al.*, 2002) y 0.07 en la raza Landrace (Noguera *et al.*, 2003).

#### **Retinol-binding Protein 4 (RBP4)**

La vitamina A es una vitamina liposoluble (también conocida como retinol) que tiene múltiples y diversas actividades biológicas, las cuales se pueden enumerar en cuatro principales:

1. Ayuda a la reproducción normal de las células, en un proceso llamado diferenciación (las células que no se diferencian normalmente tienen más probabilidades de sufrir cambios precancerosos).
2. Es necesaria para la visión; la vitamina A mantiene a las células sanas en distintas estructuras del ojo y se necesita para la transducción de la luz en señales nerviosas en la retina.
3. Se necesita para el crecimiento y el desarrollo normales del embrión y el feto; influye en genes que determinan el desarrollo secuencial de los órganos durante el desarrollo embrionario.
4. Puede ser necesaria para la función reproductiva normal; influye sobre la función y el desarrollo de los espermatozoides, los ovarios y la placenta.

Las múltiples acciones biológicas del retinol son mediadas por dos clases de proteínas: receptor del retinol y retinol binding protein.

Una vez dentro del organismo, el retinol se almacena en el hígado. En el caso de que los tejidos necesiten del retinol, éste es transportado a través de la sangre unido a una proteína llamada Retinol Binding Protein (RBP). Se origina así la holo-RPB que se procesa en el aparato de Golgi y se secreta al plasma. Los tejidos son capaces de captarla por medio de receptores de superficie. Este receptor, a su vez regula la manifestación de varios genes, la mayoría de ellos asociados con la diferenciación celular (Nalubola and Nestel, 1999).

Hay un aumento en la expresión del gen RBP4 en el lumen uterino entre los 10 y 15 días de gestación. Hay mayor producción de esta proteína de unión al retinol durante el establecimiento de la gestación, por lo cual se considera que juega un papel importante en la reproducción (Linville *et al.*, 2000).

El gen responsable de la síntesis del RBP4 se localiza en el cromosoma 14 y es estudiado como gen candidato para tamaño de la camada en cerdos porque está envuelto en el desarrollo embriológico transportando la vitamina A en el útero durante los periodos críticos de la gestación (Messer *et al.*, 1996).

Rothschild y colaboradores (2000), amplificaron un fragmento de 550 pb del gen RBP4 y lo sometieron a restricción con la enzima MspI observando dos alelos denominados A y B. Los alelos observados fueron descritos como sigue: (A) 190, 154 y 136 pb y (B) 154, 136 y 125 pb. En sus resultados reportó efectos aditivos asociados al gen RBP4 de 0.23 lechones mas por camada en seis líneas comerciales; por otro lado con anterioridad Messer y colaboradores (1996) habían reportado efectos aditivos de  $0.52 \pm 30$  lechones por camada en la raza Large-White, además los resultados de ambos trabajos mostraron que el alelo A es el favorable para aumentar el número de lechones nacidos totales y lechones nacidos vivos.

Las frecuencias génicas reportadas de una línea comercial (Landrace/Large White), para el gen RBP4 fueron de 0.42 para el alelo A y 0.58 para el alelo B (Linville *et al.*, 2001).

Por otro lado, Drogemuller y colaboradores (2001) reportaron frecuencias de 0.62 en líneas sintéticas (Duroc/Large White), 0.67 en Landrace Aleman y 0.85 en Duroc para el alelo A; sin embargo, a pesar de que la frecuencia del alelo favorable (A) fue mayor al 50% el gen RBP4 no tuvo efecto significativo sobre tamaño de la camada en la línea sintética (Duroc/Large White).

## **2.5. Genes candidatos relacionados con resistencia a enfermedades en cerdos**

La creciente presión de selección aplicada a los rasgos comercialmente importantes en la producción porcina, generalmente es acompañada de incremento en los problemas de enfermedad. El inicio de una enfermedad generalmente es el resultado de la interacción del genotipo del animal y el ambiente al cual se expone. El control genético de ciertas enfermedades puede ser la presencia o ausencia de receptores de herencia simple (Rothschild, 2003b). Por tal motivo los genes que codifican para presencia o ausencia de receptores para algunos antígenos se han convertido en genes candidatos para resistencia o susceptibilidad de enfermedades.

### **Alpha 1,2 fucosyltransferasa (FUT1)**

La diarrea en lechones es un importante problema en la producción de cerdos. El principal agente etiológico son las cepas de *E. coli* que poseen el antígeno K88. Estas cepas tienen la habilidad de adherirse a la mucosa intestinal, la cual tiene grandes facilidades de colonización en el intestino delgado y de esta

manera causa la diarrea. La adhesión es promovida por filamentos. El K88 de adhiere a receptores específicos en el borde de las células epiteliales del intestino dependiendo de las variantes del antígeno K88 ab, ac o ad. Los receptores específicos en la célula blanco son compuestos de diferentes azúcares, tal como D-galactosa, que ayudan a la adhesión bacteriana (Vögeli *et al.*, 1996; Meijerink *et al.*, 1997; Binder *et al.*, 2002).

El gen FUT1 es estudiado como gen candidato para resistencia a infecciones causadas por *E. coli* en lechones de 4 a 12 semanas de edad, ya que está asociado a la síntesis de los receptores para el antígeno K88 (Vögeli *et al.*, 1996). Este gen se localiza en el cromosoma 6q11 y mide 9.3 kb aproximadamente y presenta dos sitios de mutación, en la base 307 y 857 en el exón 2, donde cambia una guanina por una adenina (Meijerink *et al.*, 2000).

La existencia de dos fenotipos porcinos, uno de los cuales careció del receptor intestinal para K88 ac fue descrito primeramente por Sellwood y colaboradores (1975) ellos encontraron que la presencia del receptor promueve la adherencia del antígeno K88 ac, por lo tanto son susceptibles a la diarrea por K88 y fue de herencia dominante.

Para determinar el polimorfismo del genotipo de FUT1 fue usada la amplificación por PCR y digestión con RFLP con la enzima HhaI, el polimorfismo fue dialélico (alelo A y G). El alelo G es el que codifica para la síntesis de receptores, éste se ha relacionado con susceptibilidad a la infección y es de herencia dominante. Cuando el alelo A está presente no hay receptores

para el antígeno K88 de la bacteria *E. coli*, por lo tanto los animales son resistentes a la infección causada por esta bacteria, este alelo es recesivo (Meijerink *et al.*, 1997; Ciobanu *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003). Los resultados de Binder y colaboradores (2002) mostraron una asociación del genotipo FUT1 con el fenotipo, del 100% de los animales estudiados, donde los animales homocigotos A fueron resistentes a la adhesión y los heterocigotos y homocigotos G fueron susceptibles a la adhesión, las razas estudiadas fueron Landrace, Piétrain y Large White.

Por otro lado Horák y colaboradores (2005) estudiaron la relación de los genotipos de este gen con el comportamiento reproductivo de las marranas y encontraron efectos favorables del genotipo GG sobre tamaño de la camada, al igual que los estudios de Hernández y colaboradores (2006) que reportaron relación de los genotipos GG con aumento del tamaño de la camada.

La frecuencia del polimorfismo de FUT1 es diferente entre razas. Se ha demostrado que la raza Mangalitsa es de las más resistentes a la enfermedad de edema y diarrea. Existen creencias, generalmente aceptadas, que las razas antiguas, podrían ser un recurso importante de genes que confieren resistencia para diferentes enfermedades (Ciobanu *et al.*, 2001).

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit

#### 3.2. Animales experimentales

Los animales en estudio fueron proporcionados por la granja las Beatas de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit. Los cerdos se agruparon de acuerdo a la raza, originándose tres grupos que quedaron de la siguiente manera:

Grupo 1 – Raza Yorkshire (n = 29)

Grupo 2 – Raza Pelón Mexicano (n = 46)

Grupo 3 – Raza Cuino (n = 28)

Por el método aséptico de la vena carótida interna, a cada animal se le extrajeron 5 ml de sangre en tubos vacutainer con 0.5 mg/ml de anticoagulante EDTA, la sangre se transportó al laboratorio con refrigerantes y se almacenó a -20°C para su posterior procesamiento.

### 3.3. Extracción y purificación de ADN genómico

La extracción y purificación de ADN a partir de sangre se realizó mediante el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (1994), con algunas modificaciones, el cual se describe a continuación:

#### Extracción y purificación de ADN con la técnica fenólica

Poner 0.3 ml de sangre con anticoagulante EDTA en tubos Eppendorf de 1.5 o 2 ml.

Agregar agua destilada fría de 1.5 a 2 ml y mezclar.

Centrifugar a 12000 RPM por 5 min a 4°C.

Tirar sobrenadante con pipeta o decantar y quedarse con paquete sedimento.

Agregar de 1.5 a 2 ml de agua destilada.

Mezclar con vortex.

Centrifugar a 12000 RPM por 5 min.

Pipetear o decantar para dejar sedimento.

Agregar 1 ml de solución Lisis (10 mM Tris-HCl pH8, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS).

Mezclar con vortex (deshacer paquete con puntas si es necesario).

Agregar 50 µg/ml de Proteinasa K e incubar a 65° C por una hora. Deshacer paquete con vortex.

Adicionar un volumen de fenol, mezclar por inversión y centrifugar a 12000 RPM por 5 min.

Recuperar fase acuosa y adicionar un volumen Cloroformo-Isoamilico (24:1), agitar por inversión durante 5 min, centrifugar a 12000 RPM por 5 min.

Recuperar fase acuosa y precipitar con NaCl a una concentración final 0.2M más un volumen de Isopropanol concentrado, mezclar por inversión hasta que aparezca la hebra de ADN.

Con una punta se toma la hebra (sin succionar) y se transfiere a un tubo Eppendorf nuevo.

Lavar con 200 µl de Etanol al 70%, centrifugar a 14000 RPM por 10 min y decantar cuidando no tirar la pastilla.

Secar por 2 horas a 42° C o en speed vacum concentrador al vacío.

Suspender en 100 µl de EDTA 1 Mm o en agua bidestilada desionizada para guardar a -20° C. Antes de guardar suspender bien el ADN a 50°C, cuidado de no degradar por alta temperatura.

### **Electroforesis de la purificación de ADN**

Para verificar la integridad del ADN purificado se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%. Se cargó una mezcla de 3 µl de ADN, 2 µl de azul de bromofenol y se ajustó con TAE 1X a un volumen final de 10 µl. Las condiciones de electroforesis fueron de 30 minutos a 90 voltios. Al termino de la electroforesis los productos fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 5 µg/ml durante 5 minutos y visualizados en un transluminador de luz UV, se utilizó como marcador de peso molecular  $\lambda$ BstEII, considerándose como purificaciones optimas aquellas que presentaban una banda única, intensa y de alto peso molecular.

### 3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Seguendo los protocolos de Short y colaboradores (1997), Meijerink y colaboradores (1997) y Rothschild y colaboradores (2000), se amplificaron fragmentos del gen receptor estrogénico (ESR), alpha 1,2 fucosyltransferasa (FUT1) y Retinol-binding protein 4, respectivamente.

Los primers usados para la amplificación de cada gen fueron los siguientes:

Gen	Primer
ESR	F 5' CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3'
	R 5' CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3'
FUT1	F 5' CTG CCT GAA CGT CTA TCA AGA TC 3'
	R 5' CTT CAG CCA GGG CTC CTT TAA G 3'
RBP4	F 5' GAG CAA GAT GGA ATG GGT T 3'
	R 5' CTC GGT GTC TGT AAA GGT G 3'

Las concentraciones de los reactivos utilizadas en la PCR para amplificar los fragmentos del ESR, FUT1 y RBP4 fueron:

Concentración del Reactivo	Concentración final	1rx
ADN 50ng/ $\mu$ l	100ng	2 $\mu$ l
Taq polimerasa 5U/ $\mu$ l	1U	0.2 $\mu$ l
Primers 10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1 $\mu$ l
dNTPs 2mM	0.2mM	2.5 $\mu$ l
Buffer 10X	1X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 30mM	1.5mM	1.25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 25 $\mu$ l	15.55 $\mu$ l

Las condiciones de la PCR para ESR y FUT1 fueron: un ciclo de 95°C durante ocho minutos; 30 ciclos con tres tiempos a temperaturas distintas; el primer

tiempo a 95°C durante 45 segundos, el segundo a 58°C durante un minuto y el tercero a 73°C durante un minuto; y finalmente un ciclo a 73°C durante 10 minutos.

Las condiciones de la PCR para el RBP4 fueron: 1 ciclo de 95°C durante 8 minutos, 35 ciclos de 95°C 45 segundos, 62°C un minuto y 73°C un minuto y, 1 ciclo de 73°C durante 10 minutos.

Los tamaños de los fragmentos amplificadas para el gen ESR fue de 120pb, para el FUT1 de 421pb y para el RBP4 de 550 pb. Los productos de PCR del ESR fueron visualizados en geles de agarosa al 4% y los de FUT1 y RBP4 en geles de agarosa al 3%, todos preteñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) en un transluminador de rayos ultravioleta.

### 3.5. Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Las enzimas de restricción usadas para digerir el ESR y FUT1 fueron la PvuII y HhaI, respectivamente, y las concentraciones de los reactivos utilizados para la digestión fueron las siguientes:

Reactivo	Concentración final	1 rx
Producto de PCR	-----	5.0 µl
Enzima de restricción 10U/ µl	1U	0.1 µl
Buffer de enzima 10X	1X	1.0 µl
H <sub>2</sub> O	c. b. p. 10 µl	3.9 µl

La enzima de restricción que se usó para digerir el gen RBP4 fue la MspI. El protocolo del RFLP fue el siguiente:

Reactivo	Concentración final	1 rx
Producto de PCR	-----	5.0 $\mu$ l
Enzima de restricción 10U/ $\mu$ l	2U	0.2 $\mu$ l
Buffer de enzima 10X	1X	2.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 10 $\mu$ l	2.8 $\mu$ l

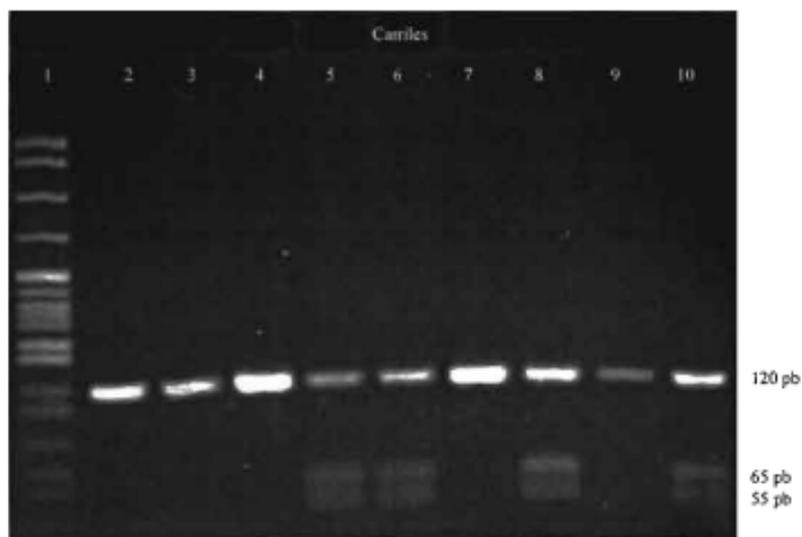
Las digestiones del ESR y FUT1 fueron sometidos a una temperatura de 37°C durante 3 horas y la restricción del gen RBP4 se sometió a la misma temperatura pero durante 7 horas.

### 3.6. RFLPs generados

Los fragmentos generados de los RFLPs fueron visualizados en geles de agarosa al 4% en el caso del ESR y RBP4, y al 3% en el caso de FUT1, todos preteñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml), en un transiluminador de rayos ultravioleta. El marcador de peso molecular usado como referencia para medir el tamaño de los fragmentos fue el pBR322/MspI.

El ESR tuvo un solo sitio de restricción generando dos fragmentos, uno de 65 y otro de 55 pb para el alelo B mientras que el alelo A no tuvo ningún sitio de restricción.

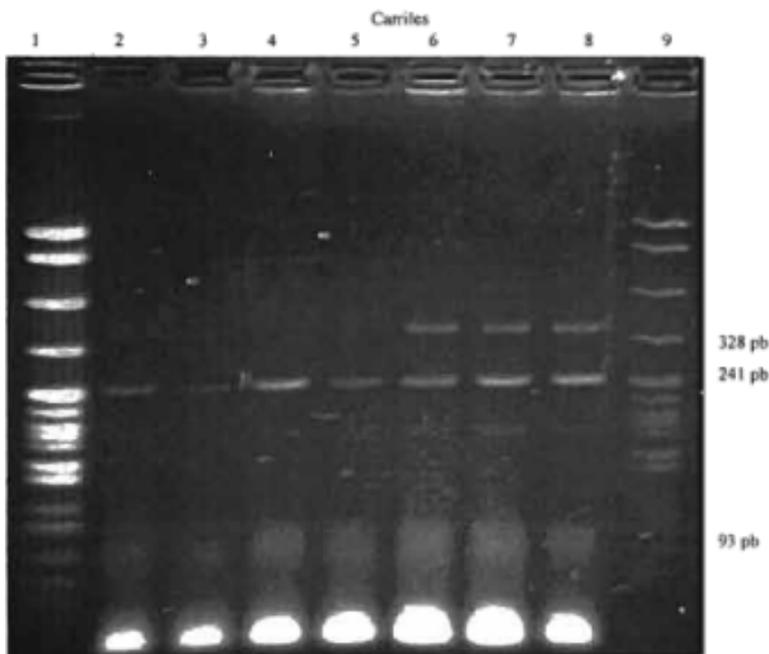
**Fotografía 1. Visualización de bandas obtenidas por la técnica de RFLP para el diagnóstico del gen ESR.**



En la fotografía 1, se observa en gel de agarosa al 4%, los productos esperados para llevar a cabo el diagnóstico de los distintos genotipos para el gen ESR; el carril uno tiene pBR322/MspI, en los carriles dos, tres, cuatro, siete y nueve se observan genotipos AA y en los carriles cinco, seis, ocho y diez los genotipos AB.

El alelo A del FUT1 tuvo un solo sitio de restricción quedando dos fragmentos, uno de 328 y otro de 93 pb y el alelo G tuvo dos sitios de restricción generando tres fragmentos, de 241, 93 y 87 pb.

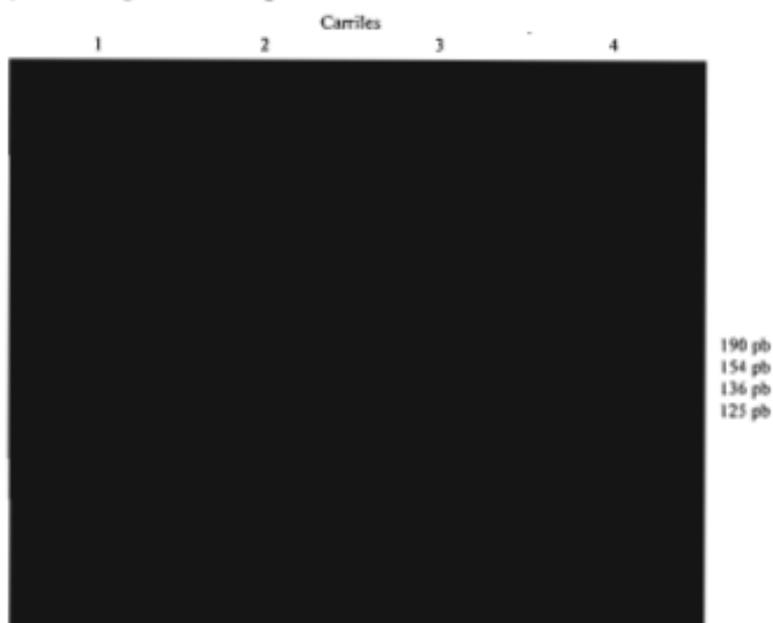
**Fotografía 2. Visualización de bandas obtenidas por la técnica de RFLP para el diagnóstico del gen FUT1.**



En la fotografía 2, se pueden observar las bandas esperadas para diagnosticar los distintos genotipos para el gen FUT1; en los carriles uno y nueve se encuentra el marcador de peso molecular pBR322/MspI, en los carriles dos, tres, cuatro y cinco se aprecian las bandas para los genotipos GG y en los carriles seis, siete y ocho las del genotipo AG.

El gen RBP4 tuvo dos alelos, el A y el B, para el alelo A se generaron 3 fragmentos de 190, 154 y 136 pb y para el alelo B 154, 136 y 125 pb.

**Fotografía 3. Visualización de bandas obtenidas por la técnica de RFLP para el diagnóstico del gen RBP4.**



En la fotografía 3, se pueden apreciar en un gel de agarosa al 4% las bandas para diagnosticar los genotipos AB y AA esperados para el gen RBP4; los carriles uno y cuatro tienen el marcador de peso molecular pBR322/MspI, en el carril dos se observa el genotipo AB y en el carril tres el genotipo AA.

### **3.7. Análisis estadístico**

#### **Análisis de frecuencias**

Se realizó un análisis de frecuencias génicas y genotípicas para cada gen,

usando una prueba de  $X^2$ , considerando la metodología propuesta por Nei (1987).

### Distancias genéticas y árboles filogenéticos

Se calcularon distancias genéticas para construir árboles filogenéticos existentes entre los distintos grupos de producción, empleando los métodos de Distancia estándar y Neighbor-Joining (Nei, 1972; Nei *et al.*, 1983; Saitou y Nei, 1987).

Para estos cálculos se utilizó el paquete Phylip 3.5c (Felsenstein, 1995). Se realizaron 100 bootstrap o replicaciones aleatorias de conjuntos de datos partiendo del original, para proporcionar confiabilidad en la topología de los árboles, siguiendo las rutinas Seqboot (Felsenstein, 1995). Se realizó la rutina Gendist para el cálculo de Distancias estándar de Nei (1972):

$$D = -\log I_N$$

$$\text{donde } I_N = \frac{\sum_k \sum_i x_{ik} y_{ik}}{\left( \sum_k \sum_i x_{ik}^2 \sum_k \sum_i y_{ik}^2 \right)^{1/2}}$$

$x_{ik}$  y  $y_{ik}$  son las frecuencias del  $i$ -ésimo alelo del  $k$ -ésimo locus en las poblaciones X y Y.  $m_k$  es el número de alelos en el  $k$ -ésimo locus. Con el procedimiento Neighbor utilizando el método Neighbor-Joining se realizaron árboles filogenéticos, concensando el mejor árbol con la rutina Consense que aplica el método "Majority rule" al seleccionar el árbol con más frecuencia de acuerdo a los bootstrap (Felsenstein, 1995).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Frecuencias génicas y genotípicas

#### 4.1.1. Gen ESR

Las frecuencias génicas y genotípicas del gen ESR de las tres razas en estudio se muestran en el cuadro 1. El gen ESR mostró dependencia con las razas Yorkshire, Cerdo Pelón Mexicano (CPM) y Cuino ( $p = 0.01$ ) con la prueba de  $\chi^2$ .

Cuadro 1. Frecuencias génicas y genotípicas del gen ESR

Raza	Frecuencia génica		Frecuencia genotípica		
	A	B	AA	AB	BB
Yorkshire	0.62	0.38	0.35	0.55	0.10
CPM	0.74	0.26	0.48	0.52	0.0
Cuino	0.84	0.16	0.68	0.32	0.0

ESR = Receptor Estrógeno; CPM = Cerdo Pelón Mexicano

La frecuencia del alelo B al igual que el genotipo BB es más alta en los cerdos de raza Yorkshire. Desde 1996 con los estudios de Rothschild *et al.* (1996) al alelo B se le ha considerado como favorable para aumentar el tamaño de la camada en cerdos, si se toma en cuenta que la raza Yorkshire es una de las más prolíficas estos resultados son muy importantes porque la población de la raza Yorkshire muestra mayor frecuencia del alelo favorable y aunque no se

hace una selección genotípica esto parece indicar que el gen se va fijando por selección indirecta del genotipo. Caso contrario se refleja en las razas de CPM y Cuino que tienen una frecuencia menor del alelo B y no se encontró genotipo homocigoto B en ninguna de estas dos poblaciones.

La ausencia del genotipo BB en las razas criollas, concuerdan con los resultados de Drogemüller y colaboradores (2001) y Hernández y colaboradores (2006), que tampoco encontraron homocigotos B en la raza Duroc, Large White y York-Landrace. Además se han reportado frecuencias del alelo B de 0.10 en la línea Duroc-Large White (Drogemüller *et al.*, 2001), 0.17 en una línea sintética  $\frac{3}{4}$  Duroc, 0.51 en tres líneas sintéticas con una base común de Large White (Short *et al.*, 1997), 0.48 en la raza Yorkshire, 0.40 en la raza Large White (Isler *et al.*, 2002), 0.07 en la raza Landrace (Noguera *et al.*, 2003) y 0.27 en cerdas York-Landrace (Hernández *et al.*, 2006). Estos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio que tuvo frecuencias bajas del alelo B menores a 0.38 en las razas estudiadas.

Rothschild y colaboradores (1996) explican que el alelo B del gen ESR está presente únicamente en grupos selectos de razas de cerdos, lo cual podría ser una explicación de la ausencia de animales homocigotos B en las razas CPM y Cuinos.

#### 4.1.2. Gen FUT1

En el cuadro 2 se muestran las frecuencias génicas y genotípicas de todos los

animales incluidos en este estudio para el gen FUT1, con diferencias significativas ( $p = 0.02$ ) con la prueba de  $X^2$ .

**Cuadro 2. Frecuencias génicas y genotípicas del gen FUT1**

Raza	Frecuencia génica		Frecuencia genotípica		
	A	G	AA	AG	GG
Yorkshire	0.33	0.67	0.10	0.45	0.45
CPM	0.36	0.64	0.11	0.50	0.39
Cuino	0.55	0.45	0.39	0.32	0.29

FUT1 = Alpha 1,2 fucosyltransferasa; CPM = Cerdo Pelón Mexicano

Se encontró mayor frecuencia génica del alelo G en los cerdos Yorkshire y CPM al igual que las frecuencias del genotipo GG. Resultados similares obtuvo Hernández y colaboradores (2006) con frecuencias de 0.69 y 0.59 del alelo G en grupos de cerdas York-Landrace de alta y baja producción, respectivamente.

Horák y colaboradores (2005) reportaron que las cerdas con genotipo AA tuvieron menor número de lechones nacidos totales, lechones nacidos vivos y lechones destetados que las cerdas con genotipo GG. Por otro lado, se ha venido reportando que el alelo A confiere resistencia a diarreas causadas por *E. coli* en lechones (Meijerink *et al.*, 1997; Ciobanu *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003); sin embargo, estos investigadores no relacionaron este gen con productividad únicamente con resistencia o susceptibilidad a las infecciones causadas por la bacteria, por lo tanto resulta importante que en nuestros

resultados la frecuencia del alelo A fuera mayor en los cerdos Cuinos que son considerados como un recurso importante de genes que confieren resistencia a diferentes enfermedades (Lemus y Alonso, 2005).

#### 4.1.3. Gen RBP4

Se encontraron dos alelos para el gen RBP4 y están presentes en todas las razas estudiadas; sin embargo, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con la prueba de  $X^2$ , además no se encontraron animales homocigotos B igual que Hernández y colaboradores (2006) que tampoco detectaron homocigotos B en una población de cerdas York-Landrace. Tanto las frecuencias génicas como genotípicas fueron similares en las tres razas lo cual se puede constatar en el cuadro 3.

**Cuadro 3. Frecuencias génicas y genotípicas del gen RBP4**

Raza	Frecuencia génica		Frecuencia genotípica		
	A	B	AA	AB	BB
Yorkshire	0.74	0.26	0.48	0.52	0
CPM	0.74	0.26	0.48	0.52	0
Cuino	0.75	0.25	0.50	0.50	0

RBP4 = Retinol-binding Protein 4; CPM = Cerdo Pelón Mexicano

Se esperaban altas frecuencias génicas del alelo A y del genotipo AA en la raza Yorkshire por ser la más prolífica y porque al alelo A se le ha considerado

como favorable para aumentar el tamaño de la camada (Messer *et al.*, 1996; Rothschild *et al.*, 2000; Linville *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2006).

Diferente a los reportes anteriores, Drogemuller y colaboradores (2001) no encontraron efectos significativos sobre tamaño de la camada en la línea sintética (Duroc/Large White) y reportaron frecuencias de 0.62 en líneas sintéticas (Duroc/Large White), 0.67 en Landrace Alemán y 0.85 en Duroc del alelo A, esto indica que las frecuencias si pueden ser diferentes entre razas lo cual no sucedió en este trabajo y las frecuencias del alelo A fueron similares en las tres razas.

#### **4.2. Distancias genéticas y árboles filogenéticos**

Con la información de las frecuencias génicas se obtuvieron distancias genéticas y a partir de ellas se obtuvieron árboles filogenéticos para cada gen por separado.

##### **4.2.1. Gen ESR**

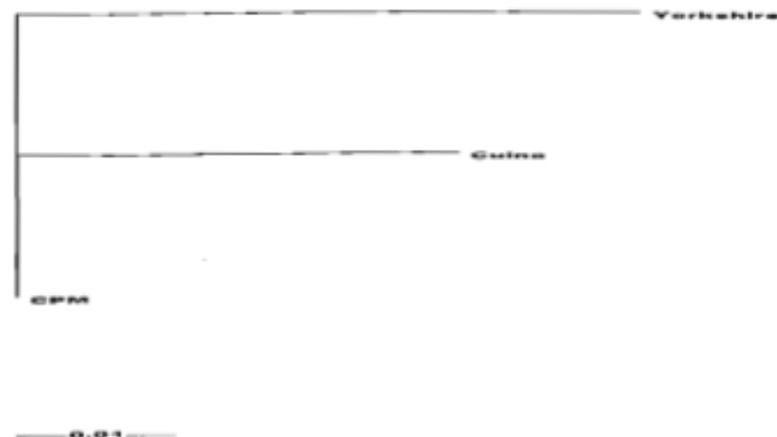
Las distancias genéticas calculadas para el gen ESR se muestran en el cuadro 4. El gen ESR se agrupó de acuerdo a las razas de cerdos con distancias genéticas menores a 0.01 de los CPM con Cuinos. En la figura 3 se aprecia claramente que los cerdos de raza Yorkshire están mas distantes genéticamente de los cerdos Cuinos, los CPM están más cercanos a los Cuinos que a los Yorkshire.

**Cuadro 4. Distancias estándar de Nei entre razas de cerdos considerando las frecuencias génicas del gen ESR**

Raza	Yorkshire	CPM	Cuino
Yorkshire	0.0000	0.0226	0.0669
CPM		0.0000	0.0112
Cuino			0.0000

Lo anterior puede explicar que las poblaciones de cerdos CPM y Cuinos son más cercanas entre sí debido a que son razas menos prolíficas con tamaño de camada de 6.36 en los CPM y 5.97 en los Cuinos (Lemus *et al.*, 2003) comparadas con el tamaño de camada de la raza Yorkshire que tiene un tamaño de camada de 9.7 de acuerdo a los reportes nacionales de PigChamp (2000). Esta explicación está basada en el hecho de que al gen ESR se le ha relacionado con características de prolificidad en cerdos (Rothschild *et al.*, 1996; Short *et al.*, 1997; Horogh *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2000; Goliasova and Wolf, 2004).

**Figura 3. Árbol filogenético (Neighbor-Joining) considerando las distancias genéticas de todas las razas estudiadas para el gen ESR.**



#### 4.2.2. Gen FUT1

En el cuadro 5 se puede observar que existe mayor distancia genética entre los cerdos Yorkshire y los Cuinos (0.0943) y que los CPM están más cercanos a los Yorkshire que a los Cuinos (0.0015), situación que además se puede observar en la figura 4.

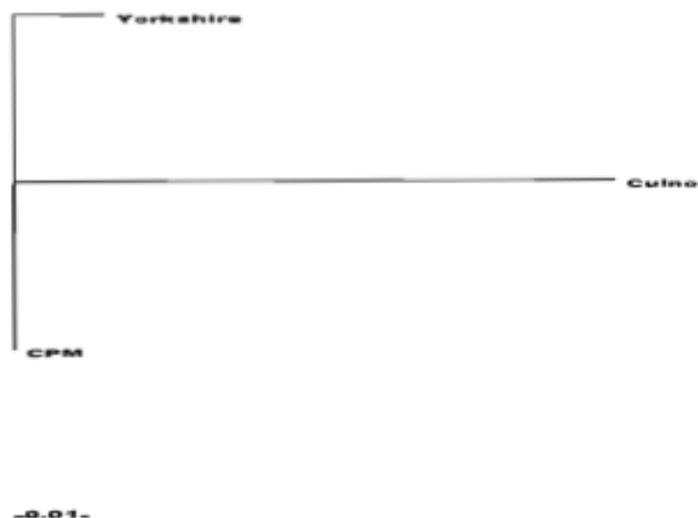
**Cuadro 5. Distancias estándar de Nei entre razas de cerdos considerando las frecuencias génicas del gen FUT1**

Raza	Yorkshire	CPM	Cuino
Yorkshire	0.0000	0.0015	0.0943
CPM		0.0000	0.0711
Cuino			0.0000

Al gen FUT1 se le ha estudiado como gen candidato para resistencia a diarreas causadas por la bacteria *E. coli* (Meijerink *et al.*, 1997; Binder *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003) y por otro lado se le ha relacionado con características reproductivas en cerdos (Horák *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006).

En términos de prolificidad se aprecia como la raza con mayor tamaño de camada (Yorkshire) está distante de las razas de menor tamaño de camada (CPM y Cuino) y en términos de resistencia a enfermedades también es importante la distancia que surgió entre la raza más resistente (Cuino) y la raza menos resistente (Yorkshire). Todo lo anterior se observa en la figura 4.

Figura 4. Árbol filogenético (Neighbor-Joining) considerando las distancias genéticas de todas las razas estudiadas para el gen FUT1.



#### 4.2.3. Gen RBP4

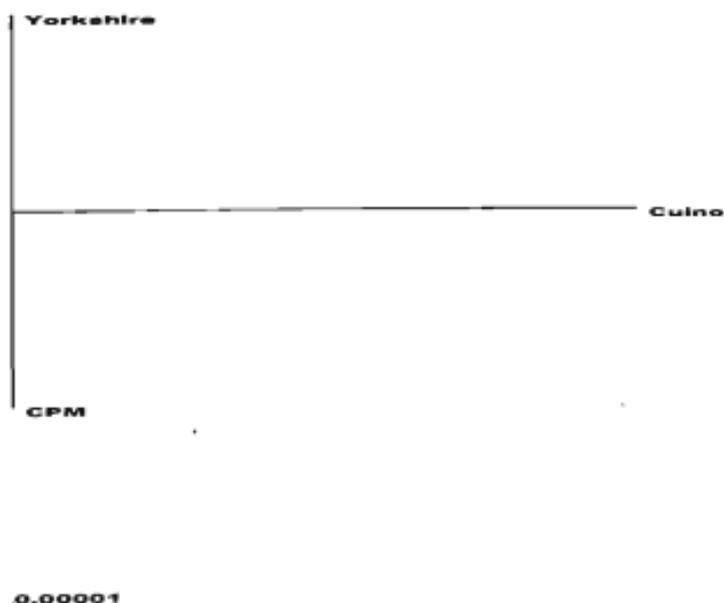
Las distancias genéticas del gen RBP4 resultaron similares entre las razas estudiadas. Los resultados se muestran en el cuadro 6. Al observar el árbol filogenético podemos deducir que este gen no agrupa de acuerdo a la raza, figura 5.

Cuadro 6. Distancias estándar de Nei entre razas de cerdos considerando las frecuencias génicas del gen RBP4

Raza	Yorkshire	CPM	Cuino
Yorkshire	0.0000	0.0000	0.0001
CPM		0.0000	0.0001
Cuino			0.0000

A pesar de que al gen RBP4 se le ha relacionado con tamaño de camada en cerdos, en este trabajo no se pudieron establecer diferencias entre poblaciones pero su efecto pudiera observarse dentro de poblaciones para diferenciar los genotipos mas productivos como lo hicieron Messer y colaboradores (1996), Rothschild y colaboradores (2000) y Linville y colaboradores (2001).

Figura 5. Árbol filogenético (Neighbor-Joining) considerando las distancias genéticas de todas las razas estudiadas para el gen RBP4.



## V. CONCLUSIONES

Para el gen ESR: no se detectaron animales homocigotos B en las razas CPM y Cuino; el alelo B fue más frecuente en la raza Yorkshire y el alelo A en los Cuinos; la distancia genética fue mayor entre las razas de cerdos Yorkshire y Cuino.

Para el gen FUT1: Se encontró mayor frecuencia génica del alelo G y genotipo GG en las razas Yorkshire y CPM, el alelo A fue más frecuente en los cerdos Cuinos; hubo mayor distancia genética entre los cerdos Yorkshire y Cuinos.

Para el gen RBP4: No se detectó el genotipo BB en ninguna raza; no hubo dependencia de las frecuencias génicas y genotípicas entre las razas Yorkshire, CPM y Cuino. La frecuencia génica del alelo A fue similar a la del alelo B, al igual que la frecuencia del genotipo AA y AB en cualquier raza. Las distancias genéticas fueron similares entre las tres razas.

## VI. LITERATURA CONSULTADA

- Anderson, L.; Haley, C.S., Ellegren, H.; Knott, S.A.; Johansson, M.; Andersson, K.; Andersson-Eklund, L.; Edfors-Lilja, I.; Fredholm, M.; Hansson, I.; Hakansson, J. and Lundstroms K.: Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in the pig. *Science*. 263:1771. (1994).
- Arredondo, P.R.: La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología molecular. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1993).
- Ashwell, M.S.; Rexroad, C.E.; Miller, R.H.; Van Randen, P.M. and Da Y.: Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. *Animal Genetics*. 28:216-222. (1997).
- Beever, J.E.; George, P.D.; Fernando, R.L.; Stormont, C.J. and Lewin, H.A.: Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a parental halfsib family of Angus cattle. *Journal of Animal Science* 68:337. (1990).
- Binder, S.; Götz K-U.; Thaller, G. and Fries, R.: Effects of variation in the FUT1 gene on various traits in swine. Technische Universität München. 0:E006. (2002).
- Birgitte, T.T.M.; Evans, J.G. and Van Der Lende, T.: Components of litter size in gilts with different prolactin receptor genotypes. *Elsevier, Theriogenology*. 59:915-926. (2003).

- Boom, M.V.: Polymerase Chain Reaction. [http://www.accessexcellence.com/RC/CT/polymerase\\_chain\\_reaction.html](http://www.accessexcellence.com/RC/CT/polymerase_chain_reaction.html). (2004).
- Brent G.: Producción porcina. Editorial El manual moderno S. A. de C. V. México, D.F. (1991).
- Buxade C.C.: Producción porcina, aspectos claves. 2ª. Edición. Editorial Mundi-Prensa. México. (1999).
- Castellanos, R. A. y Gómez, R. R.: Retrospectiva y perspectiva sobre la raza de Cerdos Pelón Mexicano. Porciram. (1984).
- Chen, K.F.; Huang, L.S.; Li, N.; Zhang, Q.; Luo, M. and Wu, C.X.: The genetic effect of estrogen receptor (ESR) on litter size traits in pig. Yi Chuan Xue Bao. 27(10):853-857. (2000).
- Ciobanu, C.D.; Day, E.A.; Nagy, A.; Wales, R.; Rothschild, M.F. and Plastow, S.G.: Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DNA markers. Genet. Sel. Evol. 33 (2001) 417-432. INRA EDP Sciences. (2001).
- Drinkwater, R.D. and Hatzel, D.J.S.: Application of molecular biology to understanding symposium on nuclear techniques in animal production and health. IAEA,FAO. Viena,15-19 April, 1991:437-452. (1991).
- Drogemuller, C.; Hamann, H. and Dist, O.: Candidate gene markers for litter size in differet German pig lines. J. Anim. Sci. 79:2565-2570. (2001).
- Felsenstein, J.: Phylip (Phyloeny Inference Package) Ver. 3.57c. Joseph Felsenstein and University of Washington. (1995).

- Georges, M.; Nielsen, D.; Mackinnon, M.; Mishar, A.; Okimoto, R.; Pasquino, A.T.; Serageant, L.; Sorensen, A.; Steele, M.R.; Zhao, X.; Womarck, J.E. and Hoeschele, I.: Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*. 130:907-920. (1995).
- Goliasova, E. and Wolf J.: Impact of the ESR gene on litter size and production traits in Czech Large White pigs. *Animal Genetics*. 35(4):293-297. (2004).
- Hagelberg, E.; Gray, I.C. and Jeffreys, A.J.: Identification of skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature*. 352:427-429. (1991).
- Haley, C.S.: Livestock QTL-bringinghome the bacon. *Trends in Genetics*. 11:488-492. (1995).
- Hernández, L. S. H.; Lemus, F. C.; Alonso, M. R. and Herrera, H. J. G.: Efecto de genes candidatos sobre características reproductivas en hembras porcinas. *Revista Científica, FCV-LUZ*. Vol. XVI: 648 – 654. (2006).
- Hershman, J.: *Fundamentos de endocrinología*. Ed. Interamericana. México. (1981).
- Horák, P.; Urban, T. and Dvolák, J.: The FUT1 and ESR genes – their variability and associations with reproduction in Prestice Black-Pied sows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. Vol. 122:210 (2005).
- Horogh, G.; Zsolnai, A.; Komlósi, I.; Nyíri, A.; Anton, I. And Fésüs, L.: Oestrogen receptor genotypes and litter size in Hungarian Large White pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. Vol. 122:56 (2005).

- Innis, M.A.; Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J.: PCR Protocols. Academic Press, Inc. San Diego California. (1990).
- Isler, B.J.; Invin, K.M.; Neal, S.M.; Moeller, S.J. and Davis, M.E.: Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive traits in swine. *J. Anim. Sci.* 80:2334-2339. (2002).
- Jeffereys, A.; Wilson, V.; Thein, S.L.; Weatherall, D.J. and Ponder, B.A.: DNA "fingerprint" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 39:11-24. (1986).
- Jiménez, P. y Collada, C.: Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. (2000).
- Jubiz, W.: Endocrinología clínica. 3ª. Edición. Ed. El Manual moderno, S.A. de C.V. México. (1996).
- Korwin, K.A.; Kamyczek, M.; Cieslak, D.; Pierzchala, M. and Kuryl, J.: Candidate gene markers for reproductive traits in polish 990 pig line. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* Vol. 120 (3): 181-191. (2003).
- Lemus F. C. y Alonso S. M. L.: El cerdo pelón mexicano y otros cerdos criollos. 1ª. Edición. Universidad Autónoma de Nayarit. Nayarit, México. (2005).
- Lemus F. C.; Alonso, M. R.; Alonso-Spilbury, M. and Ramírez, N. R.: Reproductive Performance Mexican Native Pigs. *Arch. Zootec.* 52: 109-112. (2003).
- Linville, R.; Johnson, R. and Pomp, D.: Candidate reproductive genes do not explain responses in lines selected for ovulation rate and litter size. *Nebraska Swine Report.* (2001).

- Linville, R.C.; Pomp, D.; Johnson, R.K. and Rothschild, M.F.: Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *J. Animal Sci.* 79:60-67. (2001).
- Martínez, C.F.E.; Herrera, H.J.G.; García, C.A.D. y Pérez, P.J.: Indicadores productivos y de sustentabilidad económica de granjas porcinas urbanas en el norte de México D. F. (Resultados Preliminares). *Archivos de Zootécnica.* 52: 101-104. (2003).
- McDonnell, P.D.: The molecular determinants of estrogen receptor pharmacology. Elsevier Science. *Maturitas* 48 Suppl. 1. S7-S12. USA. (2004).
- Meijerink, E.; Fries, R.; Vögeli, P.; Masabanda, J.; Wigger, G.; Stricker, C.; Neuenschwander, S.; Bertschinger, H.U. and Stranzinger, G.. Two  $\alpha(1,2)$  fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (s) and *Escherichia coli* F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammalian Genome.* 8:736-741. (1997).
- Meijerink, E.; Neuenschwander, S.; Fries, R.; Dintel, A.; Bertschinger, H.U.; Stranzinger, G. and Vögeli, P.: A DNA polymorphism influencing  $\alpha(1,2)$  fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion. *Immunogenetics.* 52:129-136. (2000).
- Messer, L.; Wang, L.; Yelich, J.; Pomp, D.; Geisert, R. and Rothschild M.F.: Linkage mapping of the retinol-binding protein (*RBP4*) gene to porcine chromosome 14. *Mamm Genome* 7:396. (1996).
- Montaldo, H. y Barria N.: Mejoramiento genético de animales. *Ciencias Biológicas.* México. (1998).

- Montaldo, H.H. y Meza, H.C.A.: Uso de marcadores moleculares y de genes importantes en la mejora genética del ganado. *Electronic Journal of Biotechnology*. ISSN: 0717-3458. (1998).
- Nalubola, R. and Nestel, P.: The effect of vitamin A nutriture on health. A review. *Ilsi Press* 6. (1999).
- Nei, M.: Genetic distances between populations. *Am. Nat.* 106:283-292. (1972).
- Nei, M.: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. (1987).
- Nei, M.; Tajima, F. and Tateno, Y.: Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19:153-170. (1983).
- Noguera, J. L.; Varona, L.; Gomez, R. L.; Sánchez, A.; Babot, D.; Estany, J.; Mecer, L. A.; Rothschild, M. and Perez, E. M.: Estrogen receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance. *Livestock Production Science* 82:53-59. (2003).
- PigChamp, Inc. PigCHAMP Breeding Herd Summary in México. College of Veterinary Medicine, University of Minnesota. (2000).
- Ramos, A.M.; Mestre, R.; Gouveia, S.; Evans, G.; Zhang, Y.; Cardoso, A.; Rothschild, M. F.; Plastow, G. and Rangel, F.: Use of type I DNA markers for initial genetic characterization of two Portuguese swine breeds. *Archivos de Zootecnia*. 52:255-264. (2003).
- Rojas, A. C.: Comparación del comportamiento productivo durante la lactancia entre cerdos de raza Pelón Mexicano e híbridos de Yorkshire con Pelón Mexicano y Landrace con Pelón Mexicano. Tesis de licenciatura. FMVZ, UNAM. México. (1994).

- Rosas, G. M. y Ávila, R. A. J.: Mejoramiento animal, Genética, Cerdos. 1ª. Ed. Editorial UNAM. México. (1999).
- Rothschild, M.F. and Plastow, G.S.: Advances in pig genomics and industry applications. Ag. Biotechnology. Net 1: February, ABN 007. (1999).
- Rothschild, M.F.: Approaches and challenges in measuring genetic diversity in pigs. Department of Animal Science. 2255 killee Hall. Iowa State University. Ames, Iowa 50011. USA. Archivos de Zootecnia. 52:129-135. (2003a).
- Rothschild, M.F.: Use of genetic markers for genetic improvement and selection for disease resistance. IV jornada internacional de producción porcina. Universidad Autónoma de México. México. (2003b).
- Rothschild, M.F.; Jacobson, C.; Vaske, D.; Tuggle, C.; Wang, L.; Shorts, T.; Eckardt, G.; Sasaki, S.; Vincent, A.; McLaren, D.; Southwood, O.I.; Van Der Steen, H.; Mileham, A. and Plastow, G.: The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:201-205. (1996).
- Rothschild, M.F.; Larson, R.G.; Jacobson, C.; and Pearson, P.: PvuII polymorphisms at the porcine oestrogen receptor locus (ESR). Animal Genetics. 22:448. Iowa, USA. (1991).
- Rothschild, M.F.; Messer L.; Day, A.; Wales, R.; Short, T.; Southwood, O. and Plastow, G.: Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. Mammalian Genome. 11:75-77. (2000).

- Saitou, N. and Nei, M.: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425. (1987).
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Press. (1994).
- Sánchez, M.V.: Identificación del polimorfismo de fragmentos largos amplificados (AFLPs) asociados a la conformación de caballos warmblood militares. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, México. (2003).
- Schwerin, M.; Brockmann, G.; Valselow, J.; and Seyfert, H. M.: Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement. *Archiv für Tiernozucht-Archives of Animal Breeding Dummerstorf*. 38:21-31. (1995).
- Sellwood, R.; Gibbons, R.A.; Jones, G.W. and Rutter, J.M.: Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: The existence of two phenotypes. *Journal of Medical Microbiology*. 8:405-511. (1975).
- Short, T.H., Rothschild, M.F.; Southwood, O.I.; McLaren, D.G.; de Vries, A.; Van der Steen, H.; Eckardt, G.R.; Tuggle, C.K.; Helm, J.; Vaske, D.A.; Mileham, A.J. and Plastow, G.S.: Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J. Anim. Sci.* 75:3138-3142. (1997).
- Silió, L.; Óvilo, C.; Castellanos, C.; Barragán, C.; Rodríguez, C. y Toro, M.A.: Marcadores genéticos. I Jornada sobre el cerdo ibérico y sus productos. Dpto. mejora genética y biotecnología, INIA, Madrid. (2000).

- Smidt, D. y Ellendorff F.: *Endocrinología y fisiología de la reproducción de los animales zootécnicos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. (1972).
- Soberon, M.F.X.: *La ingeniería genética y la nueva biotecnología*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. (2000).
- Sun, H. S.; Wang, L.; Rothschild, M.F. and Tuggle, C.K.: Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene to pig chromosome 15. *International society for Animal Genetics. Animal Genetics*. 29, 138-140. (1998).
- Trujillo, O.M.E.; Martínez, G.R.G. y Herradora, L.M.A.: *La pira reproductora*. 1ª. Edición. Ed. Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. México, D. F. (2002).
- Tuggle, C.K.; Schmitz, C.B. and Gingerich-Feil, D.: Rapid Communication: cloning of pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA. *J. Animal Science*. 75:277. (1997).
- Valadez, M.E. y Günter, K.: *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Editorial Mundi-Prensa. Universidad Autónoma de Chapingo. México, D. F. (2000).
- Vincent, A.L.; Evan, G.; Short, T.M.; Southwood, O.I.; Plastow, G.S.; Tuggle, C.K. and Rothschild, M.F.: The prolactina receptor gene is associated with increased litter size in pigs. 6<sup>th</sup> World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. Armidale, NSW. Australia. 27:15-18. (1998).
- Vincent, A.L.; Wang, L. and Rothschild, M. F.: Rapid Communication: A Restriction Fragment Length Polymorphism in the Porcine Leptin

Receptor (LEPR) Gene. Department of Animal Science. Iowa State University. Ames 50011. (1997).

- Vögeli, P.; Bertschinger, H.U.; Stamm, M.; Stricker, C.; Hagger, C.; Fries, R.; Rapacz, J. and Stranzinger, G.: Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Animal Genetics*. 27:321-328. (1996).
- Yan, X.M.; Ren, J.; Guo, Y.M.; Dings, N.S.; Chen, K.F.; Gao, J.; Ai, H.S.; Chen, C.Y.; Ma, J.W. and Huang, L.S.: Research on the genetic variations of  $\alpha$ 1-fucosyltransferase (FUT1) gene in 26 pig breeds. *Yi Chuan Xue Bao*. 30(9):830-834. (2003).