

INTRODUCCIÓN

I.1 Mejora genética porcina.

La producción mundial de carne en el año 2001 fue de 237,1 millones de toneladas, de las cuales 92,6 millones de toneladas correspondieron a carne de cerdo (FAO, 2002), (39% de la producción de carne mundial). Ello demuestra claramente la gran importancia de este sector productivo. En el año 2000, los principales países productores mundiales de carne de cerdo fueron encabezados por China, que produjo 43,05 millones de toneladas, seguida por U.S.A. con 8,53, Alemania 3,85, España 2,96, Francia 2,31, Polonia 1,90, Brasil 1,80, Canadá 1,67, Dinamarca 1,65 y Holanda 1,64 (FAO, 2000). En el año 2000 España alcanzó una producción porcina de carne que la situó como segundo país productor en el ámbito europeo, detrás de Alemania, y cuarto país productor a escala mundial (FAO, 2000). En la Comunidad Europea un 50% de la carne consumida es de porcino, alcanzando una producción de 17,3 millones de toneladas en 1999 (Aumaitre, 2001). El censo porcino de los países miembros de la comunidad Europea en el 2001 fue de 121,9 millones de cabezas, de los cuales 23,88 millones de animales fueron censados en España, 19,58% de la producción porcina europea (Pellegrino, 2002). Cataluña, la principal área productora porcina de España, con 5,9 millones de cabezas en el año 2000 produce un 24,7% de la producción de carne de cerdo española y un 4,84% de la producción Europea (DARP, 2001).

La actividad del sector porcino español mostró una evolución significativa desde 1986, año de ingreso en la Comunidad Europea. El censo porcino se incrementó un 16% desde 1986 a 1994. Durante este periodo, las granjas reproductoras mayores de 100 animales se vieron incrementadas en un 28%, mientras que las menores de 50 disminuyeron. Además las granjas de cebo mayores de 1000 animales experimentaron un incremento notable, disminuyendo el número de granjas pequeñas. (Aumaitre, 2001). No obstante, el desarrollo de este sector ha sufrido pequeños y medianos altibajos, debido a fluctuaciones en el precio de la carne en el mercado, y a variaciones en los costos de los piensos (DARP 2000). Un factor desfavorable en el desarrollo de la porcicultura europea, ha sido causado por los brotes de peste porcina clásica que se sucedieron durante el año 1997, 2001 (DARP, 2001) y 2002.

En Cataluña en el año 2000 se contaba con 11.371 granjas, 5.224 de cebo y 6.147 de reproducción. Siguiendo la tendencia iniciada en el año 1977, de aumentar la producción de lechones en Cataluña para disminuir la dependencia del exterior, en el año 2000 se alcanzó la cifra histórica de 578.000 cerdas. Los tipos de explotación

porcina en Cataluña se agrupan de acuerdo a su estructura administrativa, en propiedad e integración, de tal forma que, las granjas reproductoras son mayoritariamente de propiedad (70-87%), mientras que en las de cebo solo trabajan en propiedad entre el 10-36% (DARP 2001).

En Cataluña, el sector porcino cuenta con una infraestructura de instalaciones, manejo y sanidad moderno y tecnificado. Se caracteriza por una clara separación entre las explotaciones. Las instalaciones se modernizan constantemente, proporcionando el confort necesario a los animales para obtener su máximo rendimiento. El suministro de la alimentación es de tipo industrial en forma mecanizada acorde a los requerimientos de cada etapa de producción. La optimización de la vida reproductiva de machos y hembras se efectúa mediante programas de inseminación artificial que refuerzan la eficiencia reproductiva, logrando con todo ello un nivel productivo elevado (DARP, 2000). Sin embargo, los márgenes de beneficio son estrechos ya que los costes de producción son altos y el precio de la carne está regulado por los organismos oficiales. En este sentido, los programas de mejora genética resultan indispensables ya que contribuyen al mejoramiento y desarrollo de animales altamente productivos que puedan competir con los mercados nacionales e internacionales.

I.1.1. Objetivos y criterios de selección.

El ganado porcino puede considerarse una de las especies ganaderas que ha sufrido una mayor transformación en los últimos años, bien sea en el marco de la técnica de manejo, o en los tipos de animales que se utilizan. Los progresos conseguidos tanto en los aspectos de crecimiento y eficiencia alimentaria como en calidad de canal, han sido muy importantes (Tibau y Soler, 1999). En los últimos 25 años, uno de los principales objetivos en los programas de selección porcina ha sido la reducción del contenido de grasa de la carne porcina. La demanda por parte de los consumidores de productos cárnicos con poca grasa ha provocado una evolución de la producción hacia un cerdo magro, con un contenido menor de grasa. La mejora genética ha permitido obtener canales porcinas con un contenido en magro superior al 60%. Paralelamente a esta reducción de la grasa, se ha constatado un empeoramiento de la calidad de la carne. Los programas de selección animal tienen como objetivo mejorar el mérito genético de los reproductores y el progreso genético obtenido para gran parte de los caracteres de interés. En forma tradicional esta mejora se debe al uso eficiente de las herramientas de

la genética cuantitativa, sin embargo, durante los últimos 10 años han aparecido técnicas de análisis del ADN que permiten identificar de forma eficiente la presencia de polimorfismo genético. La existencia de esta variabilidad permite abordar mediante técnicas de genética molecular el análisis global del genoma. En el caso de las especies domésticas este análisis tiene como objetivo la identificación y caracterización de los genes responsables de la variabilidad para los caracteres de interés productivo (Sánchez, 2001). Existen dos formas de efectuar un cambio genético sobre una población animal, con el fin de mejorar la producción y hacerla más rentable. La primera es la selección adecuada de los progenitores basándose en sus registros productivos y los de sus parientes, la segunda es 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 se basa en el aprovechamiento de la variabilidad genética de las poblaciones, seleccionando de cada línea los mejores animales en función de unos objetivos predefinidos y adecuadamente valorados (Cañón y Muñoz, 1989). Los objetivos de selección no siempre son fáciles de medir, razón por la cual a la hora de efectuar la selección de reproductoras se utilizan otros caracteres denominados criterios de selección. Estos han de ser económicos y fáciles de medir y deben estar correlacionados con los objetivos de selección (Tibau, 1992). 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 pienso por hembra, las que intervienen en la fase de engorde, como son crecimiento e índice de conversión alimenticia, y los que se consideran al nivel de canal como lo es el porcentaje de magro y jamón entre otros. Estos objetivos son más fácilmente alcanzables en forma aislada (selección uní-carácter), a excepción de aquellos que tienen una débil heredabilidad. En cambio, alcanzar los objetivos en conjunto es problemático. Por una parte, no todos los niveles de la cadena de producción (cría, desarrollo, engorde) están interesados en los mismos caracteres. Además existen correlaciones genéticas desfavorables entre los parámetros de interés, p.e. la correlación positiva existente entre porcentaje de magro y el gen del halotano. Por lo tanto, cuanto más opuestos sean los caracteres entre sí, más interés tiene la selección de líneas independientes con el fin de mejorarlas de forma más eficiente y utilizar su potencial

conjuntamente mediante cruzamientos. Para algunos caracteres como el % de magro, los objetivos de selección han alcanzado prácticamente su techo biológico, por lo que ahora cada día cobran más importancia los objetivos enfocados a mejorar la calidad de la carne y los aspectos reproductivos en las cerdas (Tibau 1992).

I.1.2. Razas porcinas europeas.

Las razas más utilizadas por la industria productora porcina europea 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 incrementar la calidad de la carne. El segundo grupo lo forman las razas Landrace Belga y Pietrain. Son menos prolíficas que las anteriores pero poseen una eficiente conversión alimenticia hasta llegar a 95 kg, un porcentaje mayor de carne magra, y sin embargo son más sensibles al síndrome del estrés porcino. El tercer grupo lo forman las razas Duroc y Hampshire, que se caracterizan por su rusticidad, buena conformación, bajo consumo alimenticio y una calidad de canal con un elevado porcentaje de grasa intramuscular, pero presentan un desarrollo más lento a partir de los 45 kg con tendencia al engrasamiento, motivo por el cual estas razas son utilizadas mediante cruzamientos con Large White y con Landrace. Particularmente en España se produce el cerdo Ibérico. Se trata de un animal rústico de capa oscura o rojiza, posee una canal corta y pequeña con una conformación inferior a las razas comerciales. Es un animal precoz y con gran capacidad para depositar grasa en sus tejidos, lo cual resulta muy beneficioso a la hora de producción de jamón. Su elevado índice de infiltración de grasa, con un porcentaje mayor de ácido oleico y menor proporción de grasas poliinsaturadas, le confiere una excelente calidad organoléptica (Serra y col., 1998).

Las diferentes razas y líneas genéticas de porcino, presentan aptitudes reproductivas diferenciadas en función de las estrategias de selección que se han aplicado en los respectivos programas de mejora. Además, debido a las constantes adecuaciones que se han efectuado tanto en los sistemas de producción, alimentación y selección genética, ha sido posible mejorar constantemente la calidad de la producción porcina, atendiendo a las necesidades de los consumidores.

I.1.3. Factores que inciden en la mejora porcina.

La mejora genética del ganado porcino se basa en el aprovechamiento de la variabilidad existente entre y dentro de los tipos genéticos, mediante la aplicación de distintos métodos de selección a caracteres productivos cuya naturaleza depende del destino de los animales dentro del plan de cruzamiento (Tibau, 1992). Desde el inicio de la selección porcina, esta ha observado unos grandes avances gracias al corto intervalo generacional de la especie y al elevado número de crías producidas por camada. Además, los caracteres productivos seleccionados, han sido media o altamente heredables y su mayoría están correlacionados positivamente (Soler y col., 1999). Los programas de selección provocan un incremento en la consanguinidad, razón por la cual un programa de mejora debe de iniciarse partiendo de un grupo numeroso de familias de un tipo genético concreto, ya que cuanto más pequeño sea el núcleo de selección, mayor será la consanguinidad (Falconer y col., 1996). Las diferentes razas y líneas genéticas de porcino disponibles presentan aptitudes productivas diferenciadas en función de las estrategias de selección que se han aplicado en sus respectivos programas de mejora. De forma que una raza posee unas características productivas que aún se consideran muy amplias a la hora de hacer la selección de los caracteres a mejorar, mientras que una línea posee características muy concretas y por consecuencia su mejoramiento será menor, pero más preciso (Tibau, 1992). En ciertas razas se observan líneas portadoras de genes que pueden afectar de forma significativa la eficiencia en la transformación de pienso a carne magra. Por ejemplo, en la raza Large White, el efecto del gen del halotano es muy manifiesto sobre la calidad de la canal, sobre el peso de los animales y sobre el consumo de pienso a los 155 días de vida, aunque este efecto no se observa en la raza Landrace, otra observación es la reducción del apetito de los animales seleccionados para un alto porcentaje de magro (Tibau y Soler, 1999).

I.2. Caracteres de calidad de la canal y de carne en porcinos.

La industria productora porcina tiene presente que durante la producción debe tomar en cuenta dos factores muy importantes. Uno de ellos es la calidad de la canal y el otro es la calidad de la carne. La calidad de la canal es valorada mediante varios parámetros. Primero se valora su rendimiento, es decir, la relación entre el peso vivo y el peso de la canal. Además se valora la longitud de la canal, el porcentaje de tejido magro y el

estado de engrasamiento (ya sea con regleta o mediante ultrasonido). Para valorar la calidad de la carne existen varios parámetros, entre los cuales se pueden citar, la terneza, la coloración, la capacidad de retención de agua, y la infiltración de grasa. Para valorar estas características en la carne, existen una serie de métodos indirectos de medida que hasta el momento no son de fácil aplicación al nivel de la cadena de matadero. Algunas medidas de tipo físico son el pH y la conductividad eléctrica, la refractancia como medida de color, y de tipo químico como el porcentaje de grasa intramuscular de la carne (Tibau y Soler, 1999).

La mayor parte de los caracteres relacionados con calidad de la carne, están relacionados con el pH post-mortem. El pH₁, es el pH medido a los 45-60 minutos posterior al sacrificio, y el pH_u, 24 horas después. La velocidad y la magnitud de la caída de pH después del sacrificio es una de las causas más importantes en la calidad cárnica porcina. La velocidad de reducción de pH y la temperatura a la que se produce afectan a la desnaturalización proteica en el músculo postmortem. Una caída rápida de pH mientras la canal aún está a temperatura alta (>37°C) provoca la desnaturalización de las proteínas miofibrilares. La caída hasta un punto cercano al punto isoeléctrico (5,0-5,1) de las proteínas musculares reduce considerablemente su capacidad de retener agua. Así, la carne PSE (*Pale, Soft, Exudative*), con poca capacidad de retención de agua, blanda y de color pálido, se reconoce por un pH inferior a 5,9-6,1. La carne DFD (*Dark, Firm, Dry*) o carne oscura, dura y seca, tiene un pH por encima de 6,0-6,2. Por último, la carne ácida, tiene un pH inferior a 5,4-5,5. La aparición de carne ácida, así como la PSE, tienen una fuerte base genética, mientras que la carne DFD aparece bajo ciertas condiciones ambientales como puede ser un estrés prolongado que provoque una glucogenolisis continuada, provocando una disminución de glucógeno, y por tanto, falta de sustrato post-mortem para provocar la caída de pH (Warriss, 1996). Otro parámetro a medir es la relación porcentual de tipos y cantidad de fibras musculares con capacidad oxidativa y glicolítica, ya que la mayoría de los músculos del cerdo se componen de una mezcla heterogénea de al menos tres tipos de fibras, denominadas: tipo I (oxidativas), tipo II A (oxidativas glicolíticas) y tipo II B (glicolíticas) (Gil y col., 2001). Un cuarto tipo adicional con características intermedias entre las fibras II A y II B identificado en la raza Landrace fue denominado II AB (oxidativas-glicolíticas)(Gil-Cano, 2001). Los diferentes tipos de fibras musculares I (roja, contracción lenta, oxidativa) y II (contracción rápida, que a la vez se subdivide en IIa, IIb, IIab) presentan diferente comportamiento en el metabolismo de glucógeno debido a la diferente composición de

sus sistemas enzimáticos. La presencia de fibras tipo I (contracción lenta y metabolismo aeróbico) o tipo IIa (contracción rápida aeróbica con alto contenido en glucógeno y metabolismo rápido) son beneficiosas para una buena caída de pH y óptimo color rojizo de la carne. Las fibras tipo IIb (contracción rápida anaeróbica con alto contenido de glucógeno y metabolismo lento) resultan en una falta de glucógeno muscular. El contenido relativo de cada tipo de fibras en porcino, tipo I: IIa: IIb- 8:8:84 en músculo longissimus dorsi, predispone a la carne de cerdo a una mayor incidencia de PSE y DFD (Barton-Grade, 1997). Los tipos de fibras musculares pueden ser diferenciados mediante el empleo correcto de determinadas técnicas histoquímicas (Gil y col., 2001). Tanto la proporción de fibras así como su distribución muscular influyen en la distribución de mioglobina y coloración de los músculos y pueden influir en el crecimiento muscular y en la calidad de la carne (Klont y col., 1998). Las razas de cerdos seleccionados para crecimiento rápido y porcentaje de magro muestran un deterioro en la calidad de su carne (Sellier 1988). Poseen fibras musculares más glicolíticas que los cerdos rústicos y la capacidad de crecimiento muscular, está correlacionado positivamente con el número total de fibras musculares (Stuan, 1963; Dwyer y col., 1993; Müller, 2002). En el jabalí existe un mayor número de fibras oxidativas y menor número de glicolíticas (Rahelic y Puac, 1981; Weiler y col., 1995). Los dos genes mayores, receptor de rianodina (*RYR1* o halotano) y el gen *PRKAG3* (Rendimiento Napole), no influyen sobre el total del número de fibras, pero afectan la composición del tipo de fibra y su tamaño. La mutación *RYR1* incrementa el porcentaje de las miofibrillas de fibras glicolíticas responsables de la contracción muscular, lo cual conduce a una disminución del pH y a la aparición de carne PSE sobre todo en animales homocigotos para la mutación. Contrariamente el gen RN incrementa las miofibrillas de las fibras oxido-glicolíticas, disminuyendo el diámetro de las fibras glicolíticas, provocando un metabolismo más oxidativo y menos glicolítico (Lebret y col., 1999; Lefaucheur, 2001)

I.2.1. Parámetros genéticos.

I.2.1.1. Heredabilidad.

La heredabilidad (h^2) en sentido estricto, es considerada como el porcentaje de la varianza fenotípica de un carácter que puede atribuirse a la varianza genética aditiva. Los resultados de la heredabilidad para cada carácter oscilan entre 0 y 1 y son diferentes

en las distintas poblaciones y ambientes, por lo cual, los resultados no se pueden aplicar en otros estudios. En general, los valores medios para los caracteres de calidad de canal tienen una h^2 entre moderada y alta, mientras que los caracteres de calidad de la carne poseen heredabilidad entre moderada y baja, como puede observarse en la tabla 3 (Rothschild y Ruvinsky, 1998)

Tabla 3. Heredabilidad de calidad de canal y de carne (Rothschild y Ruvinsky, 1998).

Calidad de canal	h^2
Rendimiento de canal	0,35
Longitud de canal	0,60
Espesor de grasa dorsal	0,50
Porcentaje de magro	0,50
Calidad de carne	
Terneza	0,30
Jugosidad y <i>flavour</i>	0,10
Color de la carne	0,30
Porcentaje de grasa intramuscular	0,50
Firmeza de grasa subcutánea	0,35-0,65

I.2.1.2. Correlaciones genéticas.

El coeficiente de correlación (r_{xy}) expresa el grado de asociación por efectos genéticos comunes a dos características, las cuales puede variar entre poblaciones y estudios. Estas correlaciones son altamente consideradas en mejora genética, ya que indican que caracteres fenotípicos deben tomarse en cuenta para estimar los valores de otros caracteres estrechamente relacionados. Estas correlaciones se han estudiado en porcinos

desde los años sesenta mediante pruebas efectuadas en lotes porcinos seleccionados, existiendo por ejemplo una fuerte correlación genética entre la medida de grasa dorsal y el porcentaje de carne magra en la canal. Otra relación encontrada es la de la longitud de canal con el porcentaje de magro en la canal (Labroue y col. 1997).

La relación entre el consumo de alimento y el depósito de carne magra, depende del potencial genético del animal y de la calidad y cantidad del alimento consumido. El incremento diario de magro se aumenta progresivamente hasta un máximo y las necesidades nutritivas son variables durante este tiempo dependiendo del potencial genético de cada animal (Tibau y Soler 1999). No obstante, la heredabilidad de algunas características histoquímicas musculares como lo es el tipo de fibra muscular se relaciona directamente sobre el incremento de masa muscular (Lefaucheur 2001). Además existe una fuerte correlación positiva entre la pérdida de agua por goteo en la carne almacenada en frío y el pH_1 y pH_u (De Vries y col. 1994). La fuerte selección efectuada para obtener cerdos magros en corto tiempo, afecta la calidad de la carne (Sellier 1998b), donde el pH tiene una fuerte correlación con el potencial glicolítico de la carne, responsable de las carnes ácidas, con una elevada incidencia en la raza Hampshire, además relacionado con la pérdida de peso del jamón al ser cocido, conocido como rendimiento tecnológico Napole (Lebret y col. 1999). Otra correlación existente es la que se presenta en la aceptabilidad sensorial de los paneles de consumidores con el pH_u , además también relacionado con ternura y porcentaje de grasa intramuscular (Lo y col.1992).

La firmeza de la grasa subcutánea y su tendencia a la oxidación están altamente relacionadas con la composición de ácidos grasos (Cameron y col. 1990). Cuanto mayor sea el grado de insaturación de un ácido graso, el depósito graso será más blando y el riesgo de oxidación se incrementa, por lo que en las canales de cerdo se desea obtener una grasa subcutánea con un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados y saturados.

I.3. Genes mayores y caracteres de calidad de carne en porcino.

Actualmente se conocen dos genes cuya segregación de alelos está estrechamente relacionada con caracteres productivos porcinos, el gen *RYR1* (*Skeletal muscle Ryanodine Receptor*) y el gen RN (Rendimiento Napole).

I.3.1. Gen *RYR1*.

El gen receptor de la rianodina (*RYR1*) es conocido comúnmente como hipertermia maligna o gen del halotano, debido a la rigidez de los músculos y la hipertermia que presentan los animales homocigóticos en la forma recesiva del gen, provocando pérdidas mayores en la industria productora porcina. Eikelenboom y Minkema, (1974) demostraron la presencia del síndrome de la hipertermia maligna en animales expuestos al gas del halotano. Se considera una anomalía autosómica recesiva (Christian, 1972), causada por una mutación en el gen *RYR1*, localizado en el cromosoma 6 porcino (Harbitz y col. 1990). Anteriormente la detección de los animales portadores se realizaba mediante ligamiento de marcadores bioquímicos de las enzimas fosfohexosa isomerasa (PHI), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD) y el locus post-albumina Po-2 (Gahne y Juneja, 1985). En cerdos homocigotos para la mutación el síndrome se presenta bajo condiciones de estrés, motivo por el cual se le conoce además como síndrome del estrés porcino. Está relacionado con una hipersensitiva liberación del canal de Ca⁺ del retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. La localización del gen *RYR1* se encuentra en el cromosoma 6p11-q21, y su polimorfismo causal en el nucleótido 1843 remplazando una citosina por una timina, conduciendo a una alteración en la secuencia de aminoácidos de una arginina en la posición 615 por una cisteína (Fujii y col. 1991). La mutación puede ser localizada mediante PCR-RFLP presentando tres genotipos: NN, Nn y nn, los animales susceptibles son aquellos que presentan el genotipo recesivo nn. La hipertermia maligna es asociada a los cerdos con alto contenido de carne magra. Las razas Pietrain y Landrace Belga, caracterizadas por poseer canales magras, poseen una alta incidencia de esta mutación, presentando canales PSE (carnes pálidas, blandas y exudativas). La carne de los animales con genotipo nn para el gen *RYR1*, es de baja calidad, y se caracteriza por una caída rápida del pH post-mortem, presenta color pálido, escasa rigidez, y poca retención de agua. Los animales homocigotos para esta mutación presentan una intolerancia al estrés, y bajo condiciones estresantes de manejo, pueden llegar a presentar un cuadro de taquipnea, rigidez muscular, manchas violáceas en la piel e incluso la muerte (Noguera y Piedrafita, 1992).

Los animales portadores del gen del halotano tienen algunas ventajas en comparación con los animales negativos, incluyendo una mejor eficiencia alimenticia, mayor rendimiento de la canal y mayor contenido de carne magra, sin embargo presentan

menor color muscular y menor capacidad de retención de agua, lo que disminuye la calidad de la carne (Leach 1996). Las ventajas anteriores no se presentan en todas las poblaciones, Tor y col. (2001) describen no encontrar significación para desarrollo, ingesta de alimento y eficiencia alimenticia en una población Landrace, no obstante describen significación para mayor espesor de grasa dorsal en los animales halotano negativos. Los cerdos con el genotipo nn, presentan una carne más dura, fibrosa, y elástica y menos fácil de tragar que la de los cerdos NN, mientras los genotipos Nn producen carnes que se asemejan más a las producidas por los animales NN (Monin y col. 1999).

I.3.2. Gen *Protein Quinasa Activada por AMP no catalítica Gamma 3 (PRKAG3)*.

Otro gen individual que afecta la calidad de la carne del cerdo es el Rendimiento Napole (RN), el cual se conoce como gen Napole de la carne ácida (Naveau, 1986), o el efecto Hampshire, debido a que sus efectos únicamente se han observado en animales de raza pura y cerdos con cruce Hampshire donde produce un efecto detrimental en la calidad de la carne aumentando los niveles del potencial glicolítico (Enfalt y col. 1997; Miller y col. 2000). El gen RN es una expresión del rendimiento tecnológico de la carne después de su cocción para producir jamón cocido. Fue identificado en Francia en los años ochenta (Monin & Sellier, 1985; Naveau, 1986, Le Roy y col. 1990). El gen RN se localiza en el cromosoma 15q21-22 (Milan y col. 1996b). El alelo dominante causante es el RN⁻ y el recesivo favorable rn⁺. La carne de los animales portadores del alelo RN⁻ comparados con los no portadores, contiene en las fibras musculares blancas (IIB) una cantidad elevada de glicógeno, mostrando una caída rápida de pH postmortem en músculo y un potencial glucolítico elevado (Mariani y col., 1996; Reinsch y col., 1997), el cual se determina a partir de las concentraciones de glucógeno, glucosa-6-fosfato, glucosa y lactato en el músculo (Le Roy y col. 2000). El efecto del alelo RN⁻ incrementa las pérdidas por medio del goteo y pérdida de líquido durante la cocción, lo que reduce el rendimiento. Además el color es generalmente más pálido por el alto contenido de potencial glucolítico. Sin embargo, el alelo RN⁻ tiene efectos positivos sobre la canal, ya que retiene más líquidos, siendo la carne más suave por su mayor jugosidad. Milan y col. (2000b) han descrito una mutación en el gen de la *Protein Kinase, AMP-Activated, Noncatalitic, Gamma-3 (PRKAG3)*, que se le responsabiliza de provocar un defecto metabólico del glicógeno causante del RN.

I.3.3. Otros genes involucrados en la calidad de carne porcina.

Actualmente la industria porcina realiza test de diagnóstico para genes con menor repercusión sobre caracteres productivos como son los genes *Adipocyte Fatty Acid Binding Protein (A-FABP)* y *Heart Fatty Acid Binding Protein (H-FABP)*, con efecto sobre porcentaje de grasa intramuscular (Gerbens y col. 2000). El gen *Insuline Growth Factor-2 (IGF-2)*, con influencia sobre el porcentaje de magro y espesor de grasa dorsal (Nezer y col. 1999), y el gen *Melanocortin 4 Receptor (MC4R)* con influencia sobre crecimiento y deposición grasa (Kim y col. 2000). Existen otros genes bajo estudio que aún no son utilizados en la industria porcina como el gen de la Leptina (*LEP*), el Receptor de la Leptina (*LEPR*), etc.

I.3.3.1. *Heart fatty acid binding protein (H-FABP)*.

Uno de los principales objetivos en la industria productora porcina es la producción de carne de alta calidad. Para lograr este objetivo es necesario la reducción de grasa ya que los consumidores demandan carne magra.

La reducción de grasa en los animales es analizada sistemáticamente mediante la medición del espesor de grasa dorsal, sin embargo esta reducción también afecta a otros depósitos grasos, como la grasa intramuscular, causando una correlación negativa con la calidad de carne (Wood y col.,1998).

El contenido de grasa intramuscular es muy importante para la calidad de carne de cerdo para consumo y es altamente heredable (Hovenier y col., 1993), y tiene una correlación positiva con suavidad, jugosidad y sabor (Bejerholm y Barton-Gade, 1986; De Vol y col., 1988; Wood y col., 1988).

El contenido óptimo sugerido de grasa intramuscular en la carne de cerdo es entre el 2 al 3 % (Bejerholm y Barton-Gade, 1986; De Vol y col., 1988).

I.3.3.1.1. Funciones fisiológicas del gen *H-FABP*.

En células de mamíferos, los ácidos grasos son moléculas importantes para la síntesis y liberación de energía. Los ácidos grasos son metabolizados en la mitocondria, peroxisomas y en el retículo endoplásmico (Veerkamp, J.H., 1995).

El metabolismo de ácidos grasos en las células de mamíferos depende del transporte de los ácidos grasos del plasma a través de la membrana a los sitios de β oxidación y síntesis de triacilglicerol o fosfolípidos (Veerkamp y Maatman, 1995).

Las proteínas ligadoras de ácidos grasos (*FABPs*) juegan un importante papel en el transporte de estos compuestos a través del citoplasma (Storch y Thumser, 2000).

Desde 1972 existen antecedentes de estudios *in Vitro* de una proteína ligadora de ácidos grasos encontrada en el citosol celular de diferentes tejidos (Ockner y col. 1972).

Los *FABPs* de intestino delgado (Ockner y Manning, 1974), hígado (Mishkin y col. 1972) y corazón (Fournier y col., 1978), fueron los primeros en ser caracterizados.

Diferentes *FABPs* han sido identificados en músculo esquelético y cerebro de ratón (Peeters y col., 1991), además de los localizados en adipocitos (Matarese y Bernlohr., 1988) y epidermis (Vogel y Bernlohr, 2000).

Actualmente se conoce que los *FABPs* son miembros de una familia multigénica que codifica proteínas de aproximadamente 15 kDa.

Esta familia esta formada por nueve miembros que tienen una similitud de aminoácidos que oscila entre 20 a 70%, los *FABPs* se expresan en hígado (*FABP-1*), intestino (*FABP-2*), músculo y corazón (*FABP-3*), adipocitos (*FABP-4*), epidermis (*FABP-5*), ileon (*FABP-6*), cerebro (*FABP-7*), testículos (*FABP-9*) y en mielina (*MP-2*).

I.3.3.1.2. Características estructurales y regulación de la expresión del gen *H-FABP*.

A pesar de la gran variedad en las secuencias aminoacídicas en los diferentes *FABPs*, las estructuras tridimensionales muestran una estructura común de hoja β plegada que consta de 10 bandas antiparalelas ligadas por enlaces de hidrógeno formando una estructura similar a un cubo donde en el interior del cual se encuentra un sitio receptor de ácidos grasos (Vogel y Bernlohr, 2000).

En humanos los primeros estudios realizados mediante RT-PCR, clonación y secuenciación de los dos tipos de cDNA de *H-FABP* presentes en riñón y conocidos previamente como los tipos A y B, demostraron ser completamente idénticos a los tipos

L-FABP y *H-FABP* respectivamente (Maatman y col. 1992), y utilizando cDNA del gen *H-FABP* fue posicionado en el mapa mediante *FISH* en el cromosoma 1p31-p33 (Troxler y col. 1993).

El tipo cardiaco *H-FABP* (*Heart Fatty Acid Binding Protein*) es una proteína de 15 kDa presente en muchos tejidos pero particularmente abundante en músculo cardiaco, esquelético y glándula mamaria lactante, el gen *H-FABP* porcino fue posicionado en el mapa en el cromosoma 6 utilizando dos paneles de células híbridas somáticas cerdo/roedor. El gen presenta una estructura constituida por una región 5' UTR de 330 pb, 4 exones (72, 174, 102, y 51 pb respectivamente), 3 intrones (4,2, 2,5, y 1,5 kb respectivamente), y una región 3' UTR de 200 pb. El gen *H-FABP* codifica una proteína de 134 aminoácidos, poseyendo una similitud entre el 86 al 92 % con otros mamíferos (Gerbens y col., 1997).

Aunque los *FABPs* son de la misma familia, son de estructuras proteicas diferentes (Said y Schulz., 1984), en la rata contiene al menos 3 proteínas citosólicas que se unen a ácidos grasos de cadena larga: la hepática (L), intestinal (I) y cardiaca (H) (Heucheroth y col., 1987).

En ratas adultas el mRNA de la *I-FABP* esta confinado en el tracto gastrointestinal, mientras que el *L-FABP* está abundantemente representado en hepatocitos así como en enterocitos, mientras que el *H-FABP* se encuentra distribuido en mayor cantidad en corazón, además de encontrarse en testículos, músculo esquelético, cerebro, riñón y glándula adrenal (Heucheroth y col., 1987).

La localización del gen *H-FABP* de la rata fue determinada por *FISH* en el cromosoma 5q36 (Zhang y col., 1999).

En la década de los 90 se dio inicio a los estudios de asociación entre los distintos polimorfismos encontrados en los *FABPs* y diversos caracteres productivos porcinos.

Los estudios realizados por Gerbens y col. (1997) marcaron el inicio de la detección de polimorfismos del gen *H-FABP* en cerdos mediante la realización de la técnica PCR-RFLP.

Inicialmente el gen fue aislado de clones fago λ positivos para el gen *H-FABP*, mediante hibridación en placa. Posteriormente el *H-FABP* fue amplificado mediante PCR, y mediante las enzimas de restricción *MspI*, *Hae III* y *Hinf I*, fueron localizados varios sitios polimórficos en las razas Landrace, Duroc, Yorkshire, Hampshire, Meishan, Pietrain y Jabalí (Gerbens y col., 1998).

Analizando las variantes génicas del gen *H-FABP* se detectó su asociación con el contenido de grasa intramuscular, espesor de grasa dorsal y crecimiento (Gerbens y col., 1997 y 1998^a).

En la valoración del efecto de las variantes del gen *H-FABP* y los caracteres de contenido de grasa intramuscular, espesor de grasa dorsal, peso corporal, así como la pérdida de agua por goteo de la carne (*Drip loss*), en dos poblaciones de cerdos Duroc, Gerbens y col. (1999), encontraron diferencias significativas entre los genotipos homocigotos AA-aa (*Msp* I), DD-dd (*Hae* III) y HH-hh (*Hinf* I), para contenido de grasa intramuscular, espesor de grasa dorsal y peso corporal, pero no para *Drip loss*.

Para valorar el efecto del gen *H-FABP* en contenido de grasa intramuscular y espesor de grasa dorsal, además de determinar la posición por ligamiento del gen, Gerbens y col. (2000), realizaron un estudio con razas divergentes, cruzando machos Meishan con hembras Landrace y LargeWhite. Machos y hembras F₁ no emparentados, fueron cruzados al azar para generar una F₂, la cual fue testada para los microsatélites localizados en el gen *H-FABP* (Gerbens y col., 1998^b), los análisis de ligamiento posicionan el gen *H-FABP* a 106 cM en SSC6.

Los resultados del análisis QTL descritos por Gerbens y col. (2000) evidencian la existencia de un QTL que afecta el contenido de grasa intramuscular en cromosoma 6, pero no muestran evidencia significativa para el aumento del espesor de la grasa dorsal encontrado en los cerdos Duroc por Gerbens y col. (1999).

En otro estudio de asociación realizado por Gerbens y col. (2001), una F₁ producto del cruce de machos LargeWhite con hembras del cruzamiento LargeWhite y Landrace, se valoró la influencia del polimorfismo del gen *H-FABP*, niveles cuantitativos de expresión de mRNA y proteína vs el contenido de grasa intramuscular del músculo *longissimus lumborum*. Todos los animales fueron genotipados para el gen *H-FABP* mediante PCR-RFLP como describe Gerbens y col. (1997), en esta población se encontraron segregando solo los alelos *Hae* III y *Msp* I, detectándose asociaciones significativas para polimorfismos con el contenido de grasa intramuscular en machos pero no en hembras de la F₁. Los niveles de expresión proteica obtenidos por Gerbens y col. (2001) mediante ELISA, no mostraron diferencias significativas entre las clases genotípicas para ambos PCR-RFLP del gen *H-FABP*, pero mostraron una baja correlación con el mRNA del músculo *longissimus lumborum*.

Los resultados de los polimorfismos del gen *H-FABP* mostraron una asociación significativa con el contenido de grasa intramuscular, esta misma asociación fue

encontrada en los estudios realizados en cruces de cerdos Ibéricos con Landrace (Óvilo y col., 2002).

Nechtelberger y col. (2001) investigaron en las razas Austriacas, Pietrain, Landrace y LargeWhite la asociación de los polimorfismos de los RFLPs del gen *H-FABP* reportados en la raza Duroc por Gerbens y col. (1999), no encontrando asociación significativa del gen *H-FABP* para grasa intramuscular, sin embargo en sus resultados, el polimorfismo de restricción de la enzima *Hae* III en la raza LargeWhite, fue significativo con el genotipo dd para promedio de ganancia de peso diaria, y el genotipo Dd tuvo un efecto positivo con el pH del jamón medido a los 45 minutos postmortem.

Para la raza Pietrain se encontró además un efecto significativo con la enzima *Hae* III para pH del lomo medido a los 45 minutos postmortem.

Con la enzima *Hinf* I, genotipo HH, se encontró una asociación significativa en la raza LargeWhite con promedio de ganancia de peso diaria. Para la raza Pietrain se encontró un efecto positivo del genotipo hh con pérdida de agua por goteo (*Drip loss*).

Como puede observarse, los estudios realizados involucran poblaciones porcinas diferentes en raza y número de animales, sin embargo la mayoría de los estudios obtienen significación con los caracteres de incremento de grasa dorsal o intramuscular, no obstante es necesario valorar si estos resultados son consistentes en poblaciones de raza pura de tipo comercial.

I.3.3.2. Gen receptor de leptina.

I.3.3.2.1. Funciones fisiológicas del gen receptor de leptina.

La regulación del peso corporal implica una estrecha comunicación entre el tejido adiposo y la zona del hipotálamo involucrada en el control de la ingesta y la actividad metabólica celular (White y col., 1997; Matsuda y col., 1999). La leptina es una proteína de 146 aminoácidos, 16 KD de peso molecular, secretada por el tejido adiposo y transportada mediante el torrente circulatorio hasta el sistema nervioso central, donde inhibe la producción de neuropéptidos hipotalámicos que incluyen el neuropéptido “Y” (*NPY*), el más potente factor estimulante del apetito conocido (Stephens y col., 1995), causando una señal de saciedad, regulando el peso corporal mediante el aumento del metabolismo basal y el gasto energético (Campfiel y col., 1995).

La leptina es una proteína secretada por las células adiposas en respuesta al estado nutricional, posiblemente a la insulina y a los glucocorticoides. Además se ha asociado su implicación en hematopoyesis y reproducción. El receptor del hipotálamo recibe la señal de la leptina y controla la homeostasis de energía a través del balance entre las actividades de los neurotransmisores GLP-1 (suprimiendo el apetito) y NP-Y (estimulando el apetito) (Albar y col., 1998).

El receptor de la leptina es una proteína que pertenece a la familia de las citoquinas de tipo I, la cual tiene dos isoformas (corta y larga), las cuales son generadas por *splicing* alternativos que se diferencian de acuerdo al dominio intracelular (Tartaglia, 1997).

En condiciones de ayuno la leptina disminuye drásticamente. Con una reducción del 10% del peso corporal se observa una reducción en un 53% de los niveles de leptina en suero, y con un incremento del 10% del peso corporal, incrementa 300% los niveles de leptina en suero (Houseknecht y col., 1998).

En cerdos se ha observado que la cantidad de mRNA de leptina es mayor (113%) en cerdos seleccionados genéticamente para un elevado espesor de tocino dorsal en relación con cerdos control, además en estos cerdos seleccionados se observa un incremento en los niveles de leptina en suero (Ramsay y col., 1998). Resultados similares relacionados con la cantidad de leptina en suero fueron confirmados en cerdas con elevado contenido de grasa dorsal por Estienne y col. (2000). Aunado a lo anterior, los niveles de transcripción superiores de leptina encontrados en cerdos obesos (McNeel y col., 2000), sugieren que la expresión de la leptina está estrechamente relacionada con el incremento de la grasa corporal.

I.3.3.2.2. Características estructurales y regulación de la expresión del gen receptor de leptina.

El gen receptor de la leptina (*LEPR*) en el cerdo, se encuentra localizado en el cromosoma 6 (Ernst y col., 1996). Mediante un panel de células híbridas somáticas fue posicionado en 6q3.3-q3.5 (Stratil y col., 1998).

El gen receptor de la leptina ha sido caracterizado en ratón (Chua y col., 1996), posee 18 exones. En la forma de receptor unida a la membrana, ha sido observado que el exón 18 está sometido a *splicing* alternativo dando lugar a dos transcritos (Chua y col., 1996). Además en la forma soluble del receptor, el transcrito posee 15 exones y el último exón está sometido a *splicing* alternativo (Chua y col., 1996).

En el cerdo, el gen receptor de leptina ha sido clonado y secuenciado a partir de cDNA de hígado mediante RT-PCR, la secuencia codificante nucleotídica posee 3.498 nucleótidos y tiene una similitud con los dominios extracelular, transmembrana y citoplasmáticos de humano, rata, ratón, oveja y vaca que oscila entre un 45 a un 90 % (Ruiz-Cortes y col., 2000).

El mRNA de cerdo está presente en hígado, bazo, pulmón, riñón, testículos, útero, ovario, cuerpo lúteo, teca y células de la granulosa (Ruiz-Cortes y col., 2000).

La expresión y secreción de leptina está altamente vinculada con la cantidad de grasa corporal y con el tamaño de los adipocitos (Houseknecht y col., 1998), además se ha observado en cerdos que los niveles de mRNA de leptina, son mayores en tejido adiposo de cerdos gordos que en cerdos magros (Robert y col., 1998; McNeel y col., 2000).

I.4. Gen de la piruvato carboxilasa (*PC*).

I.4.1. Funciones fisiológicas del gen de la piruvato carboxilasa.

La piruvato carboxilasa es un miembro de la familia de las enzimas dependientes de biotina y cataliza la carboxilación ATP-dependiente de piruvato a oxalacetato. La acetil-CoA es generada en el mitocondria mediante la descarboxilación oxidativa del piruvato, y posterior a la condensación con el oxalacetato, es transportado al citoplasma en forma de citrato, una vez en el citosol, el citrato es convertido mediante ATP nuevamente en oxalacetato y acetil-CoA. A continuación la acetil-CoA es convertida mediante la acetil-CoA carboxilasa en malonil-CoA que sintetiza largas cadenas de ácidos grasos en tejido lipogénico y el oxalacetato del citosol es reducido a malato, el cual mediante enzimas málicas es nuevamente transformado a piruvato, para de nuevo participar en el ciclo del ácido cítrico (Jitrapakdee y Wallace, 1999).

La piruvato carboxilasa ha sido caracterizada en una gran variedad de procariotas y eucariotas. En mamíferos, juega un papel importante en gluconeogénesis y lipogénesis, en la biosíntesis de sustancias neurotransmisoras y en la secreción de insulina por los islotes pancreáticos (Wallace y col., 1998; Jitrapakdee y Wallace, 1999), y se encuentra solamente en la matriz mitocondrial (Carbone y col., 1998).

En condiciones de ayuno, el 96% de la glucosa se produce mediante gluconeogénesis y la presencia de una actividad elevada de piruvato carboxilasa, además de la alta

actividad de otras enzimas gluconeogénicas, sugiere que la actividad principal de la piruvato carboxilasa es en la gluconeogénesis, sin embargo se ha visto que también se expresa a elevados niveles durante la diferenciación de adipocitos (Carbone y col., 1998).

En tejido gluconeogénico (hígado y riñón) la piruvato carboxilasa cataliza los primeros pasos en la síntesis de glucosa a partir del piruvato, mientras que en el tejido lipogénico (hígado, adiposo, glándula mamaria lactante y glándula adrenal) participa en la exportación de grupos acetil, como citrato, de la mitocondria hacia el citosol (Carbone y col., 1998).

Además ha sido observada gran actividad de la piruvato carboxilasa en las células pancreáticas β desarrolladas en altas concentraciones de glucosa, y como la glucosa es un potente estimulador de la secreción de insulina por las células pancreáticas β , esto sugiere que la piruvato carboxilasa este relacionada en la regulación de los niveles de insulina (Jitrapakdee y Wallace, 1999).

I.4.2. Características estructurales y regulación de la expresión del gen de la piruvato carboxilasa.

Los estudios actuales de la piruvato carboxilasa en mamíferos, han sido desarrollados principalmente en rata, primate, ratón y humano.

La enzima nativa tiene una estructura tetramérica con cuatro unidades, cada subunidad consta de tres dominios funcionales: el dominio biotin carboxilasa, el dominio transcarboxilasa y el dominio biotinil (Carbone y col., 1998).

La alta conservación de la secuencia de aminoácidos, encontrada en el sitio biotin en la mayoría de las carboxilasas, fundamenta que el sitio biotin está presente en la piruvato carboxilasa humana.

La biotina está covalentemente ligada a la terminación final carboxil de la enzima piruvato carboxilasa. Este dato es consistente con lo observado para otras carboxilasas y sugiere fuertemente que los genes que codifican dichas enzimas tal vez procedan de un gen común ancestral (Freytag y Collier, 1984).

A partir del análisis *Northern blotting* de mRNA aislado de humano, primate y rata, Freytag y Collier (1984) demostraron que el mRNA de la piruvato carboxilasa tiene un tamaño aproximado de 4.2 kb en las diversas especies examinadas. Mediante análisis *Southern blot* de ADN genómico aislado de células híbridas somáticas humano-hamster,

los mismos autores ubicaron el gen de la piruvato carboxilasa en el brazo largo del cromosoma 11 humano. Walker y col. (1995) demostraron que el gen de la piruvato carboxilasa es de copia única, y fue ubicado en la posición 11q13.4 mediante hibridación *in situ* fluorescente. El gen contiene 19 exones codificantes y 18 intrones distribuidos en una región de 16 kb (Carbone y col., 1998), la región codificante de cDNA tiene una secuencia nucleótida de 3.537 pb que codifica un polipéptido de 1.178 aminoácidos (Wexler y col., 1994).

En el ratón se encuentra en el cromosoma 19 a 0 cM , y en la rata fue posicionado por Webb y col. (1997) en el cromosoma 1q43.

En el ratón el gen de la *PC* esta compuesto de 19 exones codificantes espaciados en 22 kb y la organización intron/exón es altamente conservada entre el ratón, rata y humano (Jitrapakdee y col., 2001).

En la rata, el gen de la *PC* posee también 19 exones codificantes pero están espaciados en una región de 40 kb (Jitrapakdee y col., 1997), el mRNA contiene una secuencia codificante de 3.537 nucleótidos codificando un polipéptido de 1.178 aminoácidos, la secuencia proteica inferida es 96.6 % idéntica con la *PC* del ratón, 96.3 % con la del humano, 68.4 % con la del mosquito y 53.5 % con las isoenzimas *PC1* y *PC2* de la levadura (Jitrapakdee, 1996a).

Análisis *Northern blot* revelan que el mRNA de la *PC* en la rata es expresada a altos niveles en el hígado, riñón, tejido adiposo y cerebro, a niveles medios en corazón, glándula adrenal y glándula mamaria lactante, y a bajos niveles en bazo y músculo esquelético (Jitrapakdee, 1996a).

El análisis *blot* RNA de una variedad de tejidos humanos demostró que los altos niveles de mRNA de *PC* encontrados en hígado corresponden al alto nivel de actividad de *PC* en este tejido (Wexler y col., 1994).

Jitrapakdee y col.(1996b), detectaron mediante *Northern blot* un fragmento de mRNA de 4.2 kb en rata y humano. Además describen que el gen *PC* de la rata posee 5 diferentes tamaños de secuencias nucleotídicas en la región 5'UTR con longitudes que van de 0.2 a 0.4 kb. Estos fragmentos fueron agrupados en dos clases; la clase I que agrupa los tipos A (222 pb), B (113 pb) y C (95 pb) por contener una región común de 95 pb, mientras que los tipos D (96 pb) y E (59 pb) fueron agrupados en la clase II debido a la presencia de una región común de 59 pb . En RNA de hígado de humano solo se detectaron la forma A (201 pb) y B (131 pb), sin embargo todas son codificadas

por el mismo gen, por lo que la diferente expresión de *PC* en los diferentes tejidos puede deberse a promotores alternativos.

En la rata, los estudios efectuados por Jitrapakdee y col. (1997) sugieren que dos promotores regulan la producción de diferentes transcritos primarios, los de clase I (A,B,C) derivados del promotor proximal, son expresados en hígado, riñón, tejido adiposo y glándula mamaria lactante. Los de clase II (D,E), se corresponden al promotor distal y se expresan en una gran variedad de tejidos. Es posible que esta forma de transcrito sea la responsable de la síntesis de enzimas utilizadas en un rol anaplerótico en el ciclo de las células (Jitrapakdee, 1998).

Por su importante participación en la gluconeogénesis en tejido adiposo, así como su asociación en la síntesis de ácidos grasos, será de interés posicionar el gen de la piruvato carboxilasa en el mapa genómico porcino y efectuar la búsqueda de mutaciones puntuales en distintas razas para realizar ulteriores estudios de asociación.

I.5. Construcción de mapas físicos y genéticos en porcino.

I.5.1. El genoma nuclear porcino.

El genoma del cerdo domestico esta compuesto por 18 pares de autosomas y los cromosomas sexuales (X e Y). Schmitz y col., (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 bastante bien con la estima de tamaño (1650 cM para machos y 2150 cM para hembras) realizada por mapeo de ligamiento (Archibald y col., 1995). Aunque no se ha realizado ninguna estima del número de genes expresados en el cerdo, por analogía con la especie humana (Lander y col., 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, existe aproximadamente un 5% de secuencias codificantes y al menos un 50% de secuencias repetitivas (Lander y col., 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 y col.,1987), cuya abundancia es de 50.000-250.000 copias/genoma, *ARE-1P*, o *artiodactyl repetitive element-1 porcine* y *ARE-2P* (Alexander y col., 1995).

Dentro del genoma de especies relacionadas filogenéticamente, existen regiones que son muy similares, debido a que dichas regiones 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 en importantes caracteres económicos en cerdos (Nicholas, 1998), p.e. la mutación puntual del síndrome del estrés porcino (Fujii y col., 1991).

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 porcino. En el cerdo, el primer objetivo consistirá en ubicar un número elevado de genes y marcadores genéticos distribuidos uniformemente sobre el genoma. El posicionamiento de dichos marcadores permitirá identificar regiones que contengan genes responsables de la variación de caracteres de interés productivo (Haley y Archibald, 1998).

I.5.2. Mapas físicos.

Como su nombre indica, los mapas físicos son aquellos que posicionan genes o marcadores sobre los cromosomas utilizando para ello diversas estrategias como la hibridación *in situ* fluorescente, los paneles de células somáticas híbridas y la construcción de *contigs*.

Para la obtención de los primeros mapas físicos se utilizó la técnica de hibridación *in situ* que consiste en la extensión y fijación de los cromosomas en metafase, los cuales previamente son reconocidos de acuerdo a su morfología, tamaño y patrón de bandas. En dichos cromosomas, se hibrida una sonda marcada de ADN, la cual consiste en un gen clonado o una secuencia de ADN anónimo de una región específica. Para marcar las sondas se utilizan comúnmente la radioactividad o compuestos como la biotina y la digoxigenina (Chowdhary y col., 1995). El procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) se basa en la unión específica de una sonda desnaturalizada a aquella secuencia genómica que presente una perfecta, o casi perfecta, complementariedad con la misma. Posteriormente, la sonda puede detectarse mediante la unión de anticuerpos marcados con un compuesto fluorescente a la biotina o la digoxigenina. Ellegren y col., (1994) usaron sondas derivadas de cósmidos para localizar microsatélites y actualmente se calcula que el número de genes y marcadores anónimos posicionados en el mapa citogenético es de 1311 (<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/>).

La identificación de homologías cromosómicas entre cerdo y humano se ha efectuado mediante la técnica de *chromosome Painting*, que se basa en la hibridación *in situ* de sondas cromosómicas sobre preparaciones cromosómicas en interfase o en metafase (Goureau y col., 1996). Otras técnicas que cabe mencionar son la *primed in situ*-PCR (*PRINS*) y la *direct in situ single-copy*-PCR. Ambas técnicas se utilizan para detectar pequeñas secuencias repetidas mediante la realización de PCR sobre preparaciones de cromosomas en metafase. La técnica *PRINS* basada en detección fluorescente ha sido utilizada en cerdos para localizar regiones teloméricas en el cromosoma 6 (Gu y col., 1996).

A principios de los años noventa, se inició el desarrollo de la elaboración de los mapas físicos porcinos mediante la implementación de los paneles de células somáticas híbridas (*SCH*) (Rettenberger y col., 1994.; Yerle y col., 1996). La obtención de estas células híbridas se efectúa mediante la fusión de dos líneas celulares, donante (D: p.e. cerdo) y receptora (R: p.e. ratón o hámster), de forma tal que se genera una librería de líneas celulares o clones que contienen el complemento cromosómico completo de R y algún cromosoma o fragmento cromosómico de D. Usando cebadores específicos que amplifiquen una región conocida del genoma del cerdo se logra la identificación de los clones que contienen dicho fragmento, logrando con ello su ubicación física. Otro método físico para la obtención de mapas es la utilización de paneles de células híbridas irradiadas mediante rayos X (*X-Ray hybrids*). Los clones híbridos irradiados (*RH*) son producidos después de irradiar las células de una especie de interés (D), causando la ruptura del ADN cromosómico en fragmentos de distintos tamaños. La fusión de la línea D con la línea receptora R, da lugar a la formación de líneas celulares híbridas que contienen el complemento cromosómico de R y fragmentos cromosómicos de D. De esta forma, las células *RH* contienen fragmentos de ADN de la especie donadora que pueden ser identificados mediante PCR. La resolución obtenida es mayor que la obtenida con los paneles de células híbridas somáticas. La distancia entre dos loci se cuantifica en función de la probabilidad que se produzca una ruptura cromosómica entre ambos, parámetro que aumenta con la distancia y se mide en centirays (cR) (Milan y col., 2000a). Yerle y col., (1998) y Hawken y col., (1999) describieron el primer panel de células somáticas híbridas irradiadas porcinas *INRA-University of Minnesota porcine Radiation Hybrid panel (IMpRH)*.

Un incremento adicional en el grado de resolución cartográfico se consigue mediante la manipulación directa de fragmentos de ADN clonados. El objetivo es generar un

conjunto de clones de fragmentos solapados (*Contigs*), que cubran en conjunto una región cromosómica, un cromosoma entero, o incluso la totalidad del genoma. Para ello es necesario fabricar una genoteca de insertos clonados en vectores capaces de albergar fragmentos de gran tamaño, como p.e cromosomas artificiales de levaduras (*YAC*), cromosomas artificiales de bacterias (*BAC*) o cromosomas artificiales de fago *P1* (*PAC*). Los insertos de gran tamaño se obtienen mediante la digestión parcial del ADN genómico y separación mediante electroforesis en campo pulsante (*PGFE*). Esta estrategia permite ordenar los clones que contienen fragmentos solapados mediante hibridación en filtros o técnicas basadas en la PCR. Una vez ordenados los clones, permite la caracterización genética de una región específica de interés o la búsqueda de genes, además de servir como molde para la posterior secuenciación de dicha región. La elaboración de *contigs* a partir del genoma completo es muy lenta, pero mediante la citometría de flujo se puede preparar ADN de cromosomas concretos. La citometría de flujo puede efectuarse utilizando la técnica para la separación de cromosomas activada por fluorescencia (*FACS*). En primer lugar, se tiñen los cromosomas metafásicos con dos colorantes, uno de los cuales se une a regiones ricas en A-T y otro a regiones ricas en G-C. Posteriormente se rompen las células liberando los cromosomas completos en una suspensión líquida, la cual pasa a un pulverizador, de tal forma que cada gota pulverizada contiene un solo cromosoma. Al pasar por un rayo láser calibrado, se excita la fluorescencia y cada cromosoma produce su propia señal fluorescente. Esta señal es reconocida electrónicamente y mediante unas placas deflectoras se dirigen las gotas que contienen los cromosomas de interés y las que contienen otros cromosomas a diferentes tubos colectores (Grunwald y col., 1986; Matsson y col., 1986; Geffrotin y col., 1987). Otra técnica para la identificación de regiones en cromosomas pequeños, consiste en fragmentarlos mediante enzimas cuyas dianas de restricción no sean frecuentes y posteriormente someterlos a *PFGE*. Dicha técnica permite la separación de grandes fragmentos de ADN, los cuales son reconocidos posteriormente mediante la utilización de sondas específicas de ADN.

En los años noventa se dio inicio a los estudios de regiones cromosómicas concretas mediante microdissección cromosómica. Esta técnica involucra la amplificación mediante PCR de un fragmento cromosómico que ha sido aislado mediante un micromanipulador. (Chowdhary, 1998).

El objetivo final de los mapas físicos es la identificación exacta de cada una de los marcadores posicionados sobre los cromosomas, además de determinar en colaboración

con los mapas de ligamiento la longitud de los mismos, así como los grupos de genes sinténicos entre especies.

I.5.3. Mapas genéticos o de ligamiento.

La ubicación de genes en el genoma además de efectuarse mediante métodos físicos, puede realizarse mediante el análisis de la frecuencia de recombinación entre loci. Si dos genes se encuentran en cromosomas distintos o a una distancia muy grande dentro del mismo cromosoma, se heredan en forma independiente (Frecuencia de recombinación $\geq 50\%$). En cambio si existen grupos de genes que se encuentran relativamente cercanos unos de otros (frecuencia de recombinación $< 50\%$) tienden a heredarse conjuntamente y son conocidos como grupos de ligamiento. La frecuencia de recombinación entre dos loci, por tanto, es proporcional a la distancia física que los separa y la unidad de mapa (m.u.) o centimorgan (cM), se define como la distancia entre genes en donde uno de cada 100 productos meióticos es recombinante. Las distancias de mapa son generalmente aditivas, y la utilización de la información de los mapas físicos y de ligamiento permite construir mapas integrados, facilitando el posicionamiento de nuevos loci y genes. Sin embargo para la realización de un mapa de ligamiento, es necesario disponer de marcadores polimórficos y el cruzamiento de un gran número de animales, con un adecuado pedigrí, que nos permita observar la proporción de gametos recombinantes y poder estimar la frecuencia de recombinación.

La distancia obtenida mediante la frecuencia de recombinación, tiene un carácter de tipo orientativo ya que los dobles recombinantes no son detectados y además la frecuencia de recombinación en el caso de las hembras suele ser mayor que en los machos. Así mismo, los centrómeros poseen menor grado de recombinación que los telómeros. Sin embargo los mapas de ligamiento continúan siendo de gran ayuda para la ubicación relativa de los marcadores moleculares en el mapa genómico porcino y una herramienta básica para estudios de asociación y búsqueda de QTLs.

I.5.3.1. Marcadores genéticos.

Un marcador molecular se define como una región del genoma, generalmente de posición conocida, que presenta polimorfismo (Kinghorn y van der Werf, 2000). 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. El polimorfismo de los marcadores afecta el tamaño de la muestra requerida para el mapeo de QTLs y el número de marcadores requeridos para las pruebas de paternidad. Por consiguiente, el polimorfismo de un marcador es un importante criterio de selección en el momento de elegir un marcador genético (Da y col., 1999). Para la realización de los mapas genéticos se cuenta con dos tipos de marcadores. Los de tipo I, que corresponden a genes que tienen una función definida y una secuencia nucleotídica conservada entre las distintas especies de mamíferos. Los marcadores tipo II, corresponden a secuencias anónimas de ADN generalmente de tipo microsatélite y no están conservados entre especies (Haley y Archibald, 1998). Los marcadores de tipo III comprenden aquellos que están posicionados en el mapa tanto física como genéticamente (Ellegren y col., 1994).

El índice polimórfico de un marcador genético, difiere entre las poblaciones debido a que poseen frecuencias alélicas diferentes. Por tal motivo a la hora de iniciar un estudio de asociación es necesario evaluar el polimorfismo de cada marcador en la población objeto de estudio. Existen varios métodos para evaluar el polimorfismo. Uno de los más utilizados es el índice de contenido de información polimórfica (*PIC*) (Botstein y col., 1980) que evalúa la informatividad de un marcador de acuerdo a sus frecuencias alélicas, de tal forma que al obtener la información de los alelos presentes en cada uno de los parentales de una población estructurada adecuadamente, se puede identificar de donde provienen los alelos que están segregando en la siguiente generación. La heterocigosidad del marcador está estrechamente relacionada con el *PIC* y su valor oscila entre 0 y 1. Existe otro método para estimar el grado de polimorfismo genético que es el índice de informatividad establecido por Ron y col., (1995) el cual fue aplicado en ganado lechero y permite estimar la informatividad del marcador en la descendencia partiendo de la comparación de las frecuencias alélicas en las dos poblaciones parentales.

Los distintos marcadores genéticos se han clasificado de acuerdo al método de detección de polimorfismos.

I.5.3.2. Polimorfismos de proteínas.

Son polimorfismos detectados mediante electroforesis de proteínas. Un cambio de un aminoácido en el polipéptido producido durante la traducción, puede afectar a la carga neta resultante de la proteína, o cambiar ligeramente la estructura tridimensional del polipéptido plegado, causando con esto un polimorfismo que puede ser detectado mediante electroforesis en gel. Los niveles de polimorfismo son generalmente moderados, la mayor parte de tipo silencioso, los hay de dos tipos, los causados por mutación que cambian la carga eléctrica y la estructura tridimensional y los causados por deleción provocando un cambio en el peso molecular.

Otro tipo de polimorfismo proteico se basa en la diferencia de diversos determinantes antigénicos de proteínas. Utilizando como antígeno la proteína de una especie, la cual es inoculada en otra especie huésped (generalmente animales de laboratorio como: cobayos, hámster y conejos) para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos producidos son aislados y purificados, para luego ponerlos en contacto con otra proteína heteróloga de una especie distinta a la donadora del antígeno. Comparando el nivel de aglutinación de la especie homóloga con la heteróloga. La diferencia en las reacciones sirve para obtener una relación genética. Los grupos sanguíneos, y en el sistema de compatibilidad de antígenos celulares implicado en el transplante de tejidos, son ejemplos claros de la utilización de esta técnica en donde los polimorfismos son detectados mediante pruebas serológicas antígeno-anticuerpo. Estas técnicas en los 70's fueron utilizadas en porcinos para valorar el polimorfismo de las proteínas séricas (Willer y Neuffer, 1970).

I.5.3.3. *RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).*

Uno de los métodos para examinar la variación de secuencias de ADN consiste en la utilización de endonucleasas de restricción. El primer tipo de marcadores *RFLP* fue descrito por Botstein y col., (1980). Los *RFLP* son marcadores dialélicos y codominantes por lo que durante la lectura de los resultados podemos encontrar los 3 genotipos posibles. Las diferencias entre los fragmentos encontrados entre individuos

son debidas a un simple cambio nucleotídico que se sucede en una cadena de ADN, en un principio fueron utilizados sobre el genoma completo, actualmente se utilizan en fragmentos previamente amplificados mediante PCR (*PCR-RFLP*), mejorando la exactitud de la técnica. Existe un gran número de endonucleasas capaces de reconocer secuencias específicas (dianas R), provocando una ruptura en la cadena de ADN dando lugar a un patrón de restricción determinado. Dicho patrón puede ser detectado mediante electroforesis en geles de agarosa, p.e. los patrones de banda generados por Gerbens y col., (1997), en el gen *H-FABP* (*Heart Fatty Acid Binding Protein*) del cerdo y su asociación con el carácter grasa intramuscular. Otra forma de visualizar los patrones de banda es mediante la utilización de la técnica *southern blot*. Esta técnica consiste en transferir por capilaridad los fragmentos de restricción que se encuentran en el gel a una membrana absorbente, generalmente de nitrocelulosa o nylon. Posteriormente se coloca la membrana a hibridar con una sonda marcada que reconozca el fragmento por complementariedad. Una vez hibridada la sonda, puede ser visualizada mediante autorradiograma o técnicas no isotópicas (Ausubel y col., 1987).

1.5.3.4. *RAPDs* (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Los *RAPDs* son conocidos además como *AP-PCR* (*Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction*) (Ali y col., 1999). Son amplificaciones al azar de secuencias de ADN, utilizando un solo juego de cebadores cortos y de secuencia aleatoria. Las condiciones de PCR deben favorecer la amplificación inespecífica (Williams y col., 1990).

Si el cebador se une a una región específica de ADN desnaturalizado, en orientaciones opuestas y a una distancia menor de 5 kb durante la PCR se obtiene una amplificación de dicha región (Benter y col., 1995). El patrón de bandas obtenido puede variar de una muestra de genómico a otra implicando diferencias en la sección de ADN.

Generalmente se logra la amplificación de entre 1 y 10 bandas (Cushwa y Medrano, 1996). Los polimorfismos causados por la presencia o ausencia de bandas o variaciones en el tamaño de las amplificaciones pueden deberse a sustituciones nucleotídicas, inserciones, deleciones o inversiones en el ADN (Williams y col., 1990; Welsh y McClelland, 1990). El *RAPD* es un tipo de marcador genético dominante, ya que no diferencia heterocigotos de homocigotos.

Esta técnica tiene que ser optimizada adecuadamente para cada aplicación, ya que puede tener problemas de repetibilidad en los análisis (Ambady y col., 1996), Una vez

identificada la banda diagnóstica, esta puede ser clonada y secuenciada, diseñando un juego de cebadores específicos para su amplificación mediante PCR-SCAR, (*Sequence characterized amplified region*).

I.5.3.5. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Esta técnica descrita por Vos y col. (1995), consiste en la digestión del ADN con dos enzimas de digestión, una vez digerido se ligan en los extremos cohesivos de los fragmentos generados unos adaptadores de secuencia conocida, posteriormente mediante la utilización de cebadores de secuencia complementaria a los adaptadores y bases seleccionadas adicionales, se amplifican selectivamente los fragmentos deseados mediante PCR. Esta técnica genera un gran número de fragmentos en el gel de electroforesis, y la interpretación del genotipado se basa en la presencia o ausencia de cada una de las amplificaciones.

Se considera un marcador de tipo dominante y es menos informativo para análisis de ligamiento que los marcadores codominantes en donde ambos alelos pueden ser analizados. La ventaja de esta técnica es que se puede obtener muchos marcadores polimórficos de cualquier ADN y muchos genotipados en poco tiempo (Moran, 1998), siendo de utilidad para incrementar la densidad de los mapas genéticos (Otsen y col., 1996).

I.5.3.6. RDA (*Representational Difference Analysis*).

Este procedimiento inicialmente fue utilizado para analizar e identificar polimorfismos entre dos genómicos de células normales y cancerosas de un individuo (Lisitsyn y col., 1993). El principio de esta técnica consiste en digerir con dos enzimas de digestión el ADN de las células cancerosas, conocido en este caso como ADN prueba (*tester*). Al ADN *tester* se le agregan dos adaptadores específicos y de secuencia conocida que se unen a los dos extremos cohesivos previamente digeridos. Posteriormente se mezcla el ADN *tester* con una gran cantidad de ADN de células normales (*driver*) y se desnaturalizan mediante temperatura. Cuando se vuelve a renaturalizar la mezcla de ambos genómicos, hibridarán *driver:driver*, *tester:driver* y una pequeña proporción de *tester: tester*. Como paso siguiente se procede a efectuar una PCR con cebadores específicos para los adaptadores unidos al ADN *tester*. La amplificación o

amplificaciones que se presenten corresponderán a las regiones o diferencias existentes en el ADN *tester*, pero no en el driver. Posteriormente los fragmentos amplificados pueden ser identificados mediante su clonación y secuenciación.

Esta técnica tiene numerosas aplicaciones e incluye la clonación de sondas para la detección de lesiones genéticas en cáncer mediante *arrays* de librerías cDNA (Geng y col., 1998), además de la identificación de secuencias en el genoma de patógenos desconocidos y el rápido aislamiento de marcadores polimórficos ligados a caracteres sin el uso de mapas genéticos pre-existentes (Lisitsyn, 1995).

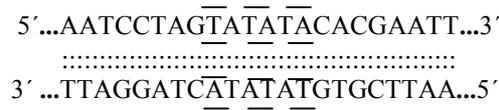
I.5.3.7. Microsatélites y minisatélites.

Las microsatélites y los minisatélites son repeticiones de nucleótidos en *tandem* en número variable, distribuidas por todo el genoma, son de naturaleza codominante, por lo cual se les considera unos excelentes marcadores moleculares. Conocidos además como *VNTR* (*Variable Number Tandem Repeats*), *SSLP* (*Strand short length polymorphisms*) y *STR* (*Short tandem repeats*).

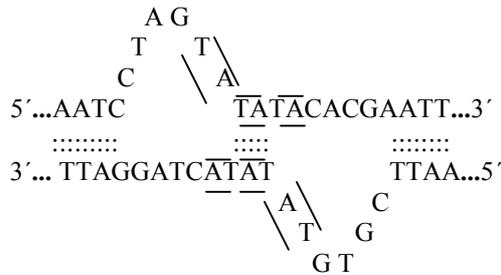
Los primeros minisatélites fueron descritos en humanos (Jeffreys y col., 1985), y posteriormente en cerdos (Coppieters y col., 1990) y otras especies. Son repeticiones en *tandem* entre 10 a 60 nucleótidos, siendo en número de repeticiones variables. Se encuentran dispersos a través del genoma, presentando un polimorfismo elevado, pero presentan algunos inconvenientes: uno de ellos es su gran tamaño, que dificulta la amplificación por PCR, y el otro es que tienen una localización preferencial en las regiones teloméricas de los cromosomas (Royle y col., 1988; Nakamura y col., 1988).

La existencia de microsatélites en eucariotas, concretamente en levaduras y vertebrados fue descrita inicialmente por Hamada y col., (1982). Los microsatélites son repeticiones en *tandem* de secuencias cortas de ADN entre 2 a 4 pares de bases, estas repeticiones han sido encontradas en numerosos organismos, son marcadores codominantes altamente polimórficos y se encuentran densa y altamente distribuidos a través de todo el genoma eucariota (Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Las bases repetidas en *tandem* pueden variar según los diferentes autores entre 2 a 8 pb (Chambers y MacAvoy, 2000). Los microsatélites presentan una tasa de mutación entre $1,10^{-3}$ y $1,10^{-5}$ mutaciones por gameto, (Edwards y col., 1992; Bowcock y col., 1994; Forbes y col., 1995). El origen de estas mutaciones no está muy claro, pero existen dos modelos, el primero debido a *strand-slippage* o *slipped-strand mispairing* (Levinson y Gutman, 1987; Schlotterer y

B. Complementariedad normal de ADN cromosomal intacto.



Slipped-strand mispairing:



Escisión / reparación de unidades repetidas **TA**

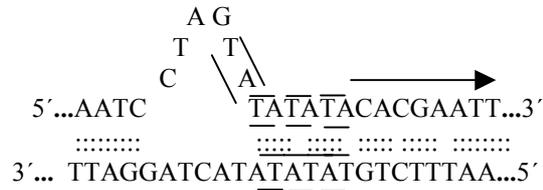


Figura **A** y **B** . Generación de duplicaciones o deleciones por *slipped-strand mispairing* entre repeticiones contiguas. La pequeña flecha indica la dirección y el punto de inicio de síntesis de DNA; dos puntos indican pares de bases. **A**, *slippage* durante la replicación de un ADN *duplex*, seguido por elongación continua. El *slippage* en la dirección 3' → 5' (lado izquierdo de la figura) resulta en una inserción de una unidad AT; *Slippage* en la otra dirección (derecha de la figura) resulta de deleción de una unidad repetida. La deleción mostrada en los resultados derechos de un par de unidades repetidas (asteriscos) para la 3' de la cadena creciente, presumiblemente por la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa. **B**. El mismo error ocurre en el ADN *duplex* intacto. Regiones *Mismatched* de bucles simples, son tal vez blanco de escisión y reparación. El resultado depende del lugar donde sean hechos los eventos de escisión / reparación: Escisión del bucle en la cadena superior, seguidas por reparación y síntesis usando la cadena inferior como molde, resulta en la adición de una unidad repetida AT (Levinson y Gutman, 1987).

Wintero y col. (1992), estiman que existen entre 65.000 a 100.000 microsatélites (CA)_n / (GT)_n en el genoma porcino, y estas repeticiones están más o menos uniformemente distribuidas a través de todos los cromosomas, y tienen menor representación en las regiones centroméricas y en regiones que contienen otras categorías de ADN repetido. La amplificación de los microsatélites se efectúa mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando cebadores específicos que son complementarios a regiones genómicas adyacentes a la región repetitiva. El producto de la amplificación puede valorarse mediante técnicas electroforéticas estándar. Actualmente se dispone de aparatos de electroforesis capilar automatizada, que cuentan hasta con 96 capilares, en los cuales se requiere que los cebadores sean marcados con compuestos fluorescentes para la correcta interpretación del número de pares de bases amplificados. Esta tecnología presenta la ventaja que permite analizar simultáneamente varios marcadores en una misma muestra, además de analizar un gran número de muestras en corto tiempo. Los microsatélites son utilizados ampliamente como marcadores genéticos, gracias a su gran polimorfismo y a la diferente distribución de frecuencias alélicas en diferentes razas y poblaciones. Actualmente se utilizan en análisis forenses, pruebas de paternidad, trabajos de biodiversidad, análisis filogenético, construcción de mapas genéticos o simplemente como marcadores para la detección de QTLs de importancia económica en la producción animal.

I.5.3.8. *SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism).*

La técnica para la detección de polimorfismos de ADN de cadena simple, mediante la electroforesis en gel descrita inicialmente por Orita y col., (1989_b), consiste en detectar los cambios de conformación que se producen en una cadena simple de ADN, debido a mutaciones nucleotídicas. Para detectarlos se procede a la amplificación por PCR del fragmento diana y su posterior desnaturalización. Dicho fragmento se compara con un fragmento equivalente de secuencia conocida, amplificado y desnaturalizado en las mismas condiciones. Los dos fragmentos son sometidos a electroforesis en un gel no desnaturalizante. La movilidad de los dos fragmentos será diferente en ambas muestras, debido a la conformación distinta que adoptan las cadenas de ADN en función de su secuencia de nucleótidos (Orita y col., 1989_a; Hayashi, 1991).

I.5.3.9. *DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).*

Esta técnica se basa en detectar mutaciones en el ADN, mediante geles sometidos a un gradiente de temperatura o de agentes desnaturalizantes. Los fragmentos son amplificados mediante PCR, y sometidos a electroforesis (fragmento normal y fragmento con mutación nucleotídica), la movilidad de los fragmentos será distinta si existen mutaciones nucleotídicas que afecten a la T_m del dímero formado (Fischer y Lerman, 1983).

I.5.3.10. *SNP (Single Nucleotide Polymorphism).*

Este polimorfismo puntual es causado por un simple cambio nucleotídico en la cadena de ADN. Son marcadores moleculares que se encuentran distribuidos ampliamente por todo el genoma, y generalmente son dialélicos (Brookes, 1999). Su frecuencia es muy elevada y se calcula que existe un *SNP* por cada 1000 pares de bases (Wang y col., 1998; Taillon-Miller y col., 1998). Su distribución es abundante tanto en regiones codificantes como no codificantes (Sachidanandam y col., 2001). Los *SNPs* localizados en regiones no codificantes, o en regiones codificantes que no den lugar a un cambio de aminoácido, pueden ser usados como marcadores para la detección de QTLs mediante ligamiento. En cambio los *SNPs* localizados en regiones codificantes que den lugar a cambios de aminoácidos no conservativos, pueden afectar directamente la estructura y función de las proteínas resultantes. Por ello, son los más importantes desde un punto de vista biológico. La mayoría de los métodos mencionados anteriormente pueden aplicarse a la detección de *SNPs*. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías permite el análisis preciso de un gran número de muestras en corto tiempo.

La técnica más sensible para localizar este tipo de polimorfismos consiste en secuenciación de productos de PCR generados a partir de diferentes individuos. Dicha información proporciona la localización precisa y naturaleza del *SNP*. Una vez localizado el *SNP* se puede utilizar la técnica de *Primer Extension Analysis* para el análisis de grandes grupos de muestras, la técnica esta basada en el diseño de cebadores específicos de la región adyacente al cambio nucleotídico. Se realiza una reacción de extensión con dideoxynucleotidos (*ddNTPs*) marcados con diferentes fluorescencias. Dependiendo de la mutación existente en la cadena molde se incorporará un *ddNTP* u otro. P.e. Si en la cadena la mutación contiene una sustitución de A (Alelo 1) por G

(Alelo 2), en la cadena en extensión se añadirá el *ddNTP* T* para el alelo 1 y C* para el alelo 2.

Para la lectura de los resultados se requiere de un secuenciador automatizado, ya que los distintos alelos se diferencian de acuerdo a su fluorescencia.

La técnica *Denaturing High-Performance Liquid Chromotography (DHPLC)*, también es empleada para la detección de mutaciones puntuales. Consiste en la digestión con una endonucleasa de restricción del ADN de las muestras control y problema, los fragmentos producidos se someten a condiciones desnaturalizantes y renaturalizantes, al renaturalizarse se formarán homoduplex y heteroduplex, aquellos heteroduplex que posean algún cambio nucleotídico serán detectados por cromatografía (Huber y Berti, 1996).

Otro sistema que permite el análisis de un gran número de muestras es desarrollado por *Pyrosequencing*, la técnica de pirosecuenciación se basa en la emisión de luz que se produce en una secuenciación a tiempo real, cuando un nucleótido concreto se une a la cadena en extensión durante la secuenciación, la luciferina se transforma en oxiluciferina por acción de la luciferasa en colaboración con el ATP, (Ronagui y col., 1998).

Recientemente se ha desarrollado la técnica *MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Time Of Flight)*, esta técnica de espectrometría de masas mide directamente el peso de las moléculas, para lograrlos primero se transforman las biomoléculas en estado gaseoso y son irradiadas con luz ultravioleta ionizando algunos de los ácidos nucleicos, posteriormente son sometidos a un campo eléctrico que proyecta las moléculas contra un espejo iónico, el cual invierte su dirección y es detectada por un sensor (Andersen y Mann, 2000).

Los *Microarrays* o Microchips de ADN, es un nuevo método automatizado para analizar en forma masiva miles de polimorfismos o patrones de expresión simultáneamente. El principio de esta técnica consiste en fijar en un soporte miniatura *In Silico* miles de fragmentos conocidos de ADN o de oligonucleótidos, que posteriormente son hibridados con ADN genómico o complementario marcado fluorescentemente. La interpretación de los resultados se realiza mediante programas informáticos específicos. Esta técnica permite el análisis de fragmentos de ADN y la monitorización de la expresión de genes en diversos tejidos mediante la utilización de cDNAs (Scheda y col., 1998).

I.6. 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 porcino, es necesario contar con información genealógica de dos o tres generaciones. Para detectar el desequilibrio de ligamiento y obtener una mayor informatividad, se pueden realizar cruzamientos de razas divergentes con fondo genético distinto, que hayan sido previamente seleccionadas basándose en sus características fenotípicas. Generalmente se asume que los alelos en los 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, está se puede cruzar con alguno de sus parentales (retrocruzamiento o *backcross*) o efectuar cruzamientos entre los mismos animales F_1 (entrecruzamiento o *intercross*). Un retrocruzamiento es preferible para mapeo de loci 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 y col., 1988).

I.7. 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 constantes innovaciones 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 los caracteres fenotípicos con la información de marcadores individuales, y el *CRIMAP* (Green y col., 1990), 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*.

1.7.1. *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., University of Leicester, Leicester, U.K., State University of Ghent, Merelbeke, Belgium., The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark., National Institute of Animal Science, Foulum, Denmark., Universität 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 LargeWhite. El grupo Sueco participó con un pedigrí producto del cruzamiento inicial de jabalí con hembras producto del cruce de LargeWhite 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 fiabilidad a los resultados. Los datos genotípicos de los laboratorios participantes 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 el cromosoma X. Como en otras especies, el mapa genético del macho, fue significativamente más corto (~16.5 Morgans) que el mapa genético de la hembra (~ 21.5 Morgans). El mapa *sex-average* genético del cerdo fue estimado en ~18 Morgans de longitud (Archibald y col., 1995). Actualmente el proyecto *PiGMAP* involucra 18 laboratorios Europeos y un total de 7 laboratorios de *U.S.*, Japón y Australia.

I.7.2. Mapa Nórdico.

El mapa Nórdico de ligamiento del genoma porcino, construido por laboratorios de Copenhague, Uppsala y Oslo, fue elaborado a partir de un cruce de razas divergentes, que incluía, 2 jabalís y 8 hembras LargeWhite X Yorkshire Sueco, 26 F₁ y 200 F₂. El desarrollo de este mapa se inició mediante el genotipado de los animales con 105 marcadores polimórficos genéticos, incluyendo entre estos 68 microsatélites y 47 marcadores físicos, que cubrían una longitud del genoma de 1800 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 11 cM. Para el procesamiento de los datos fue utilizado el paquete informático *LINKAGE*, y se logró el posicionamiento de 54 nuevos marcadores. La frecuencia de recombinación en hembras fue significativamente mayor que en los machos, obteniendo una distancia de mapa de 1130 cM (Ellegren y col., 1994_b). Posteriormente se incrementó el genotipado con marcadores provenientes del *USDA-MARC* y del *PiGMaP*, hasta completar 236 marcadores posicionados en el mapa, 89 de los cuales son de tipo I y 72 que habían sido previamente posicionados en el mapa por métodos físicos. Para la obtención de los resultados se utilizaron análisis de dos puntos y multipuntos, mediante el programa *CRIMAP* versión 2.4. De nuevo la tendencia general fue hacia un alto rango de recombinación en hembras y el total de distancia de mapa fue estimado en 2526 cM en hembras y 1830 cM en machos, longitud de mapa *sex-average* de ~2300 cM, incluyendo el cromosoma X (Marklund y col., 1996).

I.7.3. *USDA-MARC*.

Este mapa desarrollado por el USDA (*Meat Animal Research Center at Clay Center, Nebraska, USA*), está integrado principalmente por marcadores moleculares microsatélites. El pedigrí consta de dos generaciones obtenidas mediante retrocruzamiento. Las razas involucradas en este estudio comprenden Duroc, híbridos comerciales y tres razas chinas, entre las que se encuentra la Meishan. El primer mapa desarrollado por el *USDA-MARC* fue integrado por 366 microsatélites y 15 marcadores tipo I, en donde el promedio de intervalo entre marcadores fue de 5-10 cM (Rohrer y col., 1994). El segundo mapa incrementó la densidad de marcadores ya que estaba compuesto de 1042 loci agrupados en 19 grupos de ligamiento correspondientes a los 18 autosomas y el cromosoma sexual X. La frecuencia de recombinación en este mapa

fue mayor en los brazos cortos, que en los brazos largos de los cromosomas. Igualmente fue superior en las regiones cromosómicas teloméricas que en las pericéntricas. (Rohrer y col., 1996).

En los últimos años los mapas físicos y de ligamiento del genoma porcino se han desarrollado considerablemente. El mapa de ligamiento contiene alrededor de 2556 loci (<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/>) de los cuales 916 son genes estructurales. Con el incremento de un mayor número de marcadores moleculares de ligamiento, además de los físicos, se obtendrá un mapa de mayor densidad en corto tiempo. En este sentido serán particularmente útiles los paneles de células híbridas somáticas, todo ello permitirá refinar la posición en el mapa de QTLs, facilitando el análisis de genes candidatos y mutaciones puntuales que influyan directamente sobre los caracteres productivos porcinos (Rothschild, 2000).

I.8. Detección y localización de QTLs.

Un QTL (*Quantitative trait loci*) es considerado como una región genómica en la que se encuentra uno o varios genes con un efecto significativo sobre un carácter cuantitativo. La mayoría de los caracteres productivos presentan variación continua y están controlados por varios genes con un efecto pequeño, pero acumulativo sobre el carácter. Existen genes para algunos caracteres, que explican un elevado porcentaje de la variación fenotípica, y el resto de la variabilidad del carácter es causada por numerosos genes con efecto pequeño, además del efecto ambiental (Lande, 1981).

La localización de QTLs, se efectúa mediante el estudio genético de la segregación de alelos polimórficos de marcadores moleculares. Para ello es muy importante la utilización de los mapas físicos y genéticos existentes, y la presencia de un adecuado diseño estadístico aplicado a una población porcina estructurada, donde previamente se hayan medido los valores fenotípicos para los caracteres de interés. Cuanto mayor sea el número de marcadores polimórficos, distribuidos a través del genoma en los parentales, así como mayor sea el número poblacional bajo estudio, es decir, un número elevado de descendientes por progenitor, mayor será la posibilidad de detectar desequilibrio de ligamiento entre algún marcador y el posible QTL (Soller y Genizi, 1978). Analizando la segregación de los marcadores genéticos en estos pedigríes, se pueden identificar las asociaciones de determinados loci y caracteres cuantitativos de interés.

La detección de genes con efectos cuantitativos en los animales domésticos, data de los años cincuenta (Neimann-Sorensen y Robertson, 1961). La localización de estos genes se efectuaba mediante polimorfismos bioquímicos, pero debido al escaso número de marcadores disponibles y a la elección aleatoria de los individuos, los resultados no eran muy satisfactorios. Gracias al incremento de marcadores polimorficos moleculares en el mapa genético, así como la adecuación y desarrollo constante de programas estadísticos y diseños experimentales, se ha logrado optimizar sensiblemente la localización de QTLs.

I.8.1. Métodos estadísticos para la detección de QTLs.

I.8.1.1. Aproximación con un solo marcador.

La asociación entre un carácter cuantitativo y un marcador genético puede evaluarse utilizando un solo marcador o múltiples marcadores. La aproximación de un solo marcador, detecta la existencia de desequilibrio de ligamiento del QTL con respecto al marcador dialélico. Esta detección se realiza comparando los valores fenotípicos del carácter con cada una de las clases genotípicas del marcador. Las diferencias de las medias, posteriormente son analizadas para detectar el efecto fenotípico de los alelos. Este tipo de análisis requiere de un número elevado de animales, y mediante el análisis individual de los marcadores, no se define la posición relativa del QTL con respecto al marcador. Además, el análisis de un solo marcador tiene un poder menor cuanto más alejado se encuentre el QTL del marcador.

Si dos (o más) marcadores se usan conjuntamente en un análisis, se evita la confusión entre la posición y tamaño de efecto del QTL, y hay mayor poder de detección del QTL, aun cuando los marcadores estén algo más alejados. Por lo tanto el mapeo de QTLs requiere el uso de genotipos de múltiples marcadores en el análisis.

I.8.1.2. *Interval Mapping*.

Lander y Botstein (1989), proponen el modelo de mapeo de intervalos para la detección de QTLs. El término "*Interval mapping*" es utilizado para estimar la posición de un QTL entre dos marcadores, conocido además como "*marker-bracket*". La presencia o ausencia de QTL se detecta mediante la diferencia fenotípica entre las clases genotípicas

de los marcadores que flanquean el supuesto QTL. El análisis estadístico se desarrolla mediante el método de máxima verosimilitud. Este método proporciona información sobre la posición del QTL y calcula la estima de su efecto. Sin embargo requiere de cruces de líneas consanguíneas, y que se encuentren en homocigosis para todos los loci, de forma que sean informativos en las siguientes generaciones.

1.8.1.3. Método de regresión con múltiples marcadores y mínimos cuadrados.

Este método fue desarrollado por Haley y col., (1994) para la detección de QTLs aplicando el método de mínimos cuadrados. Es más rápido que el método de máxima verosimilitud, y en muchos casos, es muy similar. La ventaja del método de mínimos cuadrados, respecto al de máxima verosimilitud, radica en que el método de mínimos cuadrados no requiere cálculos tan complejos ni sistemas computacionales tan potentes, por lo tanto, permite complicar el modelo añadiendo efectos fijos, interacciones entre QTLs, etcétera, con lo que se reducen los sesgos y se incrementa la potencia de detección de QTLs (Haley y Knott., 1994). Este método, puede ser aplicado en animales domésticos en los cuales no se dispone de líneas consanguíneas, pero si de poblaciones divergentes, las cuales pueden ser cruzadas. El modelo asume que para cada QTL existen alelos alternativos fijados en cada población. El genotipo del QTL se calcula en cada cM, condicionado al genotipo de los marcadores informativos que flanquean al QTL. Este modelo contrasta la posibilidad de que exista QTL, con la de que no exista QTL en cada cM, utilizando un *test* F clásico.

1.8.1.4 Factor Bayes para detección de QTLs.

El análisis Bayesiano ofrece un atractivo modo de probar modelos alternativos de presencia de QTL vs no-QTL. El procedimiento está basado en una reparametrización de un modelo de componentes de varianza en términos de correlación intra-clases. El Factor de Bayes se calcula a partir del rendimiento de un esquema *Markov Chain Monte Carlo* promediando las densidades condicionales a la correlación nula intra-clase. Para su desarrollo se efectúa la comparación del modelo con QTL vs no-QTL. Este modelo utiliza la informatividad que proporcionan los marcadores de ambos progenitores de la población. Como resultado el modelo solo permite conocer la probabilidad de presencia o ausencia de QTL por región cromosómica analizada (Varona y col., 2001).

I.9. QTLs detectados en porcinos.

La mayoría de los estudios realizados para la detección de QTLs asociados a caracteres cuantitativos de importancia económica en la industria productora porcina, se han desarrollado mediante la utilización de cruces de razas divergentes. Asumiendo en principio, que los caracteres fenotípicos en razas divergentes están regidos por alelos alternativos. El desarrollo de estos estudios, generalmente se ha efectuado posicionando marcadores sobre el genoma completo, a una distancia aproximada de 20 cM, logrando obtener la suficiente potencia estadística para la detección de QTLs. Además los diseños estadísticos se están actualizando constantemente, permitiendo valorar los aspectos que pueden sesgar la detección de estas regiones genómicas (Rothschild, 2000).

I.9.1. QTLs asociados a caracteres de calidad de la canal.

El primer análisis de QTL en porcinos, fue realizado por Andersson y col., (1994). Mediante un análisis de segregación de marcadores moleculares, en tres generaciones producto de un cruce experimental de jabalís y Large White, fue localizado un QTL en el cromosoma 4, que explica el 18% de la varianza fenotípica para el promedio de grasa dorsal y grasa abdominal. Además se localizó un QTL en el cromosoma 13 que explica del 7 al 12 % de la variación fenotípica del crecimiento. Resultados similares del efecto del QTL localizado en el cromosoma 4 fueron observados en estudios posteriores por Marklund y col., (1996 y 1999) y en estudios realizados en cruces con cerdos de razas chinas (Wang y col., 1997; Wang y col., 1998; Milan y col., 1998; Walling y col., 1998). Debido a la consistencia de los resultados obtenidos, Marklund y col. (1999) decidieron llamarlo *FAT-1*.

Otro QTL para caracteres de canal y desarrollo, es el *PIT-1*, localizado en el centro del cromosoma 13 (Andersson y col., 1994). Mediante estudios de segregación de alelos del QTL *PIT-1* en diversos cruces de líneas Americanas y cerdos Chinos, se encontró asociación para los caracteres de peso del nacimiento a los 30 kg y para espesor de grasa dorsal (Yu y col., 1995). Posteriormente Yu y col., (1999), confirmaron en un cruce de cerdos Meishan con Americanos, asociación significativa del QTL *PIT-1* con los caracteres de promedio de ganancia de peso diaria y espesor de grasa dorsal. Knott y col. (1998), mediante un cruce de jabalí con cerdos Large White, describen un QTL asociado a espesor de grasa dorsal y otro para grasa abdominal en el cromosoma 4, que

probablemente se trate de un solo QTL con efectos pleiotropicos, ya que la distancia que los separa es de tan solo 4 cM, además en ese mismo cromosoma describen un QTL que afecta el rango de peso a los 70 kg. En ese mismo estudio es descrito un QTL que afecta el rango de crecimiento a los 30 kg en el cromosoma 13 y otro en el cromosoma 10 que afecta el rango de crecimiento de 30 a 70 kg. Paszek y col., (1999) describen un QTL en la región telomérica 1q del cromosoma 1 que afecta el crecimiento a las 18 semanas, este QTL fue confirmado por Rohrer, (2000) en un *backcross* Meishan-Large White.

El complejo mayor de histocompatibilidad, localizado en la región comprendida en el cromosoma 7 porcino (SSC 7 p1.1-q1.2), ha sido asociado con caracteres de crecimiento. Mediante el análisis de segregación de polimorfismos de restricción de la región *MHC* en las razas Duroc y Hampshire, Jung y col.,(1989), asocian esta región un QTL que influye sobre caracteres de crecimiento y grasa dorsal. Posteriormente este resultado fue confirmado en los cruces de cerdos chinos con líneas americanas, en la región comprendida entre el marcador TNF-A y S0102 (Rothschild y col., 1995; Bidanel y col., 1996; Wang y col., 1998). Bidanel y col., (2001) también describen la existencia de este QTL en el cromosoma 7, en un estudio realizado en cruces de cerdos Meishan con Large White, en la región comprendida entre el marcador tipo *RFLP SLA* y el microsatélite S0102.

Otras regiones cromosómicas han presentado evidencia de albergar QTLs como es el caso del QTL localizado en la región donde mapea el gen *RYS1* del cromosoma 6 (Geldermann y col., 1996), afectando a diferentes caracteres de conformación de canal, calidad de carne y engrasamiento entre otros. Varios QTL con efecto sobre espesor de grasa dorsal fueron localizado en los cromosomas 1, 7 y X, (Rohrer y Keele,1998a). Para crecimiento temprano en el cromosoma 1, 2, 12, y X. Y para engrasamiento a diferentes edades en los cromosomas 1, 2, 7, 8, 9, 12 y X (Rohrer, 2000). QTLs con efecto sobre el área del lomo y otras piezas del despiece en el cromosoma 1 y X (Rohrer y Keele, 1998b). Para caracteres de ganancia de peso post-destete en cromosoma 3 (Casas-Carrillo, 1997a). La región cercana al *IGF-1* en el cromosoma 5, muestra efectos significativos para promedio de ganancia de peso diario (Casas-Carrillo y col. 1997b). Otro marcador asociado a ganancia de peso diario es el presentado por el marcador PCR-*RFLP* del gen *heart fatty acid-binding protein (H-FABP)* localizado en el cromosoma 6 (Gerbens y col. 1996). Para varios caracteres como son peso del jamón y rangos de peso de 30 a 70 kg en cromosoma 4 , 6 y 13 (Kuryl y col., 1996). En otro

estudio realizado por Andersson-Eklund y col., (1998) fue localizado un QTL para longitud de canal en cromosoma 8. Bidanel y col., (2001) publicaron recientemente la detección de QTLs para grasa y crecimiento en los cromosomas 1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 y X. Otro QTL descrito recientemente en el cromosoma 1, esta asociado al crecimiento y funciones reproductivas (Smith y col. 2001). Un QTL que influye sobre la deposición de grasa intramuscular fue detectado en un cruce de Ibérico (Guadyerbas) con Landrace en el cromosoma 6, siendo ambas poblaciones progenitoras halotano negativas (Óvilo y col., (2000), posteriormente en un cruce similar se localizó la presencia de QTLs que influyen sobre el pH a las 24 horas post-mortem en el cromosoma 3, pigmentos hemáticos en cromosomas 4 y 7 y medidas del color L* Minolta en los cromosomas 4 y 7 (Óvilo y col., 2000b). Además de las mencionadas, muchas otras regiones cromosómicas han sido asociadas con caracteres de calidad de canal, pero los QTLs descritos anteriormente son los más estudiados y los más relevantes hasta el momento.

I.9.2. QTLs asociados a caracteres de calidad de la carne.

Son pocos los QTLs que hasta el momento han sido detectados en relación con la calidad de carne. Uno de los primeros análisis realizados detectó dos QTLs, uno en el cromosoma 4 y otro en el 7, ambos con efecto sobre firmeza y color de la carne (Rothschild y col., 1995). Posteriormente fue confirmado el QTL localizado en el cromosoma 7, incluyendo otros factores asociados a caracteres de calidad de carne (Wang y col., 1998; Moser y col., 1998). Andersson-Eklund y col., (1996), describen un QTL en cromosoma 2 y otro en cromosoma 12 con efecto sobre pH, capacidad de retención de agua y pigmentación del músculo. Para el número de fibras musculares, fue localizado un QTL en el cromosoma 3 en un estudio realizado en un cruce de cerdos Meishan (Bidanel y col., 1998), y otro en el cromosoma 7 con efectos sobre los niveles de androstenona la cual infiere sobre el color de la carne (Bidanel y col., 1996). Tres QTL con efecto en deposición de grasa intramuscular fueron detectados en los cromosomas 2, 4 y 6 (De Koning y col., 1999). Estudios realizados por Óvilo y col., (2000) confirman el QTL para grasa intramuscular localizado en el cromosoma 6. Óvilo y col., (2000b) describen la presencia de QTL que influye sobre la grasa intramuscular en el cromosoma 6, pH 24 h en cromosoma 3, y para pigmentos hemáticos en cromosoma 4 y 6, y para el color muscular en los cromosomas 4, 7 y 8.

Otros genes involucrados en la calidad de carne son el gen *RYR1*, *H-FABP*, *LEPR* descritos anteriormente. Otros marcadores basados en la aproximación de genes candidatos incluyen la miogenina que afecta al incremento del número de fibras musculares (Soumillion y col. 1997). El gen *obese* (OB) localizado en el cromosoma 18, donde su proteína, la leptina, influye en la regulación del peso corporal, acumulo de grasa y regulación de la ingesta (Neuenschwander y col., 1996). El gen receptor *melanocortin-4 protein (MC4R)* localizado en el cromosoma 1, que influye en la regulación del balance energético. Otro marcador generado, basado en la aproximación de genes candidato es el denominado gen *KIT* para la capa blanca, localizado en el cromosoma 8q12 (Johansson-Moller y col., 1996).

Aún con los logros obtenidos hasta el momento en la detección de QTLs y análisis de genes candidato para caracteres productivos en cruces experimentales, estos avances no son satisfactorios para la industria productora porcina comercial. Existen varios factores que influyen al respecto. La variabilidad genética se reduce considerablemente en las líneas comerciales seleccionadas. Esto provoca que las diferencias fenotípicas en los caracteres de importancia económica, difieran poco entre los distintos animales que han sido seleccionados para algún carácter como puede ser magro. Además, la localización de QTLs para determinados caracteres en estudios de razas divergentes, no necesariamente pueden encontrarse segregando en poblaciones comerciales o en otras poblaciones experimentales. La segregación de QTLs en poblaciones comerciales estaba por demostrarse en el momento de iniciarse este trabajo, siendo uno de los objetivos del presente estudio. De forma paralela a la búsqueda de QTL, actualmente se investigan genes candidatos que expliquen parte de la varianza fenotípica de los caracteres productivos analizados hasta el momento. Una estrategia para la localización y caracterización de genes candidatos para caracteres complejos, puede ser desarrollada mediante el estudio de segregación de alelos de múltiples marcadores moleculares posicionados a lo largo del genoma en el cruce de dos razas que difieran en algún carácter. Una vez localizado el QTL el siguiente paso es el mapeo fino de regiones QTL en cuestión (Fisler y Warden, 1997). Una vez localizada la subregión cromosomal se procede a la búsqueda de genes candidatos. Mediante la utilización comparativa de los mapas genéticos, humanos y animales actualmente disponibles, es posible el diseño de cebadores que nos permitan amplificar el gen y posicionarlo en el mapa. Posteriormente, mediante *PCR-RFLP* o a través de la búsqueda de mutaciones puntuales mediante la secuenciación, se puede efectuar un estudio de asociación.

I.10. *Imprinting*.

El proceso de *imprinting* inhibe la transcripción de determinados alelos en función del origen paterno o materno de los mismos. El *imprinting* se inicia en los gametos, en los que el alelo materno o paterno de un gen concreto, se inactiva por metilación de su región promotora. Este hecho implica que se exprese solo uno de los alelos ya sea el materno o el paterno. Cuando en un estudio de segregación se observa la expresión de un solo alelo se dice que éste está bajo *imprinting*.

Esta misma situación ha sido descrita en algunos estudios de detección de QTLs, en los que es posible que alguno de los genes implicados presente metilación en su región promotora. Uno de los primeros estudios de expresión de QTLs en porcinos, bajo influencia de *imprinting* es el descrito en el locus *IGF-2*, donde el alelo paterno es expresado bajo *imprinting* (Jeon y col., 1999; Nezer y col., 1999). De Koning y col. (2000), describen *imprinting* para varios caracteres que afectan la calidad de la carne, en un cruce de cerdos Chinos y Holandés. En el cromosoma 2, un alelo paterno se expresa bajo *imprinting* para el carácter de espesor de grasa dorsal. Para masa muscular un alelo materno se expresa bajo *imprinting* en cromosoma 7. Para el carácter de grasa intramuscular un alelo materno se expresa bajo *imprinting* en el brazo corto del cromosoma 6 y un alelo paterno se expresa bajo *imprinting* en el brazo largo para el mismo carácter. Rattink y col., (2000) en un cruce de porcinos Meishan con Large White-Landrace, localizan la expresión de un alelo paterno bajo *imprinting* en el cromosoma 2 para espesor de grasa dorsal.

I.11. Alelos nulos y homoplasia.

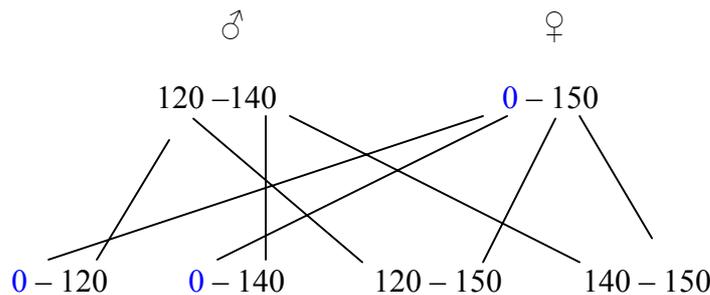
Existen dos factores principales que pueden causar errores de genotipado durante la lectura de segregación de microsatélites, disminuyendo la utilidad de los mismos. Los dos factores principales son los alelos nulos y la homoplasia.

I.11.1. Alelos nulos.

La presencia de alelos nulos representa la mayor limitación de los marcadores microsatélites para estudios genéticos en poblaciones. Se considera un alelo nulo cuando uno de sus alelos no amplifica, debido, principalmente a la existencia de una

mutación (substitución, inserción o deleción de nucleótidos) en el punto de hibridación del cebador (Callen y col., 1993). Esta mutación regularmente se localiza en la porción 3' de hibridación del cebador, evitando la amplificación del alelo microsatélite.

La existencia de alelos nulos es difícil de detectar cuando su frecuencia es baja (Lehmann, 1996). En el caso de estudios de segregación, donde es analizado un gran número de animales provenientes de un mismo padre, la sospecha de presencia de alelo nulo, apunta a un progenitor homocigoto, en este caso la madre, ya que la selección de los marcadores en este tipo de estudios se realiza considerando la informatividad, principalmente en padres, debido al elevado número de marcadores utilizados. P.e. Al genotipar uno de los microsatélites en el macho, este resulta heterocigoto y obtenemos una amplificación de dos fragmentos de 120 y 140 pb, y de la hembra (una supuesta homocigota) un solo fragmento de 150 pb. La detección del alelo nulo se realizaría cuando observamos en la descendencia sólo uno de los alelos provenientes del macho, como puede observarse a continuación.



La existencia de alelos nulos detectados en los estudios de segregación se soluciona sustituyéndolo por otro microsatélite que se encuentre en la misma región o mediante el diseño de cebadores alternativos fuera del sitio de la mutación que permitan la amplificación del microsatélite portador de la mutación, y el posterior análisis de los individuos clasificados como homocigotos.

Para corroborar la existencia de la mutación, es necesario el diseño de cebadores adicionales que amplifiquen una región un poco mayor, que incluya el microsatélite, y posteriormente clonarlo y secuenciarlo, o directamente secuenciando el producto de PCR.

I.11.2. Homoplasia.

La homoplasia es el hecho de que dos alelos amplifiquen el mismo número de bases y sin embargo presenten diferencias en su estructura, causadas por inserciones o deleciones (Primmer y Ellegren, 1998). La única forma de percatarnos de estas diferencias es mediante la secuenciación de ambos fragmentos. La homoplasia de los microsatélites ha sido demostrada en primates (Blanquer-Maumont y Crouau-Roy, 1995) y humanos (Grimaldi y Crouau-Roy, 1997), se presenta con una frecuencia relativamente baja, por lo que, los microsatélites siguen siendo los marcadores moleculares de elección para este tipo de estudios.