

# **OBJETIVOS**

## II. Objetivos.

### II.1. Objetivo general.

Esta tesis se desarrolla bajo el marco del proyecto europeo PL 962243. El objetivo principal del proyecto consiste en identificar QTLs de importancia económica que afectan a caracteres de grasa y de desarrollo en la industria productora porcina comercial. QTLs que previamente han sido descritos en estudios experimentales mediante cruces de razas divergentes.

Para investigar si estas regiones candidatas con QTLs, se encuentran segregando en poblaciones comerciales se han analizado caracteres fenotípicos y el genotipo mediante marcadores moleculares microsatélites para diez cromosomas en diez poblaciones de raza pura tipo comercial, Hampshire, Meishan, Duroc, Pietrain, Landrace y Large White. Estas poblaciones animales pertenecen a núcleos productores de distintos países como Suecia, Inglaterra y España.

### II.2. Objetivos específicos del presente estudio.

El presente estudio tiene como objetivo principal identificar si se encuentran segregando QTLs de importancia económica, previamente descritos en cruces de razas divergentes, en poblaciones porcinas comerciales españolas de raza pura Pietrain y LargeWhite.

Un segundo objetivo lo constituye analizar la influencia de los genes candidatos *HFABP* (*Heart Fatty Acid Binding Protein*) y *LEPR* (receptor de leptina) sobre caracteres productivos de interés económico porcino.

Finalmente caracterizar y posicionar en el mapa genético un nuevo gen candidato para caracteres relacionados con la gluconeogénesis y la lipogénesis *PC* (piruvato carboxilasa).

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### III. Material y Métodos.

El presente trabajo de tesis se desarrolla bajo el marco del proyecto global titulado: Transferencia de la tecnología QTL para la industria productora porcina (Pig Q Tech) – proyecto de biotecnología PL 962243, de la Unión Europea en la que participan las siguientes instituciones: *Swedish University of Agricultural Sciences – SLU, Department of Animal Breeding and Genetics, Uppsala Sweden; Roslin Institute (Edinburgh) – Rio, División of Genetics and Biometry, Midlothian, United Kingdom; Pig Improvement Company – PIC, Oxfordshire, United Kingdom; Quality Genetics – QG, Abingdon, Sweden; Cooperativa Agrícola y Ganadera de Lleida – COPAGA, Departamento de Producción Porcina, Cataluña, España; Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries – IRTA, Área de Producción animal, Cataluña, España y la Universidad Autónoma de Barcelona – UAB, Unidad de Genética y Mejora del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos.*

España participa con el análisis de tres poblaciones comerciales de raza pura Pietrain, LargeWhite y Landrace, el presente trabajo hace referencia a dos de las poblaciones que comprenden este proyecto que son Pietrain y LargeWhite.

En el presente estudio participan dos diferentes instituciones Catalanas, donde cada una de ellas participa desarrollando diferentes tareas.

1.- El centro UdL-IRTA, Departamento de Producción Animal, Lleida, quienes en coordinación con la Cooperativa Agrícola y Ganadera (COPAGA) han proporcionado las genealogías de las familias porcinas, muestras de sangre y tejidos. Además son los responsables de los seguimientos fenotípicos en las granjas, medidas fenotípicas de calidad de la carne y de la canal, así como del total de los análisis estadísticos de los datos fenotípicos y genotípicos.

2.- La Unidad de Genética y Mejora del departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UAB, Bellaterra ha desarrollado el análisis genotípico de los animales analizados en el presente estudio.

### III.1. Material Animal.

Se analizaron los caracteres fenotípicos y el genotipo mediante marcadores moleculares microsatélites de 620 y 556 animales, provenientes de dos poblaciones comerciales de raza pura Pietrain y LargeWhite respectivamente, ambos procedentes del núcleo productor de pie de cría de la Cooperativa Agrícola y Ganadera de Lerida (COPAGA), Cataluña.

La raza Pietrain se cree que es originaria de Bélgica. El origen exacto es desconocido pero la raza local surgió durante el periodo difícil del mercado del porcino en 1950-51. La raza se hizo popular en su país natal y posteriormente se exportó a otros países, sobre todo Alemania. La raza es de tamaño mediano, color blanco con manchas negras no muy pigmentadas, orejas erectas, son de cuerpo más corto que la mayoría de las razas, los jamones son extremadamente musculados con una proporción mayor de carne magra.

La raza LargeWhite, originaria del condado de Yorkshire, Inglaterra, se caracteriza por su color blanco, cuerpo y piernas largos, orejas erectas y cara ligeramente cóncava.

Es una raza productora de grandes camadas, se adapta a variaciones de clima y es un excelente productor de tocino.

En el presente estudio se analizaron animales de dos generaciones diferentes  $F_0$  y  $F_1$ . La población Pietrain constituida por 5 machos, 66 hembras  $F_0$  y 549 descendientes  $F_1$  suma un total de 620 animales, mientras que la población LargeWhite constituida por 5 machos, 60 hembras  $F_0$  y 491 descendientes  $F_1$ , totaliza 556 porcinos, sumando entre ambas poblaciones un total de 1176 animales.

Las poblaciones Pietrain y LargeWhite fueron integradas por 66 y 60 familias respectivamente donde cada uno de los machos aporta un número de descendientes que oscila entre 81 y 165 para la población Pietrain y 74 y 116 para la población LargeWhite, como puede observarse a continuación.

	Macho 1	Macho 2	Macho 3	Macho 4	Macho 5
Pietrain	81	143	96	165	64
LargeWhite	74	128	97	76	116

En ambas poblaciones se han controlado los siguientes grupos de caracteres:

### III.1.2. Caracteres productivos valorados.

Los animales se controlaron en las propias granjas de origen. Durante el periodo de engorde los animales fueron alimentados *ad libitum* con un pienso comercial de 2.425 Kcal. de EN/kg con un contenido de 16% de proteína bruta, 6% de grasa bruta, 4% de fibra bruta, 0,9% de lisina y 0,3% de metionina. Las naves de cebo fueron distribuidas en 7 salas, cada una de ellas con capacidad para ubicar 100 animales distribuidos en 10 cochiqueras. Las normas generales de funcionamiento de las granjas, en cuanto a sistemas de alimentación, manejo y sanidad fueron similares a las de una explotación de selección normal. El periodo de engorde finalizó a una edad promedio, establecida en los 175 días de edad. En ese momento, se pesaron los animales (PV, en kg), y se midió el espesor de tocino dorsal (BF, en mm), mediante ultrasonido con el aparato RENCO<sup>®</sup> (equipo modo-A), a 4 centímetros en ambos lados de la línea media, a la altura de la última costilla.

### III.1.2. Transporte de los cerdos al matadero.

El transporte de los cerdos al matadero fue efectuado cuando los animales promediaron 175 días de edad, los animales fueron transportados en ayuno, el ayuno fue de un máximo de 18 horas. Se transportaron en lotes de animales del mismo grupo para evitar agresiones entre ellos, el tiempo máximo de transporte fue de dos horas, al llegar al matadero tuvieron un tiempo de espera inferior a dos o tres horas con libre acceso al agua de bebida.

Durante el embarque en la granja, transporte, desembarque en el matadero y tiempo de espera al sacrificio, el manejo de los cerdos fue efectuado procurando evitar al máximo las situaciones de estrés.

### III.1.3. Caracteres de la canal.

Los cerdos fueron sacrificados a los 175 días de edad en promedio, en un matadero comercial (COPORC). El peso vivo se registró 24 horas antes del sacrificio. El peso de la canal (PN, en kg.) aún caliente se utilizó para calcular el rendimiento y la proporción de piezas nobles. La profundidad de la grasa subcutánea (GFOM, en mm.) y el peso

obtenido con Fat-O-Meater (PFOM, en mm.) se midió a 6 cm. de la línea media entre la tercera y cuarta últimas costillas mediante el aparato SFK Fat-O-Meater. La longitud de la canal (en cm.) se midió desde el borde anterior de la sínfisis púbica hasta el borde anterior de la primera costilla. Después de permanecer la canal a 2° C durante 24 horas, las dos medias canales se despiezaron en piezas comerciales estandarizadas de acuerdo a los procedimientos utilizados en los mataderos españoles, y se registraron las siguientes variables:

Peso (en kg.) del jamón izquierdo (JamI) y derecho (JamD).

Peso (en kg.), sin las patas, de la paletilla izquierda (PalI) y derecha (PalD).

Peso (en kg.) del chuletero izquierdo (ChulI) y derecho (ChulD).

Peso (en kg.) de la panceta izquierda (PanI) y derecha (PanD).

Peso (en kg.) del costillar izquierdo (CostI) y derecho (CostD).

Profundidad (en mm) de la grasa subcutánea al nivel de la primera vértebra dorsal (G1)

Profundidad (en mm) de la grasa subcutánea al nivel de la primera vértebra lumbar (G2)

Una muestra de sangre de cada animal se utilizó para determinar su genotipo respecto del gen *RYS1*, siguiendo el método descrito por Sánchez y col. (1993).

#### III.1.4. Caracteres de la calidad de carne.

A 45 minutos y 24 horas *post mortem* se midió el pH (Scharlau, HI-9025) y la conductividad eléctrica (PQM, Giralda) de los músculos *longissimus dorsi* (pH45LD; pH24LD; C45LD; C24LD) y *semimembranoso* (pH45SM; pH24SM; C45SM; C24SM).

#### III.2. Análisis de microsatélites.

##### III.2.1. Extracción de ADN.

La extracción del ADN genómico de los animales Pietrain y LargeWhite se efectuó utilizando tres protocolos distintos en función del tipo de muestras procesadas. En el caso de sangre fresca no heparinizada, esta era conservada con anticoagulante EDTA o congelada a -20°C. El anticoagulante EDTA es superior para preservar ADN de alto peso molecular durante el almacenaje de sangre (Gustafson y col., 1987). Además se

disponía de tejidos como bazo y músculo estriado congelados en nitrógeno líquido durante la colección y transporte y almacenados posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La gran disponibilidad de sangre fresca permitió la utilización de un *kit* comercial (*Boehringer Mannheim DNA Isolation Kit Mammalian Blood cat.* No. 1 667 327), el cual fue modificado parcialmente. Partiendo de 3,75 ml de sangre se procedió a la separación de las células sanguíneas rojas y blancas vía lisis preferencial de las células rojas mediante lavados con TE (Tris-HCL pH 8.0 a 10 mM y EDTA 1mM), centrifugando a 10.000 g durante 12 minutos entre cada lavado y decantando las células rojas del sobrenadante, hasta obtener un *pellet* limpio de células blancas sanguíneas.

Posteriormente en presencia de un fuerte detergente aniónico fueron lisadas las células sanguíneas blancas durante una incubación en movimiento de 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

A continuación las proteínas fueron eliminadas por precipitación salina mediante centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, colectando el ADN que se encuentra en el líquido de la parte superior. En un tubo limpio y añadiendo dos volúmenes de etanol, mezclándolos cuidadosamente invirtiendo el tubo durante 20 a 30 ocasiones hasta hacer visible el ADN con forma de algodón. Posteriormente se centrifugó la muestra a 875 g por 10 minutos, decantando el sobrenadante. El *pellet* formado en el fondo del tubo fue lavado con etanol al 70 % y centrifugado en las mismas condiciones anteriores durante 8 minutos, después el *pellet* fue deshidratado e hidratado con TE buffer pH 8,0 e incubado a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas en movimiento para resuspender adecuadamente el ADN obtenido en TE.

En las muestras sanguíneas en las que se disponía de poca cantidad se procedió a utilizar el método fenol cloroformo. Consiste en colectar en un tubo de 1,5 ml, la cantidad de 300  $\mu\text{l}$  de sangre sin heparinizar preferentemente conservada en EDTA y lisar las células sanguíneas rojas por cambio de presión osmótica en presencia de 600  $\mu\text{l}$  de TE (Tris-HCL pH 8,0 a 10 mM y EDTA 1mM), efectuando los lavados necesarios hasta obtener un *pellet* blanco.

Posteriormente se procede a la lisis de las células sanguíneas blancas en presencia de un tampón de lisis K (KCL 50 mM, Tris HCL 10 mM, 0,5% Tween 20 y 1  $\mu\text{l}$  de una solución a 10 mg/ml de proteinasa K), que degrada las proteínas, mediante una incubación de 3 horas a  $56^{\circ}\text{C}$ . La precipitación de proteínas se realiza mediante solventes orgánicos fenol cloroformo: Alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, seguida de centrifugación y obtención del ADN del sobrenadante agregando 35,5  $\mu\text{l}$  de



NaCl al 2,25 molar en presencia de etanol y finalmente se efectúa un lavado con etanol al 70 % y se seca el *pellet* para ser hidratado con TE al pH 8,0.

En aquellos animales de los que solo se disponía de muestras de bazo o de tejido muscular estriado el procedimiento de extracción consistió en colocar una muestra de tejido (300mg) en presencia de un tampón de lisis (Tris HCL 50 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, SDS 2%) más 5 µl de una solución a 10 mg/ml de proteinasa K para degradar las estructuras celulares y nucleares del tejido mediante una incubación de 12 horas a 56 °C en agitación.

Después se depositan 500 µl del producto de la lisis en un tubo limpio y se siguen los mismos procedimientos para precipitación de proteínas mediante el método fenol cloroformo descrito anteriormente.

### III.2.2. Cuantificación de ADN.

La cuantificación del ADN se efectuó a partir de 1 µl de ADN genómico de las extracciones, mediante electroforesis en geles de agarosa colocados en cámaras de electroforesis en presencia de tampón TAE (0,04M Tris-acetato, 0,001 M EDTA) y corridas a un voltaje de 50 V durante 30 minutos con un marcador de cantidad a tres escalas de ADN del bacteriófago λ.

En muchos de los casos debido a la gran concentración existente de ADN, fue necesario utilizar una dilución 1/10 y proceder nuevamente a su valoración.

Para comprobar la fiabilidad de las concentraciones de las muestras de ADN valoradas en gel de electroforesis, se efectuó la cuantificación de 50 muestras al azar mediante un espectrofotómetro a 260 nm considerando que una unidad de absorbancia a esta longitud de onda corresponde a 50 µg de ADN, además se valoró a una longitud de 280 nm, para comprobar su pureza.

Todas las extracciones de ADN genómico fueron separadas en dos tipos de diluciones por muestra, en la primera el ADN a la concentración de extracción y en la segunda a una dilución de 30 ng/µl, ambas fueron almacenadas a -20 °C.

### III.2.3. Selección de los marcadores moleculares microsatélites.

La selección de los marcadores moleculares microsatélites fue realizada procurando detectar dos marcadores informativos como mínimo para cada región cromosómica estudiada en cada pedigrí comercial.

Las regiones QTL objeto de este estudio fueron elegidas a partir de los resultados previos obtenidos en diferentes cruces experimentales como se describe a continuación.

Regiones cromosómicas seleccionadas para genotipado en poblaciones comerciales			
SSC	Intervalo	QTL descrito	Referencia
1P	CGA-SW2185	Control	-
2	IGF2	QTL % carne magra y espesor de grasa dorsal en Jabalí x LW y LW x Pietrain	Nezer y col. 1999. Nat.Genet. 21,155-156. Jeon y col. 1999. Nat.Genet. 21,157-158.
3	SW72-SW251	QTL ADG post-destete	Casas-Carrillo y col. 1997. J. Anim. Sci.75,2047-2053
4	SW35-SW839	QTL mayor de engrasamiento y desarrollo confirmado en varias poblaciones	Andersson y col. 1994, Science 263:1771-1774. Walling y col.2000.Genetics 155 :1369-1378.
6	SW316-S0003	Control	-
7	MHC	QTL mayor de engrasamiento en Meishan x europeos	Rohrer y Keele.1998a.J.Anim.Sci76:2247-2254. Bidanel y col.2001,Genet.Sel.Evol.33,289-309
8	SW905-SW1029	QTL para caracteres de canal en Jabalí x LW	Andersson-Eklund y col 1998.J.Anim.Sci.76,694-700
9	SW983-SW21	Control	-
10	S0070-SW1041	QTL de rangos de desarrollo Jabalí x LW	Knott y col.1996.Theor.Appl.Genet.93,71-80
13	S0068-SW398	QTL rangos de desarrollo temprano (nacimiento a 30 kg) en dos estudios independientes	Andersson y col.1994.Science 263,1771-1774. Yu y col 1995. J. Anim.Sci.73,1282-1288.

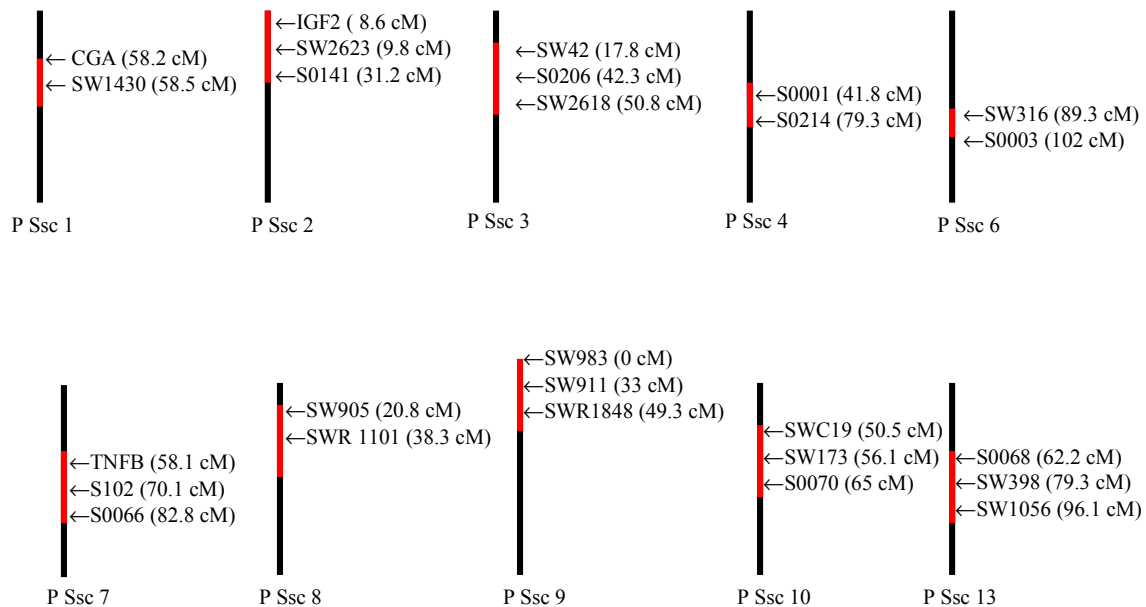
Las regiones citadas anteriormente, así como la posición de los marcadores seleccionados puede observarse en la figura 3.1.

En el presente trabajo, para la obtención de los mejores marcadores moleculares se analizó el nivel de polimorfismo en las poblaciones Pietrain y LargeWhite de los 10 padres y de 10 madres seleccionadas al azar.

La selección de los microsatélites se realizó basándose en la informatividad de los machos, en la facilidad de amplificación y en la accesibilidad de cebadores de dominio publico.

Además fue considerada la posibilidad de realizar genotipados en reacciones PCR *múltiplex touchdown*, analizándose inicialmente un total de 48 microsatélites (Tabla 3.2) para los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9,10 y 13.

Figura 3.1. Posición de marcadores moleculares utilizados en las poblaciones Pietrain (P) y Large White (LW): En rojo, la región QTL que ha sido descrita en estudios previos (Para los cromosomas 1, 6 y 9 se analizaron arbitrariamente regiones control en las que no existían QTLs descritos al inicio del presente trabajo).



Continuación Figura 3.1. Posición de marcadores moleculares utilizados en las poblaciones Pietrain (P) y Large White (LW): En rojo, la región QTL que ha sido descrita en estudios previos (Para los cromosomas 1, 6 y 9 se analizaron arbitrariamente regiones control en las que no existían QTLs descritos al inicio del presente trabajo).

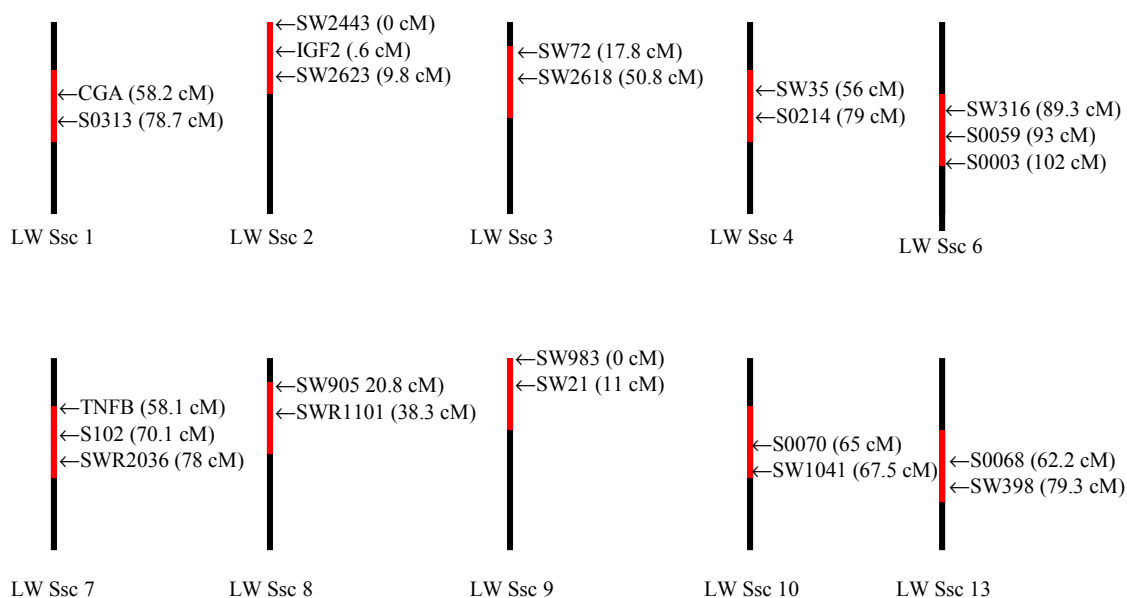


Tabla 3.2 Microsatélites utilizados para efectuar la selección de los más informativos de acuerdo a su informatividad en machos LargeWhite y Pietrain.

Crom.	Locus	Posición relativa cM	Número de alelos	Tamaño mínimo del alelo (pb)	Tamaño máximo del alelo (pb)	Tipo de Fluor.	Temp. de annealing °C
1	CGA	52.3	12	322	366	Hex	65
1	SW1430	58.5	8	160	178	Tet	60
1	S0122	60.2	6	170	180	Fam	62
1	SW2185	67.6	8	145	175	Fam	55
1	S0313	78.7	6	196	218	Hex	58
2	IGF2MS	8.6	6	241	258	Fam	58
2	SW2443	0	6	200	214	Hex	62
2	SWC19	.6	6	225	239	Fam	58
2	SW2623	9.8	7	129	147	Tet	60
2	SW256	19.2	7	92	118	Fam	62

Continuación Tabla 3.2 Microsatélites utilizados para efectuar la selección de los más informativos de acuerdo a su informatividad en machos LargeWhite y Pietrain.

Crom.	Locus	Posición relativa cM	Número de alelos	Tamaño mínimo del alelo (pb)	Tamaño máximo del alelo (pb)	Tipo de Fluor.	Temp. de <i>annealing</i> °C
2	SW240	42	8	94	114	Tet	58
3	SW72	17.8	5	101	113	Fam	58
3	S0206	42.3	5	175	201	Fam	58
3	SW2618	50.8	8	105	127	Hex	58
3	SW2408	94.2	8	130	178	Faml	58
3	S0002	102.2	5	189	209	Hex	62
3	SW349	112.6	9	149	177	Hex	62
3	S0165	129.3	7	142	170	Fam	62
3	SW590	129.3	4	184	271	Hex	60
4	S0001	41.8	6	175	189	Fam	50
4	S0175	55.9	6	121	147	Hex	62
4	SW35	55.9	5	129	137	Fam	58
4	SW839	62.3	6	144	166	Fam	62
4	S0217	69.6	5	145	165	Tet	62
4	S0214	79.3	7	121	137	Tet	58
6	SW316	89.3	8	133	159	Hex	58
6	S0059	92.8	8	126	152	Fam	58
6	S0003	102	6	131	162	Hex	60
7	SW1369	48.2	8	130	154	Hex	60
7	TNFB	58.1	7	174	213	Hex	60
7	S0102	70.1	8	123	143	Fam	65
7	SWR2036	78.2	5	155	174	Hex	60
7	S0066	82.8	4	136	158	Tet	62
8	SW905	20.8	6	125	151	Fam	60
8	SWR1101	38.3	9	122	170	Hex	62
8	SW1029	46.9	7	79	99	Hex	60
9	SW983	4	5	95	121	Hex	60
9	SW21	15.1	6	123	139	Hex	60
9	SW911	36.8	7	151	173	Fam	60
9	SWR1848	49.3	7	93	117	Tet	60
10	SWC19	50.5	4	172	190	Hex	58
10	SW173	56.1	6	194	216	Tet	58
10	S0070	62.3	7	261	293	Hex	62
10	SW1041	67.5	5	95	103	Hex	58
13	S0068	62.2	10	211	260	Tet	62
13	SW398	79.3	6	166	188	Hex	55
13	SW1056	96.1	5	150	182	Tet	62

#### III.2.4. Condiciones de amplificación de PCR.

Para la amplificación de los microsatélites se utilizaron las siguientes condiciones: Taq buffer al 1X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 0,2 μM de cebador *forward* y *reverse* respectivamente, 0,25 unidades de *Amplitaq Gold*, y 30 ng de ADN genómico en un volumen final de 5 μl. La concentración de cada cebador fue ajustada para algunos marcadores dependiendo de las condiciones particulares de cada múltiplex.

Las condiciones de amplificación de las PCRs fueron las mismas para todos los microsatélites excepto para el IGF2 donde se ajusto la cantidad de MgCl<sub>2</sub> a 0,5 mM.

Las mezclas de los cebadores se efectuaron de acuerdo al número de pares de bases de amplificación y a la fluorescencia con que están marcados (Fam, Tet y Hex), facilitando así la interpretación de los genotipados.

Para la amplificación de los microsatélites fue utilizado un termociclador ABI PRISM 877. La elección de este termociclador automatizado fue debida al gran número de muestras de ADN genómico disponibles para analizar, y a la precisión con que son dispensados los volúmenes. Las PCRs se efectuaron en un volumen final de 5 μl, efectuándose 384 PCRs simultáneamente. Terminada la PCR, los productos fueron combinados de acuerdo a la fluorescencia con que estaban marcados los cebadores y el tamaño de amplificación de pares de bases de cada fragmento, utilizándose un total de 96 muestras de ADN con las posibles combinaciones de cebadores en cada PCR.

En el presente estudio fue utilizado un programa *touchdown* decreciente que consiste en elevar la temperatura inicial a 94 °C durante 10 minutos para activar la polimerasa Taq *Gold*, seguido de 94 °C durante 15 segundos, iniciando con una temperatura de *annealing* en 62 °C la cual disminuye 1 °C cada ciclo hasta llegar a 52 °C. En cada ciclo se utilizaron 30 segundos de *annealing*, seguidos de una temperatura de extensión de 72 °C durante 60 segundos, y de 25 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 52 °C 30 segundos, 72 °C 60 segundos, con una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

Figura 3.2 Termociclador automatizado ABI PRISM 877 de *Applied Biosystems*.



### III.2.5. Análisis de los productos de PCR.

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante un secuenciador automático de electroforesis capilar y detección fluorescente ABI PRISM 310 de *Applied Biosystems*.

El ABI PRISM 310 es un equipo automatizado de electroforesis que posee un capilar el cual se rellena con un polímero hidrofílico (POP-4) y mediante electroforesis permite que los fragmentos amplificados migren por acción de un campo eléctrico.

El producto amplificado debe ser previamente desnaturalizado con formamida desionizada y acompañado de un marcador interno de peso molecular *GENSCAN-350<sup>TM</sup> TAMRA* marcado con fluorocromo Tetrametilrodamina (marcador interno de tamaños de fragmentos DNA en un rango de 35 a 350 pb desarrollado por *Applied Biosystems*).

Los productos amplificados migran por acción del campo eléctrico de 15 kV a 60 °C durante 22 minutos a través del capilar en función de su tamaño, y al pasar por una ventana que existe en el capilar, un láser excita los fluorocromos unidos a uno de los extremos 5' de los cebadores que emiten una fluorescencia al ser excitados, y en función del máximo de longitud de onda pueden ser diferenciados.

Los fluorocromos utilizados para el marcaje en los extremos 5' de uno de los cebadores de cada pareja (*forward* o *reverse*), son Fam (Carboxifluoresceína), Tet (Tetraclorofluoresceína) y Hex (Hexaclorofluoresceína).

El equipo ABI PRISM 310 tiene incorporado un ordenador, y mediante un *software* de análisis (*Gene Scan Análisis Software* de *Applied Biosystem*), convierte la longitud de onda emitida por la fluorescencia en un electroferograma, en el que los picos representan los alelos amplificados de cada marcador microsatélite, similares a las bandas obtenidas en un gel de electroforesis.

En el electroferograma los picos de color azul corresponden a los fragmentos marcados con Fam, los verdes con Tet y los amarillos con Hex.

El *software* asigna a cada pico del electroferograma una intensidad o altura, correspondiente a la cantidad de fragmentos registrados por el láser al pasar por el capilar, y un tamaño medido en pares de bases, como puede observarse en la figura 3.3.

Los productos amplificados pueden ser analizados en forma individual o juntos, gracias a la fluorescencia con que son marcados los cebadores, y analizarse aún cuando los tamaños sean muy parecidos.

Los fragmentos amplificados en el presente trabajo fueron combinados de acuerdo a su tamaño y fluorescencia en proporciones adecuadas para obtener una mayor optimización de las electroforesis como se muestra en la tabla 3.4 y 3.5.

Figura 3.3. Electroferograma del *GeneScan Análisis Software* correspondiente al primer grupo de microsatélites de la raza LargeWhite.

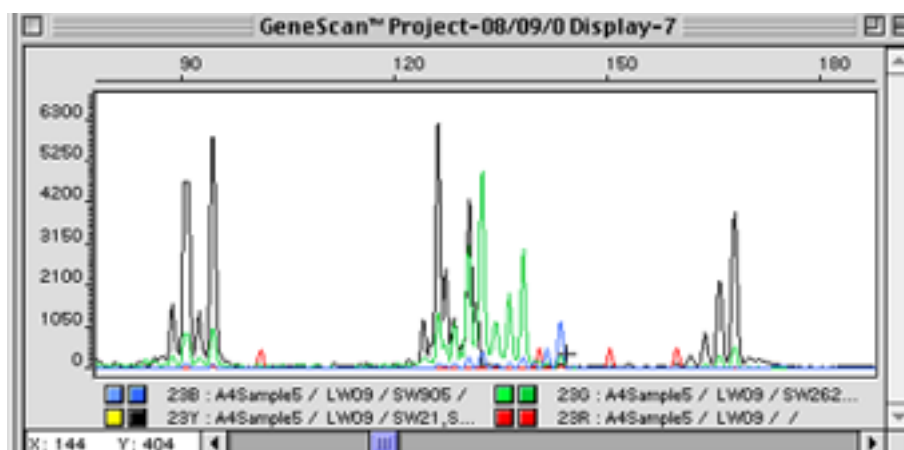


Tabla 3.4 Grupo de marcadores moleculares microsatélites combinados de acuerdo al número de pares de bases de amplificación en la población LargeWhite, entre paréntesis se observa el rango de pares de bases esperada.

Grupo I.

A.- SW2618 (104-130) + SWR2036 (142-182) + SW2443 (196-216)

B.- SW35 (130-138) + IGF2 (240-260)

C.- S0003 (131-164)

Grupo II.

A.- CGA (275-291) + TNFB (156-186)

B.- SW72 (96-116) + S0059 (142-154)

C.- SWR1101 (122-176)

Grupo III.

A.- SW983 (88-116) + SW316 (140-160) + S0070 (264-294)

B.- S0102 (124-136)

C.- S0214 (124-135) + SW398 (160-190)

Grupo IV.

A.- SW1041 (88-98) + SW21 (124-136) + S0313 (164-172)

B.- SW905 (128-150)

C.- SW2623 (130-150) + S0068 (226-268)



---

Tabla 3.5 Grupo de marcadores moleculares microsatélites combinados de acuerdo al número de pares de bases de amplificación en la población Pietrain, entre paréntesis se observa el rango de pares de bases esperada.

---

Grupo I.

A.- SW983 (89-125) + SW316 (143-159) + SW398 (163-189) + CGA (227-293)

B.- SW905 (124-140) + S0001 (182-189)

C.- S0214 (121-135) + SW1056 (143-165) + S0068 (227-261)

Grupo II.

A.- SWR1101 (122-168) + S0141 (211-223) + S0070 (265-281)

B.- S0102 (119-135) + S0206 (171-197)

C.- SWR1848 (91-105) + S0066 (134-192) + SW173 (213-217)

Grupo III.

A.- SW2618 (106-130) + TNF (154-180)

B.- SW72 (97-107) + SW911 (155-161)

C.- SW2623 (129-137) + SW1430 (156-162)

Grupo IV.

A.- S0003 (129-163) + SWC19 (174-196)

Grupo V.

A.- SW1473 (168-188) + SW71 (88-110)

B.- SW2173 (82-112)

C.- DG 94 (180-186)

---

Los resultados obtenidos en el ABI PRISM 310 fueron transferidos a través de un sistema de red a una base de datos y analizados mediante un *software* GEMMA (Iannucelli y col., 1996). Con este *software* se realizó la interpretación automática de los genotipos a partir de los gráficos creados por el GeneScan y además está programado para verificar la herencia mendeliana de los alelos de cada marcador con los datos genealógicos previamente suministrados para cada estudio en particular. El *software* puede almacenar los datos de la genealogía, protocolos de PCR, número de alelos obtenidos en cada uno de las poblaciones estudiadas, diseño de placas de PCR, así como la realización de cálculos de distancias génicas y frecuencias alélicas.

### III.3. Genotipado del gen *RYR-1* (*Ryanodine Receptor*).

Se obtuvieron los genotipos de las poblaciones porcinas completas involucradas en este estudio LargeWhite y Pietrain para el gen del *RYR-1* de acuerdo al polimorfismo descrito por Fujii y col. (1991).

A partir del ADN extraído se realizó una PCR amplificando un fragmento de 659 pares de bases del exón 17 del gen receptor de la rianodina, lugar donde se encuentra el cambio nucleotídico de una citosina por una timina.

Esta mutación causante del síndrome del estrés porcino fue diagnosticada mediante la técnica PCR-RFLP, que se basa en la utilización de una enzima de restricción que reconoce secuencias de corte de ADN que sirven de diana de restricción sobre el producto amplificado.

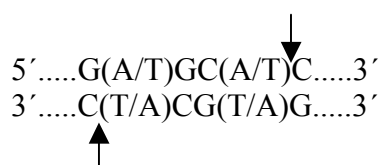
En el caso particular del producto amplificado del *RYR-1*, el fragmento amplificado posee una diana de restricción para la enzima *Bsi HKA-I* (Fig. 3.4) presente en todos los casos, además la mutación causa una segunda diana de restricción específica provocando un segundo corte en caso de existir el cambio nucleotídico.

Para la amplificación del producto de PCR fueron utilizados los siguientes oligonucleótidos: *forward* 5'- TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3' y *reverse* 5'- ATTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAG-3'.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes; buffer PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> al 1 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos *forward* y *reverse* 0.2 μM respectivamente, taq DNA polimerasa de Ecogen 1.25 U, DNA genómico 150 ng en un volumen final de 50 μl.

Los ciclos de temperaturas en el termociclador fueron las siguientes: Desnaturalización inicial 94°C /3', 34 ciclos de 94°C/1', 53°C/2', 72°C/3', con una extensión final de 72°C/5'.

Figura 3.4. Diana de restricción de la enzima *BsiHKA-I*:



La digestión del producto amplificado se realiza utilizando 1.5 U de la enzima *Bsi HKA-I* (*New England Biolabs*) acompañada de 2 μl del tampón de digestión, 2 μl de BSA X

10 más 8 µl del producto amplificado de la PCR en un volumen final de 20 µl, e incubados a 65 °C durante 6 horas. Posterior a la digestión del producto amplificado se efectúa una electroforesis en un gel de agarosa de alta resolución al 1,8 % a 100 V durante una hora.

El fragmento amplificado tiene una diana de restricción presente en todos los individuos, la cual sirve de control interno de la digestión. Además cuando existe el cambio nucleotídico C/T responsable del síndrome del estrés porcino se produce una nueva diana de restricción para esta enzima. De esta forma los animales homocigotos negativos (NN) tendrán una banda de 135 pares de bases y una de 524 pares de bases. En el caso de un animal positivo homocigoto al cambio nucleotídico (nn), tendrá el fragmento de 135 pares de bases, y el fragmento de 524 pares de bases quedará dividido en dos bandas, una de 358 pares de bases y una de 166 pares de bases (Fig. 3.5).

Para el caso de los animales heterocigotos, los fragmentos de restricción que aparecen a la lectura del gel de electroforesis son los siguientes: 524, 358, 166 y 135 pares de bases (Fig 3.6).

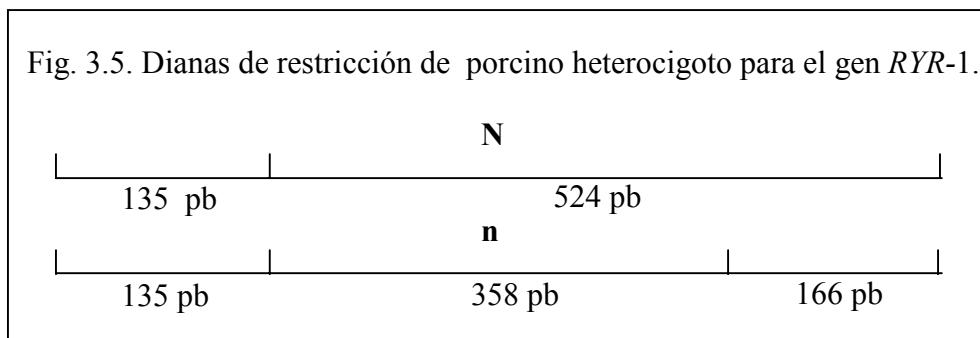


Figura 3.6. Polimorfismos PCR-RFLP del gen *RYR-1*, con la enzima *Bsi HKA-I*.

