

Trabajo de Pasantía
Universidad de la República
Facultad de Ciencias
2008

**ESTUDIO CON MARCADORES CITOGENETICOS Y
MOLECULARES EN SUINOS (*Sus scrofa*).**



Estudiante: *María del Carmen Montenegro Silva.*

Tutor: *Dra.Msc.PhD. Silvia Llambí Dellacasa.*

Co-tutor: *Msc. Miguel de Bethencourt.*

Lugar de Realización del Trabajo: Departamento de Genética y Mejoramiento Animal. Área Genética. Facultad de Veterinaria. Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias: Genética y Zootecnia.

INDICE

Resumen	3
Introducción	5
El cerdo.....	5
Origen y domesticación.....	8
Historia.....	8
Situación actual.....	11
Características de las razas.....	13
Estudios cromosómicos en suinos.....	15
Sitios frágiles.....	17
Marcadores moleculares.....	18
RFLPs.....	20
Gen Leptina.....	20
Objetivos	22
Materiales y Métodos	23
Estudio Citogenético.....	23
Estudio Molecular.....	23
Resultados y Discusión	25
Estudio Citogenético.....	25
Estudio Molecular.....	28
Bibliografía	33
Agradecimientos	37

RESUMEN

En el presente trabajo se realizaron estudios citogenéticos y moleculares en suinos (*Sus scrofa*).

Para el análisis citogenético se realizó un macrocultivo linfocitario a partir de sangre entera de un suino normal cruzado y de sexo macho. Se procesaron dos muestras del mismo animal, a una de ellas se le adicionó 5-azacitidina (5-azaC) en una concentración de 205 μM mientras que la restante se dejó como control (sin adicionar 5-azaC). Se estudiaron un total de 500 placas metafásicas de la sangre cultivada con inductor de las cuales 21 (4.2%) presentaron fragilidad cromosómica. De ellas diecinueve fueron clasificadas como fragilidades de cromátida y las 2 restantes como fragilidades cromosómicas.

Del cultivo control se estudiaron 300 placas metafásicas, de las cuales solamente una presentó fragilidad cromosómica.

El gen Leptina codifica para una hormona relacionada con el depósito de grasa corporal. Polimorfismos en este gen han sido asociados con fenotipos obesos y también se han utilizado para estudiar diversidad genética racial en suinos.

Para el estudio molecular se realizó la extracción de ADN de 6 suinos (2 Mamellados, 1 Duroc, 2 Landrace y 1 suino híbrido). En los animales de las razas Mamellado, Duroc y Landrace el aislamiento de ADN se realizó a partir de folículos pilosos empleando la técnica convencional con resina Chelex. En el caso del suino híbrido el aislamiento se realizó a partir de sangre periférica mediante la técnica convencional de fenol-cloroformo.

En este estudio, se emplearon marcadores moleculares PCR-RFLPs para el gen que codifica la leptina.

Para la amplificación de la secuencia del gen de la leptina se realizó la técnica de PCR convencional con un par de primers específicos. Para

el análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción se utilizó la enzima *HinfI*.

Las muestras analizadas por la técnica de PCR revelaron un fragmento de amplificación de 152 bp. El amplicón sometido a RFLP reveló bandas de 152 bp y 84+68 bp.

Cuatro de los animales estudiados presentaron genotipo LEP^TLEP^T y los dos restantes resultaron heterocigotos LEP^TLEP^C , no encontrándose homocigotos LEP^CLEP^C .

INTRODUCCIÓN.

El cerdo.

La especie *Sus scrofa domesticus* pertenece a la Familia Suidae, Orden Artiodactyla.

Estos animales omnívoros carecen de glándulas sudoríparas funcionales por lo cual son muy sensibles a las temperaturas elevadas, siendo por el contrario más resistentes al frío debido a la capa de tocino, a excepción de las primeras semanas de vida donde son muy vulnerables (Institut Technique du Porc, 1997).

La especie porcina es relativamente precoz, pudiendo reproducirse a partir de los 6-7 meses. Es múltipara ya que sus camadas por parto son numerosas, una cerda normalmente pare de 8 a 12 lechones por vez y tiene dos pariciones anuales. Es por eso la más prolífera de las especies de mediano y gran tamaño. Por otro lado, las cerdas son poliéstricas anuales: si no están en período de lactancia o de gestación, entran en celo en cualquier época del año (Pinheiro Machado, 1973; Institut Technique du Porc, 1997).

Durante los primeros meses de vida presenta un crecimiento de tipo exponencial hasta la etapa de pubertad (aproximadamente a los 6 meses), momento en el cual la velocidad de crecimiento disminuye hasta el estado adulto (Institut Technique du Porc, 1997).

Son animales muy rústicos (resistencia hereditaria a las condiciones adversas del medio), se adaptan bien a cualquier régimen de crianza dado que no son muy exigentes en cuanto al tipo de alimentación y transforman los alimentos con gran eficacia. Por otro lado son muy resistentes a las enfermedades, la mayoría de las cuales pueden ser controladas (Pinheiro Machado, 1973).

Estos animales pueden padecer patologías de tipo monofactoriales y multifactoriales. Las enfermedades "monofactoriales" son las causadas por agentes específicos (virus, bacterias, parásitos u otros), como por ejemplo la fiebre aftosa, la peste porcina clásica, la rabia y

la salmonelosis. La incidencia de estas enfermedades ha disminuido debido a la implementación de planes de profilaxis y a la evolución de la producción porcina (Institut Technique du Porc, 1997).

Las enfermedades "multifactoriales" son aquellas en las cuales además de la presencia del agente infeccioso, la enfermedad sólo se manifiesta en determinadas condiciones, existiendo factores de riesgo. Este tipo de enfermedades varían dependiendo del estado fisiológico del animal, por ejemplo, para el lechón lactante y destetado, los principales problemas son los digestivos. Estas enfermedades producen importantes pérdidas, por lo que deben ser controladas para optimizar los rendimientos.

En lo que respecta al comportamiento el cerdo es un animal sociable. Su comportamiento está dominado por dos prioridades que son la conservación del individuo (orientaciones alimentarias y defensivas), y la conservación de la especie (comportamiento sexual y maternal), estando éstas condicionadas por el ambiente en el que vive el animal. La percepción del ambiente se hace especialmente a través del olfato, el oído y el tacto.

En cuanto al comportamiento alimentario, el lechón busca activamente la mama de su madre desde el momento del nacimiento, estableciéndose una jerarquía que puede llegar a influir sobre el peso del lechón. Posteriormente, con la alimentación en común surge una jerarquía social de dominante a dominado.

En lo que respecta al comportamiento maternal, el vínculo madre-hijo es menos estrecho en comparación al resto de los mamíferos domésticos, por lo cual la cerda acepta fácilmente lechones extraños. El objetivo del comportamiento social y defensivo es mantener un espacio vital mínimo. La falta de espacio y de un ambiente adecuado influye sobre la fisiología de los animales expuestos al mismo (Institut Technique du Porc, 1997).

Los cerdos pueden sufrir diferentes tipos de estrés, debido principalmente a las condiciones de explotación. Se puede diferenciar

el estrés de origen genético (como consecuencia de la búsqueda de mejores rendimientos), el estrés asociado a las condiciones de alojamiento y de transporte, estrés de origen alimentario y estrés asociado con las infecciones. Esto puede conducir a la aparición de diferentes trastornos: disminución de los rendimientos zootécnicos, de las funciones reproductivas y de la calidad de la carne; aumento de la sensibilidad a las enfermedades infecciosas; estados de choque (síndrome de estrés porcino agudo); modificaciones cualitativas y cuantitativas del comportamiento (por ejemplo: canibalismo, ensañamiento de un grupo sobre uno o dos animales).

En cuanto a las razas suinas estas pueden clasificarse en razas mixtas, razas paternas especializadas, razas maternas especializadas y razas locales. Las primeras se caracterizan por tener buenos resultados productivos y reproductivos (Large White, Duroc y algunas variedades de Landrace). Las razas paternas especializadas tienen rendimientos reproductivos menores, pero rendimientos superiores de canal (Piétrain, Landrace Belga y Hampshire). Las razas maternas especializadas se caracterizan por ser precoces sexualmente y muy prolíficas (ciertas razas del Centro-Este de China como la Meishan). Por último están las razas locales que están bien adaptadas a condiciones de explotación difíciles o específicas (Institut Technique du Porc, 1997).

Origen y domesticación.

Aunque se sabe que el cerdo doméstico descende del cerdo salvaje o jabalí, aún existe controversia en lo que respecta tanto al origen como al tiempo de domesticación del mismo. Se discute si los cerdos actuales se originaron a partir del jabalí Europeo, Asiático o a partir de ambos (Pinheiro Machado, 1973; Castro, G. en <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>).

En base a un estudio con ADN mitocondrial y ADN de genes nucleares de cerdos salvajes y domésticos tanto de Asia como de Europa, se ha encontrado evidencia a favor de una domesticación independiente a partir de subespecies de cerdos salvajes en Europa y Asia, estimando una separación de estas poblaciones hace unos 500.000 años, muy anterior al tiempo estimado de domesticación hace aproximadamente 9.000 años. También se halló evidencia a favor de la introgresión de razas Asiáticas en razas Europeas lo cual señala un origen híbrido para algunas razas Europeas. Esto concuerda con la documentación existente que hace referencia a que los cerdos asiáticos fueron empleados para mejorar las razas Europeas en el transcurso del siglo XVIII y principios de XIX (Giuffra *et al.*, 2000).

Los cerdos actuales pertenecen al género *Sus* y comprenden los asiáticos (*S. vittatus*); los célticos (*S. scrofa*) provenientes del jabalí europeo; y los ibéricos (*S. mediterraneus*) de origen africano (Castro, G. en: <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>).

Historia.

Los primeros fósiles del género *Sus* corresponden al período del Mioceno Superior (11-5 millones de años). En períodos sucesivos se encontraron restos en Asia, África y Europa (Pinheiro Machado, 1973).

Existen pruebas incuestionables de la presencia del cerdo junto al hombre en la Edad de la Piedra Pulida (Neolítico), siendo éste uno de

los primeros animales que permitió al hombre dejar de vivir únicamente de la caza (Pinheiro Machado, 1973).

La porcicultura se extendió en el mundo debido a la gran adaptabilidad que identifica a los cerdos, exceptuando los países en los cuales se prohíbe a estos animales debido a razones culturales o religiosas (Castro, G en: <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>). Por ejemplo, en Egipto y muchos pueblos Asiáticos no se comía carne de cerdo por temor al contagio de la lepra, concepto que impidió la expansión de la especie en muchos países (Pinheiro Machado, 1973).

El consumo de carne porcina fue prohibido por Moisés y Mahoma por razones sanitarias, ya que en esa época se desconocía los ciclos de parásitos que atacan al hombre y cuyo huésped intermediario es el cerdo (Pinheiro Machado, 1973). Esta costumbre aún se mantiene dentro de grupos ortodoxos del Judaísmo y el Islam.

Por otro lado, los romanos si apreciaban la carne de cerdo. Uno de los platos preferidos en aquel entonces consistía en un lechón asado entero relleno de pájaros (*porcus trajanus*) (Pinheiro Machado, 1973).

Los cerdos fueron introducidos al continente Americano por Colón (1493) y llevados a Santo Domingo y Cuba, desde donde se expandieron hacia Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador. Estos animales pertenecían a razas ibéricas. Se introdujeron en diversas regiones del continente por otros navegantes (Castro, G. en <http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>).

Fueron llevados a América del Norte, más precisamente a Estados Unidos por Hernando de Soto en 1539. En México fueron introducidos posteriormente por Hernán Cortes en 1600. Estos animales también eran de razas ibéricas

En Brasil los primeros cerdos, traídos por Alfonso de Souza, llegaron a San Vicente, en el litoral del actual Estado de San Pablo, en el año 1532. A la Argentina llegaron alrededor de 1590 desde España y

desde el Virreinato del Perú (Castro, G. en: <http://www.unorte.edu.uy/amqa/multimedia/suinos>).

Posteriormente se importaron y difundieron otras razas que son las que predominan en la actualidad. Como consecuencia de ésto, las estirpes originarias tienden a desaparecer debido a la introducción de razas extranjeras, lo que pone en riesgo un patrimonio genético que debería ser conservado debido a su rusticidad, resistencia a enfermedades y capacidad transformadora de alimentos.

Las cruzas entre las primeras razas ibéricas con razas provenientes de Europa y Estados Unidos, han dado origen a lo que hoy se conoce como "cerdos criollos" (Castro, G. en: <http://www.unorte.edu.uy/amqa/multimedia/suinos>).

En nuestro país, la introducción del cerdo tuvo lugar con la colonización e instalación de centros poblados estables (Villa Soriano en 1624, Colonia del Sacramento en 1680 y Montevideo en 1724). En la Tercera Ley de Indias y en los Edictos del Cabildo de Montevideo del año 1763 ya había referencia de estos animales. Fue la instalación de los primeros saladeros en 1787, que dejaban una gran cantidad de residuos utilizables por los cerdos, el hecho que condujo a un aumento en la cantidad de estos animales. Este aumento continuo hasta 1900, observándose un descenso hasta la actualidad (Castro, G. 2007).

En 1966 se fundó La Sociedad Uruguaya de Criadores de Cerdos, filial de la Asociación Rural del Uruguay (ARU). Dicha sociedad participa en las exposiciones de la ARU y organiza, desde 1997, un Concurso de Cerdos para Industria (Castro, G. en: <http://www.unorte.edu.uy/amqa/multimedia/suinos>).

La primera raza inscrita en el Swine Book Uruguayo fue la Large White en 1906. Las anotaciones posteriores reflejan las tendencias de producción imperantes en el país y en el mundo (Castro, G. en: <http://www.unorte.edu.uy/amqa/multimedia/suinos>).

Situación actual.

El territorio de la República Oriental del Uruguay posee características geográficas que lo hacen apto para la producción ganadera, actividad que ocupa el 62% de la superficie agropecuaria (Castro *et al.*, 2007).

La actividad agropecuaria constituye el 11% de la economía uruguaya generando el 73% de las exportaciones del país, siendo los rubros más importantes la carne bovina, productos agrícolas, cueros y lácteos (Castro *et al.*, 2007).

Dentro de este contexto, la producción porcina tiene un lugar secundario en comparación a otras explotaciones agropecuarias, aportando aproximadamente un 4.8% del valor del producto agropecuario total del país. A pesar de esto la cría porcina tiene una importancia social como complemento del sustento de familias de pequeños y medianos productores rurales y periurbanos (Castro *et al.*, 2007).

La localización de los establecimientos, mayoritariamente en los alrededores de Montevideo y en el sur, litoral oeste y sureste del país, se relaciona con una mayor disponibilidad de alimentos de bajo costo para los animales (subproductos generados por industrias alimenticias humanas y agroindustriales) y también con los lugares de comercialización del producto final (Castro *et al.*, 2007).

El estado sanitario de la pira uruguaya es satisfactorio debido a que está libre de las principales enfermedades consideradas por la OIE (Organización mundial de sanidad animal). En 1991 se detectaron los últimos focos de peste porcina clásica y en 2001 los de fiebre aftosa, ocurriendo casos aislados de brucelosis y leptospirosis (Castro *et al.*, 2007).

En Montevideo la cría de cerdos es realizada mayoritariamente por los clasificadores de residuos que viven en asentamientos irregulares en zonas periféricas de la ciudad. Estos utilizan los residuos orgánicos que recogen para la alimentación de los cerdos, así como residuos domiciliarios, industriales y comerciales (Castro *et al.*, 2007).

Debido al manejo inadecuado de la cría de cerdos se generan impactos sanitarios y ambientales. Los primeros son consecuencia de la proximidad de las porquerizas a las viviendas por lo cual aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades de los animales al hombre. El impacto ambiental se debe a la contaminación de suelos y cursos de agua, ya que los criaderos generalmente están cercanos a estos cursos de agua donde se destinan los residuos.

La mayoría de los criadores no tiene acceso a medicamentos ni asesoramiento técnico, lo cual aumenta los riesgos sanitarios (Castro *et al.*, 2007).

Los animales pueden ser comercializados, formal e informalmente, pero son destinados principalmente al autoconsumo.

En nuestro País, la producción no se basa en recursos zoogenéticos locales, como consecuencia fundamentalmente del desconocimiento de las características de los mismos y la buena adaptación de las razas extranjeras (Castro *et al.*, 2004). En el caso de cerdos, los animales criados son cruces entre razas comerciales (Large White, Landrace y Duroc) y razas criollas (Mamellado, Casco de Mula) (Castro *et al.*, 2007).

En Uruguay se han descrito tres recursos genéticos porcinos locales: Mamellado, Casco de Mula y Pampa Rocha (Castro G., 2007; Vadell *et al.*, 1994). Las dos primeras razas se encuentran en estado crítico, a conservar, según la clasificación de la FAO para el estado de riesgo de estas razas (menos de 100 reproductoras), mientras que el cerdo Pampa Rocha se encuentra en situación sin riesgo, pero a preservar (más de 1000 reproductoras) (Delgado, 2002).

La caracterización genética de una especie ganadera como el cerdo en nuestro país, sería muy importante, entre otros aspectos: para el conocimiento y conservación de estas razas y sus poblaciones, así como la orientación de otros estudios; para obtener mejoras en rendimiento y calidad de los productos, y para el establecimiento de relaciones filogenéticas entre razas.

A continuación se describen las principales características de las razas utilizadas en el presente trabajo.

Características de las razas.

Mamellados:

Esta raza se caracteriza por la presencia de apéndices pendulosos ubicados en la base del cuello denominados mamellas. Esta característica se asocia a cerdos descendientes de ibéricos, debido a que están presentes en estos y otros animales del tronco mediterráneo, siendo poco comunes en animales en el tronco celta (Castro, G. 2007).

Están presentes en establecimientos de 12 de los 19 departamentos del país, ocupando ecosistemas variados y su producción es complementaria a otros rubros agrícolas-ganaderos, siendo mayoritariamente para autoconsumo (Castro, G. 2007). Como ya se citó anteriormente, es una raza en estado de riesgo crítico, a conservar (Delgado, 2002).

Figura 1: Aspecto fenotípico de cerdo mamellado (Foto cortesía de Dr. Gustavo Castro)



Figura 2: Suinos cachorros mamellados con distintos colores de capa (Foto cortesía de Dr. Gustavo Castro).



Duroc:

Es una raza originaria de Estados Unidos. Se caracteriza por un pelaje de color pardo rojizo uniforme. La cabeza es pequeña en relación al tamaño corporal, ancha entre los ojos, frente lisa y plana.

Las orejas son medianas, moderadamente finas y puntiagudas. La región dorsal es larga, medianamente ancha y levemente arqueada. Los miembros son finos, separados y perpendiculares al cuerpo.

Debe su éxito a su rusticidad y a sus muy buenos resultados en crecimiento (Pinheiro Machado, 1973; Institut Technique du Porc, 1997).

Figura 3: Aspecto fenotípico de un cerdo de la raza Duroc (foto <http://http://www.pigsmightfly.eu/images/duroc-1.gif>).

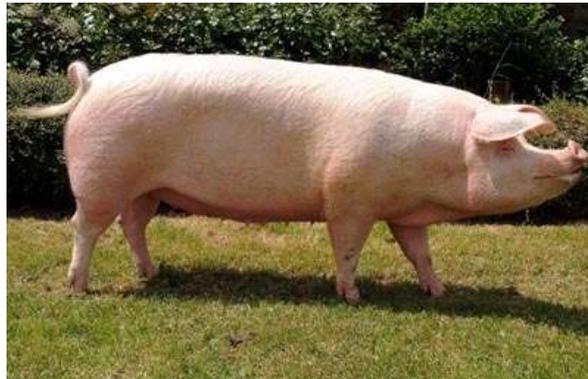


Landrace:

Su pelaje es blanco, fino y sedoso, siendo deseable que tenga manchas pigmentadas en la piel. La cabeza es moderadamente larga con quijadas livianas y ancha entre las orejas.

Las orejas son largas, delgadas e inclinadas hacia delante. El dorso es fino. Las extremidades son fuertes con costillas y articulaciones cortas y elásticas, los cascos son fuertes y parejo (Pinheiro Machado, 1973)

Figura 4: Aspecto fenotípico de un cerdo de la raza Landrace (Foto <http://www.fwi.co.uk/assets>).



Estudios cromosómicos en suinos.

La primera investigación constatada respecto a los cromosomas en cerdos fue llevada a cabo por Wodsedalek en 1913, reportando un número diploide $2n=18$ en machos y $2n=20$ en hembras. Posteriormente, en 1917, Hance reportó un número diploide de 40 cromosomas. El primer estudio que dio un número cromosómico correcto de $2n=38$ fue realizado por Krallinger en 1931. Sin embargo, Makino (1944) publicó un trabajo en el cual afirmaba que el número diploide en cerdos era $2n=40$ cromosomas sin excepciones. (Eldrige, 1985).

Una de las causas de esta confusión puede haber sido la morfología de los cromosomas del par número 10, ya que presenta una

constricción en la región centromérica y puede visualizarse cada cromosoma, como dos acrocéntricos asociados a nivel de los centrómeros (Eldrige, 1985).

En 1962 Makino *et al.* establecieron que el número cromosómico correcto en cerdos domésticos (*Sus scrofa*) era $2n=38$. Esto fue confirmado por Jiménez-Martin *et al.* ese mismo año. El cariotipo se organiza en 7 pares de submetacéntricos (del par 1 al 7), 5 pares de metacéntricos (del 8 al 12), siendo los restantes autosomas acrocéntricos (del 13 al 18). El cromosoma X es un submetacéntrico grande mientras que el Y corresponde a un submetacéntrico pequeño (Eldrige, 1985).

El primer bandeo cromosómico lo realizaron Gustavsson *et al.* (1971). Los cromosomas se organizaron en grupos, por tamaño, de metacéntricos-submetacéntricos y acrocéntricos (Eldrige, 1985).

Por bandeo C se ha demostrado que existen algunos polimorfismos en los cromosomas de cerdos, especialmente en el par 15 (Christensen y Smedegard, 1979).

Sysa en 1978 también había encontrado en la región centromérica de los cromosomas 13 a 18 variabilidad en constricciones secundarias, regiones NORs, y bandas-N (bandeo NORs) (Eldrige, 1985).

Las alteraciones cromosómicas más frecuentemente encontradas en *Sus scrofa* son las translocaciones, tanto recíprocas como robertsonianas (Miyake *et al.*, 1977, Gustavsson y Settergren, 1983). Una patología común en cerdos relacionada en algunos casos a la constitución cromosómica son los intersexos (Madan *et al.*, 1978). Tanto las translocaciones como los intersexos se han diagnosticado en animales con problemas productivos y reproductivos (Eldrige, 1985). A nivel citogenético es importante conocer aspectos de la inestabilidad cromosómica que pudieran relacionarse con alteraciones de la fertilidad. A nivel mundial existe escasa información sobre fragilidad cromosómica inducida en suinos.

Sitios Frágiles.

Los sitios frágiles son regiones de ruptura de la integridad cromosómica que aparecen en sitios concretos del cariotipo. Pueden observarse "*in vitro*" en las metafases de cultivos linfocitarios cuando se emplean inductores químicos o medios de cultivos carentes en ácido fólico (Sutherland y Hecht, 1985).

Pueden clasificarse como sitios frágiles raros y sitios frágiles comunes. Los primeros se presentan con una baja frecuencia poblacional y cuando se analizan en cultivos se presentan en gran número en las placas metafásicas (5-30%). Los sitios frágiles comunes, presentan una alta frecuencia en la población y son visibles en pocas placas metafásicas (menos del 5%) (Sutherland y Hecht, 1985).

La mayoría de los sitios raros son sensibles al ácido fólico. Un ejemplo es el FRAXA humano en el cual se identificaron expansiones de trinucleótidos (CGG/GCC) en el gen FMR-1 y se asocia con la forma más frecuente heredable de retardo mental (Síndrome del X frágil). Los sitios raros también son inducidos por la bromodeoxiuridina, distamycina A y timidina (Llambí, 2002).

Respecto a los sitios frágiles comunes, estos son inducidos principalmente por la afidicolina (inhibidor de la ADN polimerasa alfa) y potenciados por la camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I que incrementa la acción de la afidicolina). Otro inductor de sitios frágiles comunes es la azacitidina (5-azaC). Esta sustancia es un análogo de la pirimidina y actúa inhibiendo a la enzima ADN metiltransferasa responsable de la metilación del ADN, uno de los fenómenos epigenéticos más estudiados, responsable del silenciamiento génico (Pintado y Morón, 2001).

En determinados casos, la clasificación de los sitios frágiles se dificulta debido a que algunos de éstos manifiestan características comunes a los dos grupos (Llambí, 2002).

En muchas especies se asocian anomalías en los cromosomas con patologías tales como problemas de fertilidad (humanos, equinos, bovinos, osos pandas, roedores); cáncer (hombre, perros); paraqueratosis hereditaria, síndrome de calvicie en terneros, enanismo (bovinos) (Llambí, 2002).

Resultados experimentales en cerdos han demostrado que estos constituyen un sistema exitoso para el estudio de sitios frágiles. Por otro lado, los cromosomas de cerdos responden de manera similar a los cromosomas humanos frente a la afidicolina (Riggs *et al.*, 1993). Es por esto que los cerdos pueden ser un buen modelo animal para el estudio de fragilidad cromosómica en humanos. En suinos la bibliografía acerca de los efectos de la 5-azaC como inductor de fragilidad cromosómica es escasa (Danielak-Czech y Slota, 2004).

Si bien aún se desconoce el significado general de los sitios frágiles, estos se relacionarían con los puntos de fractura en reordenamientos cromosómicos asociados con el cáncer, reordenamientos cromosómicos en eventos evolutivos, y fracturas asociadas con abortos espontáneos en fertilizaciones *in vitro* fallidas (Riggs *et al.*, 1993).

La aparición de los sitios frágiles puede proporcionar un mejor entendimiento de cómo las presiones ambientales producen daño genético y probablemente reflejen variaciones en la estabilidad cromosómica a través del genoma (Riggs *et al.*, 1993).

Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares pueden definirse como biomoléculas que pueden relacionarse con un rasgo genético. Estas biomoléculas pueden ser proteínas (antígenos e isozimas) o ADN (mutaciones puntuales en genes, secuencias repetidas, SNPs, etc.). Si varios marcadores se asocian con un rasgo genético cuantitativo, forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos) (Claros Díaz, 1998). El estudio de los QTL es muy importante ya que pueden relacionarse con

enfermedades y características de interés económico en animales domésticos.

De acuerdo al grado de variabilidad que presenten, los marcadores moleculares pueden ser monomórficos o polimórficos. Los primeros se caracterizan por ser invariables entre los organismos, mientras que los polimórficos si presentan diferencias (peso molecular, actividad enzimática, estructura, sitios de restricción) (Claros Díaz, 1998).

Es deseable que los marcadores reúnan determinadas características como ser buena distribución a través del genoma, alto grado de polimorfismo, técnica de detección fácil y rápida, con repetibilidad y fiabilidad en distintos laboratorios (Bello Pigem, 2001. Tesis doctoral). Existen diferentes tipos de marcadores moleculares de ADN, entre ellos se pueden mencionar: RFLPs (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), RAPDs (fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar), microsatélites o SSR, minisatélites o VNTR, AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados), SSCP (Polimorfismo de conformaciones monocatenarias) y SNPs (polimorfismo de un solo nucleótido). Algunos de estos marcadores se basan en la hibridación del ADN, otros en la amplificación del ADN mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), mientras que algunos pueden detectarse de ambas de maneras (Picca *et al.*, 2004). El desarrollo de los marcadores moleculares ha permitido aumentar en gran medida el conocimiento de las características genéticas en diferentes organismos. Sus aplicaciones son muy variadas, permiten, entre otras cosas, conocer la estructura genética de las poblaciones, diagnosticar enfermedades, estudiar características de interés económico, MAS (selección asistida por marcadores), mapeo genómico, inferir relaciones evolutivas y parentesco.

RFLPs (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

El polimorfismo en el ADN detectado consiste en diferencias en el largo de fragmentos de ADN después de la digestión con enzimas de restricción específicas. Estas enzimas reconocen secuencias específicas de ADN y producen cortes endonucleotídicos, obteniéndose fragmentos de longitudes definidas, los cuales pueden ser revelados por electroforesis en gel de agarosa, separándose de acuerdo a su tamaño molecular. Diferencias en el largo de fragmentos particulares pueden deberse a diferencias en una o más bases, resultando en la pérdida de un sitio de restricción o en la formación de uno nuevo, o debido a la inserción o delección de bloques de ADN. Estas diferencias pueden ser reconocidas por un cambio en la movilidad de los fragmentos de restricción durante la electroforesis (Botstein *et al.*, 1980).

Los RFLPs se heredan como características mendelianas simples codominantes (Botstein *et al.*, 1980).

Estos marcadores pueden detectarse tanto por hibridación del ADN como por PCR.

En el presente estudio se emplearon marcadores moleculares PCR-RFLPs para el gen que codifica la leptina.

Gen leptina (LEP).

La utilización del estudio de genes mayores por PCR-RFLP es una alternativa para medir diversidad genética en función a las frecuencias alélicas.

El gen leptina (LEP) se ubica en el cromosoma 18 de cerdos y es un gen muy conservado en un gran número de mamíferos (Kmieć *et al.*, 2003). Codifica para la leptina, una hormona que es secretada a la sangre principalmente a partir de los adipocitos (Kmieć *et al.*, 2003) y que actúa como señal de saciedad en el hipotálamo, regulando así el peso corporal y el consumo de energía (Bauer *et al.*, 2006).

La ubicación de los receptores de dicha hormona en varias regiones del sistema reproductivo señalaría que la leptina tendría un efecto sobre rasgos reproductivos. No existe mucha información acerca de la influencia de polimorfismos del gen LEP sobre características reproductivas en cerdos (Kmieć *et al.*, 2003).

La expresión del gen está regulada por la masa de tejido adiposo y diferentes hormonas (insulina, glucocorticoides, estrógenos, prolactina, testosterona y hormona del crecimiento) (Kmieć *et al.*, 2003).

Polimorfismos del mismo se han asociado con fenotipos obesos presentando distintas frecuencias en razas suinas. Respecto a esto, se han encontrado niveles superiores de ARNm para leptina y de la propia hormona en el plasma de cerdos obesos en comparación con cerdos no obesos con el mismo peso corporal (Kmieć *et al.*, 2003).

Uno de los polimorfismos identificados en el gen LEP ocurre por la sustitución $T^{3469} \rightarrow C$ en exón 2 generando dos formas alélicas (**LEP^T**, 152bp y **LEP^C**, 84+68bp) al utilizar la enzima *Hinf I*.

OBJETIVOS

En el presente trabajo se proponen los siguientes objetivos generales:

.- Realizar el estudio de fragilidad cromosómica inducida por 5 azacitidina en cultivos linfocitarios de suinos.

.- Puesta a punto de la técnica de PCR-RFLP para identificación de polimorfismos del Gen LEP en suinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio citogenético.

Para el estudio citogenético se extrajeron 5 ml de sangre periférica con jeringa estéril y heparina como anticoagulante, de un suino normal cruza y de sexo macho. Se realizó un macrocultivo linfocitario a partir de sangre entera en tubos conteniendo 5 ml de medio RPMI 1640 completo (10% de suero fetal bovino y fitohemaglutinina como mitógeno) de acuerdo a Halnan, (1989). Se establecieron 2 grupos: Un tubo control (sin adicionar 5-azaC) y un tubo al que se le adicionó 5-azaC 7 horas antes del sacrificio del mismo, en una concentración de 205 μ M (Danielak-Czech y Slota, 2004). La muestra se cultivó en estufa de cultivo a 38.5 °C durante 72 horas. Se realizó un choque hipotónico con solución de cloruro de potasio 0.075M y se fijó en una mezcla de metanol/ácido acético en proporción 3:1.

Las preparaciones se realizaron mediante la técnica de goteo a la llama sobre portaobjetos limpios, previamente sumergidos en metanol 70%. Las preparaciones se colorearon con Giemsa al 3% en buffer fosfato Sorensen (pH 8).

La evaluación y registro de las placas metafásicas se realizó con microscopio óptico Olympus (BX60) y cámara de fotos digital conectada a equipo informático con software de digitalización de imágenes FlashBusFBG 4.2

Estudio molecular.

Se realizó la extracción de ADN de 6 suinos (2 de la raza Mamellado, 1 de raza Duroc, 2 de raza Landrace y 1 suino híbrido de raza de capa blanca). El aislamiento de ADN de los animales de las razas Mamellado, Duroc y Landrace se realizó a partir de folículos pilosos empleando la técnica convencional con resina Chelex. Para el caso del suino híbrido la extracción se realizó a partir de sangre periférica mediante la técnica convencional de fenol-cloroformo.

Para la amplificación de la secuencia del gen LEP se realizó la técnica de PCR convencional con par de primers específicos:

Primer F 5'TGCAGTCTGTCTCCTCCAAA3', Primer R 5'CGATAATTGGATCACATTTCT G3' según Urban y Mikolasova, 2006.

Se utilizó un programa de 30 ciclos y temperatura de "annealing" de 55°C.

Para el RFLP se utilizó 10U de *HinfI* en 10 µl de producto de PCR, con una incubación a 37°C durante 3hrs.

Los productos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 3% teñido con Bromuro de etidio. Se realizó registro fotográfico de los geles y genotipado utilizando el programa Kodak digital science 1D.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio citogenético.

En el cultivo con inductor se estudiaron 500 placas metafásicas de las cuales 21 (**4.2%**) presentaban fragilidad cromosómica (Tabla 1).

El tipo y distribución de las fragilidades identificadas fueron:

- a) fragilidad cromosómica (**2**, tipo gaps en el cromosoma 1q).
- b) fragilidad de cromátida (**19** de las cuales **18** eran gaps y **1** fractura). Los **18** gap se localizaron en: cromosoma 1q (**6**), cromosoma 6q (**1**), cromosoma 8q (**1**), cromosoma 13q (**5**), cromosoma 14q (**3**), cromosoma Xq (**2**). La fractura de cromátida se localizó en el cromosoma 13q (**1**). En el cultivo control, una placa metafásica presentó fragilidad cromosómica (cromosoma del par 14) (Tabla 2).

Tabla 1: Presencia de fragilidades en metafases somáticas, en cultivos control e inducido con 205 µM de 5-azacitidina.

Metafases control (n=300)		Metafases con inducción (n=500)	
Sin fragilidades	Con fragilidades	Sin fragilidades	Con fragilidades
299	1	479	21

Tabla 2: Tipo y distribución de las fragilidades observadas en el cultivo con inducción.

Cromosoma		Cromátida						
2		19						
Gap	Fractura	Gap						Fractura
2	0	18						1
Par1q	-----	Par1q	Par 6q	Par8q	Par13q	Par 14q	Xq	Par 13q
2	-----	6	1	1	5	3	2	1

Figura 5.

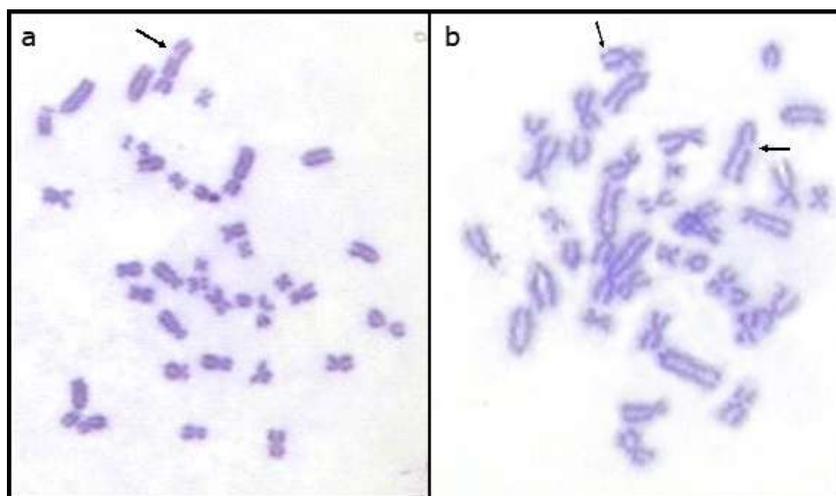


Figura 5. Ambas fotos corresponden a placas metafásicas con tinción convencional Giemsa. **5a.** En la foto la flecha señala un gap de cromátida en el brazo largo de un cromosoma del par 1 (submetacéntrico). **5b.** Se señalan dos fragilidades cromosómicas: un gap de cromátida en un cromosoma del par 13 (acrocéntrico) y un gap de cromátida en el cromosoma X (submetacéntrico), próximo al final del brazo largo.

En nuestro trabajo la mayor frecuencia de fragilidades se registro en los pares cromosómicos 1 y 13. El resto de las fragilidades se distribuyen entre los cromosomas 6, 8, 14 y cromosoma X. Estudios realizados por Riggs *et al.* (1993) utilizando afidicolina evidenciaron fragilidades en todos los cromosomas de cerdos, siendo además del 1 y del 13, los cromosomas 10, 4 y X los que más fragilidades presentaron.

Según Danielak-Czech y Slota (2004), se han descrito numerosos sitios frágiles en suinos, algunos inducidos con folato antagonistas y BrdU-Hoechst 33258 (Rønne, M., 1995). Casi un 60% de éstos intervienen en translocaciones recíprocas (alteraciones cromosómicas frecuentemente identificadas en esta especie), que se encuentran asociadas con alteraciones de la fertilidad. Por lo tanto, las

fragilidades observadas en nuestro trabajo también podrían asociarse con este fenómeno.

Danielak-Czech y Slota (2004) realizaron un estudio de inducción con 5 azacitidina en suinos donde evidenciaron una mayor cantidad de sitios frágiles en animales con problemas reproductivos frente a individuos normales. En dicho estudio los cromosomas más inestables fueron el 13 y el X siendo los sitios más expresados los 13q4.1 y el Xq2.2 en animales con problemas reproductivos. El primero se relaciona con dos translocaciones diferentes que se asocian con una disminución en la fertilidad. El otro (Xq2.2), sensible tanto a la 5 azacitidina como a la bromodeoxiuridina, también se manifiesta empleando afidilcolina y en experimentos previos llevados a cabo por los mismos autores se determinó que era altamente frágil en hembras subfértiles. Estos autores sugieren que la inestabilidad cromosómica, particularmente en loci específicos al X, podría asociarse con la expresión inapropiada de genes que determinan características reproductivas.

En nuestro estudio, el 28,57% de las fragilidades se observaron en el par cromosómico número 13 y en el caso de cromosoma X la frecuencia de fragilidades observadas fue de un 9,52%, en el brazo largo. Esto evidencia la existencia de regiones de inestabilidad en dichos cromosomas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Danielak-Czech y Slota .

El par cromosómico número 1 participa en muchas de las translocaciones recíprocas identificadas en cerdos. Eldrige (1985), sugiere que estas translocaciones podrían relacionarse con la mayor longitud en dicho cromosoma. En el caso de nuestro trabajo, la mayor frecuencia de fragilidades se detectó en este cromosoma (38,09%), lo cual estaría indicando que éste es uno de los cromosomas más inestables en suinos.

Zlotorynski *et al.* (2003) afirman que aunque el mecanismo de expresión de fragilidad cromosómica inducida por 5-azacitidina aún

no se comprende, podría deberse a secuencias de ADN ricas en bases C (citosinas).

En conclusión, en el presente trabajo se observó que la inducción con 5'azacitidina puso en evidencia la presencia de regiones de inestabilidad cromosómica en cultivos linfocitarios en suinos. Sería de importancia continuar con este tipo de estudio ya que es poca la información que existe al respecto y teniendo en cuenta la posible relación de las regiones de inestabilidad con problemas reproductivos.

Estudios Moleculares

Las muestras analizadas por la técnica de PCR revelaron un fragmento de amplificación de 152bp, concordante con el tamaño esperado de acuerdo a Urban y Mikolasova (2006). El amplicón sometido a RFLP mostró un patrón de restricción característico para cada alelo según peso molecular de las bandas observadas (LEP^T, 152pb y LEP^C, 84+68pb). En la figura 2 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de digeridos con *Hinf I*.

Figura 6.

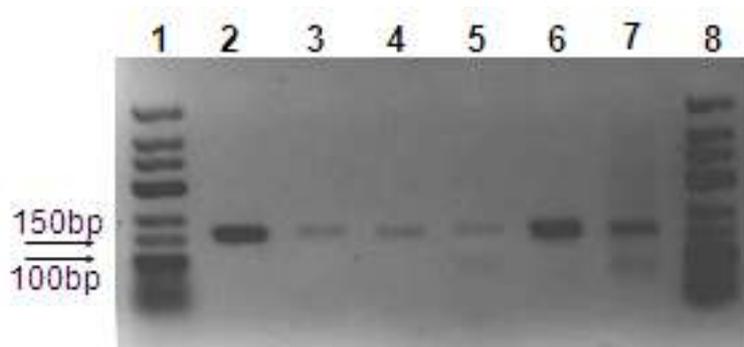


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de productos de digestión con *Hinf I*. Carriles 1 y 8: marcador de peso molecular; carril 2: Duroc; carril 3: Landrace 1; carril 4: Landrace 2; carril 5: Mamellado 1; carril 6: Mamellado 2 y carril 7: Híbrido.

Cuatro de los animales estudiados presentaron genotipo LEP^TLEP^T (66.6%). Por otro lado se observó la presencia del alelo LEP^C (heterocigotos LEP^TLEP^C), en uno de los cerdos mamellados y en el cerdo híbrido (33.3%). No se observaron animales homocigotos para el alelo LEP^C . Los genotipos de los 6 animales analizados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Genotipos de los animales analizados.

Animal	Genotipo
Duroc 1	$LEP^T LEP^T$
Landrace1	$LEP^T LEP^T$
Landrace 2	$LEP^T LEP^T$
Mamellado1	$LEP^T LEP^C$
Mamellado2	$LEP^T LEP^T$
Híbrido	$LEP^T LEP^C$

Diferentes autores han encontrado, en general, una mayor frecuencia del alelo T en diferentes razas. También se han evaluado posibles asociaciones entre polimorfismos del gen LEP, entre ellos LEP-HinfI, y características de interés productivo en suinos. Las asociaciones que se han establecidos entre los dos alelos (T y C) y genotipos con características de interés productivo son variables dependiendo de las razas (Krenková *et al.*, 1999; Stratil *et al.*, 1997).

En razas de cerdos locales Rumanos se encontró una alta frecuencia del alelo T (Mangalitsa T=1.00, Bazna T=0.97), el cual estaría asociado al aumento de depósito de grasa (Ciobanu *et al.*, 2001). Similares resultados en cuanto a frecuencias del alelo T y ausencia del genotipo homocigota LEP^C fueron reportados en cerdos híbridos en República Checa (Krenková *et al.*, 1999). En nuestro trabajo la frecuencia del alelo T fue alta (0.83), mientras que la del alelo C fue

baja (0.16), no encontrándose el genotipo homocigota Lep^C. Debemos considerar que sólo se analizaron 6 animales.

Stratil *et al.* (1997), también encontraron altas frecuencias del alelo T en diferentes razas Europeas (Large White, Landrace, Pietrain, Hampshire, Black Pied Prestice y Czech Meat Pig), sin embargo, en la raza Meishan sólo encontraron el alelo C.

Jiang y Gibson (1999) encontraron una frecuencia relativamente alta del alelo C en Large White y una posible asociación entre este alelo y un menor espesor de tocino (grasa de lomo) en esta raza. En la raza China Erhualian estos autores sólo detectaron al alelo C.

Urban *et al.* (2002) observaron una mayor frecuencia del alelo C en la raza Duroc (0.35) y describieron una asociación de dicho alelo con un mayor incremento en peso promedio diario, mayor porcentaje de carne magra y un menor espesor de tocino en esta raza. Dado que la mutación LEP-HinfI es silenciosa, estos autores proponen la probable existencia de un desequilibrio de ligamiento con otra mutación lo cual explicaría las asociaciones significativas observadas. Kennes *et al.* (2001), por otro lado, habían reportado una muy baja frecuencia del alelo C en Duroc (0.09) y en las razas Landrace y Yorkshire y obtuvieron resultados que relacionan un mayor incremento de peso diario pero, en este caso, asociado con el genotipo TT en cerdos Landrace.

Borges *et al.* (1998) sugirieron que el alelo C podría estar asociado con la acumulación de grasa ya que una mayor frecuencia del mismo fue detectada en la raza brasileña Piau, la cual tiene una fuerte tendencia a acumular grasa.

Los resultados obtenidos por estos autores son poco concluyentes ya que en algunos casos se asocia al alelo T con un mayor depósito de grasa (Mangalitsa, Bazna) y en otros casos se asocia al alelo C con dicha característica (Meishan, Piau).

Kmiec *et al.* (2003) considerando la expresión del gen LEP, la función de la proteína, el alto grado de homología y la localización de los receptores para la misma, sugieren que la leptina puede tener un efecto en características reproductivas en cerdos, más específicamente en el semen. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que el polimorfismo LEP-HinfI puede ser utilizado en la mejora de algunas características de funcionamiento reproductivo en verracos (machos utilizados como reproductores), como características cuantitativas y cualitativas del semen (encontraron una superioridad de los genotipos TT y TC frente al genotipo CC).

En conclusión, en el presente trabajo se observó la factibilidad de analizar este polimorfismo debiendo aumentar el número de cerdos Mamellados a analizar para un posterior cálculo de frecuencias alélicas en esta raza local. Esto permitiría seguir aportando datos en lo que respecta a la caracterización de las razas suinas locales, como el Mamellado. Como se menciona anteriormente, es poca la información existente; también hay que tener en cuenta que dicha información es necesaria para la implementación de un programa de conservación, recordando que dos de los recursos genéticos locales (Mamellado y Casco de Mula) se encuentran en estado crítico, a conservar.

Continuar con este estudio también sería relevante debido a que el gen (LEP) influye sobre una característica de importancia económica, como es la calidad de carne. Considerando tanto la relevancia en conservación como en el aspecto económico, sería conveniente incluir otros marcadores.

Finalmente, además de la importancia del estudio genético, también habría que tener en cuenta la importancia social que tiene la cría de cerdos en nuestro País como recurso económico en familias de pequeños productores rurales y periurbanos.

BIBLIOGRAFÍA

Bauer, M.; Bábelová, A.; Omelka, R. y Bauerová, M. (2006). Association of HinfI Polymorphism in the Leptin Gene with Production Traits in White Improved Pig Breed. *Slovak J. Anim. Sci.*, 39(3): 119-122.

Bello-Pigem, N. (2001). Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (*Struthio camelus*). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Barcelona. España. 1-43.

Borges, G.S.N; Santana, B.A.A.; Franco, M.M.; Borges, M.; Antunes, R.C. y Goulart, L.R. (1998). Determinação das freqüências alélicas do gene da obesidade em diferentes raças suínas. *Genetics and Molecular Biology*, v.21. n.3, p.89. Supplement (abstract).

Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. y Davis, R. W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331.

Castro, G. (2007). Situación de los recursos genéticos porcinos locales en Uruguay. *Arch. Zootec.* 56 (Sup.1): 783-788.

Castro, G.; Santandreu, A.; Ronca, F. y Lozano, A. (2007). La cría de cerdos en asentamientos urbanos y periurbanos de Montevideo (Uruguay). En Serie Cuadernos de Agricultura Urbana "Porcicultura urbana y periurbana en ciudades de América Latina y el Caribe". Primera Edición. Lima Perú. ISBN: 978-9972-668-11-1 pag:34-39.

Castro, G.; Fernández, G.; Delgado, J. y Rodríguez, D. (2004). Contribución al estudio racial del Cerdo Mamellado Uruguayo. *Veterinaria (Montevideo)* 39 (155-156): 11-14.

Christensen, K. y Smedegard, K. (1979). Chromosome markers in domestic pigs. A new C-band polymorphism. *Hereditas* 90(2), 303-304.

Ciobanu, D., Day, A., Nagy, A., Wales, R., Rothschild, M y Plastow. G. (2001). Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DNA markers. *Genet. Sel. Evol.* 33:417-432.

Claros Díaz, M. G. (1998). Marcadores Moleculares: que son, como se obtienen y para que valen. Encuentros en la Biología. Universidad de Málaga 49.

Danielak-Czech B y Slota E. (2004). Mutagen-induced chromosome instability in farm animals. J. Anim Feed Sci. 13:257-267.

Delgado, J. (2002). Gestión genética de las poblaciones. Jornadas Iberoamericanas sobre la Mejora y Conservación de Razas Ganaderas Locales para el Desarrollo Rural Sostenible. Antigua-Guatemala: 12-37.

Eldrige, F.E. (1985). Cytogenetics of Livestock. The AVI Publishing Company, INC. Wesport, Connecticut. Págs. 219, 220, 223-226, 230-233.

Giuffra, E.; Kijas, J.M.H.; Amarger, V.; Carlborg, Ö.; Jeon, J.T. y Andersson, L. (2000). The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. Genetics 154: 1785-1791.

Gustavsson, I., y Settergren, I. (1983). Reciprocal chromosome translocations and decreased litter size in the domestic pig. J. Dairy Sci 66 (Suppl.1), 248.

Halnan, C. (1989). Cytogenetics of animals. Ed. University of Sidney. 1-570.

Institut Technique du Porc. (1997). Manual del Porcicultor. Edición en lengua española. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Págs: 3, 20, 23, 25-27, 31, 32, 37, 67, 70.

Jiang Z.H. y Gibson J.P. (1999). Genetic polymorphisms in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. Mammal. Genome, 10, 191-193.

Kennes Y.M.; Murphy B.D.; Pothier F. y Palin M.F. (2001): Characterization of swine leptin (*LEP*) polymorphisms and their association with production traits. Anim. Genet., 32, 215-218.

Kmieć, M.; Kulig, H. y Konik, A. (2003). Preliminary results on associations between leptin gene (*LEP*) and some reproduction performance traits of boars. Arch. Tierz., Dummerstorf 46 1:63-70.

Krenkova, L.; Kuciel, J y Urban., T. (1999). Association of the RYR1, GH, LEP and TF genes with carcass and meat quality traits in pigs. Czech J. Anim. Sci, 44: 481-486.

Llambí, S. (2002). Citogenética animal. Fragilidad cromosómica en mamíferos. Boletín de Divulgación Científica. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Edición Digital. Depósito legal 328.836.

Madan, K.; Ford, C.E. y Polge, C. (1978). A reciprocal translocation t(6p+; 14q-) in the pig. J. Reprod. Fertil. 53(2), 395-398.

Miyake, Y.-I.; Kawata, K.; Ishikawa, T. y Umeza, M. (1977). Translocation heterozygosity in a malformed piglet and its normal littermates. Teratology 16(2), 163-168

Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N. y Carrera, A. (2004). Marcadores Moleculares, En: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L.; (Eds). Biotecnología y Mejoramiento vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina. pp 61-68.

Pintado, E. y Morón, F. (2001). Metilación y expresión del gen FMR1. Rev. Neurol. 33:57-62.

Pinheiro Machado, L. C. (1973). Los cerdos. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. Págs: 13-18, 33, 95-97, 118, 144.

Riggs, P.K.; Kuczek, T.; Chrisman, C.L. y Bidwell, C.A. (1993). Analysis of aphidicolin-induced chromosome fragility in the domestic pig (*Sus scrofa*). Cytogenet Cell Genet 62:110-116.

Rønne, M. (1995). Localization of landmarks and bands in the karyotype of *Sus scrofa domestica*. Comparison between different classifications. Hereditas 123 (2): 155-68.

Stratil, A.; Peelman, L.; Van Poucke, M. y Cepica, S. 1997. A *HinfI* PCR-RFLP at the porcine leptin (*LEP*) gene. Animal Genetics 28: 371-372.

Sutherland, G. y Hecht, F. (1985). Fragile Sites on human chromosomes. New York: Oxford University Press. Vol. 13.

Urban, T.; Kuciel, J. y Mikolasova, R. (2002). Polymorphism of genes encoding for ryanodine receptor, growth hormone, leptin and MYC protooncogene protein and meat production in Duroc pigs. Czech J. Anim. Sci., 47(10): 411-417.

Urban, T y Mikolasova, R. (2006). Genetic variability in the leptin, leptin receptor and heart fatty acid binding protein genes in pigs. Acta fytotechnica et zootechnica 29: 29-31.

Vadell, A.; Barlocco, N.; Methol, R; Vaselli, M. y Castillos, A. (1994). Diagnóstico de la producción porcina en el departamento de Rocha. PROBIDES/UDELAR. Uruguay:44.

Zlotorynski, E.; Rahat, A.; Skaug, J.; Ben-Porat, N; Ozeri, O; Hershberg, R; Levi, A; Scherer, W; Marrgalit, H; Kerem, E. (2003). Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile Sites. Mol Cell Biol. 23(20): 7143-7151.

<http://www.unorte.edu.uy/amga/multimedia/suinos>

AGRADECIMIENTOS

- A mis tutores, Dra. Silvia Llambí y Dr. Miguel de Bethencourt, por permitirme realizar esta pasantía, por su apoyo y disponibilidad en el transcurso de la misma.
- A la Dra. Rosa Gagliardi y al Br. Rody Artigas por su colaboración en las extracciones de ADN.
- A la Br. Wanda Iriarte por sus aportes en tareas de laboratorio.
- En general a todo el grupo de trabajo del Área Genética de Facultad de Veterinaria, tanto por su ayuda en el laboratorio como por su compañerismo.
- Al Dr. Gustavo Castro por cedermme muestras de pelo para el estudio molecular y por las fotos de cerdos.
- Al Dr. Vargas, a la Dra. H. Cardozo y al Dr. Salles por las muestras sanguíneas de cerdos para el estudio citogenético.
- A mi familia, a mis amigas y a Christian por la confianza y el apoyo incondicional a lo largo de estos años.