



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Identificación del Polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R en cerdos Landrace
y Pelón Mexicano mediante PCR—RFLP”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

GODINEZ ALVARADO ELDA DEL ÁNGEL

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

COASESORA: M. EN C. ANA ELVIA SÁNCHEZ MENDOZA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE MEXICO

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación del Polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R en cerdos Landrace y Pelón Mexicano mediante PCR-RFLP.

Que presenta la pasante: Elda del Ángel Godínez Alvarado
Con número de cuenta: 310744737 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba
en las estrellas. Ahora sabemos que está en
nuestros genes”

James Watson

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, GRACIAS por el don de la vida, por todas las bendiciones recibidas, por mantenerme de pie y por permitirme lograr una meta más.

A mis padres **Elda y Jose Daniel**, GRACIAS por mostrarme el camino correcto y guiarme por él, porque con su comprensión, confianza y todo su amor incondicional son mi gran fortaleza, por darme todo sin pedir nada, porque siempre buscan lo mejor para mí, sin ustedes nada de lo que tengo fuera posible. Hoy este éxito es de ustedes también y puedo decir con mucho orgullo: ¡Lo logramos!

A mi hermano **Daniel**, por compartir conmigo esta etapa universitaria, por enseñarme que todo puede funcionar si buscas la manera. GRACIAS por todo tu cariño y apoyo.

A mi novio **Jose Juan**, por todo el amor y apoyo brindado durante el tiempo juntos, por impulsarme a continuar cuando no podía seguir. GRACIAS ayudarme a ser una mejor persona y por siempre estar para mí.

A mis amigos **Diana, Elihu y Alejandra** por hacer de esta etapa la mejor de mi vida, por nunca soltarme y apoyarnos hasta el final. GRACIAS por su paciencia, sus palabras de aliento y sobre todo por su amistad.

A mis **abuelitos, tíos y primos**, GRACIAS por sus enseñanzas, por creer en mí y por llenar mi vida de alegría.

A mi asesor de tesis el **Dr. Francisco Montiel**, GRACIAS por la asesoría y el apoyo brindado durante este proyecto.

A mi coasesora la **Maestra Ana**, GRACIAS por su paciencia, por sus consejos brindados y por ser un ejemplo de superación para mí.

A mis **sinodales**, GRACIAS por la dedicación, su tiempo, por sus aportaciones y observaciones realizadas para la mejora de este trabajo.

GRACIAS a la **UNAM**, especialmente a la **FES-Cuautitlán** por todos los conocimientos que me ha permitido adquirir y por ser el lugar que donde decidí el rumbo que tomaría mi vida.

Agradezco a mis profesores y a todas las personas que han estado presentes en mi vida, por llenarme de buenas experiencias y valiosos conocimientos.

DEDICATORIAS

Este trabajo quiero dedicarlo a quienes siempre han confiado en mí, me han apoyado y me brindan su amor incondicional, a mis padres y a mi hermano Daniel. Todos mis logros no fueran posibles sin la presencia de ustedes en mi vida.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Elda del Ángel Godínez Alvarado

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES DE LA CARNE DE PORCINO	4
1.1 LA CARNE.....	4
1.2 CARNE DE CERDO	5
1.3 CARNE DE PORCINO EN MÉXICO Y EN EL MUNDO.....	6
1.3.1 EN MÉXICO	6
1.3.2 EN EL MUNDO	8
1.4 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LA CARNE.....	10
1.4.1 COLOR.....	10
1.4.2 TERNEZA DE LA CARNE.....	11
1.4.3 JUGOSIDAD	11
1.4.4 AROMA Y SABOR	12
1.4.5 TEXTURA.....	12
1.4.6 VETEADO.....	12
1.5 CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE ASOCIADA A LA CALIDAD.....	13
1.5.1 ANTE-MORTEM.....	13
1.5.2 MORTEM.....	14
1.5.3 POST-MORTEM.....	14
1.6 DIFERENCIAS ENTRE CERDOS LANDRACE Y PELÓN MEXICANO.....	15
CAPÍTULO 2. GENÉTICA.....	18
2.1 INTRONES Y EXONES	18
2.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	19
2.3 POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP).....	19
2.3.1. TIPOS DE SNP.....	20
2.4 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	21
2.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	23

2.5.1 FUNDAMENTO DE LA PCR	23
2.5.2 COMPONENTES DE LA PCR.....	24
2.5.3 ETAPAS DE LA PCR	26
2.5.4 APLICACIONES DE LA PCR	28
2.6 TÉCNICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS	29
2.6.1 POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)	30
2.7 GENES IMPLICADOS EN LA CALIDAD DE LA CARNE	31
2.8 GEN MC4R Y EL POLIMORFISMO EN GANADO PORCINO	33
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	37
3.1 JUSTIFICACIÓN	37
3.2 HIPÓTESIS.....	37
3.3 OBJETIVO GENERAL.....	38
3.3.1 OBJETIVO PARTICULAR 1	38
3.3.2 OBJETIVO PARTICULAR 2	38
3.3.3 OBJETIVO PARTICULAR 3	39
3.3.4 OBJETIVO PARTICULAR 4	39
3.4 CUADRO METODOLÓGICO	40
3.5 MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	41
3.5.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN	43
3.5.3 ELECTROFORESIS PARA LA INTEGRIDAD DEL ADN	44
3.5.4 PCR.....	46
3.5.5 ELECTROFORESIS	47
3.5.6 RFLP	47
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
OBJETIVO PARTICULAR 1	50
OBJETIVO PARTICULAR 2	52
OBJETIVO PARTICULAR 3	55
OBJETIVO PARTICULAR 4	57
CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	61

CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	70
ANEXO 1. EVALUACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMPLIFICACIÓN	70
ANEXO 2. CÁLCULO DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microestructura del tejido muscular.....	5
Figura 2. Volumen de la producción nacional 2006-2015 (miles de toneladas)..	6
Figura 3. Principales entidades productoras de carne de porcino en 2015.	8
Figura 4. Producción mundial de carne de cerdo 2006-2016..	9
Figura 5. Principales cambios en el músculo después de la muerte.	15
Figura 6. Cerdo Landrace..	16
Figura 7. Cerdo Pelón Mexicano.	16
Figura 8. Estructuras de un gen.	18
Figura 9. Clasificación de SNP's de acuerdo con su localización en el genoma. E: Exones; I: Intrones; UTR: Regiones no codificantes Fuente: Cargill M, 1999.....	21
Figura 10. Posibles extremos resultantes de la restricción de endonucleasas; a) extremos pegajosos o cohesivos, ideales para la clonación molecular; b) extremos romos..	22
Figura 11. Representación esquemática de: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR. B. Fases de la PCR. C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (la cadena recién formada se representa de color más claro). Fuente: Stock Silberman, 2016.	27
Figura 12. Secuencias parciales del gen MC4R porcino. La sustitución de G→A del producto PCR es marcada con una flecha. La traducción de aminoácidos muestra una substitución del aminoácido en el codón 298. El esquema representa la estructura de MC4R y localización de la mutación.....	35
Figura 13. Método para la extracción de ADN.....	42
Figura 14. Diagrama para la cuantificación de ADN.	44
Figura 15. Cámara de electroforesis.	45
Figura 16. Muestras para electroforesis.....	45
Figura 17. Electroforesis corriendo.	46
Figura 18. Transiluminador de luz U.V.....	46
Figura 19. Sitio de corte de la enzima Taq I.....	48
Figura 20. Patrón de cortes de la enzima Taq I. MP: Marcador de peso molecular 50pb, P: Individuo con presencia de polimorfismo, SP: Individuo sin presencia de polimorfismo, H: Individuo heterocigoto.	49
Figura 21. Programa de la PCR con Tm calculada.....	51
Figura 22. Gel de Agarosa al 1.5% para la prueba de especificidad. MP: marcador molecular, B: Blanco, C+: Control positivo, TV: Tomate Verde, F: Fresa, T: Tiburón, D: Delfín, Bo: Bovino.....	53
Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% para evaluar las muestras Landrace M1, M2, M3 M4 Y M5. MP: Marcador de peso molecular 100pb, C+: Control positivo, B: Blanco.	54

Figura 24. Gel de agarosa al 1.5% para evaluar la PCR en las muestras Pelón Mexicano PM6, PM7, PM8, PM9 y PM10. MP: Marcador de peso molecular 100pb, C+: Control positivo, B: Blanco.	54
Figura 25. Gel de Poliacrilamida al 12% en el que se visualizan los resultados de RFLP para las muestras M1, M2, M3, M4 y M5.	55
Figura 26. Gel de Poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP para las muestras M6, M7, M8, M9 y M10.	56
Figura 27. Gel de Poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP para las muestras PM1, PM2, PM3 y PM4.	56
Figura 28. Gel de Poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP para las muestras PM5, PM6, PM7, PM8, PM9 y PM10.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de diversas carnes.	6
Cuadro 2. Diferencias entre subespecies Landrace y Pelón Mexicano.	16
Cuadro 3. Genes asociados con la calidad de la carne.	32
Cuadro 4. Ubicación cromosómica de los genes MCR en especies de mamíferos.	34
Cuadro 5. Proporciones por muestra.	47
Cuadro 6. Primers utilizados en la experimentación.	50
Cuadro 7. Resultados obtenidos de la extracción del ADN para las muestras Landrace y Pelón Mexicano. M1-10: Landrace; PM1-PM10: Pelón Mexicano.	52
Cuadro 8. Resultados para la presencia del polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R para muestras Landrace.	57
Cuadro 9. Resultados para la presencia del polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R para muestras pelón mexicano.	58
Cuadro 10. Comparación de la presencia del polimorfismo 1426 G/A en las muestras Landrace y Pelón Mexicano.	58

RESUMEN

En este trabajo se realizó una investigación acerca de las características que afectan la calidad de la carne de cerdo (Landrace y pelón mexicano), así como los genes que están asociados a estas características.

La interacción entre melanocortinas y sus receptores en el hipotálamo es una de las principales vías neuroendocrinas de control del balance de energía (Wardlaw, 2001). Una de las moléculas más importantes de esta vía es el receptor de melanocortina-4 (MC4R), un receptor acoplado a proteína G, que es un importante mediador de los efectos de la leptina sobre la ingesta de alimentos y la homeostasis de la energía (Seeley et al., 1997; Marsh et al., 1999). Se ha identificado un polimorfismo en el gen MC4R, que resulta en la sustitución de un ácido aspártico (Asp) por una asparagina (Asn) en la posición 298 de la secuencia de aminoácidos de la proteína, que ha demostrado estar asociado con la velocidad de crecimiento, consumo de alimento y espesor de grasa dorsal en cerdos (Kim et al, 2000; Hernández-Sánchez et al., 2003).

Para evaluar la presencia de dicho polimorfismo en muestras de cerdos Landrace y Pelón mexicano se analizaron 20 muestras: 10 Landrace y 10 pelón mexicano, a las cuales se les aplicó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se llevó a cabo la detección del polimorfismo utilizando RFLP.

De acuerdo a los resultados obtenidos se obtuvo que el polimorfismo 1426 G/A no tiene presencia diferente entre los subgéneros Landrace y Pelón Mexicano, debido a que 11 de los individuos no presentaron el polimorfismo y las muestras restantes fueron heterocigotos.

INTRODUCCIÓN

La carne de cerdo está considerada una de las tres principales carnes rojas (junto con la carne de bovino y cordero) en la dieta de los mexicanos; su consumo es fundamental para el desarrollo y sano crecimiento del humano en etapas tempranas, ya que es rica en proteínas, minerales (hierro y zinc) y vitaminas del complejo B (Cortés y otros, 2012).

La carne según la Norma Oficial Mexicana 194 se define como la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano (NOM-009-Z00-1994). En general, la composición de la carne se establece durante la vida del animal, mientras que su calidad se ve fuertemente afectada por factores ante-mortem y post-mortem (Hernández y otros, 2007).

Aunque, la importancia de los diferentes aspectos cualitativos de la calidad de la carne difiere en función del segmento de la cadena cárnica en que se analice (producción, industrialización o comercialización). Los atributos organolépticos son de gran importancia para el consumidor cuando se habla de carne fresca. El consumidor asocia, como atributos de calidad de la carne, el color (intensidad y coloración), la terneza, la jugosidad, la apariencia (grasa intramuscular, veteado, exudación), el sabor y el aroma. Estos atributos están influenciados por factores como la raza, la edad, la dieta, los procesos de matanza, las características intrínsecas del músculo y tejido conectivo, intensidad de proteólisis post-mortem en las células musculares, factores genéticos y temperatura de cocción de la carne (Hernández y otros, 2007).

En el sector porcino se está comenzando a aplicar la selección asistida por marcadores para mejorar la calidad y rendimiento de los animales. Los SNPs (single nucleotide polymorphisms) son los marcadores moleculares que se están utilizando en la evaluación de estos caracteres. Aunque se han detectado miles de lugares polimórficos SNPs en porcino (USMARC, NCBI SNP database), sólo unos pocos se han asociado con caracteres económicamente importantes. Uno de los más sólidamente fundados es el gen del receptor 4

de la melanocortina (MC4R), que se expresa en el cerebro produciendo una proteína implicada en la regulación del balance energético de los mamíferos (Óvilo et al, 2006).

El receptor 4 de la melanocortina (MC4R) es una de las moléculas relacionadas con la regulación del comportamiento alimentario y el peso corporal. El gen que codifica esta proteína se considera, por tanto, candidato para caracteres de engrasamiento y crecimiento. En este gen, Kim et al. (2000) detectaron una sustitución nucleotídica G1426A no sinónima (Asp298Asn) en la secuencia del gen (GenBank AB021664), que ha mostrado una asociación significativa con el espesor del tocino dorsal, el crecimiento y el consumo de alimentos.

En este trabajo se pretende evaluar la presencia de dicho polimorfismo en cerdos Landrace y Pelón Mexicano debido a la relación observada entre la genética y la ganancia de peso corporal (Kim et al, 2000; Óvilo et al, 2006); debido a que estas subespecies son las más utilizadas para la producción de carne de cerdo en México (SIAP, 2016) es importante estudiar los posibles efectos de los genes en la calidad de carne para futuras aplicaciones.

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES DE LA CARNE DE PORCINO

1.1 LA CARNE

La ganadería es una práctica económica antigua que consiste en la crianza de animales para su aprovechamiento. Se define como una actividad del sector primario que se refiere al cuidado y alimentación de cerdos, vacas, pollos, borregos, abejas, etcétera, para aprovechar su carne, leche, huevos, lana, miel y otros derivados. Por su modo de producción se clasifica en intensiva y extensiva, la primera es en la que los animales reciben alimento procesado en establos, donde se aplica tecnología para tener mayor producción y la segunda se realiza en terrenos grandes, ya que los animales pastan (INEGI ,2011).

Por otro lado, la carne es la estructura muscular estriada esquelética acompañada o no de tejido conectivo hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos: provenientes de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas (NOM-194-SSA1-2004).

El tejido muscular de la carne de mamíferos está formado por células gigantes (Figura 1), denominadas fibras que miden desde 1mm hasta varios cm de largo, las cuales se mantienen unidas y envueltas por una membrana de tejido conjuntivo, llamada sarcolema o estroma. Dentro de las fibras y bañándose en el líquido o sarcoplasma que las llena se encuentran numerosas miofibrillas de sólo 1 micrómetro (milésimo de mm) de diámetro y que constituye el sistema contráctil de los músculos (Pamplona, 2008).

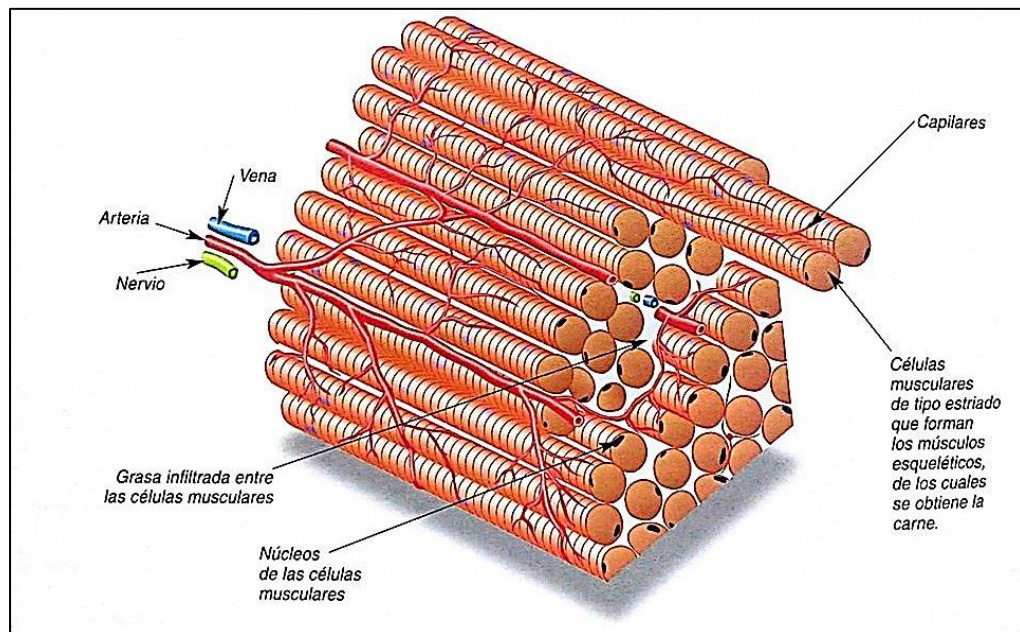


Figura 1. Microestructura del tejido muscular. Fuente: Pamplona, 2008.

La composición del tejido muscular varía con la edad, el género, especie y estado de nutrición, pero las proteínas constituyen la fracción más importante de la materia seca (Guerrero, 2006).

1.2 CARNE DE CERDO

La carne de cerdo proviene del animal de la familia *Sus scrofa*. Los cerdos se han domesticado para su consumo desde tiempos prehistóricos. Se registra su uso como alimento ya en el año 3400 a.C., en Egipto y en 2900 a.C., en China. La carne de cerdo tiene una consistencia blanda y es de fibra fina, con un color rosa pálido o bien gris claro. Además de ser una buena fuente de proteínas de alta calidad (Cuadro 1) contiene vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B6 (piridoxina), B12 (cianocobalamina), potasio, hierro (contiene 50% más que la carne de pollo), magnesio, fósforo, zinc, calcio, y la carne baja en grasa contiene 69 mg de colesterol por cada 100 g (Pamplona, 2008).

Cuadro 1. Composición química de diversas carnes. Fuente: Rubio et al, 2013.

Carne	Agua	Proteínas	Grasas	Cenizas
Vacuno	60	33	6	1
Cerdo	73	22	3	2
Pollo	69	21	9	1

1.3 CARNE DE PORCINO EN MÉXICO Y EN EL MUNDO

1.3.1 EN MÉXICO

De acuerdo con las estadísticas mostradas en la Figura 2, la producción de carne de cerdo en México ha crecido a una tasa promedio anual de 2.0 por ciento en el periodo de 2006 a 2015. Se pronostica que la producción nacional de carne de cerdo durante 2016 se ubique en 1.36 millones de toneladas, es decir, un crecimiento anual de 3.2 por ciento. Destaca la mayor productividad inducida por mejoramiento genético en el pie de cría (SIAP, 2016).

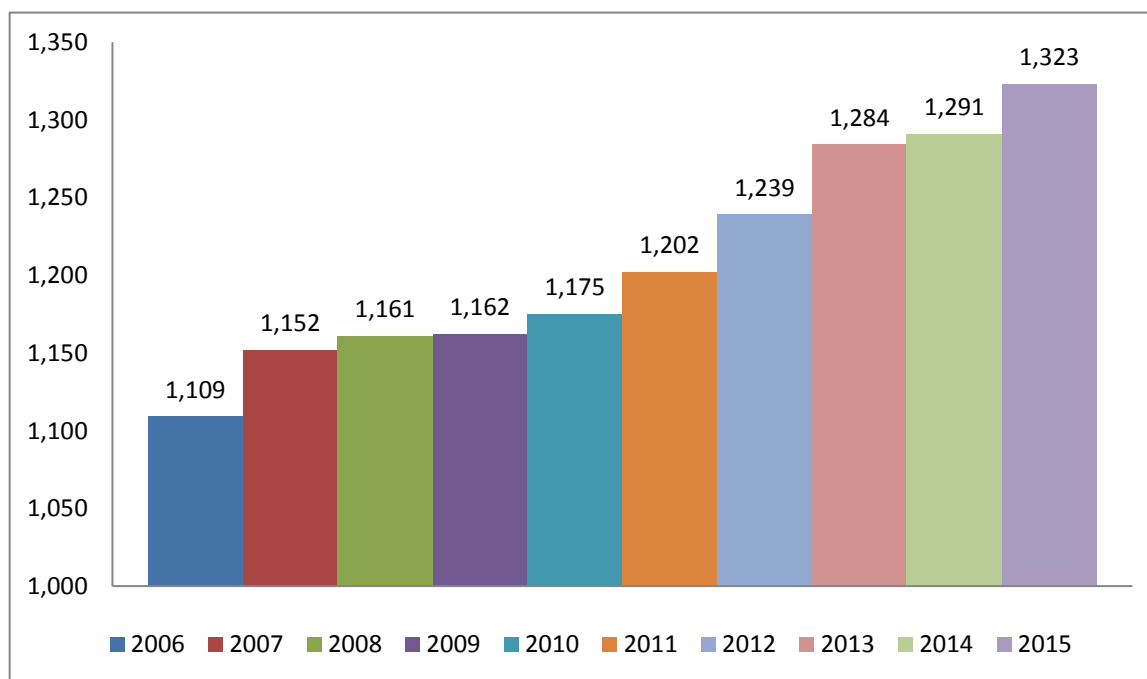


Figura 2. Volumen de la producción nacional 2006-2015 (miles de toneladas). Fuente: SIAP, 2016.

En el consumo total de la carne en México, el primer lugar lo ocupa la carne de ave (47.5%), seguido por la de cerdo (27.1%), en tercer puesto la carne de bovino (23.2%) y en cuarto lugar encontramos a la de pavo (2.15%) (COMECARNE, 2016). En cuanto al consumo per cápita de carne de cerdo, éste se ha incrementado en los últimos quince años, dado que en el 2000 el mexicano promedio consumió 11.6 kg, y en 2015, el consumo fue de 16.3 kg. Se estima que en 2016 el consumo nacional aparente de carne de cerdo se ubique en 1.98 millones de toneladas, provenientes en su mayoría de producción nacional (FIRA, 2016).

Desde los años 70's los cerdos se han localizado en 6 zonas productoras (SAGARPA, 2009):

- a) Noreste
- b) Noroeste
- c) Bajío
- d) Central
- e) Sureste
- f) Península de Yucatán

Sin embargo, en los últimos años la porcicultura en México se ha modificado tanto en su localización como en los sistemas productivos como se muestra en la Figura 3. En cuanto a su localización se observa, por ejemplo, que la zona del Bajío se ha observado la principal área de concentración de granjas localizada en La Piedad, Michoacán ha disminuido su inventario y tiende a moverse a nuevas zonas, entre las que se tiene a los estados de Aguascalientes y Zacatecas. En la actualidad la porcicultura del Bajío se puede denominar como la zona del Occidente (SIAP, 2009).

En este sentido, la porcicultura a principios de la presente década aportaba el alrededor del 24% del total nacional, en contraposición la carne de pollo, que en el 2000 aportó el 41%, en el 2008 incrementó su participación al 47%. Como se ha señalado; los

cambios en el entorno económico de la porcicultura han tenido impactos de diferente magnitud a nivel del tipo de productor y a nivel de los diferentes estados (SAGARPA, 2009).

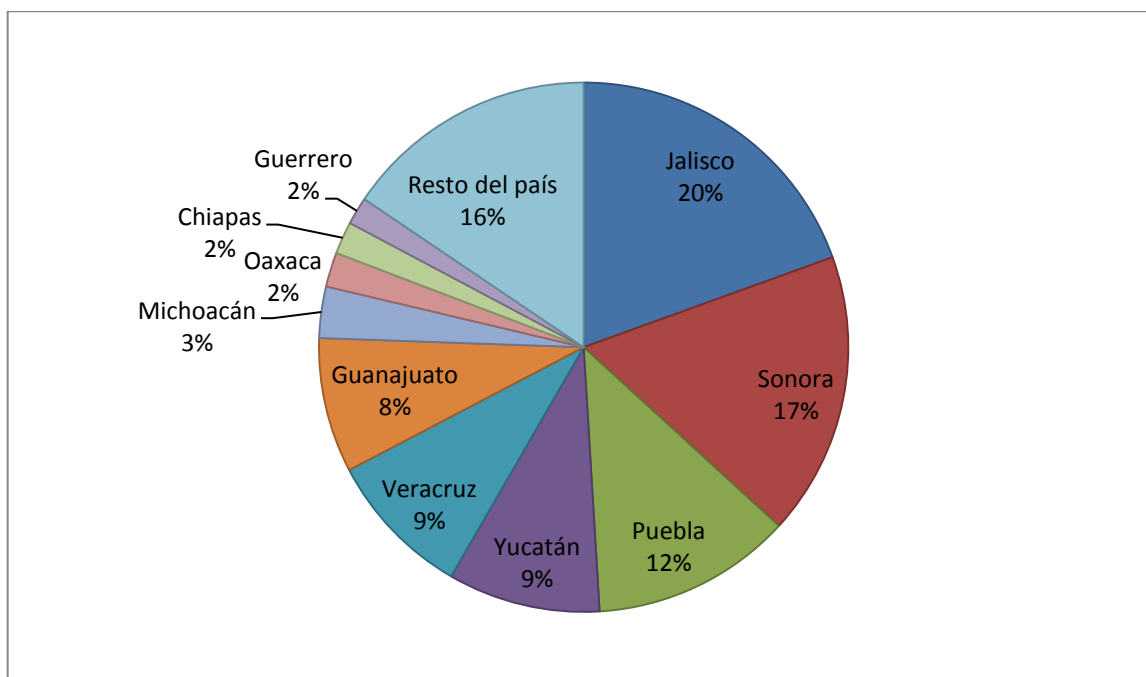


Figura 3. Principales entidades productoras de carne de porcino en 2015. Fuente: SIAP, 2016.

Se espera que la carne de cerdo siga siendo una alternativa de menor costo en relación con la carne de res, y presente precios competitivos respecto a la carne de ave. Dado que los consumidores son cada vez más conscientes de que los sistemas de producción porcina son tan fiables como los de carne de ave y de carne de res, el cerdo continúa ganando la confianza del consumidor como una fuente saludable de proteína animal (SIAP, 2016).

1.3.2 EN EL MUNDO

El cerdo doméstico (*Sus scrofa spp*) es explotado en todo el mundo en los países cuya religión y cultura lo permiten. Según los datos de FIRA para 2016 (Figura 4), se pronostica que la producción mundial de carne de cerdo alcance 109.3 millones de toneladas, lo que representaría una disminución anual de 0.9 por ciento con respecto a la producción del año previo. Lo anterior debido, principalmente, a la disminución anual de 2.5 por ciento en la

producción de China, líder mundial en este sector. Para la Unión Europea también se prevé una disminución anual en la producción de 0.5 por ciento en 2016. Cabe resaltar que en 2015 la producción de carne de cerdo en esta región alcanzó el máximo nivel del que se tenga registro, por lo que la producción de 2016 se ubicaría como la segunda más grande de la historia.

Por otro lado, se espera un crecimiento anual en la producción de Estados Unidos de 1.9 por ciento, en Brasil de 2.6 por ciento y en Rusia de 2.3 por ciento. En su conjunto, los principales cinco países productores aportan el 86.3 por ciento de la oferta mundial del cárnico. La producción de carne de cerdo en Estados Unidos alcanzaría 11.3 millones de toneladas en 2016, derivado de menores costos y amplia disponibilidad de granos forrajeros, así como por una sólida demanda de este producto. Para el caso de México, se espera que la producción aumente a tasa anual, de forma que nuestro país se consolidará como noveno productor a nivel mundial con una participación de 1.3 por ciento del total (FIRA, 2016).

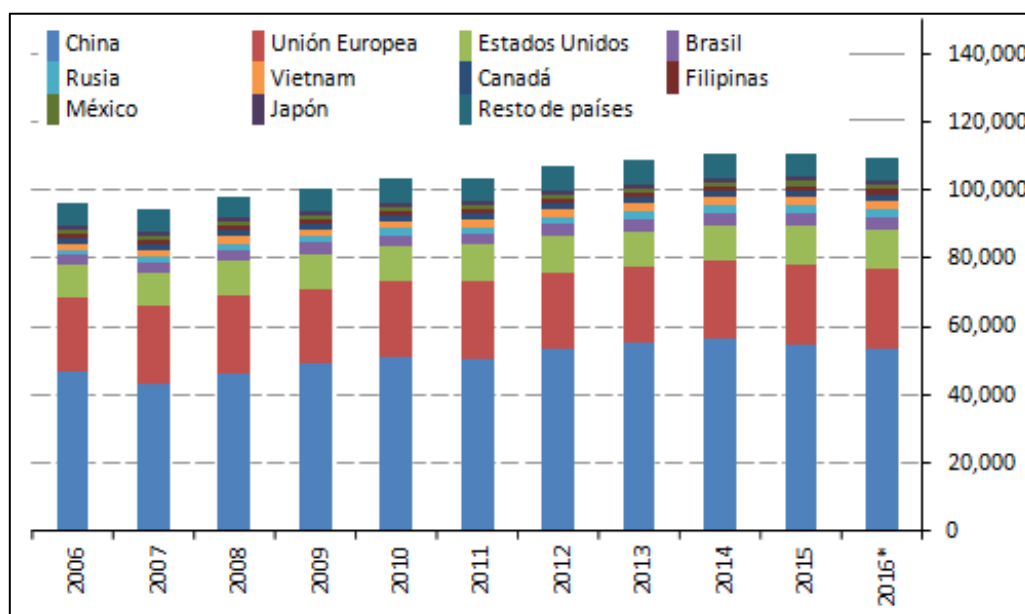


Figura 4. Producción mundial de carne de cerdo 2006-2016. Fuente: SIAP, 2016.

En cuanto a las tendencias durante la década reciente, destaca que la producción mundial de carne de cerdo creció a una tasa media anual de 1.6 por ciento entre 2006 y 2015.

En la mayoría de los principales países productores se presenta la misma tendencia. Destaca el caso de Rusia, ya que entre 2006 y 2015 la producción de carne de cerdo creció a una tasa media anual de 6.8 por ciento; le siguen Vietnam, con el 3.3 por ciento; Brasil, con el 2.5 por ciento; China, con el 1.9 por ciento; Estados Unidos, con el 1.7 por ciento; y la Unión Europea, con 0.6 por ciento promedio anual. Para 2016, se espera un decremento anual de 0.9 por ciento en la producción mundial del cárnico (FIRA, 2016).

En los últimos años, la participación de los principales países productores de carne de cerdo en el total mundial se ha mantenido relativamente estable. De forma que alrededor del 86 por ciento de la producción mundial se concentra en cinco países: China, que participa con casi la mitad de la producción mundial; Unión Europea, que participa con alrededor de 20 por ciento del total mundial; Estados Unidos, con una participación cercana a 10 por ciento del total; y con menores participaciones se encuentran Brasil y Rusia (FIRA, 2016).

1.4 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LA CARNE

Las características organolépticas son el conjunto de propiedades perceptibles por los sentidos que demandan y cuantifican los consumidores directamente. Las variables más importantes son, el aspecto (color y consistencia de la carne cruda), la textura (terneza y jugosidad) y el sabor (sabor, olor y aroma) (López, 1991) las cuales se describen a continuación.

1.4.1 COLOR

La mioglobina, es la proteína responsable del color rojo. La mioglobina no circula en la sangre, pero se fija en las células del tejido y es púrpura en color. El color restante proviene de la hemoglobina, la cual se encuentra principalmente en la sangre que circula, pero se puede encontrar en pequeñas cantidades en los tejidos después de la matanza. El color de la carne es influenciado por la edad del animal, las especies de animales, el sexo, la dieta y aún el tipo de ejercicio que realiza el animal. La carne de un animal más viejo será más oscura en color, porque el nivel de mioglobina aumenta con la edad. Los músculos ejercitados serán siempre

más oscuros en color, lo cual significa que, dentro del mismo animal, puede haber variaciones en el color de sus músculos (USDA, 2008).

El color óptimo de la superficie de la carne fresca (color cereza-rojizo para la carne de res; rojo cereza oscuro para cordero; rosa-grisáceo para cerdo; y rosa pálido para ternera) es altamente inestable y de corta vida. Cuando la carne es fresca y está protegida del contacto con el aire (como empaques al vacío), ésta tiene el color rojo-púrpura de la mioglobina, uno de los pigmentos claves responsable del color de las carnes. Cuando se expone al aire, la mioglobina forma el pigmento oximioglobina, el cual le proporciona a la carne un color rojo-cereza agradable (USDA, 2008).

1.4.2 TERNEZA DE LA CARNE

La terneza es una de las características sensoriales más importantes de la carne, la cual es considerada en la evaluación de calidad por parte del consumidor, siendo la que determina en mayor medida su aceptación. Es determinada fundamentalmente por las fibras musculares y por el tejido conectivo, compuesto principalmente de colágeno. También se va a ver condicionada por la cantidad de grasa y la cantidad y tipo de enzimas presentes en el músculo. De esta forma, la presencia de grasa infiltrada o veteado contribuye positivamente a la sensación de terneza (Braña Varela, y otros, 2011).

La terneza es un factor importante para determinar la calidad global de productos frescos de la carne de cerdo y es señalado a menudo por los consumidores como un componente importante de la experiencia agradable de su consumo. En los paneles sensoriales, la terneza se correlaciona más con la aceptación general que otras propiedades sensoriales, tales como la jugosidad y sabor (López, 1991).

1.4.3 JUGOSIDAD

La jugosidad de la carne viene determinada por la cantidad de agua retenida por el músculo y por la cantidad de grasa que contiene. De esta forma, la jugosidad comprende dos sensaciones: en primer lugar, la «jugosidad inicial», por el jugo liberado durante la

masticación y en segundo lugar, la sensación de «jugosidad mantenida» por la grasa infiltrada que se funde. Los factores que influyen en la jugosidad serán aquellos que tengan relación con la forma en la que el agua queda retenida en el músculo entre las fibras musculares o directamente unidas a las proteínas y también aquellos que afectan a la cantidad de grasa intramuscular (Medina y otros, 2007).

1.4.4 AROMA Y SABOR

El sabor involucra la percepción de cuatro sensaciones básicas (salado, dulce, ácido y amargo) por las papilas gustativas de la lengua. El aroma se detecta por los numerosos componentes volátiles liberados de la carne que estimula los receptores de la nariz. La carne cruda presenta poco aroma y sabor y solo cuando es cocida o calentada ambos atributos se desarrollan. Existen componentes no específicos comunes a todas las carnes y componentes específicos. Los primeros derivan del calentamiento de los componentes hidrosolubles de bajo peso molecular, tales como los azúcares, aminoácidos, péptidos, nucleótidos y compuestos nitrogenados y los segundos, son atribuidos a la cocción de los lípidos, principalmente los fosfolípidos y en menor medida los triacilglicérols (Warriss, 2000).

1.4.5 TEXTURA

Textura (Condición de humedad): Se trabajan 5 rangos: Rango 1: muy suave y húmeda (músculo de textura abierta), acumulación de fluido en la superficie, se presenta en carnes pálidas. Rango 2: Suave y húmeda. Rango 3: Poco firme y jugosa. Rango 4: Firme y moderadamente seca. Rango 5: Muy firme y seca, estructura rígida y cerrada (sin fluidos en la superficie), asociada a carnes oscuras (López, 1991).

1.4.6 VETEADO

La grasa intramuscular (veteado) es el depósito adiposo que se encuentra asociado a la membrana de los haces musculares (intercelular) o en gotas en las fibras musculares (intracelular). Se observa principalmente en el área del ojo de costilla en un corte hecho entre las costillas duodécima y decimotercera. El veteado es el principal factor a tomar en cuenta

por el consumidor para determinar la calidad de la carne. Mientras el nivel de marmoleo sea mayor, la carne será de mayor calidad, puesto que ésta tendrá mejor sabor y será más jugosa. También asociado por algunos consumidores a un factor de riesgo para la salud (Braña Varela, y otros, 2011).

1.5 CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE ASOCIADA A LA CALIDAD

La calidad de la carne se ve afectada por múltiples factores previos y posteriores a la faena de los animales, pero la alimentación juega un papel determinante en la aptitud tecnológica (consistencia y color de la grasa, estabilidad oxidativa de lípidos y pigmentos), en el valor nutricional (proporción de los diferentes ácidos grasos, tenor graso de la carne) y en los atributos sensoriales de la carne (color, aroma, sabor, jugosidad) (López, 1991).

El proceso bioquímico posterior a la muerte lleva a la transformación gradual del músculo de la carne. Este proceso se puede dividir en tres etapas, 1) ante-mortem caracterizado por que el músculo es aun elástico, 2) mortem y 3) post-mortem. El tiempo en que ocurren dependen de la especie animal y del método de sacrificio. La calidad de la carne depende de las condiciones ante mortem y del manejo post mortem (Guerrero, 2006).

1.5.1 ANTE-MORTEM

Al eliminar la sangre del animal en el sacrificio, la fuente de oxígeno se agota al cesar la respiración, por lo que la única fuente de oxígeno para soportar el metabolismo aerobio es aquel que se encuentra unido a la mioglobina. Posteriormente cuando el oxígeno se agota el tejido muscular adopta un metabolismo anaerobio, siendo la glucólisis la única vía para obtener energía, por lo que disminuyen las reservas de glucógeno y el ácido láctico se acumula en el tejido muscular, lo que reduce el pH de 7 hasta 5.3 a 5.7, según la especie y el manejo anterior al sacrificio. Lo anterior provoca un fallo en los reguladores de temperatura controlados por el hipotálamo, debido a que el mecanismo por el cual el calor se distribuye uniformemente por el cuerpo es la sangre y al dejar esta de circular, ya no hay distribución del calor ni acciones reguladoras como la sudoración o el escalofrío. Entonces se da una

rápida acidificación cuando la temperatura corporal es aun elevada provocando la desnaturalización de las proteínas, la reducción de la solubilidad y la disminución de la retención de agua (Guerrero, 2006).

1.5.2 MORTEM

Posterior a la muerte (Figura 5), se pierde el control nervioso, por lo que se inician rápidos ciclos de contracción y relajación muscular. El rigor mortis se presenta poco después de la muerte donde el tejido muscular se encuentra en un estado de rigidez sostenida y es inextensible. El desarrollo de la glucólisis anaerobia y producción de ácido láctico se acompaña también de la reducción de las reservas fosfato de creatina que disminuyen gradualmente para la refosforilación de ADP a ATP. El ciclo de contracción relajación se detiene por la falla en los mecanismos que sintetizan el ATP, por lo que la elasticidad muscular se pierde paulatinamente hasta llegar a un estado de contracción sostenida por la formación irreversible del complejo de actomiosina (Moreno, 2006). La proteína contráctil actomiosina, está compuesta de actina, miosina y del complejo tropomiosina – troponina. La miosina tiene capacidad ATPasa e hidroliza por lo tanto el ATP en ADP y fosfato, con la consiguiente energía para la contracción muscular. La miosina ATPasa, es activada gradualmente con el descenso del pH acelerando la hidrolisis de ATP. La acción ATPasa de esta proteína es activada por la actina y por la presencia de iones calcio. A su vez la troponina impide la contracción, pero su efecto es inhibido por los iones calcio que son liberados por el retículo sarcoplasmático, resultado de un estímulo nervioso. Por lo tanto, la relajación se inicia ante la reducción de la concentración de los iones calcio. De esta forma la troponina deja de ser inhibida y la miosina ATPasa es desactivada (Guerrero, 2006).

1.5.3 POST-MORTEM

La etapa posterior al rigor mortis es la resolución donde el tejido muscular recupera cierta elasticidad debido a la pérdida de la integridad del tejido, mejorando la textura y formando compuestos precursores del aroma de la carne. El aumento de la suavidad se debe a la degradación de proteínas (Guerrero, 2006).

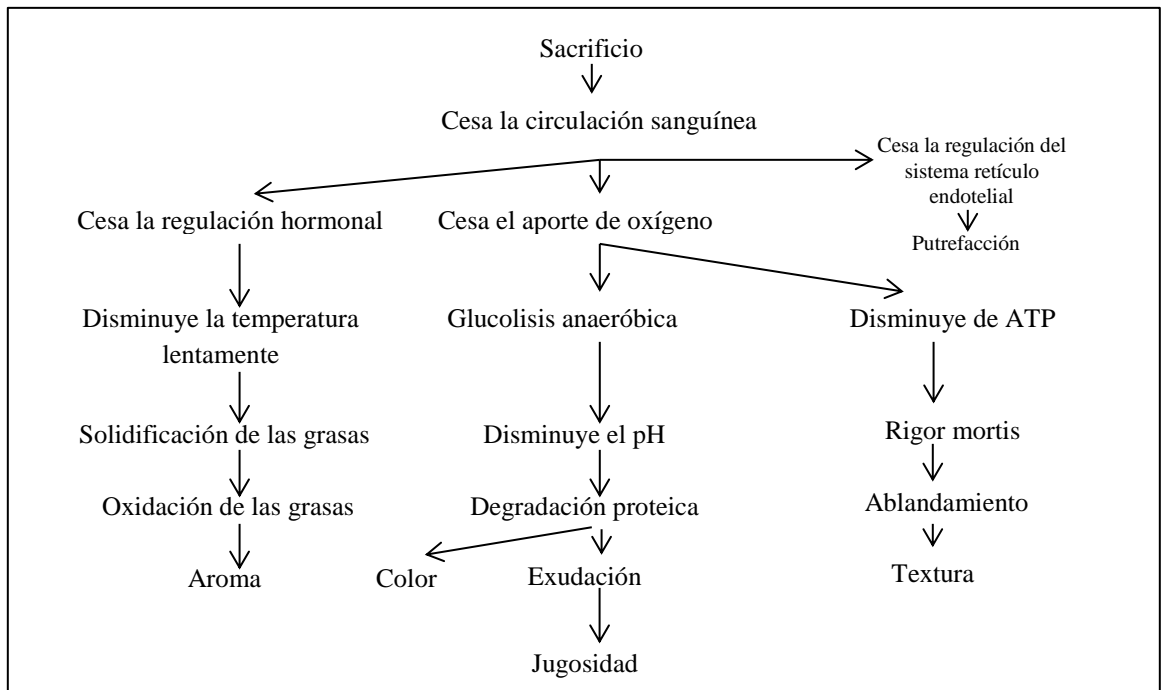


Figura 5. Principales cambios en el músculo después de la muerte (Pamplona, 2008).

1.6 DIFERENCIAS ENTRE CERDOS LANDRACE Y PELÓN MEXICANO

Los cerdos parecen descender de dos suidos (jabalí) salvajes, una especie europea y otra del Sureste asiático; probablemente se domesticaron en China hace unos 9.000 años y más tarde en Europa. Fueron introducidos en América por Cristóbal Colón y los expedicionarios españoles (SAGARPA, 2009).



Existen en el mundo una gran cantidad de razas de cerdos y también muchas líneas genéticas comerciales. Estas razas se tienen clasificadas de diferentes maneras, por ejemplo, existen razas mejoradas que se utilizan en producción comercial y razas autóctonas o criollas que generalmente solo se encuentran en un país o región determinada (Trujillo, 2002).

Otra clasificación es por el color de su capar y el tipo de características productivas que mejoran, así se tienen razas blancas o maternas y razas oscuras o paternas (Trujillo, 2002).

Las razas blancas se caracterizan por una mejor habilidad materna (mayor cantidad de lechones nacidos, destetados y producción de leche), mientras que las razas oscuras por tener mejor velocidad de crecimiento y características de la canal (Trujillo, 2002).

Las diferencias entre las subespecies Landrace (Figura 6) y Pelón mexicano (Figura 7) es por el origen de las razas (Cuadro 2), la primera es originaria de Dinamarca y el pelón mexicano se originó de cerdos Ibéricos y Asiáticos. Las principales diferencias se enuncian en el Cuadro 2 (Trujillo, 2002).

Cuadro 2. Diferencias entre subespecies Landrace y Pelón Mexicano. Fuente: Trujillo. 2002.

LANDRACE	PELÓN MEXICANO
<ul style="list-style-type: none"> - Origen: Dinamarca -Color: Blanca -Orejas: Grandes y caídas al frente -Perfil: Recto largo 	<ul style="list-style-type: none"> -Origen: México -Color: Gris a negro -Orejas: Grandes ligeramente caídas -Perfil: Recto largo -Tamaño: Pequeño y grasoso
 <p data-bbox="418 1348 776 1413">Figura 6. Cerdo Landrace. Fuente: SAGARPA, 2009.</p>	 <p data-bbox="963 1348 1382 1413">Figura 7. Cerdo Pelón Mexicano. Fuente: SAGARPA, 2009.</p>

La raza Landrace es una raza muy versátil, ya que se utiliza como línea pura, materna o paterna. Sus índices productivos son muy parecidos a la Yorkshire, aunque tienen un mayor rendimiento de la canal y también una mayor longitud de la misma. Está reconocida como de tipo magro, y presenta unos bajos valores de engrasamiento. Es de muy buena musculatura, remarcado por la alta calidad de su canal, alto porcentaje de jamón y

particularmente la producción de tocino. Se emplea en la industria cárnica por su buen rendimiento a la canal, la producción de jamones bien conformados y la calidad de su carne (Trujillo, 2002).

Por otro lado, uno de los principales problemas del Cerdo Pelón Mexicano (CPM) es su valor comercial, ya que al considerarse como “corriente”, y por su alto porcentaje de grasa producida, desmerita su apreciación comercial (Lemus Flores, 2001).

Al probarse recientemente que la calidad de la carne de Cerdo Pelón Mexicano es apropiada para su industrialización, con excelentes productos embutidos tipo Ibérico (Montiel et al, 1997), se presenta una oportunidad para estudiar y difundir la elaboración de estos productos en las comunidades rurales, para crear una cultura de conservación y uso de proteína animal en la alimentación humana, mejorando el nivel de nutrición y beneficiando la preservación y uso de este tipo de cerdo (Montiel et al, 1997).

CAPÍTULO 2. GENÉTICA

La genética es la ciencia que se encarga de estudiar todo lo relacionado con la herencia; entendiéndose como tal la transmisión de caracteres o información de generación en generación (H. Vázquez, 2015).

Debemos recordar que dicha transmisión se efectúa mediante los genes, siendo éstos, fragmentos de ADN que codifican esa información a través de copias de los mismos que constituyen los distintos tipos de ARN. Si el ARN es mensajero, esa información servirá para traducirse en la síntesis de una proteína (H. Vázquez, 2015).

Sabemos que sólo el 5 % del ADN corresponde a genes, mientras que el 95 % restante se denomina ADN intergénico (H. Vázquez, 2015).

2.1 INTRONES Y EXONES

El gen es un fragmento de ADN que sirve para codificar información para la síntesis de macromoléculas (proteínas, ARNr, ARNt, ARNm) que ocupa un locus específico en un cromosoma específico y contiene elementos necesarios para regular su transcripción, como la secuencia de ADN que codifica a la información para la síntesis de proteínas o ácido ribonucleico (ARN) como se muestra en la Figura 8. Los procesos de corte y empalme juegan un papel muy importante para la traducción de una proteína, gracias a las regiones que comprende un gen, así como los intrones y exones que son componentes importantes del gen (A. Pierce, 2009).

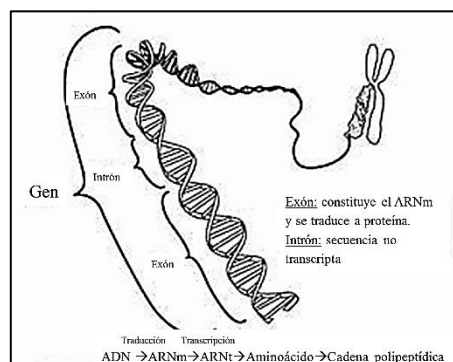


Figura 8. Estructuras de un gen. Fuente: A. Pierce, 2009.

Los genes que codifican para proteínas de los eucariontes contienen las estructuras llamadas “intrones”. Estas estructuras, que son también ADN, están interrumpiendo las regiones del gen que codifican para la proteína y que son llamadas “exones” (Bolívar Zapata, 2007). Por definición un gen termina y empieza con un exón y los intrones son secuencias que son removidas cuando el transcrito primario es procesado (Jiménez y otros, 2004).

2.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

La información genética contenida en el DNA es susceptible de sufrir cambios, los cuales se denominan mutaciones. Las mutaciones son causa de cambios que se heredan y, también, por ello, de la predisposición a enfermedades. Se sabe que todos los organismos experimentan mutaciones en su DNA debido a factores ambientales, tales como la radiación solar, interacción con productos químicos o infecciones virales y también como resultado de errores cometidos al replicar el DNA. Son varios los tipos de cambios que puede sufrir el DNA, y éstos pueden alterar desde un solo nucleótido, hasta cromosomas completos. Alteraciones en la secuencia de los nucleótidos de un gene pueden ocasionar un cambio en la fase de lectura del gene, a nivel del RNA mensajero, y por ello generarse una proteína con su secuencia de aminoácidos diferente, la cual ya no sea capaz de realizar su función original. Sin embargo, puede haber cambios en la secuencia del DNA que no afecten el funcionamiento de la proteína codificada por el gene particular. Estos cambios son responsables de la aparición de los llamados “polimorfismos genéticos” en los genes de una especie (Bolívar, 2007).

2.3 POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP)

Los Polimorfismos más frecuentes son los de posición en una única base en el ADN genómico en el que un nucleótido tiene una diferente secuencia alternativa y son llamados Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP; por sus siglas en inglés de Single Nucleotide Polymorphism), estos están presentes en individuos normales en una población dada y en el cual el alelo más frecuente tiene una abundancia igual o menor al 1%. La mayoría de las

variaciones son los SNP que involucran simples sustituciones de bases, el resto de ellas son inserciones o deleciones. Expresado esto último de manera simple, un SNP es la sustitución de una base de purina o pirimidina en un lugar preciso de la hebra de ADN (Collins, 2001).

Un SNP se detecta por secuenciación de una región particular de diferentes individuos, quienes pueden ser idénticos (homocigotos: T/T o C/C) o diferentes (heterocigotos T/C) en el mismo sitio polimórfico. Una secuencia de ADN es una combinación lineal de cuatro nucleótidos, al comparar dos secuencias, posición por posición, donde se entrecrucen diferentes nucleótidos en la misma posición encontraremos un SNP (González, 2006).

2.3.1. TIPOS DE SNP

Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido; a este tipo de SNP's les conoce como "no sinónimos". Puesto que este tipo de SNP's afecta directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones (Botstein D, 2003).

Asimismo, existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de "splicing" (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas (Lin MT, 2003) (Betticher DC, 1995).

Otro tipo de SNP's son los llamados "sinónimos" (o silenciosos) los cuales no alteran la conformación del gen; sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido (Duan J, 2003).

Según su localización en el genoma, los SNP's se clasifican en (Figura 9): iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en

regiones reguladoras, y gSNP, localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden estar representados por SNP's sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) (Cargill M, 1999).

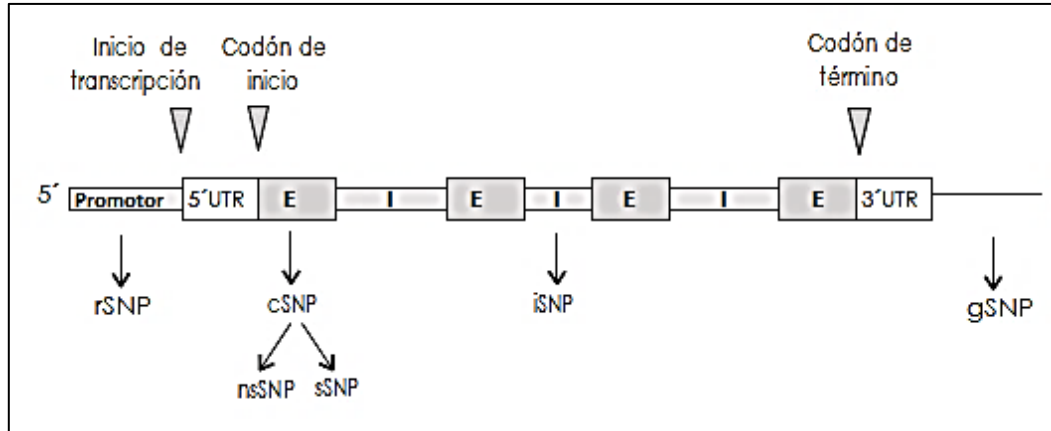


Figura 9. Clasificación de SNP's de acuerdo con su localización en el genoma. E: Exones; I: Intrones; UTR: Regiones no codificantes Fuente: Cargill M, 1999.

2.4 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las nucleasas o enzimas de restricción son proteínas con actividades enzimáticas que permiten a la célula romper uniones covalentes fosfodiéster en las cadenas del ADN y ARN. Existen desoxirribonucleasas las cuales son nucleasas que cortan uniones fosfodiéster en el ADN y ribonucleasas, que cortan ARN; las hay que degradan cadenas dobles o sencillas (Bolívar, 2007). El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria (Dibner & M.D., 1986). Generan fragmentos de ADN conocidos como fragmentos de restricción (Contreras J, 1991).

Estas enzimas se encuentran en muchas especies de bacterias, donde funcionan en vivo como parte de un sistema de restricción y modificación. Este sistema es análogo a un sistema inmune, y le permite distinguir a la bacteria entre su propio ADN y el ADN exógeno, siendo este último degradado por la enzima de restricción (Puerta & Urueña, 2005).

Estas enzimas se han convertido en herramientas fundamentales para la disección in vitro del ADN, ya que las secuencias que reconocen y posteriormente cortan, son generalmente pequeñas secuencias específicas de entre cuatro y ocho pares de nucleótidos en cualquier molécula de ADN. De esta manera con ciertas enzimas es posible cortar o digerir un ADN particular, siempre de la misma manera, en forma reproducible, utilizando la misma enzima de restricción como se muestra en la Figura 10 (Bolívar, 2007).

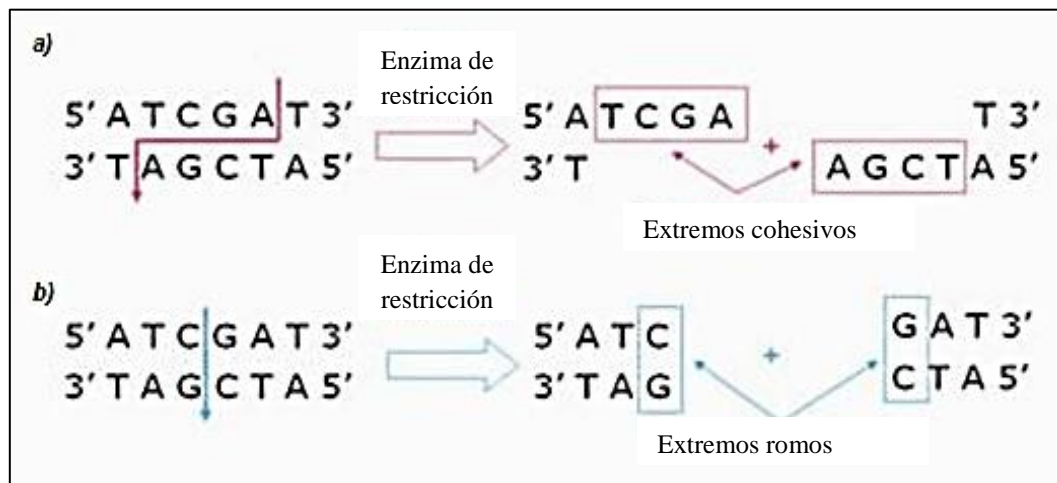


Figura 10. Posibles extremos resultantes de la restricción de endonucleasas; a) extremos pegajosos o cohesivos, ideales para la clonación molecular; b) extremos romos. Fuente: Bolívar, 2007.

Con respecto al tipo de corte que realizan, pueden ser en ambas hebras del ADN, dejando de dos a cuatro nucleótidos sin aparear en cada extremo del corte de cada hebra. Los extremos de estas hebras son conocidos como extremos pegajosos debido a que pueden aparearse entre ellos o con otros extremos complementarios de ADN foráneo. Otro tipo de extremos producidos son los romos, los cuales no generan extremos sin aparear debido a que el corte de los enlaces fosfodiéster se realiza a la misma altura en ambos lados de la doble hélice (Bolívar, 2007).

Las endonucleasas se nombran a partir de las bacterias de las que son extraídas, su nombre está dado según el género y la especie de la bacteria de donde se aisló por primera vez esta enzima. La primera letra representa el género de la bacteria, las próximas dos indican

la especie, una cuarta letra indica la cepa, y un número al final indica la cantidad de enzimas que se han aislado de esa cepa. Ej: *Eco RI*. E = género *Escherichia*, Co = especie *coli* R = cepa RV 13, I = primera endonucleasa aislada de esta cepa (Contreras J, 1991).

2.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR es un método que permite clonar fragmento de ADN sin utilizar células, es rápido y sensible. También es estándar. Es un procedimiento *in vitro* para amplificar secuencias definidas de ADN blanco. Además de que permite amplificar fragmentos de ADN mil millones de veces en unas pocas horas. Puede utilizarse con cantidades extremadamente pequeñas de ADN original, incluso una sola molécula (Pierce, 2010).

La replicación de una molécula ocurre mediante una reacción en la que un par de primers (pequeñas secuencias de nucleótidos sintéticos escogidos con secuencias complementarias a los finales opuestos de las cadenas simples del fragmento de ADN seleccionado) dirigen la síntesis de millones de copias del fragmento de interés (Sambrook, 2001) (Tamarin, 1996).

Para que esto suceda, es necesaria la presencia de una enzima: la ADN- polimerasa, misma que se encarga de catalizar la replicación del ADN mediante la adición de nucleótidos complementarios de la hebra molde del ADN a un extremo 3' libre de la hebra naciente. Esta enzima requiere además de ADN molde, el cual se denomina primer o cebador, es decir un fragmento de ADN monocatenario que hibride con el ADN molde, y que suministre el extremo 3' libre a partir del cual ocurre la polimerización (Hernández, 2007).

2.5.1 FUNDAMENTO DE LA PCR

La amplificación de ADN por PCR corresponde a una reacción enzimática ejecutada por alguna ADN polimerasa; esta clase de enzimas cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de ADN a elongar (el iniciador) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) entrante (Innis, 1995) (Newton, 1995).

La elección de cada nucleótido a incorporar está determinada por el ADN molde, al que el iniciador se ha unido previamente por complementariedad de bases (McPherson, 1995).

La amplificación del ADN se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales presenta 3 etapas distintivas de temperatura (Innis, 1995).

2.5.2 COMPONENTES DE LA PCR

2.5.2.1 SECUENCIA "BLANCO"

Mediante la PCR es posible sintetizar, en pocas horas, millones de copias de un gen o de una región específica de DNA, a partir de cualquier genoma la cual es llamada DNA diana, blanco, etc. (Bolívar, 2007).

En principio puede efectuarse la amplificación por PCR si está presente al menos un ejemplar intacto del gen diana. Cualquier alteración, como una muesca en el ADN diana, puede bloquear la amplificación por PCR. El tamaño de la secuencia diana puede variar entre $< 0,1$ y unas cuantas kilobases. La cantidad total de ADN utilizada normalmente para la PCR está entre $0,05$ y $1,0 \mu\text{g}$, lo que permite la detección de ejemplares solos de la secuencia diana. Aunque las muestras no tienen que estar muy purificadas, sí es necesario eliminar algunos contaminantes, como la heparina, el formol, los agentes quelantes de Mg^{2+} o los detergentes, para evitar que inhiban el proceso de amplificación (Somma, 2015).

2.5.2.2 INICIADORES DE LA AMPLIFICACIÓN (PRIMERS)

Los iniciadores o primers son secuencias sintéticas cortas (de 20 a 30 bases) que se unen a cada una de las dos hebras simples del ADN desnaturalizado. La alineación generalmente ocurre entre 40°C y 65°C , dependiendo de la longitud y la secuencia de bases de los iniciadores. El control preciso de la temperatura y el adecuado diseño de los iniciadores permite que éstos se unan a la secuencia diana con alta especificidad (BIMODI, 2014).

En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanco (la región que debe ser copiada). Es decir, les agregan secuencias que harán

que se unan a cadenas opuestas del molde de ADN solo en los extremos de la región a copiar. Los cebadores se unen al molde mediante complementariedad de bases (Biología Avanzada, 2017).

2.5.2.3 ADN POLIMERASA I TERMOESTABLE

La enzima responsable de la replicación en las células es la ADN polimerasa. Esta cataliza la unión del grupo OH-3' del extremo del cebador, con el grupo fosfato del deoxiribonucleósido trifosfato que se incorpora a la cadena en síntesis a través de una unión fosfodiéster. En la reacción de PCR, los primers (sintéticos) tienen una secuencia que les permite hibridar, en forma específica, y amplificar la secuencia comprendida entre dos primers con la secuencia blanco que el usuario quiere amplificar. En la PCR estos procesos ocurren en un tubo de ensayo sometido a variaciones de temperatura con un máximo de 95 °C, y la polimerización es conducida por una ADN polimerasa llamada Taq polimerasa (Bolívar, 2007).

La enzima DNA polimerasa obtenida de un microorganismo termorresistente, *Thermos aquaticus*, es una enzima que no se desnaturaliza por calor y que trabaja a altas temperaturas (72 °C). Esta propiedad permite desnaturalizar el DNA de interés para ser polimerizado sin destruir la enzima, y así se puede multiplicar rápidamente el número de copias de un fragmento específico de DNA (Bolívar, 2007).

2.5.2.4 DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS (dNTP'S)

La síntesis de ADN requiere de desoxirribonucleótidos trifosfatados libres (dNTPs); la concentración de cada uno de ellos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) en el PCR debe ser 200µM, para lograr una especificidad óptima. En todo caso, es conveniente que los cuatro dNTPs se utilicen en concentraciones aproximadas, a fin de reducir los errores en la incorporación (BIMODI, 2014).

2.5.2.5 OTROS COMPONENTES

Uno de los participantes “secundarios” más importantes del PCR es el ión Mg²⁺, ya que su participación influye en lo relativo al alineamiento de los iniciadores, a la temperatura

de fusión del ADN y a la actividad enzimática de la Taq ADN pol I; su proporción óptima en la mezcla de reacción fluctúa entre 0.5 y 4.0mM. Evidentemente, la presencia de EDTA o de otros agentes quelantes puede disminuir la concentración de este componente (Bolívar, 2007)

Por otra parte, la solución amortiguadora recomendada para la PCR es la de Tris-HCl, 10 a 50mM a pH 8.3 a 8.9. Ésta proporciona un adecuado medio de reacción que incrementa la especificidad y el rendimiento de los productos de amplificación (Bolívar, 2007).

2.5.3 ETAPAS DE LA PCR

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, al final hay al menos 10^5 copias de la secuencia específica (Passarge, 2004). La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura como se ilustra en la Figura 11. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura ($> 90^{\circ}\text{C}$), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros (Sambrook, 2001). Las tres etapas que se repiten durante los ciclos son:

a) Desnaturalización: calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (Luque, 2002) a alrededor de 93°C a 95°C (Passarge, 2004), generalmente durante unos 5 minutos (Lehninger y otros, 1991).

b) Hibridación o templado del cebador: a unos 50°C – 70°C , dependiendo de la temperatura de fusión esperada de los primers (Passarge, 2004), o la denominada temperatura de hibridación, a la que los cebadores se unen al ADN de cadena sencilla. Los cebadores son complementarios a las secuencias que flanquean en ADN diana a copiar. Los cebadores sirven de punto de iniciación para la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementarias al ADN diana (Lehninger y otros, 1991).

c) Elongación o replicación: etapa de amplificación a unos $70^{\circ}\text{C} - 75^{\circ}\text{C}$ (Passarge, 2004), en la que el ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales, la replicación ocurre en dirección $5'$ a $3'$ a partir del extremo $-\text{OH}$ de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización (Luque, 2002). La polimerasa Taq extiende los cebadores añadiendo nucleótidos en dirección $5' - 3'$, haciendo una copia doble de la cadena diana (Lehninger y otros, 1991).

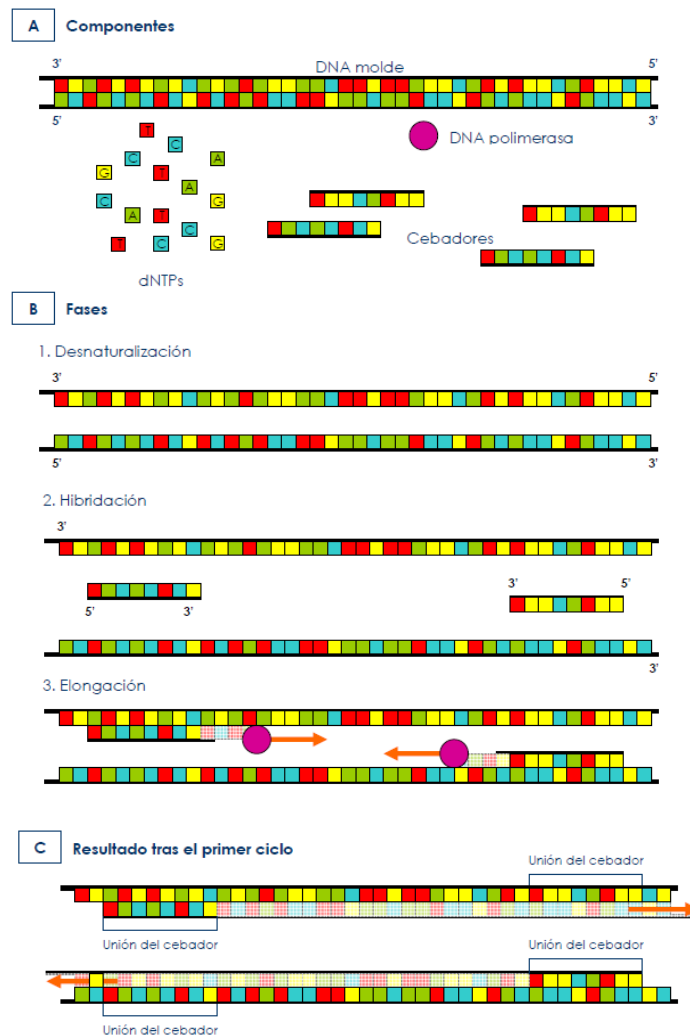


Figura 11. Representación esquemática de: A. Componentes básicos para llevar a cabo una PCR. B. Fases de la PCR. C. Resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación (la cadena recién formada se representa de color más claro). Fuente: Stock Silberman, 2016.

Cabe señalar que la reacción concluye cuando la cantidad de enzima se reduce hasta niveles insuficientes (por la inactivación térmica ocurrida después de cada paso de desnaturalización), pero también gravita el hecho de que la efectividad del alineamiento de los iniciadores va decreciendo paulatinamente (al irse disminuyendo su concentración e incrementando en forma exponencial el número de secuencias "blanco") (Innis, 1995).

Además de las 3 etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, a elevada temperatura (incluso superior a la de las etapas de desnaturalización), sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, especialmente si este es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas (caso de un ADN genómico completo). La etapa final por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos (Luque, 2002).

2.5.4 APLICACIONES DE LA PCR

La PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como biotecnología, ecología, evolución, biología de la conservación, arqueología, patología, medicina forense, entre otras (Luque, 2002).

Antes del desarrollo de la PCR las técnicas de biología molecular eran muy onerosas y sólo eran posibles cuando se obtenían numerosas copias del ADN por clonación. La PCR convirtió en una rutina la aplicación de estas técnicas, como es el caso de la secuenciación genética, permitiendo la lectura completa del genoma humano, así como de muchos organismos que se toman como modelos en la investigación de distintos problemas biológicos (Luque, 2002).

- Secuenciación: una de las razones más comunes para el uso del PCR es la generación de suficiente ADN molde para su secuenciación. Es mucho más rápido y sencillo

que el clonaje, y la amplificación y secuenciación pueden realizarse en una única operación continua si se desea. Los productos lineales de PCR realinearán brevemente después de la desnaturalización, lo cual inhibe la unión de los cebadores de secuenciación (Walker, 1997). La PCR se utiliza para proporcionar grandes cantidades de cualquier gen a partir de pequeñas cantidades de ADN para uso en diversos estudios (Alberts et al, 2006).

- Manipulación genética y estudios de expresión: los cebadores de oligonucleótidos no necesitan ser complementarios al ADN molde en su extremo 5' para que suceda la síntesis durante una PCR. Esta propiedad suministra al biólogo molecular con una vía conveniente de alterar un fragmento de ADN y estudiar los efectos que proceden. También puede ser útil para el estudio de ARN mensajero generados por expresión génica (Walker, 1997).

La PCR y sus variantes tienen muchas otras aplicaciones. Identifica rápidamente variaciones en las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, así como también variaciones en el número de repeticiones de secuencias de ADN repetidas en tándem, que pueden usarse como marcadores genéticos en estudios de cartografía genética. Los cebadores específicos del alelo proporcionan una manera de rastrear mutaciones en el ADN genómico, lo que permite determinar con rapidez la naturaleza de una mutación. Se pueden diseñar cebadores que distingan entre dos secuencias diana que se diferencien en un solo nucleótido. El uso de cebadores aleatorios permite amplificar ADN de manera indiscriminada, lo que es ventajoso para explorar regiones no caracterizadas adyacentes a regiones conocidas (Lehninger y otros, 1991).

2.6 TÉCNICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

Para detectar las variaciones (polimorfismos) en la secuencia del genoma de distintos individuos se acude a distintas estrategias con enfoques característicos, o una combinación de ellas. En principio, la forma más directa de detectar un polimorfismo es la secuenciación

del ADN, pero por su laboriosidad se suele acudir a otras técnicas, entre las que destaca el análisis RFLP (Luque, 2002).

2.6.1 POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Este es uno de los primeros métodos desarrollados para la detección de polimorfismos, y el que más se ha empleado durante muchos años. Se basa en la detección de aquellas variaciones de la secuencia del ADN (codificante o no) que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción. Casi siempre la variación afecta a un solo nucleótido. Por lo tanto, los fragmentos de restricción que se obtienen son diferentes dependiendo de qué alelo esté presente en la muestra; de ahí su nombre (restriction fragment length polymorphism) (Luque, 2002).

Mediante cortes de determinadas secuencias del ADN con enzimas que reconocen específicamente tales sitios se generan fragmentos cortos y largos (fragmentos de restricción) que hibridan con sondas de ADN construidas específicamente para reconocerlos. En la población algunas secuencias de ADN contienen sitios particulares de restricción, mientras que en otras homólogas faltan a causa de la mutación. Los individuos que presentan un sitio de restricción determinado en ambas secuencias homólogas serán homocigotos y generarán una sola banda electroforética, la cual puede ser larga o corta. Los individuos con un sitio de restricción presente en un cromosoma, pero no en el homólogo serán heterocigotos y generarán dos bandas electroforéticas, una larga y una corta. Debido a que con los RFLPs podemos diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos concluimos que estos polimorfismos son codominantes (Cargill M, 1999).

Los RFLP's son causados por rearrreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que genera una ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico (Rentaría, 2000).

Con el fin de poder utilizar el método sobre cantidades pequeñas de muestras, es común realizar una amplificación previa por PCR; ello exige disponer de un par de cebadores específicos para secuencias que flaqueen la región polimórfica. en este caso, puede ser innecesario el uso de la hibridación, pues la cantidad de ADN es suficiente para detectarlo en el gel con un método de tinción, y se podrá observar la diferencia en el patrón de fragmentación (Herráez, 2012).

La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce cantidades equimolares de fragmentos para una molécula de ADN dada. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en gel y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos-X, de acuerdo al peso molecular de la banda (Becerra, 2000).

2.7 GENES IMPLICADOS EN LA CALIDAD DE LA CARNE

Los caracteres que determinan la calidad de la carne son mayoritariamente de herencia cuantitativa, eso significa que actúan en su determinación muchos genes con efecto individual pequeño. Además, el ambiente influye sobre ellos de manera importante (Sica, 2011).

La tendencia actual es estudiar genes candidatos con el propósito de desarrollar marcadores moleculares que puedan asistir a la selección (Sica, 2011). En el cuadro 3 se muestra una lista de algunos genes asociados con la calidad en la carne.

Cuadro 3. Genes asociados con la calidad de la carne.

Gen	Asociación con la calidad en la carne
CAPN1 (subunidad mayor de la μ-calpaína)	Asociado con la terneza (Smith et al., 2000).
MC4R (receptor de melanocortina 4)	Se asocia con la profundidad de grasa dorsal ultrasónica, promedio diario, ganancia y consumo de alimento diario en los cerdos (Gill et al., 2010).
POU1F1 (clase POU 1 homeobox 1)	Asociado con el espesor de grasa, espesor de la grasa dorsal y el peso al nacer (Gill et al., 2010).
PRKAG3 (proteína quinasa, activada por AMP, gamma 3 subunidad no catalítica)	Asociado con la capacidad de retención de agua y su pérdida por cocción en los cerdos (Gill et al., 2010).
POMC (Propiomelanocortina)	Asociado con el peso de la canal caliente (Gill et al., 2010).
PPARA (peroxisomas proliferatoractivated receptor alfa)	Se encuentra cerca de un QTL del cerdo asociado con grasa dorsal (Gill et al., 2010).
PGAM2 (fosfoglicerato mutasa 2)	Se ha asociado con la pérdida por goteo en los cerdos (Gill et al., 2010).
IGF2 (factor de crecimiento 2 similar a la insulina)	Asociado con él % de grasa en área del músculo y en el área de la costilla (Gill et al., 2010).

RYR1 (gen halotano o de la sensibilidad al Síndrome del Estrés Porcino, codifica para el Receptor de la Ryanodina)	Afecta la composición del tipo de fibra y su tamaño al incrementar las miofibrillas en las fibras glicolíticas, provocando una disminución del pH y a la aparición de carne pálida suave y exudativa (PSE) (Camacho, 2013).
ESR (Estrógeno receptor)	Se relaciona al aumento en el número de lechones nacidos vivos y totales (Rothschild et al., 1996) y el peso de los lechones nacidos vivos y totales (Isler et al., 2002).

2.8 GEN MC4R Y EL POLIMORFISMO EN GANADO PORCINO

El sistema de las melanocortinas está compuesto por los receptores de las mismas y sus ligandos endógenos. La familia de genes receptores de melanocortina está formada por cinco miembros únicos de exón, acoplados a proteína G llamados MC1-MC5 (codificados por los genes MC1R-MC5R). La expresión de los genes *MCR* es específica de tejido: *MC1R* se expresa principalmente en melanocitos, *MC2R* en la corteza suprarrenal, *MC3R* y *MC4R* en el sistema nervioso y *MC5R* en glándulas sebáceas y otros tejidos, por ejemplo el cerebro, los músculos, los pulmones y el riñón (Yang, 2011). Los genes *MCR* contienen sólo un único exón y el número codificado de aminoácidos varía de 296 (*MC2R*) a 332 (*MC4R*). Algunos de ellos (*MC2R*, *MC4R* y *MC5R*) se encuentran en un solo cromosoma: 18 en humanos y el ratón, 24 en ganado y 1 en el perro. En el caso del cariotipo de cerdo, la localización es ligeramente diferente (Cuadro 4), ya que los genes *MC1R*, *MC2R* y *MC5R* residen en el cromosoma 6, pero no *MC4R*, que no es sinténico con *MC2R* y *MC5R*. Esta diferencia refleja los reordenamientos cromosómicos que tuvieron lugar durante la evolución del cariotipo del cerdo (Goureau et al., 1996).

Cuadro 4. Ubicación cromosómica de los genes MCR en especies de mamíferos. Fuente: Goureau et al., 1996.

Gen	Humano	Ratón	Cerdo	Ganado	Perro
<i>MC1R</i>	16	8	6	18	5
<i>MC2R</i>	18	18	6	24	1
<i>MC3R</i>	20	2	17	13	24
<i>MC4R</i>	18	18	1	24	1
<i>MC5R</i>	18	18	6	24	1

El MC4R se expresa en la región apetito del cerebro en donde se regula el consumo de alimento y el balance energético (Van den Maagdenberg, 2007). El gen que codifica esta proteína se considera por tanto candidato para caracteres de engrasamiento y crecimiento. En cerdos se ha identificado una mutación puntual no sinónima, localizada en una región altamente conservada entre los genes de receptores de melanocortina, que ha mostrado una asociación significativa con el espesor de tocino dorsal, el crecimiento y el consumo de alimentos en distintas líneas (Kim K. L., 2000) (Hernández-Sánchez, 2003).

Un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos predicha del cerdo MC4R con MC4R proteínas de otras especies, otra proteína MCR o GPCRs representante demostró que el ácido aspártico en posición 298 del séptimo dominio transmembrana está muy altamente conservado en las proteínas MCR (Figura 12). Es interesante notar, sin embargo, que esta posición es ocupada por asparagina en la mayoría de otros GPCRs.

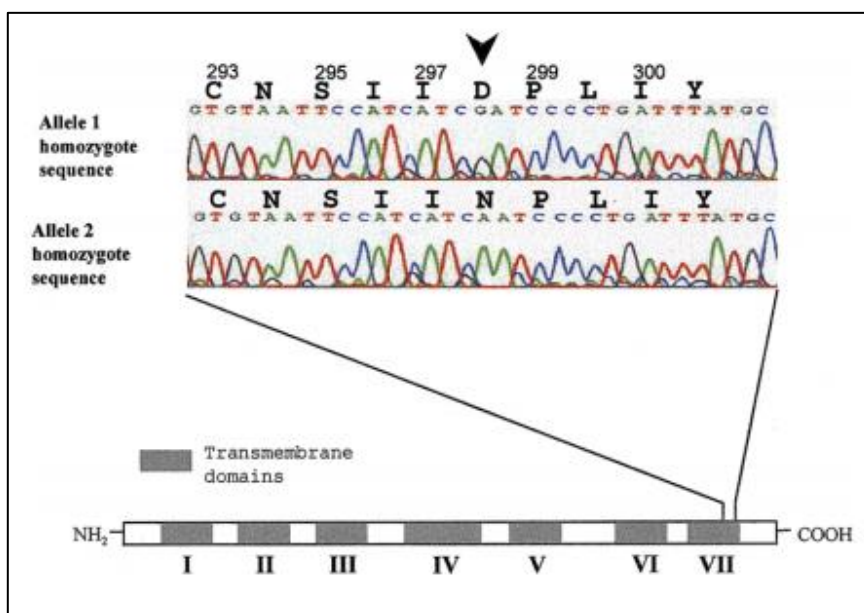


Figura 12. Secuencias parciales del gen MC4R porcino. La sustitución de G→A del producto PCR es marcada con una flecha. La traducción de aminoácidos muestra una sustitución del aminoácido en el codón 298. El esquema representa la estructura de MC4R y localización de la mutación. Fuente: Kim, 1999.

La sustitución Asp298Asn se encuentra en el séptimo dominio transmembrana. Los estudios funcionales revelaron que ambas formas polimórficas de MC4R (Asp298 y Asn298) se unen a su agonista con afinidad similar. Sin embargo, la generación de señal debe estudiarse con más cuidado, ya que Kim et al. (2004) informaron la incapacidad de la variante Asp298 para generar señales, en contraste con Fan et al. (2008), que demostraron una fuerza de señalización similar para ambas variantes. En la mayoría de los estudios, se alegó que el alelo Asp298 está fuertemente asociado con espesor de la grasa inferior de la espalda, mayor porcentaje de carne magra, menor tasa de crecimiento y menor consumo de alimento, mientras que el alelo Asn298 tuvo los efectos opuestos, es decir, mayor deposición de grasa y crecimiento más rápido, lo que parece ser el resultado de una mayor ingesta de alimento. También se realizaron estudios de asociación sobre rasgos de calidad de la carne y composición de ácidos grasos. Por ejemplo, Ovilo et al. (2006) concluyeron que los animales homocigóticos para el alelo Asn298 presentan menor rojez de la carne y un mayor contenido de ácidos grasos saturados en comparación con el homocigoto GG. Otros estudios revelaron

que las frecuencias de los alelos difieren mucho entre razas y líneas de cerdos, probablemente debido a la selección artificial a largo plazo. Por ejemplo, los cerdos que representan líneas de la misma raza y criados para la producción de carne fresca mostraron una mayor frecuencia de alelo Asp298 en comparación con los criados para la producción de jamón y lomo curados (Burgos et al., 2006). A pesar de estos informes prometedores, algunos de los estudios posteriores no lograron confirmar una asociación de Asp298Asn SNP en el gen MC4R con características de rendimiento y calidad en cerdos (Schwab et al., 2009; Munoz et al., 2011) o reportaron diferencias relacionadas con la raza en los efectos observados (Stachowiak et al., 2005 , Davoli et al., 2012).

El gen MC4R puede afectar por tanto a los caracteres productivos y de calidad de mayor interés en cerdos Ibéricos, y la selección asistida por este gen tendría especial interés en esta raza, dadas las ineficiencias que presenta su selección convencional dependiente de registros obtenidos en animales emparentados con los candidatos y sacrificados tras un largo ciclo productivo (Silió, 1997).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 JUSTIFICACIÓN

La carne de cerdo es considerada una de las tres principales carnes rojas (junto con la carne de bovino y cordero) en la dieta de los mexicanos; su consumo es fundamental para el desarrollo y sano crecimiento del humano en etapas tempranas, ya que es rica en proteínas, minerales (hierro y zinc) y vitaminas del complejo B (Cortés y otros, 2012).

Son varios los genes candidatos propuestos para ser utilizados como herramientas auxiliares en la selección de poblaciones porcinas. Uno de los más sólidamente fundados es el gen del receptor 4 de la melanocortina (MC4R), que se expresa en el cerebro produciendo una proteína implicada en la regulación del balance energético de los mamíferos (Kim, 2000).

Una sustitución nucleotídica G/A localizada en el codón 298 del gen MC4R porcino origina un cambio de aminoácido (Asp298Asn), en una posición altamente conservada en otras especies y otros receptores de melanocortina (Kim et al., 2004). Este polimorfismo presenta en distintas razas y líneas de cerdos efectos sobre espesor de tocino dorsal, crecimiento y consumo de alimentos (Kim et al., 2000; Hernández-Sánchez et al., 2003; Houston et al., 2004).

En este trabajo se identificó la presencia del polimorfismo en cerdos Landrace y Pelón mexicano, para relacionarlo con las características de calidad de la carne (contenido de grasa, crecimiento del cerdo, etc.) para futuras aplicaciones en la producción de carne con este polimorfismo.

3.2 HIPÓTESIS

El polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R tendrá diferente frecuencia alélica en cerdos Landrace y Pelón mexicano, lo cual puede afectar a las características asociadas a la calidad de su carne.

3.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia del polimorfismo 1426 en el gen MC4R mediante PCR-RFLP en cerdos Landrace y Pelón Mexicano para confirmar la asociación de dicho polimorfismo con el fenotipo de cerdo.

3.3.1 OBJETIVO PARTICULAR 1

Definir los primers específicos que permitan identificar la presencia del polimorfismo 1426 en el gen MC4R en cerdos Landrace y Pelón Mexicano.

ACTIVIDAD 1

Seleccionar los primers y la zona de amplificación propuestos en trabajos previos que permitan utilizarlos o modificarlos en el presente trabajo mediante programas bioinformáticos.

ACTIVIDAD 2

Extraer el ADN de muestras de bovino, fresa, maíz y cerdo para utilizarlas en la prueba de especificidad de los primers.

ACTIVIDAD 3

Evaluar la especificidad de los primers seleccionados aplicando PCR con las muestras extraídas de res, fresa, maíz y cerdo.

ACTIVIDAD 4

Visualizar los resultados de la PCR con electroforesis en gel de agarosa.

3.3.2 OBJETIVO PARTICULAR 2

Aplicar la técnica de PCR en muestras de cerdo Landrace y Pelón mexicano para amplificar el fragmento del gen a estudiar.

ACTIVIDAD 1

Extracción de ADN de las muestras de cerdos Landrace y Pelón mexicano.

ACTIVIDAD 2

Aplicación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el ADN extraído.

ACTIVIDAD 3

Realizar electroforesis con gel de agarosa y visualizar los fragmentos amplificados mediante luz ultravioleta.

3.3.3 OBJETIVO PARTICULAR 3

Determinar la presencia del polimorfismo 1426 en el gen MC4R mediante RFLP.

ACTIVIDAD 1

Realizar la digestión de las muestras amplificadas con la enzima de restricción TaqI.

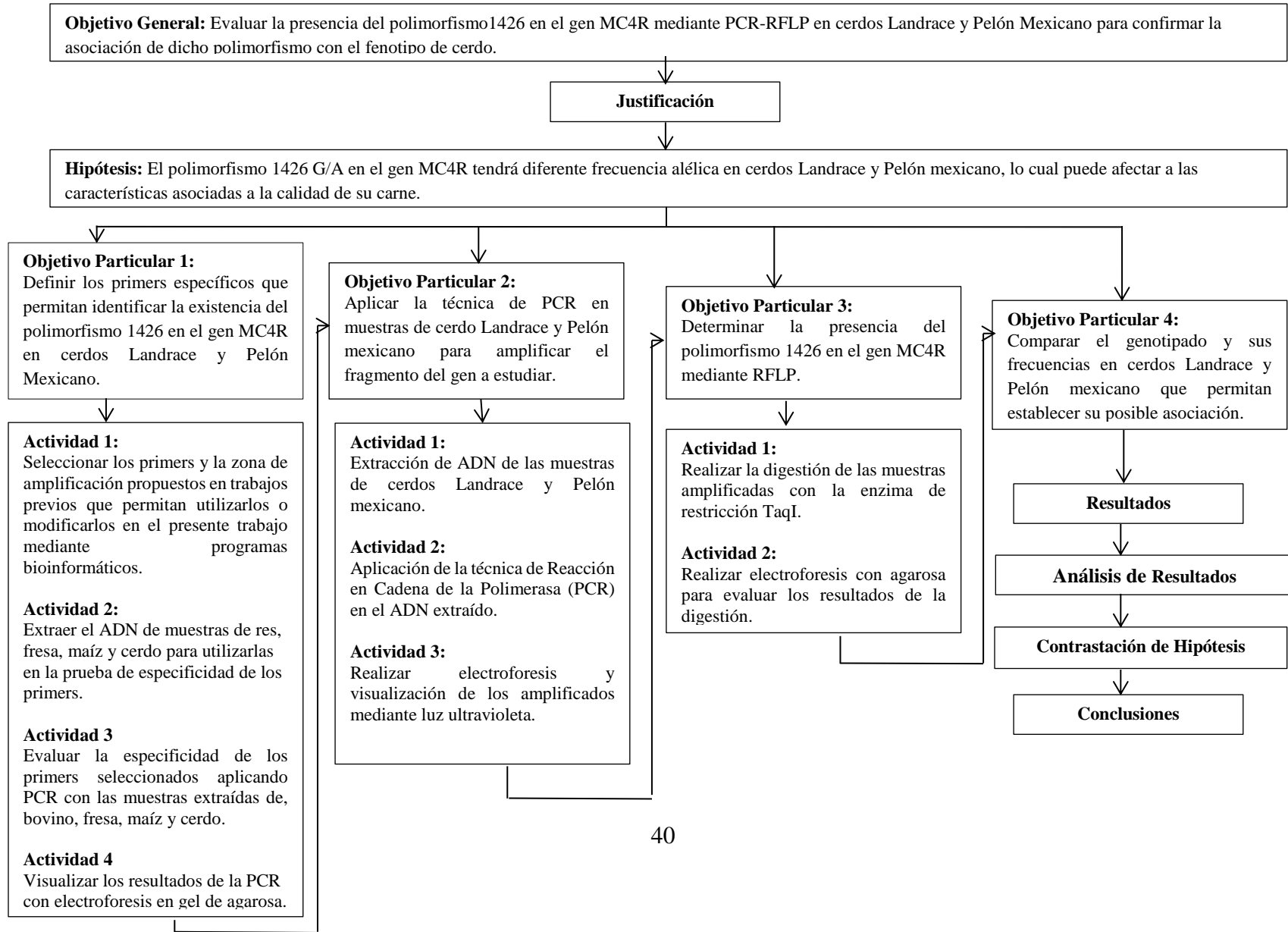
ACTIVIDAD 2

Realizar electroforesis con gel de agarosa para evaluar los resultados de la digestión.

3.3.4 OBJETIVO PARTICULAR 4

Comparar el genotipado y sus frecuencias en cerdos Landrace y Pelón mexicano que permitan establecer su posible asociación.

3.4 CUADRO METODOLÓGICO



3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Para evaluar la presencia del polimorfismo 1426 en el gen MC4R se requirieron 20 cerdos: 10 de la especie Landrace y 10 de Pelón mexicano provenientes del rastro municipal de Tlalnepantla y del rastro de la Asociación Mexicana Especializada en Cerdos Criollos (AMECC) ubicado en Mérida, Yucatán, respectivamente; para obtener ADN de estos cerdos se les extrajo una muestra de tejido del músculo dorsal toracolumbar (lomo). Para su conservación, todas las muestras fueron congeladas y mantenidas a una temperatura de -18°C. A continuación se describe el protocolo completo:

- **Material biológico**

Se utilizaron 20 muestras de cerdos (10 Landrace y 10 Pelón Mexicano).

- **Reactivos**

-Agua desionizada.

-Solución de lisis (Tris base 50nM, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)

-Enzima Proteinasa k.

-Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

-Etanol frío.

- **Material y Equipo:**

-Agitador vortex, Scientific Industries, Genie K-55-G, Estados Unidos.

-Balanza analítica electrónica, Symmetry, PR410, Estados Unidos.

-Calentador para tubos, Eppendorf, Estados Unidos.

-Juego de micropipetas, Rainin, SL-XLS, California, Estados Unidos.

-Microcentrifuga, Eppendorf, Mminispin plus 1400rpm, Estados Unidos.

- **Método**

El método utilizado se ilustra a continuación (Figura 13).

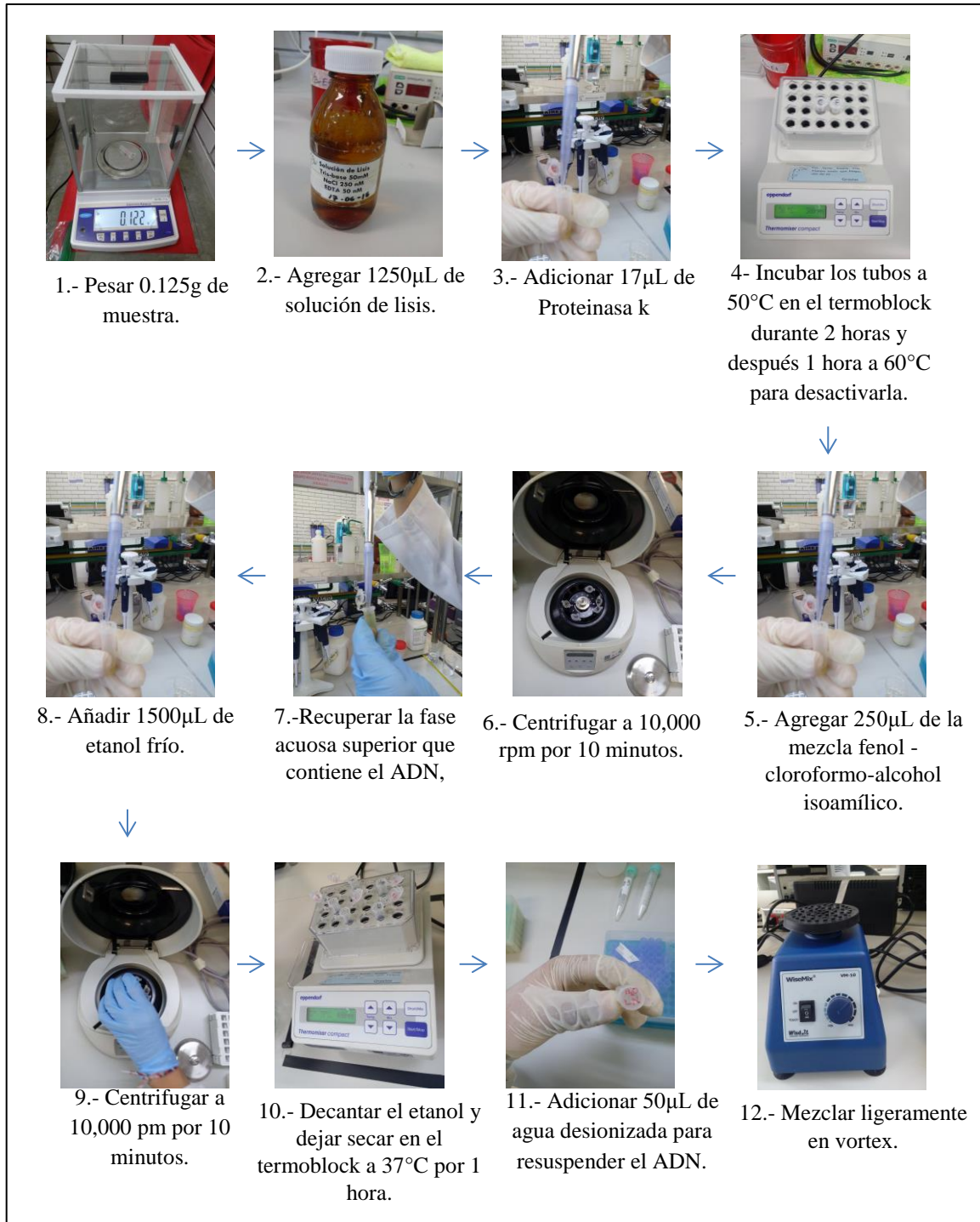


Figura 13. Método para la extracción de ADN.

3.5.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN

Las lecturas para cuantificación de ADN se hicieron entre 260 y 280nm, la lectura de 260nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos. La relación entre lecturas a 260/280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Valores de lectura de 1.8 es de ADN puro y de 2 de ARN puro (BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III, 2016); si existe contaminación significativa con fenol o proteínas la relación 260/280 será menor de 1.8 y por lo tanto no es posible utilizar el ADN obtenido para la PCR.

- **Material Biológico:**

- Muestras de ADN extraído.

- **Reactivos:**

- Agua libre de nucleasas.

- **Material y equipo:**

- Espectrofotómetro, NanoDrop ND-1000 A113, Estados Unidos.

- Juego de Micropipetas, Rainin, SL-XLS, California, Estados Unidos.

- Tubos de 1.5ml.

- **Método (Figura 14):**

1. Calibrar el equipo colocando 2 μ L de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo.
2. Abrir el programa de Nanodrop y seleccionar la opción de ácidos nucleicos.
3. Colocar de nuevo 2 μ L de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco.
4. Correr el programa.
5. Colocar 2 μ l de la muestra de ADN a cuantificar y correr el programa.
6. Registrar la concentración de ADN proporcionada por la relación 260/280.
7. Limpiar el equipo.



Figura 14. Diagrama para la cuantificación de ADN.

3.5.3 ELECTROFORESIS PARA LA INTEGRIDAD DEL ADN

La electroforesis se realizó para corroborar si el ADN extraído nos sirve para utilizarlo en la PCR, se llevó a cabo en gel de agarosa al 1%.

- **Material Biológico:**

- Muestras de ADN extraído.

- **Reactivos:**

- Agua libre de nucleasas.

- TAE 1X.

- BRET

- Agarosa

- **Material y equipo:**

- Cámara de electroforesis Apollo 75.10, Estados Unidos.

- Juego de Micropipetas, Rainin, SL-XLS, California, Estados Unidos.

- Transiluminador de luz U.V Bio-Imaging Systems UVP.

- **Método:**

1. El gel de agarosa se preparó pesando 300mg de agarosa que se disolvió en 30mL de TAE 1X.

2. Posteriormente se agrega 1 gota de BrEt.

3. Después de colocó la muestra en el soporte del gel de la cámara de electroforesis.

4. Cuando esté listo el gel, se coloca de manera correcta en la cámara de electroforesis (Figura 15) y se cubre con TAE 1X.

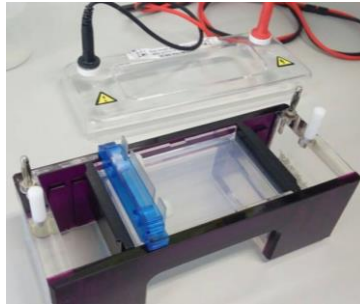


Figura 15. Cámara de electroforesis.

5. Para cargar el gel se agregó en cada pocillo 3 μ L de BRET; 3 μ L de colorante blue/orange y 5 μ L de la muestra extraída como se ilustra en la Figura 16.



Figura 16. Muestras para electroforesis.

6. El gel de agarosa se corrió a 60V durante 1 hora y 30 minutos en una cámara de electroforesis (Figura 17).



Figura 17. Electroforesis corriendo.

7. Finalmente, el gel se visualizó en un transiluminador de luz U.V (Figura 18).



Figura 18. Transiluminador de luz U.V.

3.5.4 PCR

Antes de efectuar la PCR, se hidrataron los primers de acuerdo a los datos proporcionados por el proveedor (353 μ L de agua libre de nucleasas para el primer Frontal y 276 μ L para el primer Reverso, obteniendo una concentración final de 100 μ M) y se realizaron las pruebas de PCR y RFLP en una muestra de cerdo Pelón Mexicano obtenida de la AMECC la cual se utilizó como control positivo. Una vez terminado lo anterior se procedió a la preparación de la muestra con las siguientes proporciones (Cuadro 4). Se realizaron 26 μ L de reacción de PCR con el kit Master Mix.

Cuadro 5. Proporciones por muestra.

Componente	Proporción
Master mix	12.5 μ L
Agua libre de nucleasas	10.5 μ L
Primer Frontal	0.5 μ L
Primer Reverso	0.5 μ L
ADN	2 μ L

- **Reactivos:**

- Kit para PCR, Promega que contiene:

- *Agua libre de nucleasas.

- *PCR Master Mix (50 unidades de Taq ADN polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3mM de MgCl₂).

- **Materiales y equipo:**

- Termociclador, Apollo, ATC401, Estados Unidos.

- Juego de micropipetas, Rainin, SL-XLS, California, Estados Unidos.

- Tubos 0.2ml.

3.5.5 ELECTROFORESIS

El análisis de los productos obtenidos de la amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis utilizando gel de agarosa al 3%, y su posterior exposición a luz ultravioleta en un transiluminador de luz U.V, Bio-Imaging Systems, UVP, California, Estado Unidos. El gel se preparó siguiendo la metodología previamente descrita en la integridad del ADN (punto 3.5.3).

3.5.6 RFLP

El SNP ubicado en la posición 1426 del gen MC4R fue genotipado con una prueba de PCR-RFLP TaqI. Para la digestión con la enzima de corte se prepararon 10 μ L de reacción,

compuesta de 4.8μL de agua bidestilada, 1μl de buffer de la enzima TaqI, 0.2μL de la enzima de restricción TaqI y 4μL de ADN producto de la PCR. Las reacciones resultantes se incubaron en el Termociclador a 65°C por 1 hora.

Posteriormente, el fragmento amplificado (226pb) fue digerido con la enzima de restricción TaqI y los productos de digestión se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% debido a que son fragmentos pequeños (Freifelder, 2003). Los geles se prepararon agregando 2.8mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 2.75mL de agua bidestilada, 1.4mL de TBE 5X, 0.049mL de APS y 2.45μL de TEMED, dando como resultado un total del 7mL de gel.

Para cargar el gel se agregó en cada pocillo 3μL de colorante blue/orange y 5μL de la muestra resultante de la digestión enzimática y 1.5μL de marcador de peso molecular en lugar de la muestra para el primer pocillo del gel. Los geles de poliacrilamida se corrieron a 100V durante 1 hora.

La enzima TaqI tiene un sitio de reconocimiento (Figura 19) y al encontrarlo en la secuencia de ADN hará el corte, produciendo dos fragmentos (156pb y 70pb).

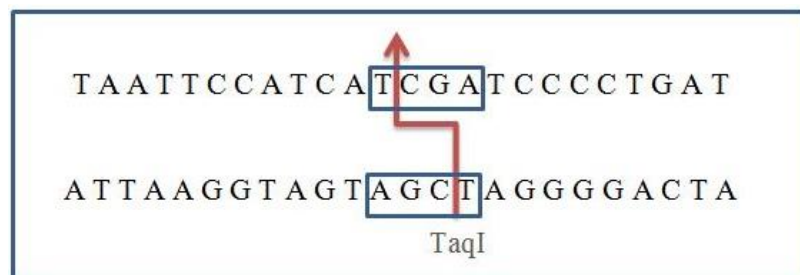


Figura 19. Sitio de corte de la enzima Taq I.

A continuación, se presentan los fragmentos esperados después de la digestión enzimática:

- Ausencia del polimorfismo: 156pb y 70pb.
- Presencia del polimorfismo: 226pb.
- Individuo heterocigoto: 226pb, 156pb y 70pb.

Al analizar los geles de poliacrilamida al 12% los patrones de corte se observarán como se muestran en la Figura 20.

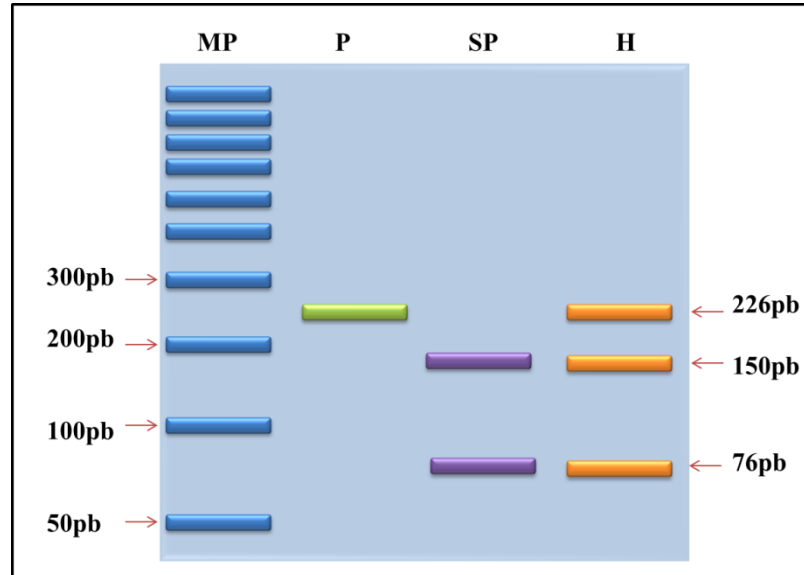


Figura 20. Patrón de cortes de la enzima Taq I. MP: Marcador de peso molecular 50pb, P: Individuo con presencia de polimorfismo, SP: Individuo sin presencia de polimorfismo, H: Individuo heterocigoto.

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJETIVO PARTICULAR 1

Definir los primers específicos que permitan identificar la presencia del polimorfismo 1426 en el gen MC4R en cerdos Landrace y Pelón Mexicano.

Los primers utilizados en la experimentación están reportados en un artículo previo (Kim et al, 2000) para identificarlos se recurrió a la base de datos del GenBank.

Las secuencias reportadas fueron verificadas con respecto a la secuencia AF087937.1 del GenBank, realizando un alineamiento para el primer frontal y reverso mediante el programa bioinformático “sequencher”, la metodología utilizada se describe en el Anexo 1.

Los primers utilizados en la experimentación se muestran a continuación (Cuadro 5).

Cuadro 6. Primers utilizados en la experimentación. Fuente: Kim et al, 2000.

Primer	Secuencia	No. de bases	Tamaño del Amplificado
Frontal	TAC CCT GAC CAT CTT GAT TG	20	226pb
Reverso	ATA GCA ACA GAT GAT CTC TTT G	22	

Después de establecer los primers se calculó la temperatura de hibridación (Anexo 2) y se realizó el programa de la PCR que se ilustra en la Figura 21.

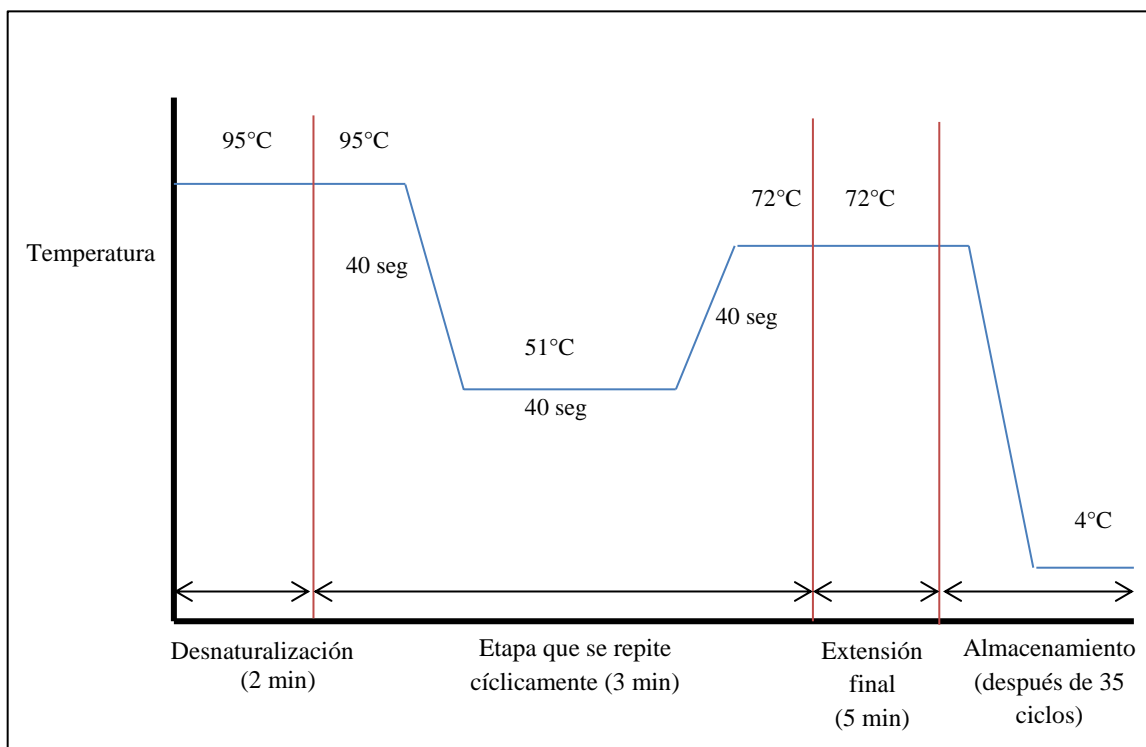


Figura 21. Programa de la PCR con Tm calculada.

Para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron utilizados los primers utilizados en el trabajo Kim et al (2000) para amplificar un fragmento de 226 pb. El fragmento fue amplificado con los primers de secuencia: primer frontal, 5'-TAC CCT GAC CAT CTT GAT TG-3' y primer reverso, 5'-ATA GCA ACA GAT GAT CTC TTT G-3'. El producto de PCR abarca desde las posiciones 519 a 744 del gen, que incluye toda la región codificante (exón). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2 min a 95°C; 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 51°C, 40 segundos a 72°C; y a una extensión final de 5 min a 72°C; en un Termociclador.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Aplicar la técnica de PCR en muestras de cerdos Landrace y Pelón mexicano para amplificar el fragmento del gen a estudiar.

Se realizó la extracción del ADN de 10 muestras Landrace y 10 muestras Pelón Mexicano utilizando el protocolo detallado anteriormente, obteniendo los siguientes resultados (Cuadro 6):

Cuadro 7. Resultados obtenidos de la extracción del ADN para las muestras Landrace y Pelón Mexicano. M1-10: Landrace; PM1-PM10: Pelón Mexicano.

Landrace			Pelón Mexicano		
Muestras	260/280	ng/ μ L	Muestras	260/280	ng/ μ L
M1	1.95	83.1	PM1	1.92	65.8
M2	1.79	81.8	PM2	2.03	98.9
M3	2.0	86.1	PM3	2.05	73.9
M4	1.93	87.9	PM4	1.86	74.9
M5	1.79	92.0	PM5	2.09	69.7
M6	1.97	105.8	PM6	1.82	82.9
M7	1.96	102.2	PM7	1.83	67.3
M8	2.03	82.3	PM8	1.72	106.1
M9	1.76	69.9	PM9	2.01	115.8
M10	1.97	119.5	PM10	1.73	75.0

Los resultados de la relación 260/280 para las muestras Landrace y Pelón Mexicano demuestran que no hay contaminación significativa con proteínas en el ADN. Por otra parte, la concentración de ADN es adecuada para su uso en la PCR. Antes de llevar las muestras a PCR se comprobó la especificidad de los primers utilizando ADN de tomate verde, fresa, plátano, tiburón, delfín y bovino; obteniendo el siguiente gel (Figura 22):

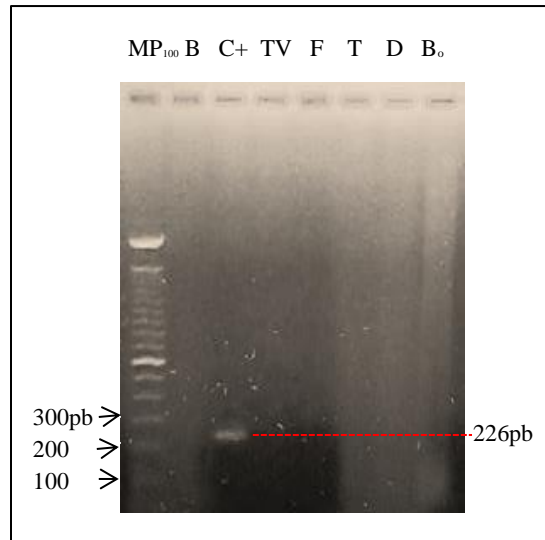


Figura 22. Gel de Agarosa al 1.5% para la prueba de especificidad. MP: marcador molecular, B: Blanco, C+: Control positivo, TV: Tomate Verde, F: Fresa, T: Tiburón, D: Delfín, Bo: Bovino.

En la Figura 22 se muestra que los primers si son específicos, pues únicamente amplificaron con la muestra C+ que es el control positivo utilizado en la prueba, que es una muestra de carne de Cerdo. Además de que se obtuvo el amplificado esperado de 226pb.

Una vez mostrada la especificidad de los primers se realizó PCR a las 20 muestras totales. Los resultados de la PCR fueron evaluados en geles de agarosa al 1.5%, sometidos en un campo eléctrico a 80V por aproximadamente 1h.

En la Figura 23 se observa que las muestras M1, M2, M3, M4 Y M5 de la especie Landrace amplificaron en la reacción de PCR, obteniendo bandas claras, indicando que las muestras son útiles para realizar RFLP posteriormente, pues las bandas claras indican que se obtendrá una buena visualización de los fragmentos de restricción resultantes.

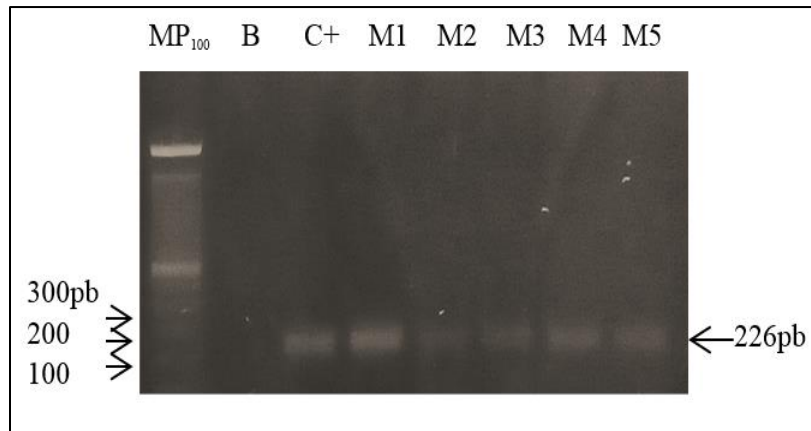


Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% para evaluar las muestras Landrace M1, M2, M3 M4 Y M5. MP: Marcador de peso molecular 100pb, C+: Control positivo, B: Blanco.

En el siguiente gel (Figura 24) se observan bandas claras de las muestras Pelón Mexicano PM6, PM7, PM8, PM9 y PM10, las cuales son aptas y se utilizaron para RFLP.

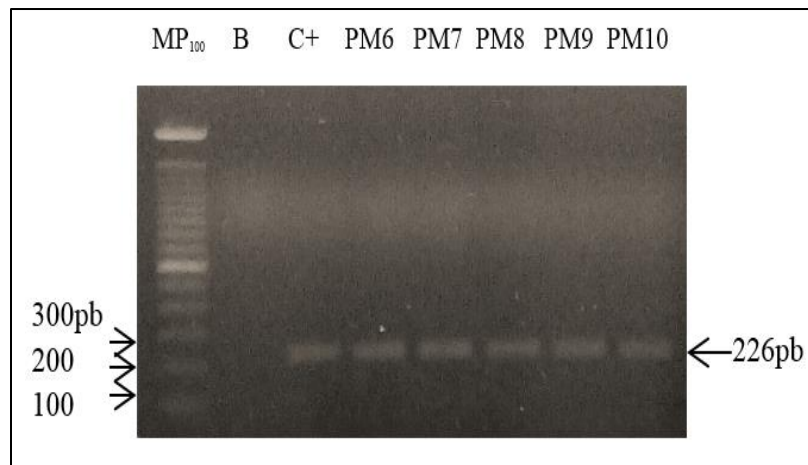


Figura 24. Gel de agarosa al 1.5% para evaluar la PCR en las muestras Pelón Mexicano PM6, PM7, PM8, PM9 y PM10. MP: Marcador de peso molecular 100pb, C+: Control positivo, B: Blanco.

Finalmente, se visualizaron las bandas de las muestras Landrace M6.M7, M8, M9 y M10 y de las muestras Pelón Mexicano PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5. Todos los individuos presentaron amplificado útil para RFLP.

OBJETIVO PARTICULAR 3

Determinar la presencia del polimorfismo 1426 en el exón del gen MC4R mediante RFLP.

El ADN resultante de la reacción de PCR fue sometido a digestión con la enzima TaqI siguiendo la metodología descrita anteriormente, si el amplificado resultante cuenta con la secuencia TCGA y su correspondiente AGCT como se mostró con anterioridad, la enzima realizará el corte, indicando la ausencia del polimorfismo, mientras que si la secuencia no presenta corte entonces el polimorfismo está presente.

Los resultados de la digestión fueron evaluados en geles de poliacrilamida al 12%, sometidos en un campo eléctrico a 100V, obteniendo los siguientes geles:

Geles de las muestras Landrace:

En el primer gel (Figura 25) se observa que en las muestras M1 y M5 la enzima TaqI realizó un corte, indicando la ausencia del polimorfismo 1426 del gen MC4R. Por otro lado, las muestras M2, M3 y M4 reportaron ausencia del polimorfismo debido al corte de 150pb y su restante de 76pb, al mismo tiempo una banda de 226pb que indica la presencia del polimorfismo, lo que indica que estos ejemplares son heterocigotos, es decir, que tienen distintos alelos para este gen.

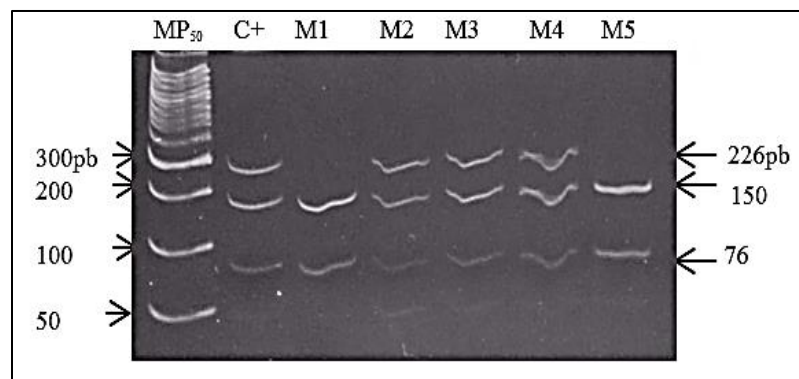


Figura 25. Gel de Poliacrilamida al 12% en el que se visualizan los resultados de RFLP para las muestras M1, M2, M3, M4 y M5.

En el segundo gel (Figura 26) se aprecia que las muestras M6 y M10 presentan ausencia del polimorfismo al tener 2 bandas (150pb y 76pb). Por el contrario, los individuos M7, M8 y M9 resultaron ser heterocigotos.

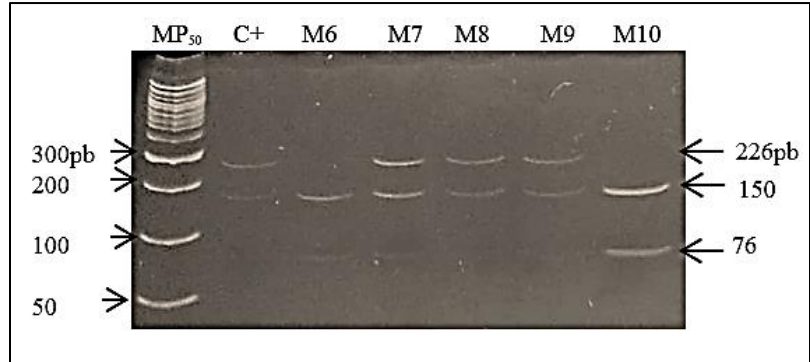


Figura 26. Gel de Poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP para las muestras M6, M7, M8, M9 y M10.

Geles de las muestras de Pelón Mexicano:

En la Figura 27, la muestra PM1 mostró corte lo que indica que es un individuo heterocigoto al presentar las 3 bandas (76pb, 150pb y 226pb), mientras que, por otra parte, en las muestras PM2, PM3 y PM4 no hay corte, reportando a individuos sin presencia del polimorfismo.

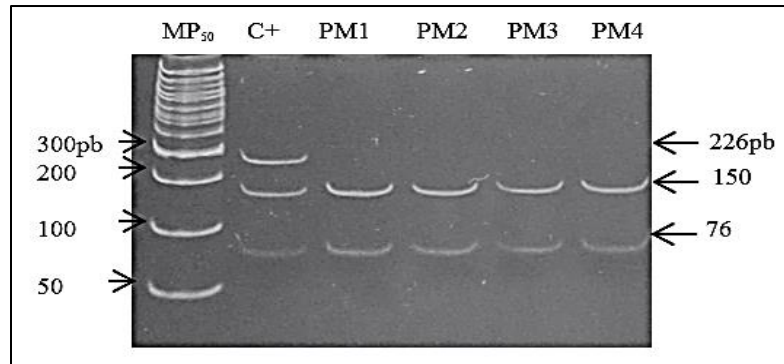


Figura 27. Gel de Poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP para las muestras PM1, PM2, PM3 y PM4.

Finalmente, en la Figura 28 se observa que las muestras PM6, PM9 y PM10 carecen del polimorfismo estudiado en este trabajo, en cambio, las muestras PM5, PM7 y PM8 revelan a individuos heterocigotos al presentar las 3 bandas. Por todo lo anterior, podemos decir que 9 de las 20 muestras analizadas resultaron ser individuos heterocigotos y 11 muestras carecen del polimorfismo 1426 del gen MC4R.

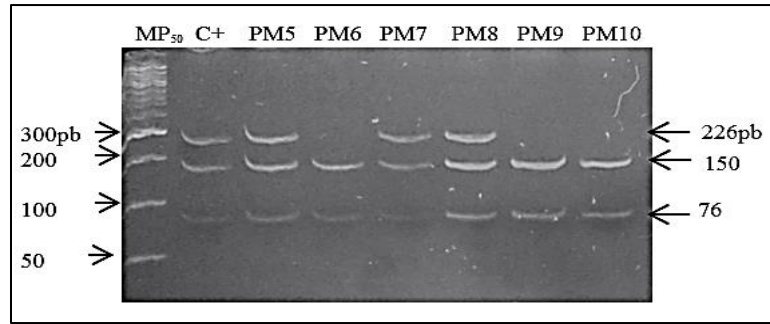


Figura 28. Gel de Poliacrilamida al 12% para visualizar los resultados de RFLP para las muestras PM5, PM6, PM7, PM8, PM9 y PM10.

OBJETIVO PARTICULAR 4

Comparar el genotipado y sus respectivas frecuencias en cerdos Landrace y Pelón Mexicano que permitan establecer su posible asociación.

En los Cuadros 7 y 8 se muestran los resultados obtenidos en la identificación del polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R para cada individuo analizado.

Cuadro 8. Resultados para la presencia del polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R para muestras Landrace.

Muestra	G/G (Normal)	A/G o G/A (Heterocigoto)	A/A (Polimorfismo)
M1	×		
M2		×	
M3		×	
M4		×	
M5	×		
M6			
M7		×	
M8		×	
M9		×	
M10	×		

Cuadro 9. Resultados para la presencia del polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R para muestras pelón mexicano.

Muestra	G/G (Normal)	A/G o G/A (Heterocigoto)	A/A (Polimorfismo)
PM1	×		
PM2	×		
PM3	×		
PM4	×		
PM5		×	
PM6	×		
PM7		×	
PM8		×	
PM9	×		
PM10	×		

El polimorfismo 1426 G/A del gen MC4R se ausentó en todas las muestras, mientras que en los individuos M2, M3, M4, M7, M8, M9, PM5, PM7 Y PM8 indicaron ser heterocigotos. En el Cuadro 9 se encuentra la comparación de la presencia del polimorfismo en todas las muestras.

Cuadro 10. Comparación de la presencia del polimorfismo 1426 G/A en las muestras Landrace y Pelón Mexicano.

	Landrace		Pelón Mexicano	
	No. Muestras	Frecuencia	No. Muestras	Frecuencia
Ausencia del polimorfismo G/G: 150pb y 76pb.	4	0.4	7	0.7
Individuo heterocigoto A/G o G/A: 226pb, 150pb y 76pb.	6	0.6	3	0.3

Presencia del polimorfismo A/A: 226pb.	0	0	0	0
Total	10	1.0	10	1.0

El conocimiento sobre los componentes genéticos de la acumulación de tejido graso es muy importante en la producción ganadera. Existen características de la gordura en el mejoramiento de la producción de cerdos, tales como espesor de grasa dorsal, contenido de grasa intramuscular, porcentaje de grasa abdominal y composición de ácidos grasos (Fortin et al., 2005). La mejora genética de estos caracteres debe evitar la disminución del contenido en grasa intramuscular (GIM), que debe ser elevado para favorecer una lenta deshidratación en el proceso de curación, una adecuada producción de aromas y el veteadado de los productos apreciados por los consumidores (Fernández et al., 2003).

El polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R ha sido ampliamente estudiado en cerdos Landrace (Kim et al, 2000; Hernandez-Sanchez et al, 2003; Houston et al, 2004; Jokubka et al, 2006) y se ha establecido que presenta una posible asociación con el espesor de tocino dorsal, ya que su presencia se ha detectado mayormente en esta raza de la cual se obtiene carne con mayor contenido de grasa. Por otro lado, el estudio de este polimorfismo en cerdos Pelón Mexicano no se había realizado y al tener en su composición una mayor cantidad de grasa (Montiel et al, 1997) es importante investigar la posible asociación entre sus características de calidad de carne y el polimorfismo mencionado. Por ello se realizó el estudio comparativo entre ambas razas y su asociación con el polimorfismo.

En estudios previos (Kim et al, 2000; Hernandez-Sanchez et al, 2003) reportaron que el cambio de G por A se asocia significativamente con la grasa intramuscular (FMI) en cerdos Landrace por lo que se estableció que la carne de individuos homocigotos para el polimorfismo (A/A) resultaba tener mayor contenido de grasa que los individuos homocigotos para el genotipo sin polimorfismo (G/G), mientras que los individuos heterocigotos (G/A o A/G) tenían valores intermedios de grasa intramuscular en comparación de los otros dos genotipos. En cuanto al cerdo Pelón mexicano no se tenía establecida la

asociación de este polimorfismo, así, en este trabajo se realizó la comparación de los genotipos en ambas especies para establecer la asociación entre la raza y el polimorfismo.

Los resultados obtenidos en este trabajo respecto a cerdos Landrace presentaron al genotipo homocigoto G/G en 4 muestras de 10, el número de muestras que presentaron el genotipo heterocigoto A/G o G/A fue de 6 y no se presentó el patrón que corresponde a los individuos homocigotos para el polimorfismo A/A. Con respecto a los valores obtenidos para las muestras de cerdos Pelón mexicano, el número de muestras con el genotipo G/G fue de 7, para el genotipo heterocigoto A/G o G/A fueron 3 muestras y finalmente para el genotipo homocigoto para el polimorfismo A/A no se presentó en ninguna muestra. Al realizar la comparación entre los resultados obtenidos para cada raza (Cuadro 9) se puede observar que el polimorfismo no es característico de cada raza, por lo que su asociación al espesor del tocino dorsal con base al estudio realizado entre cerdos Landrace y Pelón mexicano no puede atribuirse a este.

CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

La hipótesis planteada fue la siguiente:

El polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R tendrá diferente frecuencia alélica en cerdos Landrace y Pelón mexicano, lo cual puede afectar a las características asociadas a la calidad de su carne.

Los resultados demuestran que el polimorfismo 1426 G/A no tuvo presencia en las especies Landrace y Pelón Mexicano pues 6 de las muestras de Landrace fueron heterocigotos y el resto no lo presentó. Por otro lado, de las muestras de Pelón Mexicano solo 3 individuos fueron heterocigotos y las demás mostraron ausencia del polimorfismo. Por lo tanto, se puede afirmar que en esta investigación el polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R no tiene presencia diferente entre las especies Landrace y Pelón Mexicano.

En este sentido, con los resultados obtenidos se puede decir que, el polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R no tiene relación alguna con el perfil de características de la carne de cada especie, ya que como se mencionó con anterioridad hay diferencias entre las especies Landrace y Pelón Mexicano que afectan a la calidad de la carne de cada una de ellas, sin embargo, al carecer todos los individuos del polimorfismo, se comprueba que dicho polimorfismo no tiene relación entre las características que dan diferente perfil en la carne de cada especie.

CONCLUSIONES

La técnica de PCR- RFLP llevada a cabo con los primers específicos de la especie y la enzima Taq I respectivamente, permiten detectar la presencia del polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R en cerdos Landrace y Pelón Mexicano de manera satisfactoria, ya que en la electroforesis se observaron las bandas correspondientes de 150pb y 76pb que indican la ausencia del polimorfismo y la banda de 226pb que indica la presencia del polimorfismo en el caso de las muestras que resultaron ser individuos heterocigotos.

Al carecer ambas especies del polimorfismo, se descarta la participación del polimorfismo 1426 G/A en el gen MC4R como un factor que determine el perfil en las características de la carne entre dichas especies.

En este estudio el polimorfismo estudiado no tiene presencia significativa entre las especies Landrace y Pelón Mexicano, no obstante, como se mostró con anterioridad, existen otros polimorfismos que deben ser estudiados para comprender su impacto y así obtener en el futuro cruza de cerdos con las características genéticas óptimas para su uso en la industria alimentaria.

Los resultados obtenidos en este trabajo son confiables, sin embargo, se sugiere la ampliación del proyecto llevándolo a cabo con un número mayor de muestras para obtener resultados concluyentes en cuanto a la condición del polimorfismo 1426 G/A en cerdos Landrace y Pelón Mexicano.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Pierce, B. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. Estados Unidos: Médica Panamericana.
- Alberts, B., Bray, D., & Hopkin, K. e. (2006). *Introducción a la biología celular (2°ed)*. México: Médica Panamericana.
- Audesirk, T., & Audesirk, G. y. (2004). *Biología, ciencia y naturaleza*. México: Pearson Educación.
- BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III. (2016.). *Control de calidad muestras de ADN en solución*. Salamanca.: Universidad de Salamanca.
- Becerra V., V., & Paredes C, M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *SciELO*.
- Betticher DC, T. N. (1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* , 1005-1011.
- BIMODI. (2014). *BIMODI*. Recuperado el 04 de Septiembre de 2017, de LOS PASOS EN LA PCR: <http://www.bimodi.com/index.php/tecnicas/93-temas-de-interes/232-el-adn-y-la-biologia-molecular.html>
- Biología Avanzada. (2017). *La Reacción en Cadena de la Polimerasa - Avanzada*. Recuperado el 04 de Septiembre de 2017, de <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Bolívar Zapata, F. (2004). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. México: EL COLEGIO NACIONAL.
- Botstein D, R. N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease future approaches for complex disease. *Nat Genet*, 228-237.
- Braña Varela, D., Ramírez Rodríguez, E., Rubio Lozano, M., Sanchez Escalante, A., Torrescano Urrutia, G., Arenas de Moreno, M., . . . Ríos Rincón, F. (2011). *Manual de Análisis de Calidad en Muestras de Carne*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Camacho Rea, M., Arechavaleta Velasco, M., Braña Varela, D., & Ramírez Ramírez, F. (2013). *Factores genéticos que influyen en la calidad de carne de*

cerdo. Querétaro: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal.

- Campbell, N. y. (2005). *Biología (7° ed.)*. España: Médica Panamericana.
- Cargill M, A. D. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* , 231.
- Carleton, S. (1995). *The PCR: applications in genomic analysis, “En” Human chromosomes: principles and techniques. 2nd. ed.* U.S.A: Mc Graw Hill.
- Collins, F. &. (2001). Implications of the human genome project for medical scien. *JAMA Vol 285*, 540.544.
- COMECARNE. (2016). *Compendio estadístico 2016*. Obtenido de CONSEJO MEXICANO DE LA CARNE: <http://comecarne.org/estadisticas/>
- Contreras J, P. G. (1991). *Manual de Técnicas Básicas. Primer Curso Institucional sobre Biología Molecular*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
- Cortés Tinoco, G., Mora Flores, J., García Mata, R., & Ramírez Valverde, G. (2012). Estudio del consumo de la carne de cerdo en la zona metropolitana del Valle de México. *SciELO*, 335-351.
- Dibner, D. L., & M.D., &. (1986). *Basic methods in molecular biology*. Nueva York: Elsevier Science publishing Co. Ind.
- Duan J, W. M. (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet*, 205-216.
- Fernández A, de Pedro E, Núñez N, Silió L, García-Casco J, Rodríguez C, 2003. Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in Iberian pigs. *Meat Sci.* 64: 405-410.
- FIRA. (2016). *Situación de la porcicultura mexicana*. Obtenido de Porcicultura: http://www.porcicultura.com/porcicultura/app_porcicultura/art_interior.asp?cve_art=10147
- Fortin, A., Robertson, W.M., Tong, A.K.W. (2005). The eating quality of Canadian pork and its relationship with intramuscular fat. *Meat Science.* 69:297–305.
- Freifelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. España: Reverté.

- Gantz I, M. H. (1993). Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. . *J Biol Chem* 268, 15174–15179.
- Gill, J., Bishop, C., & McCorquodale, C. e. (2010). Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Science*, 86, 985-993.
- González, F. (2006). Ensayos médicos sobre genética, Aproximación breve al genoma Humano y los polimorfismos genéticos. . *Research, Health & Medicin*, 1-32.
- Guerrero, I. (2006). *Ciencia y tecnología de carnes*. México: Limusa.
- Hernández C. J.F., G. C. (2007). *Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente*. Nacameh.
- Hernández-Sánchez, J. V. (2003). Candidate gene analysis for quantitative traits using the transmission disequilibrium test: the example of the melanocortin 4 receptor in pigs. *Genetics* 164, 637-644.
- Herraéz, A. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en la ciencia de la salud (2° ed.)*. España: Elsevier Science.
- Houston, R. D. (2004). A melanocortin four receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations. *Animal Genetics*, 35., 386-390.
- INEGI. (2011). *Ganadería*. Recuperado el 20 de 09 de 2016, de INEGI: <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/primarias/gana/default.aspx?tema=E>
- Innis, M. G. (1995). *PCR Strategies*. San Diego, California: Academic Press Inc.
- Isler, B. J. (2002). Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive traits in swine. . *J. Anim. Sci.* 80, 2334-2339.
- Jimenez Garcia, E., Tapia Vieyra, J., & Mas Oliva, J. (2004). El esplaiceosoma: corte y empalme del pre-ARNm. *REB*, 59-63.
- Jokubka, R., Maak, S., Kerziene, S., Swalve, H.H. (2006): Association of a melano-cortin-4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 123:12-22.

- Kim KS, L. N. (1999). Rapid communication: linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene. *J Anim Sci*.
- Kim, K. L. (2000). A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome 11*, 131-135.
- Kim, K. S. (2004). Domestic Animal Endocrinology, 26. *Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin four receptor in domestic pigs.*, 75-86.
- Lehninger, A., & Nelson, D. y. (1991). *Principios de bioquímica*. España: Ediciones Omega.
- Lemus Flores, C., & Alonso Spilsbury, M. (2005). *EL CERDO PELÓN MEXICANO Y OTROS CERDOS CRIOLLOS*. CONACYT.
- Lemus-Flores, C. U.-A.-K. (2001). Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *J. Anim. Sci.* 79., 1-6.
- Lin MT, S. B. (2003). Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versushost disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*, 349:2201-2210.
- López, G. (1991). *Manual de bioquímica y tecnología de la carne*. España: Vicente Ediciones.
- Luque, J. y. (2002). *Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones*. España: Elsevier Science.
- Marsh, D.J., Hollopeter, G., Huszar, D., Laufer, R., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Burn, P., Palmiter, R.D. (1999). Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nature Genetics*. 21(1):119–122.
- McPherson, M. H. (1995). *PCR2: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- Medina, F., Alemán, T., & Ferguson, B. e. (2007). *Ganadería, desarrollo y ambiente: una visión para Chiapas*. . México: Fundación Produce Chiapas.
- Montiel, R. A. (1997). Composición de la canal del Cerdo Pelón Mexicano. *Memorias XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. , 183.
- Moreno, B. (2006). *Higiene e inspección de carne*. España: Díaz de Santos.

- Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 25 de Agosto de 2004.
- Óvilo, C., Fernández, A., Rodríguez, M., Nieto, M., & Silió, L. (2006). Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Science Direct*, 42-47.
- Pamplona Roger, J. (2008). *Enciclopedia de los alimentos y su poder curativo*. España: SAFELIZ.
- Passarge, E. (. (2004). *Genética, texto y atlas* (2° Edición ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Pierce, B. (2010). *Genética, un enfoque conceptual* (3° ed.). España: Médica Panamericana.
- Puerta , C., & Urueña, C. (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rentarías, M. (2000). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Blood*, 541-566.
- Rothschild, M. F. (1996). The Estrogen Receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Genet* 93, 201-205.
- Rouessac, F. (2003). *Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. España: McGraw Hil.
- Rubio Lozano, M., Braña Varela, D., Méndez Medina, R., & Delgado Suárez, E. (2013). Composición de la Carne Mexicana. *Folleto Técnico No. 27*, 40.
- Rys, P. P. (1993). *Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification product*. J Clin Microbiol.
- SAGARPA. (2009). Recuperado el 22 de Septiembre de 2016
- Sambrook, J. y. (2001). *Molecular Cloning a laboratory manual* (3° ed.). E. U. A: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, J. (2014). Melanocortin-4 receptor: relevance in eating behaviour and body fat accumulation. *Endocrinol. diabetes*, 17-20.

- Seeley, R.J., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Burn, P., Thiele, T.E., van Dijk, G., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (1997). Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*. 390 (6658): 349.
- SIAP. (2016). *Atlas Agroalimentario 2016*. México: SIAP.
- SIAP. (2009). *Directorio estatal y nacional de centros de sacrificio y resumen de centros de sacrificio por estado*. . Recuperado el 05 de Septiembre de 2016, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA: www.siap.gob.mx
- Sica, B., Soria, L., & Corva. P., e. a. (2011). Variantes en dos genes candidatos para características e calidad de carne bovina en Argentina. *Arch zootec*, 521-532.
- Silió J., T. M. (1997.). Inferencias sobre cambios genéticos en una línea de cerdos ibéricos seleccionada para crecimiento magro. . *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* 12, 65-77.
- Smith, T., Casas, E., & Rexroad, C. e. (Journal of Animal Science). Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. 2000, 2589-2594.
- Somma, M. (2015). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. JRC European Commission.
- Stock Silberman, R. (2016). *PCR en tiempo real*. Obtenido de Métodos físico-químicos en Biotecnología: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
- Tamarin, R. (1996). *Principios de genética*. Barcelona, España: Reverte.
- Tatro, J. (1996). Receptor biology of the melanocortins, a family of neuroimmunomodulatory peptides. *Neuroimmunomodulation* 3, 259–284.
- Trujillo OME, M. G. (2002). *La piara Reproductora*. México: Mundi-Prensa.
- USDA. (2008). *El Color de las Carnes y de las Aves*. Recuperado el 20 de Abril de 2017, de Información sobre Inocuidad de Alimentos: https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/4ce35862-b3a7-4050-9140-48a296dfb88e/Color_Carnes_Aves.pdf?MOD=AJPERES

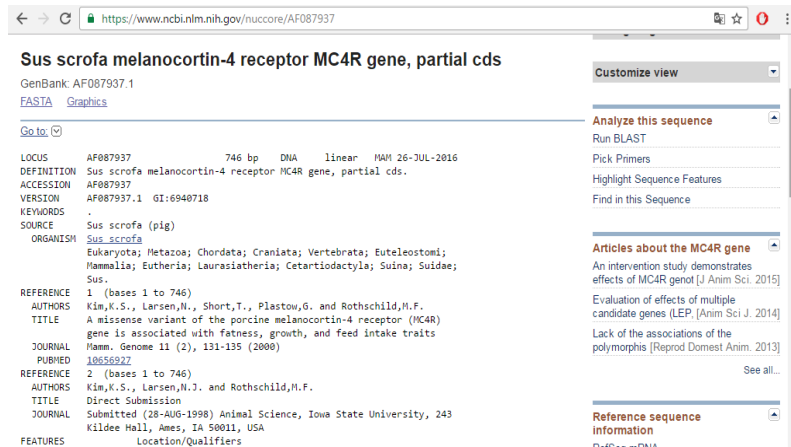
- Van den Maagdenberg, K. (2007). El Asp298Asn mutacion sin sentido en el MC4R que afecta el crecimiento y características de la canal sin un efecto sobre la calidad de la carne. *Cambridge Core*, 1089-1098.
- Voet, D. y. (2006). *Bioquímica (3° ed.)*. Argentina: Médica Panamericana.
- Walker, J. y. (1997). *Biología molecular y biotecnología (2° ed.)*. España: Acribia.
- Wardlaw, S. L. (2001). Obesity as a neuroen-docrine disease: lessons to be learned from proopiomelanocortin and melano-cortin receptor mutations in mice and men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86:1442–1446.
- Warriss, P. (2000). *Meat Science. An introductory text*. CABI Publishing. Cab International.

ANEXOS

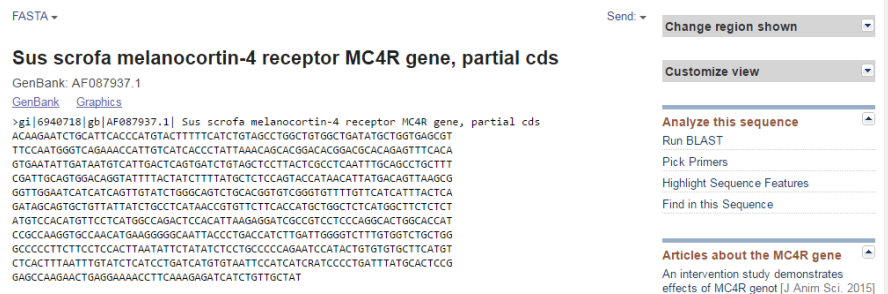
ANEXO 1. EVALUACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMPLIFICACIÓN

Para corroborar que las secuencias de los primers seleccionados del artículo previo “A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits” (K. S. Kim et al, 2000) eran correctas, se verificaron con ayuda del programa Sequencher para poder llevar a cabo esta actividad se realizó lo siguiente:

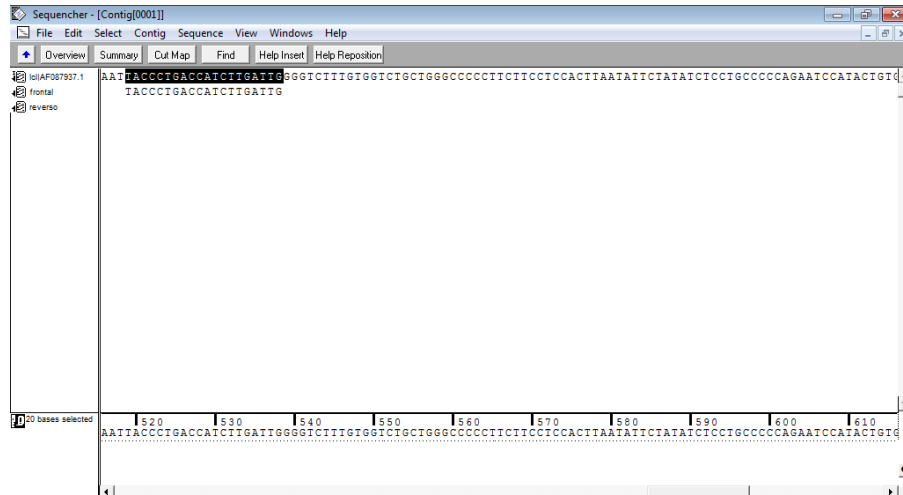
Ingresar a la base de datos de GenBank, seleccionar la opción Nucleotide y consultar la secuencia del gen MC4R de Sus Scrofa (AF087937.1).



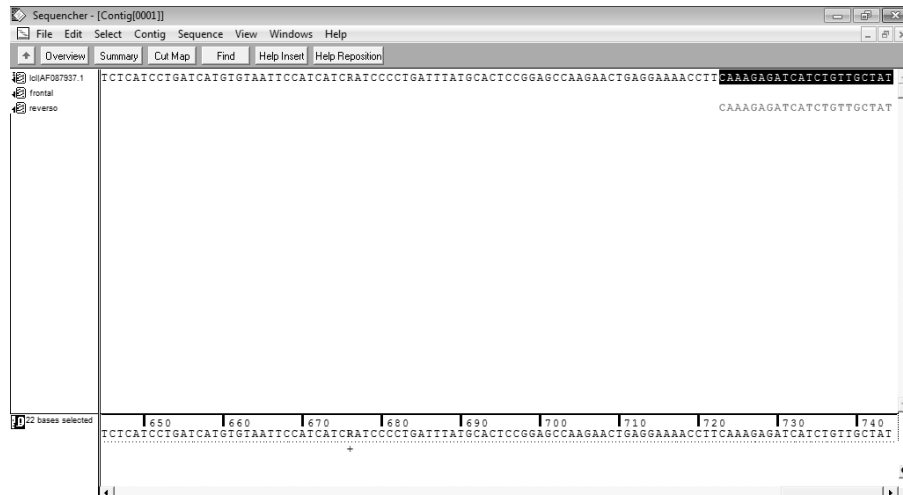
Posteriormente se consultó la secuencia en formato fasta y se copió en el programa sequencher.



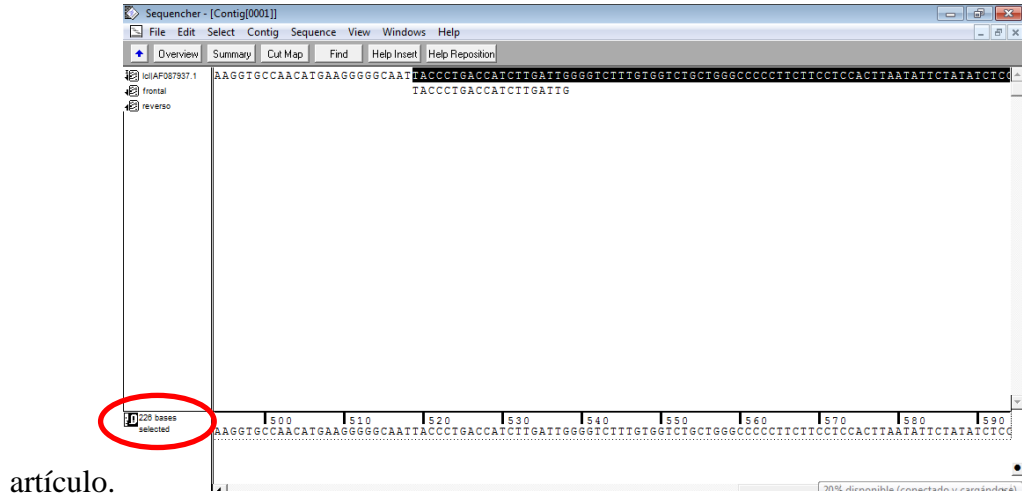
Después de identificó la secuencia del primer frontal reportado en el artículo (20pb).



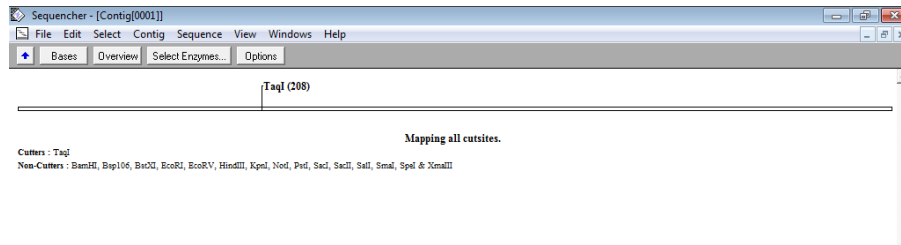
Una vez identificado el primer frontal, se hizo lo mismo con el primer reverso (22pb).



Se corroboró que la secuencia a amplificar es de 226pb, como está reportada en el



Como último paso se seleccionó la opción cutmap para corroborar si la enzima reportada en el artículo si cortaba en el sitio del polimorfismo y si corta en el codón 298 originando 2 bandas: una de 156pb y otra de 70pb.



ANEXO 2. CÁLCULO DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN

Para definir la estrategia de la PCR se realizó el cálculo de la Temperatura de hibridación (Tm):

Primer	Secuencia	Número de T	Número de G	Número de C	Número de A
Frontal	TAC CCT GAC CAT CTT GAT TG	7	3	6	4
Reverso	ATA GCA ACA GAT GAT CTC TTT G	7	4	4	7

Para el cálculo de la Tm se utilizó la siguiente ecuación:

$$Tm = ((G + C)4 + (A + T)2) - 5$$

Dónde:

G = número de G

C = número de G

A = número de A

T = número de T

Sustituyendo nos queda para:

- Primer frontal:

$$PF = ((3 + 6)4 + (4 + 7)2) - 5 = 53^{\circ}\text{C}$$

- Primer reverso:

$$PR = ((4 + 4)4 + (7 + 7)2) - 5 = 55^{\circ}\text{C}$$

Haciendo el promedio de ambos valores, el resultado final de la temperatura de hibridación es:

$$Tm = 54^{\circ}\text{C}$$