

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2008 2(1): 39-50

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN
EN SEMENTALES PORCINOS PARA EVALUAR LA
FRECUENCIA DE LOS GENES ESR Y PRLR CON PCR-RFLP**

**TECHNICAL STANDARDIZATION OF DNA EXTRACTION IN SWINE
SIREES TO EVALUATE THE FREQUENCY OF ESR AND PRLR GENES WITH
PCR-RFLP**

Eva Dolores Ramos¹, Reyna Isabel Rojas Martínez², José G. Herrera Haro¹, Adelfa del Carmen García Contreras³, Clemente Lemus Flores⁴ y Alfonso Hernández Garay¹.

¹Programa de Ganadería y ²Programa de Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados.56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. ³Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, ⁴Universidad Autónoma de Nayarit.

Resumen

El presente estudio consistió en estandarizar una técnica de extracción y purificación de ADN a partir de pelo por ser una muestra no-invasiva, dado que la obtención de muestras constituye una de las principales limitaciones en estudios moleculares. Se muestrearon 35 sementales porcinos línea materna Yorkshire y Landrace. La calidad del ADN se verificó por medio de electroforesis. La técnica estandarizada produjo una alta cantidad y calidad de ADN, así mismo, mediante la amplificación y generación de fragmentos de los genes por medio de PCR se evaluó la frecuencia de dos genes relacionados con prolificidad: Receptor de la prolactina (PRLR) y Estrógeno receptor (ESR). En la generación de los genotipos (RFLP) se utilizaron las enzimas Alu I para PRLR y Pvu II para ESR. Los resultados obtenidos mostraron que los genotipos asociados a los genes PRLR y ESR no se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg (X^2 , $p < 0.05$). El alelo favorable A del gen PRLR y B del gen ESR mostraron frecuencias de 0.21 y 0.14 respectivamente. En el gen ESR, no ocurrieron animales homocigotos para el genotipo BB.

Palabras clave: ADN de pelo, cerdos, PCR-RFLP.

Summary

In order to standardize extraction technique and purification of DNA from hair in swine, samples of 35 sires of Yorkshire and Landrace maternal Lines were obtained and the frequency of the genes ESR and PRLR were valued using PCR-RFLP. As a result of this technique a high quantity and quality of DNA was extracted. Two genes related with high prolificidad were identified: Estrogen (ESR) and prolactina (PRLR) receiver. These genes were amplified using PCR and RFLP's and the genotypes were identified. The enzyme Pvu II was used to identification of ESR and Alu I for PRLR. The results showed that the genotypes associated to the genes ESR and PRLR were not in Hardy-Weinberg balance ($X^2, p < 0.05$). The favorable allele A of the gene PRLR and B of the gene ESR it showed frequencies of 0.21 and 0.14 respectively. There were not homocigote genotypes BB for the ESR gene.

Key words: hair analysis DNA, boars, PCR-RFLP.

Introducción

La eficiencia en la industria porcina esta relacionada directamente con la productividad de las piaras que a su vez, depende de la identificación y uso de sementales y hembras como progenitores de futuras generaciones (Duarte, 2001; Herrera *et al.*, 2003). La prolificidad es una de las características reproductivas con mayor importancia económica, pero con baja heredabilidad (Buxadé, 2000; Torres *et al.*, 2004). Por ello, la genética molecular, apoyada en la selección asistida con marcadores, posibilita la identificación de genes relacionados con la superioridad reproductiva de la piara, permitiendo seleccionar en forma más precisa a los mejores reproductores. (Romero, 2003; Cunningham y Meghen, 2001). Así, una vez identificados los alelos asociados con un carácter de interés, es posible trazar cual de ellos será transmitido a su descendencia, permitiendo seleccionar animales antes que ingresen a la unidad de producción (Canul *et al.*, 2005; Yáñez *et al.*, 2005), abriendo nuevas estrategias tecnológicas en la selección de cerdos.

En la actualidad, aunado a las técnicas de genética cuantitativa se incorporan las de biología molecular (Rothschild y Plastow, 1999), apoyadas en marcadores que utilizan la amplificación de una secuencia específica de un fragmento de ADN vía reacción en cadena de la polimerasa. Actualmente se conocen diversos genes en ganado porcino, como los receptores de la prolactina (PRLR) y de estrógenos (ESR), los cuales son candidatos para tamaño de camada. Algunos investigadores coinciden en que el alelo A es el favorable para

obtener mayor tamaño de camada en el gen PRLR (Kelly et al., 1989; Vincent et al., 1997; Alonso et al., 2003) y B el alelo favorable para aumentar el número de lechones nacidos vivos y totales (Rothschild et al., 1996; Short et al., 1997) y el peso de la camada al nacimiento (Isler et al., 2002). Aunque la extracción y purificación de ADN es un protocolo conocido, se requiere de un procedimiento de muestreo de sementales en granjas de cerdos núcleo y centros de inseminación artificial que evite el estrés y el exceso de manejo de los sementales, como la utilización de pelo. El objetivo de la presente investigación fue estandarizar y perfeccionar una metodología de extracción y purificación de ADN a partir del pelo de sementales porcinos, valorando su eficiencia como método de extracción de ADN y analizando la frecuencia genotípica de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP.

Material y métodos

En la presente investigación se utilizaron 35 sementales de raza pura York y Landrace, en actividad reproductiva y con registros de producción localizados en diferentes granjas del país.

Colección y manejo de muestras

La información obtenida incluyó la identificación del semental, número de camadas, total de lechones por camada (LNT), lechones nacidos vivos (LNV), lechones nacidos muertos (LNM) y lechones destetados (LDEST).

Se colectaron muestras de pelo del lomo de los sementales, tirando fuertemente con los dedos pulgar, índice y medio, se procuró extraer el bulbo piloso de aproximadamente 50 pelos por cerdo. Las muestras fueron etiquetadas, transportadas y conservadas en bolsas de plástico a temperatura ambiente hasta el momento de ser procesadas en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular del Colegio de Postgraduados, Campus-Montecillo.

Extracción de ADN

La metodología desarrollada se basó en la combinación de diversos protocolos preestablecidos y modificados, tomando como referencia la propuesta por Sambrook et al. (1994) que consistió en lavar 20 pelos por semental, cortando cada pelo a una distancia de 5 a 10 mm del folículo colocándolos dentro de un Eppendorf al que se le agregaron 1000 µl de solución lisis (Tris HCl pH 8, NaCl 5M, EDTA 0.5M pH 8, SDS, H₂O), 50 µl de dithiothreitol (DTT) 1M y 50 µl de proteinasa K agitando durante 5 minutos en vortex (MS1 Minishaker, Marca IKA). Después de este procedimiento, las muestras se incubaron durante

12 h. a 50°C. Transcurrido el tiempo, se agitaron en vortex durante 5 minutos y se centrifugaron (Spectrafuge 16M, Marca Labnet) por 10 minutos a 14000 rpm. Una vez recuperado el sobrenadante, nuevamente se adicionó a cada tubo 50 µl de DTT y 50 µl de proteinasa K, incubándose en baño María por una hora a 65°C. Posteriormente, se aumento la temperatura a 90°C por 10 minutos y se adicionó a cada tubo un volumen de fenol cloroformo (1:1) mezclando en vortex durante 5 minutos y centrifugando 10 minutos a 14000 rpm. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se adicionó un volumen de Cloroformo Alcohol Isoamilico (24:1) agitando por inversión y centrifugando durante 10 minutos a 14000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y precipitó con un volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de cloruro de sodio (NaCl), agitando por inversión e incubando durante 4 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos y se decantaron, procediéndose a lavar la pastilla con 300 µl de etanol al 70% agitando por inversión y centrifugando a 14000 rpm durante 8 minutos. Las muestras se decantaron y fueron expuestas a una temperatura de 37°C para su secado. Finalmente se resuspendió cada muestra con 35 µl de agua estéril.

Evaluación de ADN

Una vez extraído el ADN se procedió a verificar su calidad en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis (Horizon 58, Marca Life Technologies) durante 25 minutos a 86 voltios. Los resultados se visualizaron en el fotodocumentador (Gel Doc 2000, Marca Bio Rad) y las imágenes capturadas en el programa Quatityone; según la presencia, integridad y calidad del ADN extraído se procedía a realizar la técnica de PCR.

Amplificación de ADN por PCR

Para cada muestra de ADN la mezcla de PCR estaba compuesta por 2.5 µl de buffer 10X (Promega), 1.25 µl de Mg, 0.5 µl de dNTPs (Biogenica), 1 µl de Primer Forward, 1 µl de Primer Reverse, 16.25 µl de Agua y 0.5 µl de ADN polimerasa (Amplificasa® 500U BIOGENICA). Una vez hecha la mezcla se tomaron 23 µl del tubo para depositarlos dentro un tubo de PCR, más 2 µl de ADN extraído del pelo de cada semental, para tener un volumen final de 25 µl. Los primers para PRLR fueron los siguientes: F 5'CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG 3' y R 5'GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA 3' y para ESR los primer utilizados fueron: F 5'CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG 3' y R 5'CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3'.

Las reacciones se colocaron en el termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer®), bajo las siguientes condiciones: para el gen Receptor de la Prolactina (PRLR): desnaturalización inicial a 93°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 93°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 3 minutos. Para el gen Estrógeno Receptor (ESR): el programa consistió: 94°C 5 minutos, 31 ciclos de 94°C por 45 segundos, hibridación a 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 8 minutos. Las amplificaciones de los dos genes se verificaron en geles de agarosa al 2% por medio de electroforesis durante 1 hora a 75 voltios.

Genotipificación mediante fragmentos polimorficos largos de restricción (RFLP)

Para la genotipificación, los productos de PCR se digirieron con enzimas de restricción. Cada tubo de PCR contenía la siguiente mezcla: 2 µL de buffer, 9.8 µL de agua, 0.2 µL de enzima de restricción (AluI para PRLR y PvuII para ESR) y finalmente 8 µL de la amplificación de PCR de los diferentes sementales. Una vez identificados los tubos se colocaron en baño maría durante 3 h. a 37°C.

Las bandas generadas por las enzimas de restricción fueron verificadas en un gel de acrilamida y visualizadas mediante exposición a la luz ultravioleta en el fotodocumentador. Cada fragmento obtenido se comparó con patrones estándar de los genes PRLR y ESR, propuestos por Vincent et al. (1997) y Short et al. (1997) respectivamente.

Análisis estadístico

Con la información de las granjas se obtuvieron los estadísticos descriptivos para las características de número de lechones totales (LNT), vivos (LNV), muertos (LNM) y destetados (LDEST). Con el análisis molecular de los sementales se obtuvieron las frecuencias génicas y fenotípicas para el polimorfismo de receptor de la prolactina (PRLR) y de los receptores de estrógeno (ESR), probando el equilibrio de Hardy – Weinberg con una prueba de Chi-Cuadrado. Los datos fueron analizados con PROC GLM (SAS, 1997).

Resultados y discusión

El método de extracción estandarizado fue eficiente produciendo un ADN integro en buena cantidad y calidad (Fig. 1). Al inicio de cada extracción solo se elegían pelos que tenían folículo perfectamente visible (Hukkelhoven et al., 1981), ya que cuando los pelos tenían folículo nulo o ligeramente palpable, en las corridas electroforéticas se observaban bandas de ADN nítidas, confirmando lo descrito por Higuchi et al. (1988) quienes mencionan que

también es posible obtener ADN de pelos sin folículo. En cambio, Moller y Brinkmann (1994) y Yoshii et al. (1994) sugieren no elegir este tipo de muestra si se puede optar por otras más eficientes (sangre, semen, uñas, saliva etc.), ya que aseguran que extraer ADN a partir de pelo tiene una eficiencia muy baja, que en ningún caso llega al 100%.

En el presente estudio, la estandarización de este protocolo busco desarrollar una técnica que permitiera obtener muestras no-invasivas, en este caso pelo, evitando técnicas de muestreo que implicaran la captura o estrés de los animales para obtener las muestras. La opción de usar pelo abrió puertas para muestrear granjas a las cuales difícilmente se puede ingresar por razones de bioseguridad.

La extracción de ADN a partir de pelo se estandarizó a pesar de estar catalogado como un protocolo difícil desde el punto de vista de los métodos de extracción de ADN. En esta investigación las electroforesis de los geles teñidos en TBE 1X con 1 µg/ml de bromuro de etidio muestran la especificidad de la técnica de extracción de ADN del pelo de los sementales porcinos empleados en este estudio. Se desarrollo un protocolo de extracción en el cual se realizó un primer paso de lisis a través del detergente SDS y posteriormente para la purificación del ADN total se aplicó el método de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico que permitió la remoción de los productos de degradación, lo que conserva el ADN por mayores períodos. También requirió un tiempo prolongado de incubación y mucho cuidado en la serie de pasos a seguir durante la manipulación, ya que muchas veces se pierde en el transcurso del procesamiento de las muestras, atribuida quizá a la escasez de células nucleadas que contienen los pelos, localizados casi exclusivamente en el bulbo piloso y su cubierta epidérmica o por los contenidos de metabolitos secundarios como polifenoles y al efecto inhibidor de las melaninas hidrosolubles que se generan y causan problemas frecuentemente al momento de la extracción del ADN, formando un complejo inactivo constituido por dos moléculas de melanina,

Los resultados de esta técnica revelaron que es altamente reproducible y confiable “casi perfecto”, demostrado con la amplificación de PCR y digerido con enzimas de restricción (RFLP). Todas las muestras fueron amplificadas y digeridas satisfactoriamente; estos análisis se realizaron con el objetivo de encontrar una metodología que permitiera muestrear animales como en este caso; sementales línea materna, sin restricción alguna para ser obtenidas. Se evidenció una alta especificidad de la técnica (100%) debido a que el ADN extraído del pelo de los sementales amplificó con los primers: F 5' CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG 3' y R 5' GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA 3' las bandas de 427 pb para el gen PRLR y 120 pb para el gen ESR usando los primers F 5' CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG

3' y R 5' CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG 3', demostrando así la especificidad de la técnica estandarizada (Fig. 2 y 3). La alta sensibilidad de la PCR a partir de ADN de pelo fue demostrada con la generación de los diferentes fragmentos del producto amplificado digerido con enzimas de restricción; AluI para el gen PRLR generando fragmentos de 124, 110, 79, 77 y 67 pb (Vincent et al., 1997) (Fig. 4) y Pvu II para generar fragmentos de 120, 65 y 55 pb del gen ESR (Short et al., 1997) (Fig. 5).

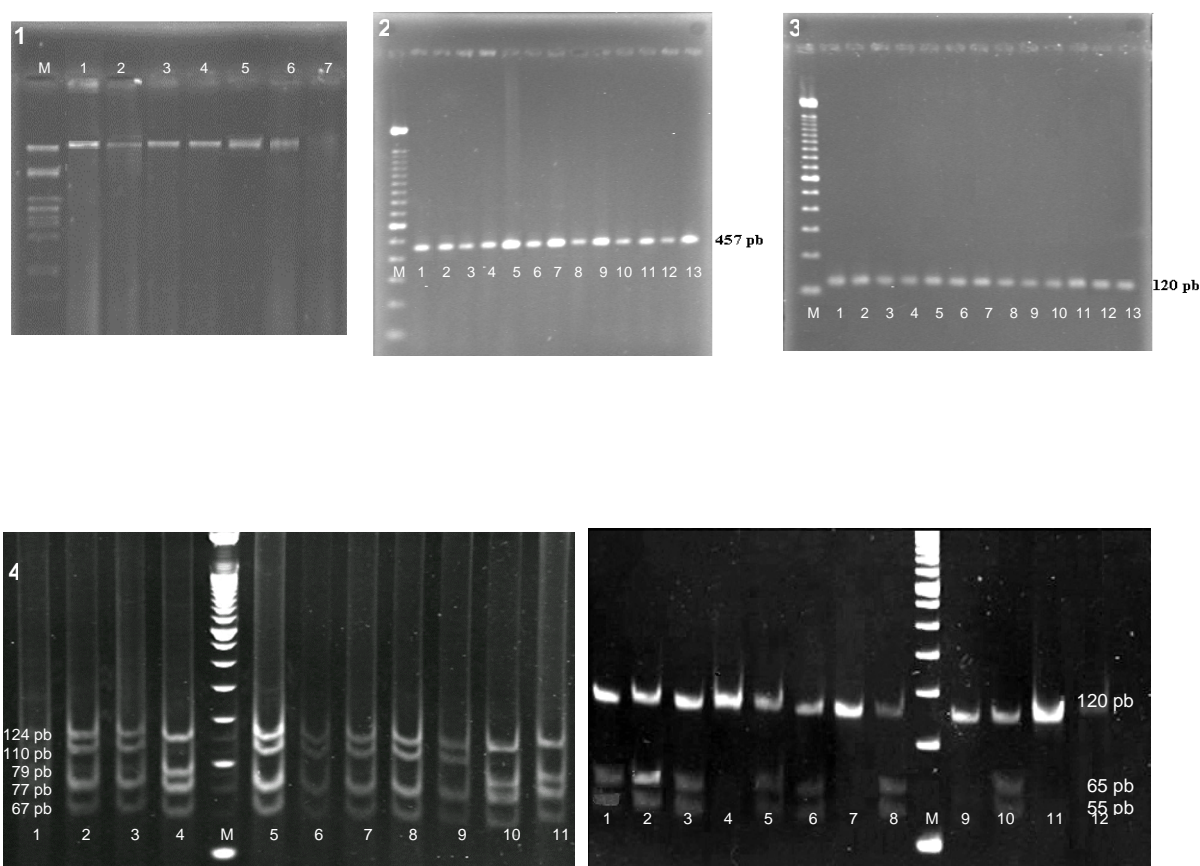


Figura 1. Gel de agarosa al 1%; (M) marcador 1kb; (2-7) AND proveniente de pelo de sementales porcinos. **Figura 2.** Amplificación del gen PRLR (457 pb) en gel de agarosa al 2%; (M) marcador 1kb (Promega Corporation). **Figura 3.** Amplificación del gen ESR (120 pb) en gel de agarosa al 2%; (M) marcador 1kb (Promega Corporation). **Figura 4.** Digestión del gen PRLR en acrilamida; (M) marcador de 50 pb; (1) sementales con genotipo AB; (4, 10 y 11) sementales con genotipo AA y (2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9) sementales con genotipo BB. **Figura 5.** Digestión del gen ESR en acrilamida; (M) Marcador de 50 pb; (1, 2, 3, 5, 6, 8 y 10) sementales con genotipo AB; (4, 7, 9, 11 y 12) sementales con genotipo AA.

Los estadísticos descriptivos para las características relacionadas con la prolificidad de las piaras, obtenidas con una muestra de 35 sementales de raza materna (18 Yorkshire y 17 Landrace) se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Número de camadas, medias y errores estándar para diferentes características relacionadas con prolificidad de líneas maternas de cerdos.

Característica	Número de camadas	Media	Error Estándar
Lechones nacidos totales	644	9.92	0.16
Lechones nacidos vivos	640	9.24	0.11
Lechones nacidos muertos	635	0.58	0.05
Lechones destetados	383	8.30	0.11

En este cuadro, se puede apreciar la importancia del semental a la contribución genética de la piara, ya que cada uno es responsable de un promedio de 18 camadas, lo que significa que cada semental en promedio fue padre de 183 lechones. También se puede observar que la progenie de estos sementales es cerca de 10 lechones nacidos en total, 9 nacidos vivos y 8 destetados por camada, lo cual son buenos indicadores en este tipo de piaras.

La amplificación y digestión del gen PRLR mostró fragmentos polimórficos de 90 y 110 pb, en geles de acrilamida al 8%, se detectaron sementales con genotipos AA (homocigotos para los fragmentos de 124, 90 y 79 pb), AB (heterocigotos presentando fragmentos de 124, 110, 90 y 79 pb) y BB (homocigotos para los fragmentos de 124, 110 y 79 pb). En el cuadro 2. Para el gen PRLR se muestra las frecuencias genotípicas de PRLR, de 0.14% de AA, 0.14 de AB y 0.72 de BB. Vincent et al. (1998) reportan que el alelo A es el favorable para obtener mayor tamaño de camada, en esta investigación se encontraron sementales homocigotos para el genotipo AA con una frecuencia de 0.14. En el gen ESR para el alelo A no hubo sitio de restricción, resultando el fragmento completo de 120 pb para el genotipo AA y tres fragmentos de 120, 65 y 55 pb para el genotipo AB (Figura 5).

Hernández et al. (2006) destaca en un estudio realizado con 300 hembras porcinas una mayor frecuencia del alelo B, pero ningún homocigoto para el alelo B. Como se puede observar en el cuadro 2., el alelo B mostró una frecuencia baja de 0.14., esto se explica por el tamaño de población con que se trabajó, caso contrario ocurrió con el alelo A que alcanzó la mayor

frecuencia de 0.86 para el gen ESR. En varias investigaciones se ha indicado que el alelo para aumentar el tamaño de camada es el B (Rothschild et al., 1996; Short et al., 1997). En esta investigación, tampoco se encontraron sementales homocigotos para el genotipo BB del gen ESR, justificado esto en lo descrito por Rothschild *et al.*, (2003), quienes señalan que el alelo B del ESR está presente únicamente en grupos selectos de razas de cerdos, con lo que se explica la ausencia de sementales homocigotos BB en este estudio.

Cuadro 2. Frecuencias génicas y genotípicas para una muestra de sementales porcinos de razas maternas Yorkshire y Landrace.

Gen	N	Frecuencias génicas		Frecuencias genotípicas			Equilibrio de H-W
		Alelo A	Alelo B	AA	AB	BB	
PRLR	35	0.21	0.79	0.14	0.14	0.72	No
ESR	35	0.86	0.14	0.72	0.28	0.0	No

PRLR= Receptor de prolactina ESR= Estrógeno receptor H-W= Hardy – Weinberg

Los resultados obtenidos, con las muestras de sementales, mostraron que los genotipos asociados con tamaño de camada como los genes PRLR y ESR, en esta investigación no están en equilibrio Hardy-Weinberg (X^2 , $p < 0.05$). La comparación entre genotipos de los dos genes ocurrió en mayor frecuencia para los alelos que no son deseables en los dos genes, PRLR mostró frecuencia de 0.79 y 0.86 para ESR. El Análisis de Varianza permitió comparar los genotipos asociados a los genes candidatos PRLR y ESR, no encontrando diferencias entre ellos ($p > 0.05$) en las variables LNT, LNV, LNM Y LDEST. Esto se explicaría por el tamaño finito poblacional, la deriva genética o selección y el tipo de apareamientos en cada una de las granjas, por lo que solamente se establece su importancia basada en los hallazgos de diferentes investigadores.

En esta investigación, se ha realizado la amplificación de los dos genes mediante PCR, así como su digestión por RFLP, con ADN extraído de pelo de sementales porcinos, unas con y otras sin folículo, aunque generalmente no recomiendan este tipo de muestra para realizar la extracción por la eficiencia relativamente baja que muchas veces se observada en el análisis de pelos, explicada tal vez por las escasas células nucleadas que contienen, localizadas en el bulbo piloso o por el efecto inhibitor de las melaninas hidrosolubles que se generan durante el

proceso de extracción del ADN, que forman un complejo inactivo constituido por dos moléculas de melanina y una de Taq polimerasa. Se logró estandarizar dicho protocolo con la finalidad de poder obtener muestras no-invasivas y realizar estudios a nivel molecular para animales, en este caso sementales de línea materna que en la mayoría de las granjas su muestreo se encuentra restringido. Para mayor seguridad, se recomienda arrancar y no cortar los pelos destinados al estudio genético.

Conclusiones

La estandarización de la técnica de extracción de ADN a partir de pelo, es una técnica de muestreo no-invasiva que ofrece la oportunidad de muestrear sementales sin ser perturbados o incluso difíciles de muestrear y aunque esta técnica conlleva una serie de inconvenientes a la hora de estar procesando las muestras en el laboratorio, fue posible usar pelos para extraer ADN de ellos con solo optimizar las condiciones del protocolo establecido. Se obtuvo ADN genómico de elevada calidad, cantidad y pureza demostrado con las amplificaciones de la PCR y la generación de los genotipos de sementales porcos.

Los métodos de selección asistida por marcadores, conjuntamente con métodos de selección tradicional pueden ser utilizados para potenciar acelerar y mejorar, características de interés económico en sementales, donde los genes receptor de la prolactina (PRLR) y estrógeno receptor (ESR) pueden ser utilizados para seleccionar a los mejores animales para elegir o descartar sementales desde que este tiene una edad temprana, sin necesidad de esperar a que se manifieste la característica de interés al llegar a la edad reproductiva.

Bibliografía

- Alonso, V., A. B. Santana, W. Pirage-Junior, L. R. Goulart, H. da S. Diniz, M. F. Machaim y G. S. N. Borges. 2003. Efeito do gene receptor de prolactina sobre características quantitativas de interesse econômico em suínos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 40:366-372.
- Buxadé C. C. 2000. *Producción Porcina*. 2a. ed. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 215 .
- Canul, S. M., V. A. Sierra, M. A. Martínez, O. J. Ortiz, J. V. Delgado, J. L. Vega-Pla y G. F. Pérez. 2005. Caracterización genética del cerdo pelón mexicano Mediante marcadores Moleculares. *Arch. Zoot.* 54: 267-272.
- Cunningham E. P. y C. M. Meghan. 2001. Sistemas de identificación biológica: marcadores genéticos. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 20(2): 491-499.

- Duarte O. A. 2001. Aplicación de técnicas moleculares en el mejoramiento genético del ganado. Memorias del 3er. Congreso de Egresados de Medicina Veterinaria y Zootecnia UAM-X. México, D. F.
- Hernández L. S. H., C. Lemus., M. R. Alonso y J. G. H. Herrera. 2006. Efecto de genes candidatos sobre características reproductivas, en hembras porcinas. *Revista Científica, FCV-LUZ.*, 16 (6), 648-654.
- Herrera H. J. G., C. Lemus y A. Barreras. 2003. *Mejoramiento Genético Animal. Un enfoque aplicado*. 1ª edición. Ganadería IREGEP. Texcoco, Edo de México. 151 p.
- Higuchi, R., C. H. Von Beroldingen, G. F. Sensabaugh y H. A. Erlich. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature*. 332: 543-546.
- Hukkelhoven, M. W. A. C., E. Vromans, A. M. G. Markslag y A. J. M. Vermorken. 1981. A simple fluorimetric microassay for DNA in hair follicles or fractions of hair follicles. *Anticancer Res*. 1: 341-344.
- Isler B. J., K. M. Irvin, S. M. Neal, S. J. Moeller and M. E. Davis. 2002. Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive traits in swine. *J. Anim. Sci*. 80: 2334-2339.
- Kelly P. A., J. M. Boutin, C. Jolicoeur, H. Okamura, M. Shirota, M. Edery, F. I. Dusanter and J. Djiane. 1989. Purification, Cloning, and Expression of the Prolactin Receptor. *Biol Reprod*. 40: 27-32.
- Moller A. and B. Brinkmann. 1994. *Adv. in For. Haem*. 5: 336-338.
- Romero P. J. M. 2003. *Teoría del mejoramiento genético con ayuda de marcadores moleculares y construcción de un índice apoyado en marcadores ligados*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 135p.
- Rothschild M. F. 2003. Use of biotechnology and molecular genetics in swine selection programs. 2255 Kildee Hall. Iowa State university. Ames, IA 50011. USA. *Allattenyesztes es Takarmanyozas* 52(Supplement) 91-99.
- Rothschild M. F., C. Jacobson, D. Vaske, C. Tuggle, L. Wang, T. Shorts, G. Eckardt, S. Sasaki, A. Vincent, D. McLaren, O. Southwood, H. Van Der Steen, A. Mileham and G. Plastow. 1996. The Estrogen Receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Genet*. 93: 201-205.
- Rothschild, M. F. and G. S. Plastow. 1999. *Advances in pig genomics and industry applications*. Ag. Biotech. CAB International.
- Sambrook J., F. E. Fritsch y T. Maniatis. 1994. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. E. U. A.

SAS Institute, Inc. 1997. SAS User's Guide. Statistics, Statistical Version 8. Cary, North Carolina. 956 p.

Short T. H., M. F. Rothschild, I. O. Southwood, G. D. McLaren, A. de Vries, H. Van der Steen, R. G. Eckardt, K. C. Tuggle, J. Helm, A. D. Vaske, J. A. Mileham and G. S. Plastow. 1997. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J. Anim. Sci.* 75: 3138-3142.

Torres G. G., C. Lemus, R. Alonso, M. del C. L. de G. Muñiz, M. A. I. Cortés. 2004. Frecuencia del Gen Receptor de Estrógeno en Cerdos Pelón Mexicano, Cuinos y Yorkshire. En memorias XL Congreso Nacional de Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC)". León Guanajuato, México.

Vincent A. L., L. Wang, K. C. Tuggle and M. F. Rothschild. 1998. Linkage and physical mapping of prolactin to porcine chromosome 7. *Anim. Genet.* 29: 27-29.

Vincent A. L., L. Wang, K. C. Tuggle, A. Robic and M. F. Rothschild. 1997. Prolactin receptor maps to pig Chromosome 16. *Mamm Genome.* 8: 793-794.

Yáñez L., J. Trompiz and H. Vecchionacce. 2005. Introducción de razas de cerdos hiperprolíficas chinas en las occidentales: Una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 13(2): 70-80.

Yoshii T., K. Akiyama, K. Tamura and I. Ishiyama. 1994. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis *Adv. in For. Haem.* 5: 393-396.