

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**IDENTIFICACIÓN DE CERDAS REPRODUCTORAS TOLERANTES
A PRRS A TRAVÉS DE SELECCIÓN GENÓMICA EN EL SUR DE
SONORA, MÉXICO.**

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA:
CARLOS MARTÍN AGUILAR TREJO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
PhD. PABLO LUNA NEVÁREZ**

Culiacán, Sinaloa, México; septiembre de 2018.

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**IDENTIFICACIÓN DE CERDAS REPRODUCTORAS TOLERANTES
A PRRS A TRAVÉS DE SELECCIÓN GENÓMICA EN EL SUR DE
SONORA, MÉXICO.**

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

CARLOS MARTÍN AGUILAR TREJO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. PABLO LUNA NEVÁREZ

ASESORES:

DR. JOSÉ CLEMENTE LEYVA CORONA

Culiacán, Sinaloa, México; Septiembre de 2018.

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **CARLOS MARTÍN AGUILAR TREJO**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO

CO-DIRECTOR:

DR. PABLO LUNA NEVÁREZ

ASESOR:

DR. JOSÉ CLEMENTE LEYVA CORONA

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO; SEPTIEMBRE DE 2018.



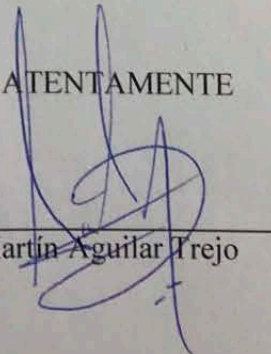
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, el que suscribe Carlos Martín Aguilar Trejo, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 1375103-4, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Javier Alonso Romo Rubio y Dr. Pablo Luna Nevárez y cede los derechos del trabajo titulado “ IDENTIFICACIÓN DE CERDAS REPRUCTORAS TOLERANTES A PRRS A TRAVÉS DE SELECCIÓN GENÓMICA EN EL SUR SONORA, MÉXICO ” a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE



Carlos Martín Aguilar Trejo

CORREO ELECTRÓNICO: mariacandelaria@gmail.com
CURP: JLS562LM1GHY3456



UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.

DEDICATORIA

A mi hermosa familia; Mi esposa Claudia e hijos; Carlos Manuel, Aron, Carlos, Alonso y Leonardo quienes son la luz para salir adelante y superarme.

A mis padres y hermana, por enseñarme con su ejemplo lo que es el esfuerzo y el trabajo y por estar siempre junto conmigo.

Al Dr. Pablo Luna Nevárez y al Dr. Javier Alonso Romo Rubio, por comenzar conmigo este sueño y ser el gran apoyo en esta muy importante meta de mi vida profesional y personal.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque me permitió culminar con esta meta de mi vida.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y al Instituto Tecnológico de Sonora por recibirme y darme la oportunidad de desarrollarme dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias.

A los MC. Ricardo Zamorano, Miguel Sánchez y Eduardo Aragón, por su enseñanza, su tiempo y valiosa amistad.

Al Dr. José Clemente Leyva Corona por su asesoría y valiosa contribución en mi formación doctoral.

A los investigadores de la Universidad Estatal de Colorado, Dr. Milton G. Thomas, Dr. R. Mark. Enns, Dr. Scott E. Speidel y Dra. Xi Zeng, por su colaboración y confianza.

.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LA LITERATURA	
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
1.2.2. Antecedentes del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.....	3
1.2.3. Impacto económico del PRRS.	5
1.2.4. Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo.....	6
1.2.4.1. Características del virus..	6
1.2.4.2. Aspectos epidemiológicos.	8
1.2.4.3. Interacción virus-huésped.	9
1.2.4.4. Diagnóstico del PRRS.	11
1.2.5. Aspectos generales sobre el control del PRRS	13
1.2.5.1. Estudio asociativo del genoma completo (GWAS).	13
1.2.5.2. Selección asistida por marcadores (SAM).....	15
1.2.5.3. Tipos y usos de los marcadores moleculares.....	16
1.2.5.4. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP).	20
1.2.5.5. Genes relacionados con la productividad en los cerdos.....	21
1.2.6. Análisis estadístico de validación.....	24
1.2.7. Modelo estadístico de validación; Procedimiento mixed.....	24
1.2.8. Conclusiones	25
CAPÍTULO 2. POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO SIMPLE ASOCIADOS A SERVICIOS POR CONCEPCIÓN EN CERDAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL PRRS	
2.1 Abstract.....	26
2.2 Resumen.....	26
2.3. Introducción.....	27
2.4. Materiales y métodos	27
2.4.1. Sitio y unidades experimentales	27
2.4.2. Datos fenotípicos	27

2.4.3. Determinación viral	27
2.4.4. Estudio de genoma completo	28
2.4.5. Análisis estadístico	28
2.5. Resultados y discusión	28
2.6. Conclusiones.....	30
2.7. Referencias	31
CAPÍTULO 3. POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON EL NÚMERO DE LECHONES NACIDOS VIVOS EN CERDAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL PRRS EN EL SUR DE SONORA MÉXICO	
3.1. Resumen.....	35
3.2. Abstract.....	36
3.3. Introducción.....	37
3.4. Materiales y Métodos.....	39
3.4.1. Sitio y unidades experimentales.....	39
3.4.2. Análisis de laboratorio.....	40
3.4.3. Estudio del genoma completo.....	40
3.4.4. Análisis estadístico de validación.....	41
3.5. Resultados.....	43
3.5.1. Análisis del genoma completo.....	43
3.5.2. Validación de polimorfismos de nucleótido simple (SNP).....	43
3.6. Discusión.....	44
3.7. Conclusiones e implicaciones.....	48
3.8. Literatura citada.....	50
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES.....	
61	
CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA.....	
63	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.2.	Valores mínimos, máximos, media y desviación estándar para las variables de NSC1 del número de servicios por concepción en la primera gestación en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.....	29
2.2.	Marcadores significativos, secuencia y cambio de la bases para la variable NSC1 en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.....	29
3.2.	Frecuencias alélicas y genotípicas para la variable NSC1 en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS....	30
4.2.	Medias de cuadrados mínimos \pm EE para el caracter de NSC1 entre los genotipos de SNP encontrados en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.....	30
5.2.	Efectos de sustitución alélica para los genotipos de los polimorfismos para NSC1, en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.....	31
1.3.	Valores promedio \pm EE para variables reproductivas y de viabilidad asociadas al primer y segundo partos en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.....	56
2.3.	Número y localización cromosómica de SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.....	56
3.3.	Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP asociados a LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.....	57
4.3.	Medias de cuadrados mínimos \pm EE para los genotipos de los SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.....	58
5.3.	Efectos de sustitución alélica para SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1.	Prevalencia de la enfermedad de PRRS en México.....	5
2.1.	Esquema del genoma completo del virus del PRRS.....	7
3.1.	Secuencia del ORF 5 del virus del PRRS.....	7
4.1.	Gráfica Manhattan, representa los SNP asociados con una característica fenotípica seleccionada presentes en el genoma completo del cerdo.....	15
5.1.	Estructura funcional de un gen.....	19
6.1.	Gráfico de un polimorfismo de nucleótido simple.....	21
7.1.	Esquematación del efecto del SNP WUR1000125, en lechones desafiados con el virus del PRRS.....	23
8.1.	Marcadores utilizados a escala comercial para ser tomados en cuenta en la Selección de individuos asistida por marcadores-genes en cerdos.....	23
1.3.	Gráfica Manhattan que muestra la ubicación de los SNP asociados a la variable de LNV1 (umbral de significancia fijado a $P < 0.001$).....	60
2.3.	Gráfica Manhattan que muestra la ubicación de los SNP asociados a la variable de LNV2 (umbral de significancia fijado a $P < 0.001$).....	60

RESUMEN

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino es una enfermedad que genera pérdidas económicas en la porcicultura mundial y se caracteriza por afectar el desempeño reproductivo y productivo de las cerdas de pie de cría. El presente estudio tuvo por objetivo identificar polimorfismos de nucleótido simple asociados al número de servicios por concepción y número de lechones nacidos vivos al el primer y segundo parto en cerdas reproductoras expuestas al virus del PRRS. Se identificaron cinco SNP significativos ($P < 0.05$) asociados con el número de servicios por concepción y ocho SNP al número de lechones nacidos vivos. Los marcadores moleculares encontrados están en genes asociados con funciones en el control del tono o contracción del músculo liso, dominios relacionados con la ovulación y adherencia de los óvulos en la matriz de hembras gestantes y como promotores de antivirales. Los resultados encontrados indican que existe una base genética asociada a la susceptibilidad al virus del PRRS en hembras reproductoras infectadas con el virus. En la población estudiada se reporta la existencia de una base genética asociada al desempeño reproductivo en cerdas reproductoras infectadas al virus de PRRS.

ABSTRACT

The Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome (PRRS) is a disease that causes economic losses in global swine industry and is characterized by its negative effect on the reproductive performance of sows. The objective of the present study was to identify single nucleotide polymorphisms that are associated with the number of services per conception, as well as the number of live-born piglets in the first and second pregnancy of sows exposed to the PRRS virus. Five significant SNPs were found to be associated ($P < 0.05$) with the number of services per conception and eight with the number of live-born piglets. These molecular markers were linked with contraction of the smooth muscle or tone control, domains related to ovulation and adhesion of eggs in the matrix of pregnant females and promoters of antivirals. The results indicate that there is a genetic basis associated with susceptibility to the virus of PRRS in breeding females infected with virus. These results indicate the existence of genetic basis associated with reproductive efficiency in sows infected with the PRRS virus.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1. Introducción

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) es una enfermedad de distribución mundial que genera pérdidas económicas a la industria porcina (Neumann *et al.*, 2005). Estas pérdidas de productividad se estiman en \$3.08 dólares americanos por cerdo al mercado (Holtkamp *et al.*, 2013). La etiología de PRRS es por un virus unicaténico de ARN perteneciente al género Arterivirus, cuyas principales características son una elevada tasa de mutación que le confiere una alta variabilidad antigénica y la capacidad para inducir infecciones persistentes (Lunney y Chen, 2011; Boddicker *et al.*, 2012; Chand *et al.*, 2012).

La infección por el virus del PRRS se caracteriza por producir baja conversión alimenticia y bajo peso en los cerdos en general, así como repeticiones del estro, muerte de lechones e incluso la inducción de abortos en hembras reproductoras (Holtkamp *et al.*, 2013). En la actualidad, las vacunas han logrado prevenir en cierta medida la infección por PRRS, sin embargo, la eficacia de las mismas aún se encuentra lejos de ser universal ya que el virus posee la habilidad para modular la respuesta inmune del hospedador y existen diferencias genéticas en la forma de responder a la presencia del virus (Lewis *et al.*, 2007; Mateu y Díaz, 2008; Geldhof *et al.*, 2013).

Boddicker *et al.* (2012) reportaron una región génica dentro del cromosoma 4 asociada a la tolerancia al virus del PRSS en lechones y cerdos en crecimiento, sin embargo, existen escasos reportes sobre la capacidad genética para tolerar al virus por parte de hembras reproductoras. El esclarecer la base genética de la respuesta del huésped al virus modificado del PRRS (VMPPRS) podría conducir al establecimiento de marcadores genéticos asociados a mejores respuestas ante la presencia del antígeno vacunal. El presente estudio tuvo por objetivo identificar polimorfismos de nucleótido simple asociados a la tolerancia al virus del PRRS

con el número de servicios por concepción y número de lechones nacidos vivos cerdas reproductoras infectadas al virus del PRRS, a través de un estudio de genoma completo en el sur de Sonora México.

1.2. Revisión de la literatura

1.2.1. Situación actual de la porcicultura. La carne de cerdo es una de las de mayor consumo a nivel mundial; su importancia nutricional, económica y social es indudable. La porcicultura se encuentra hoy entre los sistemas productivos pecuarios más eficientes; sus características específicas, como gran precocidad y prolificidad, corto ciclo reproductivo y gran capacidad transformadora de nutrientes, lo hacen fundamentalmente atractivo como fuente de alimentación (Benítez y Sánchez, 2000). El volumen de consumo de carne a cerdo a nivel mundial fue de 100.9 millones de toneladas; del volumen total de las carnes más consumidas (bovino, porcino, ave) el consumo de carne de cerdo representó 43%; asimismo, éste presenta una tasa de crecimiento media anual de 1.3% (FIRA, 2012). De acuerdo con el Atlas Agroalimentario México (SAGARPA, 2014) la producción de carne en canal de porcino de México ocupó el lugar número 16 a nivel mundial, con 1'238,626 toneladas, lo que representó el 1.1% de la producción mundial. Por su parte, China se posicionó como el primer lugar mundial, con 50'003,628 toneladas. Resulta importante mencionar que los principales consumidores de carne de cerdo en el mundo son Japón y Corea del sur. Estas naciones son las que han abierto el acceso a los mercados internacionales con su fuerte demanda. En el 2013, Japón fue el principal mercado de las exportaciones de carne de puerco mexicana (83%) (FIRA, 2016).

La porcicultura tradicionalmente ha sido muy interesante para la población de México, en la que se han involucrado una amplia gama de productores; se estima que eran más de 1.8 millones hasta los años noventa. Con el tiempo, esta actividad se concentró en pocas manos, mantuvo su potencial de ser en el medio rural y es muy viable para generar empleo, riqueza y alimentos sanos altamente

apetecidos. La industria porcícola nacional ha experimentado cambios importantes en sus formas de operación y en su estructura organizativa. A raíz de la apertura comercial, los productores han buscado que el País tenga un papel activo en la evolución de la rama; éstos han comprobado que para mantenerse en el mercado es necesario aplicar procesos y productos biotecnológicos que incluyen cambios estructurales en los sistemas productivos de cerdos y sus productos derivados (Kato y Suárez, 1996).

En México, la porcicultura ocupó el tercer lugar en importancia como sistema productor de carne, después de la cría de bovinos y aves. Si bien su parte en el producto interno bruto es mínima (alrededor del 0.3 %) su importancia reside en proporcionar un conjunto de productos de valor nutricional, algunos de los cuales son componentes esenciales de la dieta de grupos de ingresos bajos y medianos (Pérez, 2006). El sector porcícola mexicano cuenta con 350 mil empleos directos y 1.7 millones de indirectos; por cada empleo directo se generan cinco indirectos. Comprende 15 millones de cabezas en inventario, de las cuales 9.4 millones son explotadas en 5,434 granjas tecnificadas, 3.5 millones en granjas semitecnificadas, y 2.1 millones en traspatio. La producción alcanzó en 2012 cifras de 1.2 millones de toneladas, con un valor de 26 mil millones de pesos (SAGARPA, 2013).

El estado de Sonora ocupa un preponderante sitio en la actividad porcina del País por sus elevados niveles de producción, los estándares de sanidad con que operan las unidades, además de la especial presencia que tiene en el mercado externo. La entidad se encuentra mayormente concentrada en un reducido número de municipios, así como de productores, debido fundamentalmente a un proceso caracterizado por sus elevados costos de producción, mismo que han dejado en el camino a muchos productores que no pudieron asumir las exigencias de la actividad (INEGI, 2007).

1.2.2. Antecedentes del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino. En los años ochenta una enfermedad no reconocida causó pérdidas económicas en la

producción de hatos de cerdos en América del Norte. Hubo un aumento dramático en los años 1988 y 1989. Primeramente esta enfermedad fue reconocida clínicamente en los Estados Unidos de América (E.U.A.) también en los ochenta, a la cual inicialmente se le llamó Enfermedad Misteriosa del Cerdo (Meredith, 1995; Kolb, 1996; Murtaugh et al., 1997; Zimmerman et al., 1997). En Europa una epidemia devastadora con estimaciones de un millón o más de cerdos muertos ocurrió en el invierno 1990/91. En Noviembre de 1990, la enfermedad apareció en Alemania y se difundió rápidamente a Holanda e Inglaterra en 1991; desde entonces se ha extendido mundialmente, volviéndose endémica en las principales áreas de producción porcina (Done, 1995).

La primera identificación del agente etiológico se realizó en Lelystad, Holanda, (Wensvoort *et al.*, 1991) por lo que inicialmente se le denominó “virus Lelystad”. Posteriormente se le crearon una gran variedad de nombres, hasta que en abril de 1991 la Comunidad Europea de Veterinarios concluyeron en el nombre de “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome” (PRRS); en 1992, durante el “Primer Simposium Internacional de PRRS” realizado en Minnesota, se adoptó este término (Zimmerman *et al.*, 1997b). La enfermedad se caracteriza por afectar los sistemas respiratorio, reproductivo e inmunológico de los cerdos, y por poseer una alta capacidad para diseminarse (Done, 1995; Meredith, 1995).

Miliam y Weimersheimer (1994) realizaron un muestreo de animales en granjas con antecedentes de haber importado animales de los E.U.A. durante los 7 años anteriores, encontrándose un 8.1% de seroprevalencia. Correa *et al.* (1995) encontraron el 8.6% de animales positivos importados de E.U.A., pero únicamente se incluyeron una parte de las granjas importadoras de cerdo, esto abarcó solo una parte del país; en otro estudio, realizado por Weimersheimer *et al.* (1997) encontraron el 39.10% de seroprevalencia; en ese mismo año, Morilla *et al.* (1997) informaron, con base en el muestreo de cuarenta granjas evaluadas en todo el país, que el 88% eran serológicamente positivas; posteriormente, Diosdado *et al.* (1998) reportaron 181 granjas, ubicadas en distintas regiones del

país, como seropositivas. En México, el virus del PRRS fue aislado por primera vez de muestras provenientes de Puebla, Veracruz y México en 1998 y con una prevalencia del 100% en México a partir del año 2000 (Figura 1.1.).

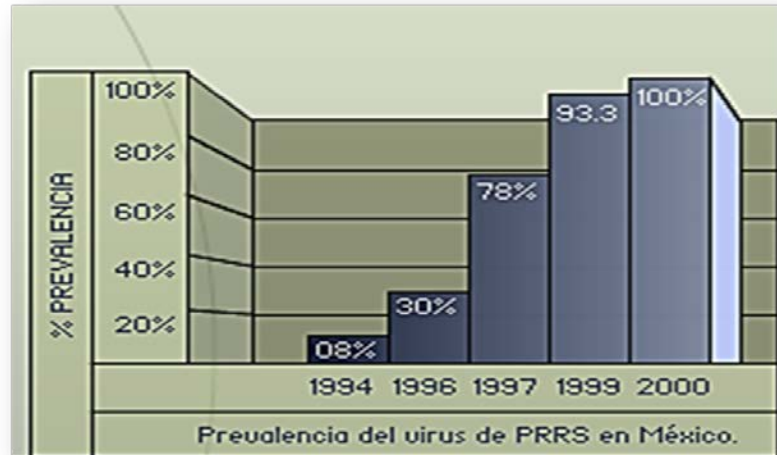


Figura 1.1. Prevalencia de la enfermedad de PRRS en México.
Fuente: Sierra *et al.* (2000).

1.2.3. Impacto económico del PRRS. El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad de distribución mundial que ha afectado seriamente a la industria porcina, generando pérdidas millonarias, ya que afecta a cerdos de todas las edades. Factores tales como la elevada tasa de mutación del virus, su alta capacidad infecciosa, así como la poca eficiencia de las vacunas actualmente utilizadas, prevén un incremento a corto plazo de los efectos negativos causados por el PRSS en la producción porcina (Holtkamp *et al.*, 2013). Según reportes de la “National Pork Board” (FAO, 2007), en Estados Unidos el PRRS les cuesta a los productores aproximadamente \$560 millones de dólares al año; un 45% de estas pérdidas se deben a la disminución en la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia de cerdos en crecimiento (\$243 mill. de USD) un 43% debido a la mortalidad de cerdos en crecimiento (\$243 mill. de USD) y el restante 12% se atribuye a las pérdidas reproductivas (\$63 mill. de USD). En México, aún y cuando no se tienen datos exactos sobre las pérdidas anuales causadas por el PRSS, se calcula que un brote agudo puede provocar pérdidas

de hasta \$3'500,000 M/N, por cada 1000 vientres; de \$60 a \$150 M/N por cerdo enviado a rastro y entre \$250 a \$500 USD por hembra al año (Flores-Mendoza y Hernández, 2010).

Diversos reportes han revelado la existencia de una base genética asociada a la tolerancia al PRRS en cerdos. En EE.UU. el PRRS se describe como la enfermedad más devastadora en las granjas porcinas, al causar brotes severos y endémicos con duración de meses o años. Además, en las granjas infectadas puede reactivarse nuevamente después de algún periodo de inactividad y presentar signos clínicos en los animales (Petry *et al.*, 2005).

1.2.4. Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo. La OIE (2004) informó que el PRRS es una enfermedad viral infecciosa de los cerdos que se transmite a través del contacto directo e indirecto y verticalmente a los fetos. Esta enfermedad es considerada la más importante en las explotaciones porcinas intensivas en Europa y Norteamérica, por su impacto económico. Se caracteriza por el fracaso reproductivo en cerdas y dificultad respiratoria en los lechones y cerdos de engorda, que, junto con su potencial de propagación rápida, puede causar pérdidas económicas significativas en la producción. El PRRS, también conocido como Enfermedad Porcina Misteriosa o Enfermedad de la Oreja Azul, no se sabe que sea una zoonosis. La enfermedad es causada por el virus SRRP, un virus clasificado actualmente como miembro del nuevo orden establecido de los Nidovirales, familia Arteriviridae, género Arterivirus. La diana celular primaria de los virus son los macrófagos alveolares de los cerdos. Existen dos tipos antigénicos principales, el tipo europeo y el tipo americano (Chand *et al.*, 2012).

1.2.4.1. Características del virus. El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus* (Plageman y Moenning, 1992), es un virus esférico, con envoltura y un tamaño medio de 62 nm, que puede oscilar entre 45 y 80 nm. Contiene una nucleocápside isométrica de 25 a 35 nm, aunque a veces se ha visto icosaédrica y presenta unas proyecciones de superficie de unos 5 nm. Es

un virus ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, con 1257 pb de RNA lineal (Figura 2.1. y 3.1.), que termina en una cadena de adeninas de longitud variable. Se ha visto que la organización del genoma contiene 9 ORFs (fragmentos de lectura abierta) que se solapan entre sí, de las cuales la ORF1a y la ORF1b ocupan cerca del 80% del genoma del virus y codifican la polimerasa vírica (Christianson *et al.*, 1993; López *et al.*, 2015).

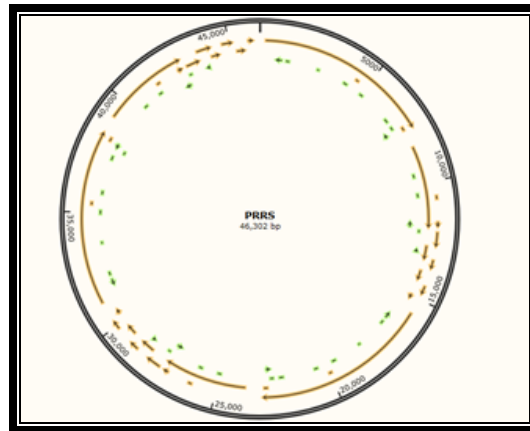


Figura 2.1. Esquema del genoma completo del virus del PRRS, con 1257 pb RNA (SNP gene viewer.ink versión 3.3.3. 2016). Fuente: Aguilar-Trejo *et al.* (2017).

```

ATGTCGGGGAAATGCTTGACCGCGGGTTGTTGCTCGCAGTTGCTTTTTTTGTGGTGTATCGTGCCGTTCTGTTTTGTTGTGCC
CACCAACGCCAACAGCAACAGCAGCTCCCATTTACAGTTGATTTATAACCTGACAATATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAAATAGG
AGGTTTGATTGGGCAGTGGAGACCTTTGTCATCTTTCTGTATTGACTCACATCGTCTCCTATGGTGCCCTCACCAGTCCATTTCTAG
ATACGGTCGGTCTGATCACTGTGTCCACCGCCGGATACTACCACAGGCGGTACGTCCTGAGCAGCATTATGCTGTATGCGCCTTGCC
CGCGTGGTTTGCTTCGCCATTAGGCTGACAAAAAACTGCATGTCTGGCGCTACTCATGTACTAGATATACCAATTTCTTCTAGACACCA
AGGGCAAACCTCTATCGTTGGCGGTCTTCCGTCATCATAGAGAAAGGGGGAAAAGTCGAGGTTAACGGTCACTTGATTGACCTCAAGACAG

```

Figura 3.1. Secuencia del ORF 5 del virus del PRRS. Fuente: Aguilar-Trejo *et al.* (2017)

Las diferencias en las secuencias genómicas del PRRSV lo dividen en dos genotipos, el europeo (EU o tipo I) representado por la cepa prototipo *Lelystad* y el norteamericano (NA o tipo II) representada por la cepa prototipo *ATTC VR-2332*; estos tipos comparten el 63 % de su identidad genómica, con variaciones del 55 al 70 % comparando todo el genoma (Flores-Mendoza y Hernández, 2010). Hay una gran diversidad genética de cepas NA, así como entre las cepas europeas EU y NA; lo cual ocasiona problemas en la vacunación y en el

diagnóstico (Kleiboeker *et al.*, 2005). Aun cuando a la infección clínicamente se manifiestan de manera similar, difieren significativamente en términos de propiedades antigénicas y contenido genético, pudiendo presentarse rápidas variaciones genéticas o recombinaciones (Goldberg *et al.*, 2003; Thanawongnuwecha y Suradhatb, 2010).

1.2.4.2. Aspectos epidemiológicos. El Síndrome Respiratorio Reproductivo del Cerdo (PRRS) anteriormente conocido como enfermedad misteriosa, fue reconocido clínicamente en los E.U. en 1987. Desde entonces, la infección se ha extendido rápidamente por Europa; ésta ha sido detectada en diversos países como Alemania, Holanda, Reino Unido, Bélgica, España, Dinamarca, así como en Norte América y Asia (Weimersheimer *et al.*, 1997). En México el PRRS fue clínicamente descrito por primera vez en 1992, coincidiendo como enfermedad pandémica; aunque se sospecha, pudo entrar a finales de la década de 1980 y confundirse con enfermedades como ojo azul, influenza porcina A y Aujeszky; originándose de animales importados, según un reporte de la presencia de anticuerpos contra PRRSV en 1992 (Milian y Weimersheimer, 1994; Morilla *et al.*, 1997).

Actualmente está presente en casi todos los países con producción porcina, permaneciendo endémico en la mayoría; sólo se han notificado como libres de la enfermedad a Australia, Suecia, Noruega y Nueva Caledonia (Zimmerman, 1999; Shi *et al.*, 2010).

Existen investigaciones donde se ha recuperado el virus del PRRS de tejidos congelados y almacenados por más de 3 años, más sin embargo este fue un caso particular, pues el virus es considerado frágil por que no resiste temperaturas extremas; según varios estudios se define que a 56 °C perdura 6 minutos, a 37 °C persiste 3 horas y a 21 °C por 20 horas, pero en ambientes frescos y húmedos dura por más tiempo; en agua a 4 °C con un pH de 6.25 puede permanecer hasta 90 días, soportando hasta 20 ciclos de congelación y descongelación (Meredith, 1995; Zimmerman, 1998).

La principal forma de transmisión es por contacto directo (Wills *et al.*, 1997^a) sin embargo Wensvoort *et al.* (1991) propuso que la forma más importante es por vía aérea, incluso hasta 20 km de distancia (Zimmerman, 1999). De estas teorías, la considerada como más viable es la de contacto directo, por el movimiento constante que se realiza en los animales; es por la vía aérea que se favorece más en el invierno, cuando el viento es rápido, hay alta humedad, temperaturas bajas y la exposición a la luz es menor (Albina, 1997). El virus puede replicarse en células testiculares germinales, por lo tanto se libera a través de semen, por lo que se le considera una forma importante de transmisión (Sur *et al.*, 1997; Dewey, 1997). El virus tiene la capacidad de transmitirse a través de la placenta; según estudios, ocurre en el tercer trimestre de la gestación, por consiguiente los lechones nacen infectados y quedan con infección persistente por largos períodos (Benfield *et al.*, 1997; Zimmerman, 1998).

La infección del virus de PRRS también se da por las vías respiratorias y urinarias; el virus se elimina de forma intermitente por la orina, heces y saliva (Done *et al.*, 1996). El virus perdura en la orina por 14 días y en la saliva hasta por 42 días (Wills *et al.*, 1997^b).

Las condiciones climatológicas como viento, baja temperatura y humedad, favorecen la transmisión (De Jong *et al.*, 1991; Fiedler, 1991; Robertson, 1991). Albina *et al.* (1994) reportaron que el virus se libera a distintos tiempo aun 105 después de la infección; Wills *et al.* (1997b) de manera experimental, recuperaron el virus de muestras orofaríngeas, tomadas de cerdos inoculados con el virus 157 días antes. Benfield *et al.* (1997) reportaron el RNA viral en animales que fueron expuestos en el útero a los 210 días de edad. Christopher-Hennings *et al.* (1995) detectaron RNA viral en el semen de sementales a los 92 días después de haber expuesto a los animales al virus de manera experimental.

1.2.4.3. Interacción virus-huésped. Como se ha venido mencionando, el PRRS es una enfermedad viral que afecta la producción de cerdo en todo el mundo y trae como consecuencia la disminución del rendimiento reproductivo en cerdas

(Rowland *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2009; Serão *et al.*, 2014). De acuerdo a algunas estimaciones recientes, el PRRS es la enfermedad más costosa que afecta a la industria porcina (Chareerntantanakul, 2012; Alonso *et al.*, 2013) debido a que afecta el comportamiento reproductivo de esta especie, y este desempeño es fundamental en el éxito económico de la producción porcina (Rothschild *et al.*, 1996). Uno de los parámetros que disminuye es el número de lechones nacidos vivos por camada, uno de los indicadores más importantes en la cría de cerdos, debido a su influencia en la eficiencia económica de la producción porcina (Bergfelder-Drüing *et al.*, 2015). Lande y Thompson (1990) sostienen que la mejora genética de los rasgos reproductivos en las cerdas (tales como el número de lechones nacidos vivos) es difícil y compleja, debido a la baja heredabilidad y a que el fenotipado sólo es posible de forma tardía en la vida de las marranas. Así mismo, con el fin de generar mayores ganancias en la producción de lechones, los objetivos de selección para la cría de cerdos se centran en la crianza y reproducción de marranas con alto número de lechones nacidos vivos (Hanenberg *et al.*, 2001; Geisert y Schmitt, 2005; Lewis *et al.*, 2005).

La vacunación frente a PRRS es el método más popular para el control de los casos clínicos causados por PRRS. La vacuna más utilizada contra el PRRS utiliza virus vivo modificado (MLV, por sus siglas en inglés) atenuado por pasaje múltiple en cultivo celular. En el caso del PRRS, las vacunas atenuadas son más eficientes que las inactivadas debido a que inducen mayor respuesta celular y humoral; sin embargo, esta respuesta es insuficiente para proteger completamente contra la infección frente a virus heterólogos y la principal ventaja de las vacunas inactivadas es que no pueden revertir a la virulencia pero de igual forma su protección es limitada (Royae *et al.*, 2004; Cano *et al.*, 2007). Por definición, las vacunas son productos formados con un microorganismo completo, atenuado o muerto, o fracciones de él, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera a dicho microorganismo. Su función es prevenir y controlar futuras infecciones, para lograrlo, deben desencadenar una respuesta inmune protectora

y además ser inocuas, es decir, incapaces de desencadenar una reacción adversa. Para que las vacunas puedan prevenir o controlar una enfermedad, tienen que estimular eficazmente el sistema inmunitario e inducir una memoria inmunológica (López-Fuentes *et al.*, 2000).

1.2.4.4. Diagnóstico del PRRS. Para el diagnóstico de PRRS es importante integrar el cuadro clínico, realizar el examen patológico e histopatológico, hacer la detección de anticuerpos específicos, la detección del agente viral y analizar los datos de producción de la granja, todo esto para establecer y evaluar el estado de salud; posteriormente esta información requiere ser estandarizada y capturada en una base de datos para ser correlacionada con los rendimientos zotécnicos (Dee, 1997; Collins *et al.*, 1999; Luc, 2001). Done (1995) afirma que debido a la complejidad de la enfermedad, por efecto de la interacción de patógenos secundarios y factores medioambientales, la metodología del diagnóstico es difícil y tiene que apoyarse en varios procedimientos.

El diagnóstico del virus del PRRS se basa en métodos serológicos junto con técnicas como son aislamiento viral, inmunohistoquímica o transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) que determinan la presencia del virus, proteínas virales o el ARN viral (Kleiboeker *et al.*, 2005). El muestreo detectará animales virémicos por RT-qPCR para eliminarlos o aislarlos, así como por ELISA (9-16 semanas de edad para evitar anticuerpos maternos y vacunales).

Para el diagnóstico en granjas que presentan la enfermedad en forma endémica, con animales que no presentan sintomatología, la mayoría realiza diagnóstico con ELISA y RT-PCR para determinar presencia y circulación del virus en la granja; considerando normal que ambas pruebas en el mismo animal podrían no concordar en sus resultados (Duihof *et al.*, 2011).

Las técnicas de PCR sirven para identificar de forma concreta la presencia del virus en un individuo por medio de amplificación de un segmento del genoma viral.

La reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) es un de las técnicas utilizadas, en la cual, por medio de una transcripción inversa se pasa de ARN a ADN y luego se amplifica exponencialmente este ADN, para alcanzar niveles detectables, siendo una prueba altamente sensible y específica (Benson *et al.*, 2002; Horter *et al.*, 2002). La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una prueba muy sensible y se puede detectar el RNA viral en sementales persistentemente infectados (Christopher-Hennings *et al.*, 1995). En PCR también se ha elaborado una prueba automatizada denominada Taq Man™, que detecta el agente viral en muestras de semen porcino (Collins *et al.*, 1999). Sin embargo, la técnica de RT-PCR puede diferenciar virus americanos de europeos (Botner, 1997).

También, existe una variedad de técnicas para la detección de anticuerpos séricos contra el PRRSV. El diagnóstico serológico es, en general, fácil de realizar, y presenta una adecuada especificidad y sensibilidad. La serología se lleva generalmente a cabo mediante técnicas de unión, tales como la técnica del enzimoimmunoensayo (ELISA) (Albina *et al.*, 1994). Esta prueba se lleva a cabo habitualmente con antígeno vírico de un determinado tipo antigénico, de modo que los anticuerpos dirigidos contra el otro tipo antigénico, heterólogo, pueden ser detectados con menor sensibilidad. Actualmente se ha utilizado extensamente un ELISA de bloqueo y se ha descrito como un sistema ELISA doble, que emplea como antígeno tanto el virus europeo como el americano (Sorensen *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 1998). Hay varios formatos: ELISA bloqueada, ELISA indirecta con la utilización de valores OD directos, MACELISA (IgM Antibody Capture) y ELISA indirecta la cual utiliza un sistema de proporción muestra positivo s/p (McCaw *et al.*, 1998; Zimmerman, 1998). IDEXX ofrece un kit que tiene la ventaja de utilizar la cepa Lelystad (europea) y una americana del virus de PRRS; tiene una sensibilidad de 100 % y especificidad del 97 %; además se considera rápida y permite ser muy repetible (Joo, 1994; Kolb, 1996; Harding *et al.*, 1998; Zimmerman, 1998; Bautista, 2001). La diversidad genética del virus, la variación

en la antigenicidad cruzada y la posible transmisión del virus vacunal, ocasionan problemas para el diagnóstico y control de la enfermedad (Flores-Mendoza y Hernández, 2010; Arias *et al.*, 2016).

1.2.5. Aspectos generales sobre el control del PRRS. Thanawongnuwecha y Suradhatb (2010), sostienen que la epidemiología del virus del PRRS es compleja y la adaptación e inmunización de las cerda no es suficiente para el control de esta enfermedad. Por tanto, para poder tener éxito en el control del PRRS es necesario aplicar medidas de bioseguridad. El principal objetivo en el control del PRRSV es producir lechones destetados negativos a PRRSV, prevenir la transmisión del PRRSV a granjas libres y la introducción de cepas distintas de las endémicas (Cano *et al.*, 2007). Los elementos clave de un programa para el control y erradicación del PRRS son: la detección temprana de la enfermedad confirmada por un laboratorio; rápida identificación de las granjas infectadas y la implementación de diferentes estrategias de sacrificio sanitario y la selección.

La selección a través del genoma completo se basa en la biología molecular y la ingeniería genética, surge por la necesidad de ser más precisos para la selección de animales productivos, con caracteres de interés zootécnico o de salud. La capacidad de generar mapas genéticos permite evaluar completamente su genoma e identificar marcadores moleculares, es decir, regiones de ADN capaces de identificar en los cromosomas los genes que codifican para características cuantitativas (Flint y Woolliams, 2008). Con el descubrimiento de la secuencia genómica del ADN de las especies domésticas, así como la identificación de una gran cantidad de marcadores moleculares, ha sido posible incrementar y agilizar el mejoramiento genético animal.

Las opciones de control dependerán de la densidad de cerdos, el grado de estructura multi-sitio de las explotaciones, el movimiento de cerdos y el estatus sanitario de la misma (AHA, 2004).

1.2.5.1. Estudio asociativo del genoma completo (GWAS). Los estudios de asociación de todo el genoma, conocidos como GWAS (por sus siglas en inglés,

Genome-Wide Association Studies) como su propio nombre indica, son estudios en los que se examinan todas las mutaciones presentes en el genoma, aumentando la probabilidad de encontrar el gen, o los genes, causantes de cambios observables y evaluables (Weller y Ron, 2011). Los estudios de GWAS, básicamente son análisis donde se estudia el grado de asociación entre los marcadores y uno o más caracteres. El objetivo es examinar, de forma independiente, la asociación de cada polimorfismo nucleotídico sencillo (SNP, de sus siglas en inglés) con el fenotipo estudiado (Bush y Moore, 2012). El diseño de los GWAS proporciona un enfoque no sesgado para ubicar en los mapas cromosómicos las variantes genéticas de riesgo frecuente; la variante de riesgo frecuente se define arbitrariamente como la que tiene una frecuencia igual o superior al 5% en la población general. De esta forma la gráfica Manhattan, representa los SNP asociados con una característica fenotípica seleccionada presentes en el genoma completo (Figura 4.1.). La selección genómica básicamente consiste en utilizar la información disponible del ADN de los animales como un dato adicional para predecir sus valores genéticos y basándose en esos valores genéticos “mejorados” tomar las decisiones de selección. La gran ventaja es que la información sobre el ADN se puede tener al nacimiento del animal, a partir de una muestra de sangre (Pena, 2012).

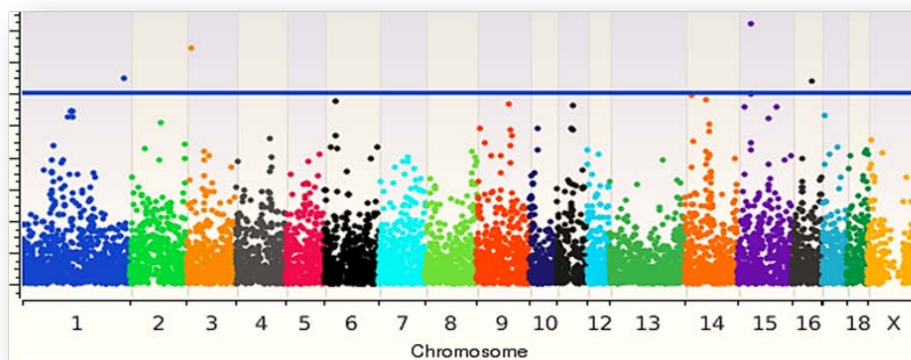


Figura 4.1. Gráfica Manhattan, representa los SNP asociados con una característica fenotípica seleccionada presentes en el genoma completo del cerdo. Fuente: Aguilar-Trejo *et al.* (2017)

1.2.5.2. Selección Asistida por Marcadores (SAM). La incorporación de la información que proporcionan los avances en genómica en los programas de mejoramiento animal es una realidad en especies de abasto como los porcinos (Andersson *et al.*, 1994). Tal incorporación se lleva a cabo mediante herramientas de genética cuantitativa, lo cual se denomina de forma genérica “selección asistida por marcadores” (SAM por sus siglas en inglés, Marker Assisted Selection) (Dekkers, 2004). Ésta puede ser aplicada para aumentar la velocidad del progreso genético en programas de selección dentro de poblaciones o para explotar la variabilidad genética entre poblaciones en programas de cruzamiento o de introgresión (Cañón, 2006). En la SAM se utiliza información directamente aportada por el ADN de un candidato a ser seleccionado, juntamente con sus registros productivos y los de individuos emparentados (Kolath, 2009).

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología, tal como la biomedicina y las diversas ramas de esta misma. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los marcadores moleculares, a su vez, corresponden a un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo. Esta variación genética detectada es conocida como polimorfismo y es lo que permite separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores (Astorga, 2008).

A través del uso de los marcadores moleculares es posible encontrar asociaciones entre marcadores y fenotipos. El proceso en el cual se usa una asociación conocida entre marcadores moleculares y un carácter de interés para seleccionar por la presencia del marcador molecular, en lugar de por el fenotipo del gen de interés (Dekkers, 2004; Bai y Lindhout, 2007)

La importancia de la SAM radica en que se pueden utilizar para llevar a cabo la genotipificación de animales en distintas explotaciones pecuarias con un costo reducido, facilitando al productor detectar a aquellos animales que son portadoras de genes deseables y con ello desarrollar programas de selección (Dekkers, 2004). La selección por marcadores es una herramienta que asiste a las técnicas tradicionales de selección animal, pero no reemplaza a los modelos tradicionales.

1.2.5.3. Tipos y usos de los marcadores moleculares. La historia de los marcadores moleculares comienza desde mediados del siglo pasado, cuando los científicos, James D. Watson, Francis Crick y Maurice Wilkins, hicieron públicos sus hallazgos sobre la estructura y función del ácido desoxirribonucleico (ADN) al que identificaron como la molécula de la herencia, es decir, la unidad responsable de la transmisión de características de una generación a la siguiente. Estos estudios los hicieron merecedores del premio Nobel, pues dieron origen a lo que hoy conocemos como biología molecular y provocaron un vertiginoso desarrollo en las ciencias biológicas, permitiendo, entre otras cosas, que la biotecnología moderna incluyera la genómica, la ingeniería genética, la proteómica y los marcadores de ADN (Solís y Andrade, 2005). Los primeros estudios *in vitro* que se realizaron utilizando marcadores, pretendían estudiar las poblaciones y se llevaron a cabo con marcadores bioquímicos y el estudio de la variabilidad fenotípica de polimorfismos, utilizando esencialmente las proteínas antigénicas expresadas por los glóbulos rojos: el sistema AOB (Calafell *et al.*, 2008). Posteriormente se difundieron los marcadores enzimáticos y proteicos que prometían ser el avance final para el estudio molecular, por su abundancia y polimorfismo. No obstante, dichas técnicas se vieron reemplazadas, pocos años después, cuando se desarrolló la técnica de PCR (Mullis *et al.*, 1986).

Desde la década de los 80, se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar variaciones en la secuencia del ADN al comparar distintos individuos. Colectivamente se han denominado marcadores moleculares basados

en ADN (Torres y Moreno, 2001). Dentro de estas técnicas se destaca la tecnología de amplificación *in vitro*, la llamada Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y sus variantes para el estudio de los polimorfismos, la cual marcó un antes y un después en el estudio de los marcadores moleculares (Quesada *et al.*, 2004). Debido a esto, la ciencia genética ha experimentado grandes avances, sobre todo a partir del momento en que se desarrolló la técnica de PCR. Con el tiempo, se han ido proponiendo numerosos tipos de marcadores; las técnicas y su eficacia para diferentes propósitos, han ido creciendo. La larga época de los marcadores microsatélites, ampliamente usados en la investigación y los controles genealógicos, está llegando a su término con la introducción de las plataformas de genotipado masivo de polimorfismos de una sola base (SNPs). Este tipo de tecnología permite automatizar el proceso de genotipado y utilizar las herramientas genómicas para introducir un nuevo reto en la selección animal (Landi y Quiroz, 2011). Los marcadores moleculares son conocidos como Polimorfismos de Nucleótido Simple, también llamados SNP (del inglés Single Nucleotide Polymorphism); Risch (2000), define a un Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) como un locus genómico (posición genética) donde existen dos o más bases nucleotídicas alternativas con frecuencias apreciables en la población (>1%).

Entre los marcadores moleculares más útiles y apreciados se encuentran los denominados microsatélites o “Secuencias Repetidas Simples” (SSR). Su alta tasa de mutación y naturaleza codominante permiten la estimación de la diversidad genética dentro y entre razas, así como la mezcla genética entre razas incluso si están estrechamente emparentadas (Sunnucks, 2001). Los microsatélites (SSR) son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tandem de unos pocos pares de bases (1 a 4) flanqueadas por secuencias de copia única. La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tandem y consecuentemente del tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una

especie. Los SSR se encuentran distribuidos por todo el genoma de la mayoría de las especies eucariotas. El microsatélite amplificado por PCR es sometido a electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar diferencias de 2, 3 o 4 nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite (Litt y Luty, 1989; Picca *et al.*, 2004). Los microsatélites son marcadores muy utilizados, ya que se tienen grandes ventajas, como el hecho de ser codominantes, fáciles de interpretar y susceptibles, traspasando en muchas ocasiones las barreras entre especies, géneros e incluso grupos bastante alejados evolutivamente. No obstante, no siempre están disponibles, y en tal caso es necesario generarlos, lo cual puede ser tedioso, laborioso y caro. Además, los SSR producidos pueden no ser útiles por ser monomórfos, careciendo por tanto del nivel de variabilidad polimórfica deseada en todo marcador molecular (Rallo *et al.*, 2003). Los marcadores moleculares son un segmento del ADN con una ubicación física identificable dentro o fuera de un gen, que se puede rastrear, contiene áreas que codifican para una aminoácidos y posteriormente proteínas en regiones llamadas exones y regiones que no codificantes intrones (Figura 5.1.). Las secuencias que no traducen son el 5 UTR y el 3 UTR. La primera se extiende al comienzo de la secuencia codificante de la proteína, mientras que 3 'UTR indican el final de la secuencia (Griffiths, 2000).

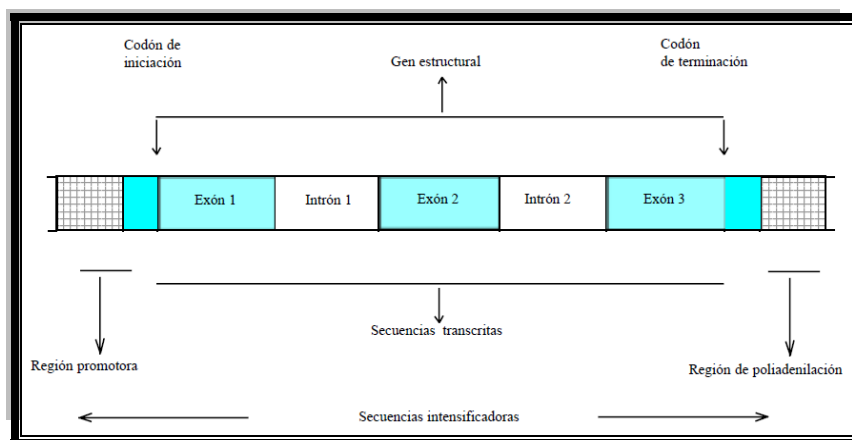


Figura 5.1. Estructura funcional de un gen. Fuente: Griffiths (2000).

Woodward *et al.* (1998) aseguran que el mejoramiento genético animal consiste en aplicar principios biológicos, económicos y matemáticos, con el fin de encontrar estrategias óptimas para aprovechar la variación genética existente en una especie animal, en particular para maximizar su mérito. Esto involucra tanto la variación genética entre los individuos de una raza, como la variación entre razas y cruza. El mejoramiento genético animal permite orientar la adaptación de las poblaciones animales a las condiciones de producción, logrando incremento en la eficiencia de los procesos productivos.

Los genomas del bovino y el pollo fueron completamente secuenciados en el 2005, mientras que los del porcino y equino fueron determinados en el 2007 (Green *et al.*, 2007). Ello ha facilitado la implementación de tecnologías basadas en marcadores moleculares para la identificación de genes y regiones cromosómicas que regulan la expresión de importantes caracteres cuantitativos en el ganado (Dekkers, 2004). Como resultado, estas tecnologías han permitido el desarrollo de programas de selección genética a través de la incorporación de genes que controlan caracteres fenotípicos de importancia económica para los productores de ganado bovino (Fernández *et al.*, 2016). Una gran ventaja de las tecnologías moleculares, es la posibilidad de mejorar la selección para caracteres fenotípicos difíciles de evaluar, tal y como lo son los caracteres reproductivos y la tolerancia a las enfermedades.

Los modelos de evaluación genética se aplican generalmente a reproductores dentro de una población, por ejemplo, de una línea o raza de animales. Tradicionalmente, la selección y el cruzamiento han sido consideradas como estrategias separadas para el mejoramiento genético. El uso de cruzamientos es muy común en especies productoras de carne, donde es deseable que las líneas femeninas sean fértiles y relativamente ligeras para reducir los costos de mantenimiento, mientras que los animales de engorda se espera que sean de rápido crecimiento, lo que muchas veces está asociado con

una menor fertilidad y mayor peso adulto, dando mayores costos de mantenimiento en raza pura (Montaldo y Barría, 1998).

Los medios que posee el productor son: a) Selección: se eligen los individuos que expresen valores superiores al promedio en las características que se desean mejorar. Se aparean entre sí, seleccionando los hijos que resultan superiores al promedio de la nueva población. Así se va logrando en el largo plazo una población estable en las características que se han elegido para mejorar. B) Cruzamientos: cuando se desea aumentar en muy corto plazo la producción de carne, se aparean dos razas diferentes, y el producto cruza resultante manifiesta una exaltación de las características productivas. Este hecho es denominado vigor híbrido, que se expresa con mayor fuerza cuanto menos emparentadas están las dos razas cruzantes (Bavera, 2002). De este modo, la selección tradicional se basaba en el modelo poligénico de características cuantitativas (BLUP por sus siglas en inglés; best linear unbiased production) que emplea la información fenotípica y el pedigrí para establecer valores de crianza individuales en los animales (Gelderman, 1975; Huiying *et al.*, 2001). Según Montaldo y Barría (1998), históricamente no se conoce cuáles son los genes que contribuyen para que se expresen las características de comportamiento productivo y por ello se han utilizado registros de comportamiento fenotípico, así como herramientas para inferir el mérito genético de los animales (diferencia esperada en la progenie [DEP]; evaluación genética integral, comportamiento productivo (en cerdos, ovinos y cabras).

Mientras tanto otros autores como Rowland (2012) concluyen en que el mejoramiento genético, en base a la selección genética y haciendo uso de la genómica y la genética, es la herramienta clave para mejorar la salud animal, especialmente en las enfermedades infecciosas que carecen de vacunas o tratamientos efectivos.

1.2.5.4. Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP). Los SNP son mutaciones o variaciones de una sola base (transiciones, transversiones, deleciones o

inserciones; Figura 6.1.); una posición específica de un par de bases (pb) dentro de un genoma cuyo valor alélico varía en al menos el 1% de la población. La variación o mutación resultante de la sustitución de un solo nucleótido, modifica la función y estructura de una proteína y genera cambios funcionales (Umesh *et al.*, 2014). El auge de estos marcadores estriba en el hallazgo, de que en cada pocos pares de bases (de 50 a 500) suele encontrarse un SNP, que en algunos casos, puede estar relacionado con la susceptibilidad a alguna enfermedad o con alguna característica de interés (Dorado *et al.*, 2007). Desde hace unos años, los polimorfismos de nucleótido simple han comenzado a ser intensamente estudiados con el objetivo de dilucidar las bases genéticas de enfermedades de base multifactorial (Barbisan, 2014; Ibanez-Escriche y Simianer, 2016).

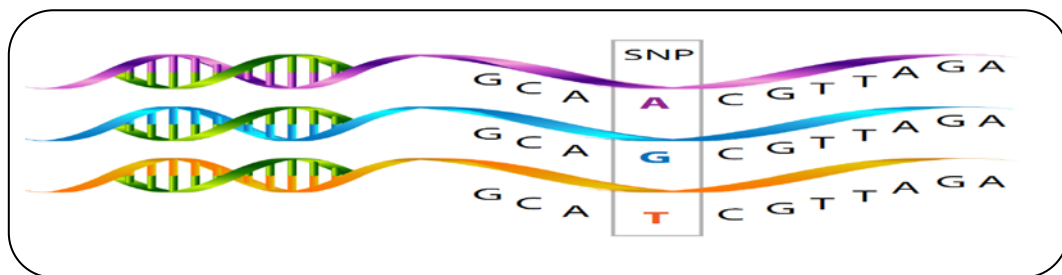


Figura 6.1. Gráfico de un polimorfismo de nucleótido simple. Fuente: Ramírez-Bello *et al.* (2013).

1.2.5.5. Genes relacionados con la productividad en los cerdos. Las técnicas de biología molecular permiten estudiar los mecanismos genéticos implicados en la regulación de la respuesta protectora y han puesto en evidencia la existencia de polimorfismos genéticos en las regiones reguladoras de ésta (Filella *et al.*, 2002).

Las bases genéticas asociadas a la productividad fue demostrada por Boddicker *et al.* (2012), este grupo reportó la expresión de genes del interferón, los cuales fueron capaces de revertir las alteraciones inmunes causada por la infección por el virus del PRRS, evitando su efecto adverso sobre la respuesta inmune innata, e induciendo una inmunidad adaptativa eficiente manteniendo ganancias de pesos por encima del promedio. Al respecto, Rowland *et al.* (2012)

reportaron una región dentro del cromosoma 4, asociada a la reducción de la carga viral en lechones inoculados con el virus del PRRS. Dicha región génica se localiza en un sitio cercano a un grupo de genes involucrados en la inmunidad innata, por lo que sugieren el estudio y validación de dichos genes como marcadores asociados a la respuesta inmune. Boddicker *et al.* (2012; 2014) encontraron una región génica del cromosoma 4, con genes de la proteína ligada al guanilato que induce la síntesis de interferón, por lo que indica la existencia de una fuerte base genética asociado a la respuesta ante la presencia del virus del PRRS. Boddicker *et al.* (2014) señalan que el polimorfismo WUR0000125 ($P < 0.01$) de los individuos con genotipo AA para dicho marcador mostraron menor ganancia de peso y mayor carga viral, en comparación con los animales de genotipo AB, mientras que aquellos con genotipo BB difirieron de los anteriores. La diferencia en la carga viral del genotipo AB con respecto al promedio de los homocigotos AA y BB fue de -2.8 (Figura 7.1.).

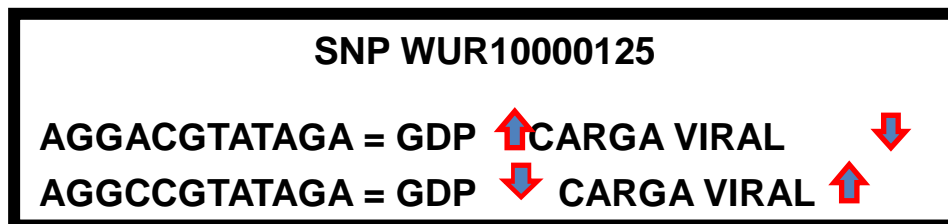


Figura 7.1. Esquemización del efecto del SNP WUR1000125, en lechones desafiados con el virus del PRRS. Fuente: Boddicker *et al.* (2014).

Existen el mapeo y la identificación de genes con sus patrones polimórficos implicados en la regulación de la fisiología reproductiva y productiva en los animales en producción. En la Figura 8.1., indican marcadores a nivel comercial que permiten identificar individuos porcinos portadores de rasgos productivos deseables.

Porcino	HAL/RYOR1	Receptor de rianodina o hipertermia maligna	Rendimiento en canal PSE
	CAST	Calpastatina	Terneza de la carne
	HFABP	Proteína cardiaca de ligamiento de ácidos grasos	Grasa intramuscular
	ESR	Receptor de estrógenos	Tamaño de camada
	PRLR	Receptor de prolactina	Tamaño de camada
SLA	Antígeno leucocitario porcino	Grasa dorsal, área del lomo, calidad de carne	
ACT1	α -actina	Fertilidad del berraco	
ACT2	γ -actina	Calidad espermática	

Figura 8.1. Marcadores utilizados a escala comercial para ser tomados en cuenta en la Selección de individuos asistida por marcadores-genes en cerdos. Fuente: Casas (2006).

Por otra parte, el primer estudio que fue reportado de asociaciones entre SNP y resistencia al PRRS, es el de Lewis *et al.* (2009b) quienes identificaron 6 SNP significativos a partir de un chip de 7k SNP que fueron asociados con los rasgos de rendimiento de la cerda para el total de lechones nacidos vivos, total de nacidos muertos y el total de momias; sin embargo la ubicación de estos SNP no fue reportada. Los datos que reportaron en su estudio provenían de una base de datos que contenía información de 5 años de los rasgos reproductivos de una explotación de multiplicación de varias líneas. Según lo reportado, Boddicker *et al.* (2012) fueron los primeros en tener hallazgos en las regiones genómicas asociadas con la resistencia al PRRS o la susceptibilidad en los cerdos en crecimiento, identificaron regiones en los cromosomas 1, 4, 7 y 17, 42 días post-infección.

Los estrógenos son hormonas esteroideas que junto con la progesterona hacen posible la fertilidad de las hembras al liberar el óvulo y regular el ciclo sexual, sin embargo, todas las funciones de los estrógenos están mediadas por el receptor estrogénico (ESR), que es regulador en estos procesos. Por esta razón, el gen (ESR) se ha estudiado como gen candidato para el tamaño de la camada en cerdos (Noguera *et al.*, 2003). La acción de la prolactina se encuentra involucrada en diferentes actividades endocrinas y está mediada por el receptor de

la prolactina (PRLR), un importante regulador de la reproducción de mamíferos. Desde el descubrimiento del polimorfismo del locus del (PRLR) éste se ha convertido en un gen candidato para el tamaño de la camada (Drogemuller *et al.*, 2001).

La respuesta inmune está controlada en muchos casos, por genes que pertenecen a un grupo conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad y, en el cerdo es conocido como Antígenos Leucocitarios en Cerdo (SLA), este complejo es una región genética importante que tiene influencia en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Fang *et al.*, 2005).

1.2.6. Modelo estadístico de validación. Las estadísticas descriptivas para las variables continuas se calculan con el procedimiento MEANS del paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Las pruebas de normalidad e igualdad de varianza se calculan con procedimiento UNIVARIATE. Para evaluar las frecuencias alélicas y genotípicas, así como la prueba Ji-cuadrada (X^2) y posibles desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, se realiza el procedimiento ALLELE. Cuando los SNP resultan asociados ($P < 0.001$) a los caracteres fenotípico importantes y que cumplan los criterios de frecuencia del alelo menor superior al 10 % ($FAM > 0.10$) y no-desviación del equilibrio Hardy-Weinberg ($X^2 > 0.05$) se utiliza el procedimiento MIXED (Littell *et al.*, 2002).

1.2.7. Análisis de validación; Procedimiento Mixed. El análisis de validación se realiza por medio de un estudio asociativo entre genotipo y fenotipo, empleando el procedimiento MIXED para variables de distribución continua. Dicho análisis de validación individual para cada SNP se efectúa a través de un modelo de efectos mixtos, el cual se describe a continuación:

$$Y = Xb + Zs + e$$

Donde:

Y = vector de valores fenotípicos del rasgo de interés (LNV1, LNV2),

X = matriz de incidencia para efectos fijos (genotipo del SNP y edad de la madre),

Z = matriz de incidencia para efectos genéticos aleatorios (padre),

b = vector de coeficientes para efectos fijos,

s = vector de efectos genéticos aleatorios ($s \sim N(0, \sigma^2s)$),

e = vector de residuos ($e \sim N(0, I\sigma^2e)$)

Dentro del modelo anterior, σ^2s representa la varianza genética del padre, misma que corresponde a $\frac{1}{4}$ de σ^2a (varianza genética aditiva) I representa una matriz de identidad y, σ^2e representa la varianza residual (Saxton *et al.*, 2004).

1.2.8. Conclusiones

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad de distribución mundial que genera pérdidas económicas a la industria porcina. La enfermedad es causada por un virus unicaténico de ARN perteneciente al género Arterivirus cuyas principales características son una elevada tasa de mutación que le confiere una alta variabilidad antigénica y la capacidad para inducir infecciones persistentes que afectan negativamente la conversión alimenticia y la ganancia de peso en los cerdos en general; en hembras reproductoras provoca repeticiones de estro, muerte de lechones e incluso la inducción de abortos.

El esclarecer la base genética de la respuesta del huésped al virus modificado del PRRS (VMPPRS) conduce al establecimiento de marcadores genéticos asociados a mejores respuestas ante la presencia del antígeno vacunal, lo que contribuiría en la selección de animales tolerantes a este patógeno.

La selección asistida por marcadores moleculares es una alternativa para mejorar de selección de cerdos tolerantes al VPPRS y se prevé como una herramienta clave para mejorar la salud de los hatos porcinos, especialmente en las enfermedades infecciosas que carecen de vacunas eficaces o tratamientos efectivos.

CAPÍTULO 2. Polimorfismos de nucleótido simple asociados a servicios por concepción en cerdas infectadas con el virus del PRRS

C. M. Aguilar-Trejo¹, J.A. Romo-Rubio¹, R. Zamorano-Algandar², G. Luna-Nevárez², M.G. Thomas³, R.M. Enns³, S.E. Speidel³, M.A. Sánchez-Castro³, J.R. Reyna-Granados², P. Luna-Nevárez^{2*}

¹*Colegio de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Sinaloa, 80260, Culiacán Rosales, Sinaloa, México.*

²*Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, CP 85000 Cd. Obregón Sonora, México.*

³*Department of Animal Sciences, Colorado State University; P.C. 80523-1171, Fort Collins, CO.*

Single nucleotide polymorphisms associated with services per conception in sows infected with PRRS virus.

2.1 Abstract

The porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) is a disease that causes economic losses in global swine industry and is characterized by affecting the reproductive performance of sows. The objective of the present study was to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) that are associated with the number of services per conception in the first pregnancy (NSC1) in breeding sows infected with the PRRS virus. The investigation included 53 sows Landrace/Yorkshire line previously detected as positive to PRRS virus by PCR. A blood sample from each of the sow was collected and fixed in FTA-Cards™ cards. These cards were sent to Geneseek lab for to genotype 10,000 SNP. A mixed model effects was used to identify five SNP associated to NSC1 ($P < 0.001$), which were rs81364943, rs81382736, rs80976363, rs80890869 and rs81460050. The effect of allelic substitution was calculated using a regression model that included the term genotype as a covariate, and this model demonstrated an increasing in NCS1 of 0.41 ± 0.15 , 0.11 ± 0.07 , 0.23 ± 0.08 , 0.15 ± 0.11 y 0.20 ± 0.09 for each SNP, respectively. These results indicate the existence of genetic basis associated with reproductive efficiency in sows infected with the PRRS virus.

Key words: sows, genome, PRRS, SNP, fertility.

2.2 Resumen

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad que genera pérdidas económicas en la porcicultura mundial y se caracteriza por afectar el desempeño reproductivo de las cerdas. El objetivo del estudio fue identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados al número de servicios por concepción en la primera gestación (NSC1) en cerdas reproductoras infectadas naturalmente por el virus del PRRS. La investigación incluyó 53 hembras de la línea Landrace/Yorkshire previamente detectadas como positivas al virus del PRRS a través de PCR. Una muestra de sangre de cada una de las hembras fue recolectada y fijada en tarjetas FTA-Cards™. Las tarjetas fueron enviadas al laboratorio Geneseek para la genotipificación de 10,000 SNP. Un modelo de efectos mixtos identificó una asociación ($P < 0.001$) entre el NSC1 con los SNPs rs81364943, rs81382736, rs80976363, rs80890869 y rs81460050. El efecto de sustitución alélica fue calculado usando un modelo de regresión que incluyó el término genotipo como covariable, el cual demostró un incremento en la variable NSC1 de 0.41 ± 0.15 , 0.11 ± 0.07 , 0.23 ± 0.08 , 0.15 ± 0.11 y 0.20 ± 0.09 para los cinco SNP, respectivamente. Los resultados encontrados indican la existencia de bases genéticas asociada a la eficiencia reproductiva en hembras porcina infectadas por el PRRS.

Palabras claves: cerdas, genoma, PRRS, SNP, fertilidad.

* Autore de correspondencia

Email: pluna@itson.edu.mx; (644) 410 90 00

2.3. Introducción

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad viral infecciosa de los cerdos que se transmite por vía vertical, horizontal directa e indirecta a cerdos susceptibles y se considera la enfermedad viral más importante desde el punto de vista económico de las explotaciones intensivas de cerdos de Europa y América. El virus del PRRS es de tipo RNA y pertenece al orden Nidovirales, familia Arteriviridae, género Arterivirus (López-Heydeck *et al.*, 2015) cuyas principales características son una elevada tasa de mutación que le confiere una alta variabilidad antigénica y la capacidad para inducir infecciones persistentes (Lunney *et al.*, 2010; Boddicker *et al.*, 2012; Chand *et al.*, 2012). Las diferencias en las secuencias genómicas del PRRSV lo dividen en dos genotipos, Europeo (EU o tipo I) representado por la cepa prototipo Lelystad y Norteamericano (NA o tipo II) representada por la cepa prototipo ATTC VR-2332; estos tipos comparten el 63 % de su identidad genómica, con variaciones del 55 al 70% comparando todo el genoma (Flores *et al.*, 2001). Hay una gran diversidad genética dentro de las cepas NA y entre las cepas europeas EU y NA, lo cual ocasiona problemas en la vacunación y en el diagnóstico (Kleiboeker *et al.*, 2005).

La infección por el virus del PRRS se caracteriza por producir baja conversión alimenticia y bajo peso en los cerdos así como repeticiones del estro, muerte de lechones e incluso abortos en hembras reproductoras (Holtkamp *et al.*, 2013). Las vacunas han logrado prevenir parcialmente la infección por PRRS, ya que el virus posee la habilidad de evadir la respuesta inmune del hospedador (Collins *et al.*, 1996; Lewis *et al.* 2007; Mateu *et al.*, 2008; Geldhof *et al.*, 2013). Sin embargo, se han reportado poblaciones infectadas con el virus del PRRS donde algunas cerdas muestran el índice del número de servicios por concepción por encima del promedio (Sierra *et al.*, 2000); es decir, muestran cierta habilidad para convivir con la enfermedad sin sacrificar su comportamiento reproductivo.

En base en lo anterior, la genómica puede ser una alternativa para explorar los mecanismos detrás de la respuesta a la infección por el virus del PRRS, y poder seleccionar cerdas con menor vulnerabilidad a la infección (Lunney y Chen, 2010). El análisis de su perfil genético que identifica aquellos polimorfismos de nucleótido simple (SNP), que son una variación en la secuencia de ADN con una sola

base y que están implicados en la regulación de caracteres asociados a la reproducción en hembras infectadas con el virus del PRRS (Lunney *et al.*, 2011). La validación de dichos SNP como marcadores genéticos permite la aplicación de procedimientos estadísticos especializados para la selección genómica de individuos superiores. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue determinar y validar polimorfismos de nucleótido simple asociados al número de servicios por concepción en cerdas infectadas con el virus de campo del PRRS.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Sitio y unidades experimentales

El presente estudio se realizó en una granja porcina comercial de ciclo completo ubicada en el valle del Yaqui, Sonora, México (LN: 27°17', LO: 109°56') Unidades experimentales. La investigación incluyó 53 hembras de la línea Landrace/Yorkshire de 9.03 meses de edad y un peso inicial de 108.23 ± 10.9 kg.

2.4.2. Datos fenotípicos

El número de servicios que recibió cada hembra para obtener su primera gestación (NSC1) fueron colectados en el programa PigWINTM. Se registró el número de servicios por concepción (NSC1) que recibió cada hembra para obtener su primera gestación.

2.4.3. Determinación viral

El aislamiento del ARN viral se obtuvo a partir de suero de cerdas positivas a PRRS diagnosticadas por la técnica de ELISA (ELISA-IDEXX, Lab Inc., i.e Enzyme Linked Immunoassay). La técnica para la determinación de los ácidos nucleicos de las hembras fue desarrollado con el Kit DNA/ARN (GeneReach Biotechnology Corporation) mediante un sistema de extracción automática de ácidos nucleicos (tacoTM), basado en la tecnología de separación magnética. Con las muestras de ARN identificadas se realizó el análisis de PCR en tiempo real para PRRS utilizando un Kit comercial (Tetracore Nextgen Real-Time QT-PCR Target Specific reagents for the detection differentiation of North American European PRRSV Viral ARN), que reconoce un segmento del ORF 7 (Cepheid Smart Cycler Version 2.0d).

2.4.4. Estudio de genoma completo

Se utilizaron 8,826 polimorfismos de nucleótidos único (SNP, por sus siglas en inglés), provenientes del panel comercial “GeneSeek Genomic Profiler (GGP) low density BeadChip (GeneSeek®, Lincoln, NE)”, versión GSGT 1.9.4. La detección de SNP asociados al NSC1 fue realizada por selección genómica de Bayes C (Habier *et al.*, 2011).

2.4.5. Análisis estadístico

Mediante el procedimiento MEANS en SAS (Versión 9.4; SAS Inst. Inc., Cary, NC). Se calculó la estadística descriptiva para los datos fenotípicos (Edad y NSC1). La normalidad e igualdad de varianzas fueron probadas usando el procedimiento UNIVARIATE. Los SNP identificados mediante el análisis de genoma completo que fueron significativamente relacionados con la variable NSC1 se validaron en un modelo de efectos mixtos, el cual incluyó el NSC1 como variable respuesta, el genotipo del SNP y la edad de la madre como efectos fijos, y el macho como efecto aleatorio. La comparación entre las medias para cada genotipo de los polimorfismos asociados ($P < 0.05$) con el NSC1 la variable fenotípica de estudio fue calculada utilizando la opción PDIF del procedimiento LSMEANS. La sustitución de alelos y su efecto sobre la variable NSC1 fue estimado mediante la regresión lineal que incluyendo el término genotipo como covariable (Habier *et al.*, 2011).

2.5. Resultados y discusión

La media, valores máximos y mínimos de la variable NSC1 y la edad de las hembras

reproductoras infectadas con el virus del PRSS se describen en la tabla 1.

Cuadro 1.2. Valores mínimos, máximos, media y desviación estándar para las variables de NSC1 del número de servicios por concepción en la primera gestación en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRSS.

Carácter	No.	Min	Media	Max	DS
*Edad al primer servicio (meses)	53	5.00	9.03	14.00	1.414
NSC1	53	1.00	2.96	5.00	0.619

*Edad en meses al primer servicio, NSC1.

En el análisis del genoma completo identificaron cinco SNP (rs81382736, rs80976363, rs80890869 y rs81460050) asociados ($P < 0.001$) NSC1, los cuales fueron rs81364943. En la tabla 2 se describe la secuencia y el cambio de bases de los marcadores para cada uno de los cinco SNP asociados fueron encontrados en las hembras reproductoras infectadas con el virus del PRSS.

Los marcadores mostraron una frecuencia de alelo menor por arriba del 10 % ($FAM > 0.10$), asegurando así que todos los posibles genotipos para estos marcadores tienen una frecuencia mínima del 1 % en la población, lo cual de acuerdo con Balding (2006) evita resultados falsos en el estudio asociativo entre genotipo y fenotipo. Posteriormente, los polimorfismos fueron analizados a través de la prueba de Chi-cuadrada ($X^2 < 0.05$), la cual demostró que la distribución de sus genotipos estuvo en equilibrio Hardy-Weinberg ($P > 0.05$). Lo anterior indica que la población de cerdas utilizadas para el presente estudio ha mantenido cierto grado de estabilidad alélica y genotípica a través del tiempo.

La tabla 3 describe el registro oficial para cada SNP que existe dentro de la base bioinformática de NCBI, su posición dentro del genoma, así como las frecuencias alélicas y genotípicas de cada SNP.

Cuadro 2.2. Marcadores significativos, secuencia y cambio de las bases para la variable NSC1 en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRSS.

Marcador	Secuencia	N	Pr > f
rs81364943	CACACATCTTGAGCTGGGCTTTCCT[C/T]CAGGCAGAAGGAAGCAGATGTAGGT	49	0.0201
rs81382736	TATAAACACAGGTCTTTATTTCCCT[C/T]CCAGTTTAGCTGTACGTGTA TATCT	49	0.0606
rs80976363	ACCTAAGGGGCCACCCCTAGCATGT[A/C]AAAGCTATAGATCCATTCC CCCAGG	49	0.0058
rs80890869	ATGCAGGAAACAAGAGTCTACCAA[A/G]AGCTAGCAGCAGGAGAAC TCAGCTC	49	0.0361
rs81460050	GCTCCCTGCTGAAACACCGGTACCT[A/G]TCGGGGTCTGGGACAGAGA AGATGC	49	0.0361

La tabla 4 muestra los genotipos favorables para los SNP rs81364943, rs81382736, rs80976363, rs80890869 y rs81460050 fueron TC, TT, AA, AA y GG, respectivamente, puesto que las cerdas con dichos genotipos mostraron el menor número de servicios por concepción que la media de sus grupos.

Los cinco marcadores asociados a NSC1 en 0.41 ± 0.15 , 0.11 ± 0.07 , 0.23 ± 0.08 , 0.15 ± 0.11 y 0.20 ± 0.09 , servicios por concepción, respectivamente (Tabla 5). Los 5 marcadores ya han sido

por lo que a partir del presente estudio y debido a que los polimorfismos son estadísticamente significativos ($P < 0.05$), es necesario realizar estudios para validar la función del marcador dentro del gen. La sustitución alélica indica la capacidad que tienen las cerdas de ser eficientes reproductivamente pese a estar infectadas con el virus del PRRS, lo que indica que dichas hembras reproductoras poseen un alelo favorable y por consiguiente, las crías podrían tener la misma habilidad de la madre al mostrar una conducta

Cuadro 3.2. Frecuencias alélicas y genotípicas para la variable NSC1 en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

*Marcador	Posición	Frec. de alelos			Frec. genotípicas	
		<i>C</i>	<i>T</i>	<i>CC</i>	<i>TC</i>	<i>TT</i>
rs81364943	SSA 02	0.826	0.173	0.680	0.293	0.026
rs81382736	SSA 05	0.713	0.287	0.507	0.413	0.080
		<i>A</i>	<i>C</i>	<i>AA</i>	<i>CC</i>	<i>AC</i>
rs80976363	SSA 14	0.480	0.520	0.213	0.253	0.533
		<i>A</i>	<i>G</i>	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>AG</i>
rs80890869	SSA 15	0.573	0.426	0.253	0.106	0.640
rs81460050	SSA 16	0.460	0.540	0.200	0.280	0.520

* Marcadores que cumplen con ($MAF > 10\%$) y equilibrio Hardy-Weinberg ($chisq < 0.05$).

Cuadro 4.2. Medias de cuadrados mínimos \pm EE para el caracter de NSC1 entre los genotipos de SNP encontrados en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

NSC1	Genotipo	No.	Media	<i>Prob</i>
rs81364943	CC	49	3.03 ^a	.0001
	TT	49	3.26 ^a	.0001
	TC	49	2.82 ^b	.0001
rs81382736	CC	49	2.98 ^a	.0001
	TC	49	3.01 ^a	.0001
	TT	49	2.16 ^b	.0001
rs80976363	AA	49	2.67 ^a	.0001
	AC	49	3.02 ^a	.0001
	CC	49	3.14 ^b	.0001
rs80890869	AG	49	3.04 ^a	.0001
	GG	49	3.01 ^a	.0001
	AA	49	2.68 ^b	.0001
rs81460050	AA	49	3.14 ^a	.0001
	AG	49	3.01 ^a	.0001
	GG	49	2.74 ^b	.0009

caracterizados, en un estudio previo (SnapGene®),

Cuadro 5.2. Efectos de sustitución alélica para los genotipos de los polimorfismos para NSC1, en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

Polimorfismo	Alelo favorable	Efectos de sustitución alélica		
		<i>Prob</i>	Valor estimado	± EE
rs81364943	C	0.0095	0.4128	0.1506
rs81382736	T	0.1434	0.1114	0.0739
rs80976363	C	0.0133	0.2352	0.0876
rs80890869	G	0.1764	0.1539	0.1088
rs81460050	A	0.0379	0.2021	0.0915

reproductiva favorable, aun estando infectadas con PRRS.

Aguilar *et al.*, (2017) encontraron doce SNP asociados con el desempeño reproductivo en función al número de lechones nacidos vivos, en hembras reproductoras infectadas por PRRS. De acuerdo con la literatura, la variante rs81364943 se localiza dentro del gen ISOC1 y su función está asociada con la actividad catalítica, aún y cuando se desconoce su función in vivo (Kikuchi *et al.*, 2004). La variante rs81382736 se localiza dentro del gen SEC31-like, y son proteínas asociadas con el retículo endoplásmico en el procesamiento de proteínas de exportación y la apoptosis (Shibata *et al.*, 2007). La variante rs80976363 se ubica dentro del gen LZTS1 (encoding leucine zipper), el cual codifica una proteína supresora de tumores que se expresa en los tejidos normales (Vecchione *et al.*, 2007). El SNP variante rs81460050 se localiza en el gen KCNMB1 (encoding potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member1), se asocia con el control del tono/contracción del músculo liso, y codifica para proteínas con funciones moleculares de la actividad del canal de potasio, activado por el calcio, (Xie *et al.*, 2010).

El PRRS es una importante enfermedad viral que afecta la producción de cerdos en todo el mundo y trae como consecuencia la disminución del rendimiento reproductivo en hembras (Lewis *et al.*, 2009; Rowland *et al.*, 2012; Serão *et al.*, 2014). De acuerdo a algunas estimaciones recientes, el PRRS es la enfermedad más costosa que afecta a la industria porcina (Charentantanakul, 2012; Alonso *et al.*, 2013), esto debido a que los rasgos reproductivos del ganado porcino son sumamente importantes por el papel principal que desempeñan en el éxito económico de la producción (Rothschild *et al.*, 1996). De este modo, los parámetros reproductivos son considerados uno de los aspectos más importantes en la cría de cerdos debido a su influencia en la eficiencia económica de la producción porcina (Bergfelder-Driuing *et al.*,

2015). Otros autores afirman que, con el fin de generar mayores ganancias en la producción de lechones, los objetivos de selección para la cría de cerdos se centran en la crianza y reproducción de marranas con superiores parámetros reproductivos (Koning *et al.*, 2001; Hanenberg *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2005). De acuerdo con Boddicker *et al.* (2012), ellos fueron los primeros en reportar hallazgos en las regiones genómicas asociadas con la resistencia al PRRS o la susceptibilidad en los cerdos en crecimiento. En su estudio identificaron regiones genómicas para el día 42 post-infección en los cromosomas 1, 4, 7 y 17.

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede proponer que hay más regiones dentro del genoma del cerdo que indican tolerancia al PRRS, mientras que la conducta reproductiva de las cerdas permanece estable. Balding *et al.* (2006) mencionan que al explorar el genoma completo, resulta complicado detectar una variante causal o directamente responsable de los cambios fenotípicos en las poblaciones, sin embargo, debido a la presencia del desequilibrio de ligamiento, es posible detectar asociaciones indirectas a través del estudio, por lo que al encontrar polimorfismos asociados a variaciones fenotípicas es necesario considerar en cuenta también a los genes que rodean al polimorfismo significativo.

2.6. Conclusiones

Se identificaron cinco polimorfismos asociados al carácter de número de servicios por concepción en la primera gestación en hembras reproductoras infectadas con el virus del PRRS. Los alelos favorables de estos polimorfismos (SNP) mostraron un efecto eficiente con respecto a la media de sus grupos, lo cual significa que al estar presente al menos una copia del alelo favorable en el genotipo de la cerda, ésta mostrará una mejora significativa en la disminución del número de servicios por concepción.

Por lo anterior, estos polimorfismos pueden ser considerados como parte de un programa de

selección asistida por marcadores moleculares (SAM), con el propósito de obtener un mejoramiento genético entre las explotaciones porcinas, de manera que las nuevas generaciones del pie de cría, sean capaces de tolerar la presencia del PRRS, mientras que su conducta reproductiva no se vería afectada.

La selección genómica ayuda a los métodos convencionales, por su economía y alto rendimiento. Se requiere identificar los mapas de interacción de genes involucrados para de esta forma determinar los mecanismos fisiológicos de la respuesta en la interacción genotipo con el fenotipo.

Agradecimiento

Fuentes de financiamiento del proyecto de investigación: Laboratorio de Diagnóstico ITSON-UGRPS \$31,000.00 (45.5%); Laboratorio ITSON, \$223,000.00 (2.5 %); Unión Ganadera de Porcicultores del Estado de Sonora = \$150,000.00 (22.0 %) y Convenio con el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Colorado (CSU) y Universidad Estatal de Iowa (ISU), Facultad de MVZ de Universidad Autónoma de Sinaloa y CONAcYT becario 279847/302410

2.7. Referencias

- Aguilar-Trejo, C.M., Valerio-Valle, K.M., Luna-Ramirez, R.I., Luna-Nevarez, G., Reyna-Granados, J.R., Romo, J.A., Sanchez-Castro, M.A., Zeng, X., Enns, R.M., Speidel, S.E., Thomas, M.G., y Luna-Nevarez, P. 2017. Validation of candidate markers associated with reproductive performance in porcine respiratory and reproductive syndrome virus naturally infected replacement gilts in southern Sonora México. *J. Anim.Sci.* 95(4):29
- Alonso, C., Murtaugh, M.P., Dee, S. A. & Davies, P.R. 2013. Epidemiological study of air filtration systems for preventing PRRSV infection in large sow herds. *Prev. Vet. Med.* 112(1–2):109–117
- Balding, D.J. A. Bergfelder-Drüting, S., Grosse-Brinkhaus, C., Lind, B., Erbe, M., Schellander, K., Simianer, H., & Tholen, E. 2015. A Genome-Wide Association Study in Large White and Landrace Pig Populations for Number Piglets Born Alive. *PLoS ONE* 10(3).
- Boddicker, N., E.H. Waide, R.R.R. Rowland, J.K. Lunney, D.J. Garrick, J.M. Reecy, and J.C.M. Dekkers. 2012. Evidence for a major QTL associated with hot response to Porcine Reproductive and Respiratory virus syndrome challenge. *J. Anim. Sci.* 90:1733.
- Chand R.J., Tribble B.R., Rowland R.R.R. 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology*: 2:256–263.
- Charerntantanakul, W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. 2012. *World. J. Virol.* 1(1):23–30.
- Collins J.E., Mollitor T.W., Shin J.R., Pijoan C., Casamiglia M., Kapur V. 1999. Necesidad de los Médicos Veterinarios de diagnosticar enfermedades porcinas, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Memorias del curso “Actualidades en la Producción Porcina y en el diagnóstico de Enfermedades, México, D.F.* 13-18
- Flores-Mendoza, L. y Hernández, J. 2001. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Vet. México.* 41:139-159.
- Geldhof M.F., Breedam W.V., Jong E., Rodriguez A.L., Karniyuchuk U.U., Vanhee M, Doorselaere Jv, Maes D., Nauwynck H.J. 2013. Antibody response and maternal immunity upon boosting PRRSV-immune sows with experimental farm-specific and commercial PRRSV vaccines. *Vet Microbiol*; 167:260–271.
- Habier D., Fernando R. L., Kizilkaya K., Garrick D. J. 2011. “Extension of the Bayesian Alphabet for Genomic Selection”. *BMC Bioinformatics* 12:186.
- Hanenberg, E. H. A. T., Knol, E. F. y Merks, J. W. M. 2001. Estimates of genetic parameters for reproduction traits at different parities in Dutch Landrace pigs. *Livest. Prod. Sci.* 69: 179-186.
- Holtkamp D.J., Kliebenstein J.B., Neumann E.J., Zimmerman J.J., Rotto H.F., Yoder T.K., Wang C., Yeske P.E., Mowrer C.L., Haley C.A. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod*; 21:72–84
- Kikuchi M., Hatano N., Yokota S., Shimozaawa N., Imanaka T., Taniguchi H. 2004. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: Presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J Biol Chem.* 2; 279(1):421-8.
- Kleiboeker, S. B., Schommer, S. K., Lee, S. M., Watkins, S., Chittick, W. & Polson, D. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *Journal Vet. Diagn. Invest.* 17:165-170.
- Koning D.J., Rattink B., Harlizius M.A., Groenen E.W., Brascamp 2001. Detection and characterization of Quantitative Trait Loci for growth and reproduction traits in pigs. *Livestock Production Science.* 72: 185-198
- Lewis T. W., Wiseman J., Woolliams J.A. 2005. Genotype by mating type interaction for litter size in Landrace and Large White sows. *Anim. Sci.*; 81: 331-335
- Lewis C.R., Ait-Ali T., Clapperton M., Archibald A.L., Bishop, S. 2007. Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol*; 20(3), 343-358.
- Lewis C.R., Torremorell M., Galina P.L., Deeb N., Mellencamp M.A., Archibald A.L. Bishop S. A genomewide association analysis identifying SNPS for PRRS tolerance on a commercial pig farm. *Proc. Assoc. Advmt. J Anim Breed Genet.* 2009; (18)187–190.
- Lunney J.K., Steibel J.P., Reecy J.M., Fritz E., Rothschild M.F. 2011. Probing genetic control of swine responses to PRRSV infection: current progress of the PRRS host genetics consortium. *BioMed Central Ltd.* pp. S30
- Lunney J.K., Chen H. 2010. Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Research.* 154:161–169.
- Rothschild, M., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki, S., Vincent, A., McLaren, D., Southwood, O., van der Steen, H., Mileham, A. & Plastow, G. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a

- major gene influencing litter size in pigs. . Proc Natl Acad Sci USA 93: 201–205.
- Rowland R.R, 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology*;2:256–263.Serão, N.V.L., Matika, O., Kemp, R. A., Harding, J.C., Bishop, S. C., Plastow, G. S. & Dekkers, J.C. M. 2014. Genetic analysis of reproductive traits and antibody response in a PRRS outbreak herd. *J. Anim. Sci*; 92:2905–21.
- Shibata H., Suzuki H., Yoshida H., Maki M. 2007. ALG-2 directly binds Sec31A and localizes at endoplasmic reticulum exit sites in a Ca²⁺- dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 16; 353(3):756-63. Epub 2006 Dec 22
- Sierra N., Ramírez, R. Mota, D. 2000. Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Archivos de medicina veterinaria*; 32(1), 1-9
- Vecchione A, Baldassarre G, Ishii H, Nicoloso M.S., Belletti B, Petrocca F, Zanesi N, Fong LY, Battista S, Guarnieri D, Baffa R, Alder H, Farber JL, Donovan PJ, Croce CM. 2007. Fez1/Lzts1 absence impairs Cdk1/Cdc25C interaction during mitosis and predisposes mice to cancer development. *Cancer Cell*. Mar; 11(3):275-89.
- Xie M.J., Ma Y.G., Gao F., Bai Y.G., Cheng J.H., Chang Y.M., Yu Z.B., Ma J. 2010. Activation of BKCa channel is associated with increased apoptosis of cerebrovascular smooth muscle cells in simulated microgravity rats. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jun; 298(6):C1489-500. doi: 10.1152/ajpcell.00474.2009.

**CAPÍTULO 3. POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON EL NÚMERO DE LECHONES
NACIDOS VIVOS EN CERDAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL PRRS EN EL
SUR DE SONORA MÉXICO**

**POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH THE NUMBER OF LIVE-BORN
PIGLETS IN SOWS INFECTED WITH THE PRRS VIRUS IN SOUTHERN SONORA
MEXICO**

C. M. Aguilar-Trejo¹, J.A. Romo-Rubio¹, G. Luna-Nevárez², J.R. Reyna-Granados², X. Zeng³,
M.A. Sánchez-Castro³, R.M. Enns³, S.E. Speidel³, M.G. Thomas³ P. Luna-Nevárez^{2*}.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa.

²Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora.

³Department of Animal Sciences, Colorado State University.

†

3.1. Resumen.

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad viral que afecta el comportamiento reproductivo de las cerdas generando severas pérdidas económicas. El objetivo del presente estudio fue identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados al número de lechones nacidos vivos al primer (LNV1) y segundo parto (LNV2) en cerdas reproductoras infectadas con el virus del PRRS. El estudio incluyó 100 hembras de la línea Landrace(¾)/Yorkshire(¼), gestantes y con diagnóstico positivo del virus del PRRS. Muestras sanguíneas individuales fueron obtenidas y depositadas en tarjetas para colección de ácidos nucleicos. Dichas tarjetas fueron procesadas para la extracción de ADN, el cual fue genotipado usando un dispositivo para perfil genómico con 10,000-SNP. Los genotipos resultantes fueron analizados usando un modelo mixto multi-locus, el cual detectó tres SNP asociados a LNV1 y cinco SNP asociados a LNV2 ($P < 0.001$). Los ocho SNP fueron validados utilizando un modelo asociativo de efectos mixtos que incluyó los términos genotipo y edad de la madre como efectos fijos, y el padre como efecto aleatorio. Los efectos de sustitución alélica fueron estimados con el modelo anterior incluyendo el término genotipo como covariable. Los SNP rs81276080, rs81334603 y rs80947173 se asociaron a LNV1 ($P < 0.01$), siendo los alelos favorables T, G y A, respectivamente. Los SNP rs81364943, rs80859829, rs80895640, rs80893794 y rs81245908 se asociaron a LNV2 ($P < 0.01$), siendo los alelos favorables T, T, T, C y G, respectivamente. En conclusión, estos resultados sugieren la existencia de variantes génicas asociadas al desempeño reproductivo de cerdas infectadas por el virus del PRRS.

Palabras clave: alelos, cerdas reproductoras, genotipo, lechones nacidos vivos, PRRS, SNP.

3.2. Abstract.

The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a viral disease that decreases the reproductive performance in breeding sows and leads to economic losses to the swine industry. The objective of the present study was to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) associated to the number of live-born piglets in the first (LBP1) and second birth (LBP2) in breeding sows infected with the PRRS virus. The study included 100 females of the Landrace(¾)/ Yorkshire(¼) line, pregnant and with a confirmed positive diagnosis of the PRRS virus. Individual blood samples were obtained and spotted onto cards for collection of nucleic acids. The cards were processed for DNA extraction which was genotyped using a 10,000-SNP chip for genomic profile. Resulting genotypes were analyzed using a multi-locus mixed model that detected three SNP associated to LBP1 and five SNP associated to LBP2 ($P < 0.001$). These eight SNP were validated using an associative mixed effects model which includes the terms genotype and age of dam as fixed effects, and sire as random effect. Allele substitution effects were estimated using the same model including the term genotype as covariate. The SNP rs81276080, rs81334603 and rs80947173 were associated to LBP1 ($P < 0.01$), being the most favorable alleles T, G and A, respectively. The SNP rs81364943, rs80859829, rs80895640, rs80893794 and rs81245908 were associated to LBP2 ($P < 0.01$), being the most favorable alleles T, T, T, C and G, respectively. In conclusion, these results suggest the existence of gene variants associated with the reproductive performance of sows infected by the PRRS virus.

Key words: alleles, breeding sows, genotype, live-born piglets, PRRS, SNP.

3.3. Introducción.

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad de distribución mundial que genera pérdidas económicas en la industria porcina estimadas aproximadamente en \$3.08 dólares americanos por cerdo al mercado⁽¹⁾.

El agente etiológico del PRRS es un virus ARN de cadena sencilla que pertenece al género Arterivirus, cuyas principales características son su elevada tasa de mutación, que le confiere una alta variabilidad antigénica, y su capacidad para inducir infecciones persistentes^(2,3). El reporte inicial de la enfermedad del PRRS en México describió que las cerdas infectadas mostraban un cuadro de problema reproductivo y mortalidad en la línea de producción⁽⁴⁾. La primer descripción clínica, epidemiológica y productiva de la enfermedad, así como el primer aislamiento del virus del PRRS, fueron reportados en los estados de México, Guanajuato, Veracruz y Puebla⁽⁵⁾.

La infección por el virus del PRRS se caracteriza por pobre conversión alimenticia que se traduce en bajos pesos de los cerdos en general, así como alteraciones en la fertilidad en hembras reproductoras tales como repetición del estro, mortalidad fetal, momificación, inducción de abortos y baja viabilidad de lechones al nacimiento⁽¹⁾.

La vacunación es el método más común para el control del PRRS y a la fecha ha logrado prevenir en cierta medida la infección por PRRS. Sin embargo, la eficacia de las vacunas aún se encuentra lejos de ser universal, ya que el virus posee la habilidad para evadir la respuesta inmune del hospedador, y además, entre hospedadores existen diferencias de origen genético en su respuesta ante la presencia del virus^(6,7). La vacunación puede tener cierta eficacia cuando se trata de cepas homólogas, pero al tratarse de cepas heterólogas su efectividad se reduce drásticamente. Por lo tanto, actualmente vacunar contra el virus del PRRS sólo garantiza una reducción en la duración de la viremia y del período de eliminación del virus, así

como una disminución en el grado de presentación de signos y síntomas clínicos, pero no suprime la enfermedad⁽⁸⁾.

La existencia de variantes génicas asociadas a la interacción entre el virus del PRRS y su huésped, así como la evidencia de una variabilidad natural en la tolerancia y/o susceptibilidad al PRRS en las líneas porcinas comerciales, han abierto la puerta al uso de tecnologías moleculares como una valiosa herramienta para combatir la enfermedad del PRRS⁽⁹⁾. Al respecto, la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) puede emplearse para identificar, a través del estudio de genes candidatos, a aquellos animales que poseen una habilidad genética superior para la expresión de caracteres de importancia económica, entre los cuales se incluye la resistencia o tolerancia a enfermedades⁽¹⁰⁾. Los primeros ejemplos de la aplicación de estas tecnologías en cerdos fueron la selección en contra del gen del halothano, y la identificación de una asociación significativa entre el gen del receptor del estrógeno y el número de lechones nacidos vivos⁽¹¹⁾. Sin embargo, el desarrollo actual de sistemas de cómputo más robustos ha facilitado la selección genómica completa, la cual involucra el uso extensivo de marcadores moleculares que cubre la totalidad del genoma, de tal manera que cientos de miles de variantes moleculares pueden ser estudiadas al mismo tiempo a fin de explicar la variación genética de una característica fenotípica⁽¹²⁾. Este método permite realizar estudios asociativos que incluyen el análisis de una gran cantidad de marcadores en forma simultánea a través del uso de dispositivos de baja (10k=10,000 SNP) o alta densidad (50k=50,000 a 60k=60,000 SNP).

Diversas investigaciones se han realizado en cerdos con el fin de identificar regiones en el ADN relacionadas con rasgos de interés económico, entre los cuales se encuentra la resistencia al virus del PRRS^(13,14,15). Reportes iniciales sugirieron la existencia de base genética asociada a la enfermedad del PRRS. Al respecto, cerdos de la raza Hampshire infectados con PRRS

mostraron lesiones pulmonares más graves que cerdos de las razas Duroc y Meishan⁽¹⁶⁾. Por otra parte, cerdos de la línea sintética Large White-Landrace mostraron una menor temperatura rectal y una reducción en la viremia después de ser infectados con el virus del PRRS, en comparación con cerdos de la línea sintética Hampshire-Duroc⁽¹⁷⁾. Recientemente, se reportó una región génica dentro del cromosoma 4 asociada a la resistencia al virus del PRRS, lo cual evidenció la existencia de un fuerte componente genético asociado a esta habilidad⁽³⁾.

Sin embargo, actualmente es escasa la información reportada sobre genes y/o variantes génicas relacionadas a las diferencias fenotípicas observadas en la eficiencia reproductiva de hembras infectadas con el virus del PRRS. Por lo tanto, el análisis de la base genética de la respuesta reproductiva de dichas hembras, podría conducir a la identificación de marcadores genéticos asociados a un adecuado comportamiento reproductivo, lo cual sería de gran utilidad para la implementación de programas más eficientes de selección, que incluyan cerdas con habilidad genética superior para tolerar y/o resistir la infección del virus del PRRS.

En base a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar polimorfismos de nucleótido simple asociados al número de lechones nacidos vivos al primer (LNV1) y segundo parto (LNV2) en cerdas reproductoras infectadas con el virus del PRRS.

3.4. Materiales y Métodos.

3.4.1. Sitio y unidades experimentales.

El presente estudio se realizó en una granja porcina comercial de ciclo completo ubicada en el valle del Yaqui, Sonora, México (LN: 27°17', LO: 109°56'). Se utilizaron 100 cerdas reproductoras de la línea comercial Landrace^(3/4)/Yorkshire^(1/4), de 12 meses de edad, las cuales fueron expuestas e infectadas en forma natural con el virus de campo del PRRS al

ingresar al área de pie de cría. Dentro de esta área, las hembras iniciaron su manejo reproductivo que consistió en proporcionarles dos servicios con verracos de fertilidad probada después de ser observadas en estro. Una vez confirmadas como gestantes, las cerdas fueron trasladadas al área de gestación y permanecieron ahí hasta el día previo a su parto, momento en el cual fueron movilizadas al área de maternidad. Inmediatamente después del parto se contabilizó el número de lechones nacidos vivos. El mismo manejo reproductivo antes descrito se repitió para la segunda cubrición de cada hembra y su parto correspondiente. Los registros obtenidos del número de lechones nacidos vivos al primer (LNV1) y segundo parto (LNV2) fueron almacenados dentro del programa de cómputo PigWIN®.

3.4.2. Análisis de laboratorio.

Muestras de sangre fueron colectadas en forma individual por punción de la vena auricular, para la determinación sérica de los títulos de anticuerpos específicos contra el virus del PRRS empleando la herramienta diagnóstica “ELISA-IDEXX” (Enzyme Linked Immunoassay, Lab Inc.). El aislamiento de ARN viral se realizó a partir del suero sanguíneo mediante un sistema de extracción automática de ácidos nucleicos basado en la tecnología de separación magnética (TACO System, GeneReach Biotechnology Corporation). Con las muestras de ARN purificadas se realizó el análisis de PCR en tiempo real utilizando un Kit comercial (Tetracore Nextgen Real-Time QT-PCR), el cual reconoce un segmento del ORF 7 del virus del PRRS y cuyos resultados se reportan como número de copias de ARN del virus del PRRS por mL de muestra (Cepheid Smart Cyclor Version 2.0d).

3.4.3. Estudio del genoma completo.

Se obtuvo una muestra adicional de sangre (0.5 ml) de cada hembra la cual fue colocada en tarjetas para recolección de ácidos nucleicos. Las tarjetas se almacenaron a 25°C y posteriormente fueron enviadas al Laboratorio Neogen donde se realizó la extracción,

purificación y cuantificación del ADN para cada una de las hembras muestreadas. El ADN fue sometido a un proceso de genotipado utilizando un dispositivo de perfil genómico de baja densidad (Low Density Porcine BeadChip, Neogen®, Lincoln, NE) con capacidad para análisis de 10,000 SNP. Una vez obtenidos los resultados, se utilizó el software PLINK (V1.07)⁽¹⁸⁾ para el análisis de calidad y depuración de genotipos que consistió en la remoción de los SNP con tasa de genotipado por debajo del 90%, frecuencia del alelo menor inferior al 5% y tasa de error Mendeliano superior a 0.1. Finalizado este análisis, un total de 8,826 SNP resultaron útiles e informativos para el estudio asociativo de genoma completo. Para ello, un modelo mixto multi-locus fue construido con el fin de identificar SNP asociados a los caracteres reproductivos de LNV1 y LNV2 utilizando el programa Golden Helix SVS 7 (Golden Helix Inc., Bozeman, Montana, USA). Al procesar el modelo asociativo antes mencionado, se implementó el procedimiento “stepwise” para identificar los polimorfismos significativos como covariables de efectos fijos. Además, el modelo permitió la utilización de una matriz de relaciones genómicas estimada a partir de los genotipos disponibles (SNP) para cada animal. Se consideró a los SNP como asociados a los fenotipos de interés a un $\alpha = 0.001$, y todos aquellos que resultaron estadísticamente significativos ($P < 0.001$), fueron retenidos para su posterior análisis individual de validación.

3.4.4. Análisis estadístico de validación.

Las estadísticas descriptivas para las variables continuas de LNV1 y LNV2 se calcularon con el procedimiento MEANS del paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Las pruebas de normalidad e igualdad de varianza fueron realizadas usando el procedimiento UNIVARIATE⁽¹⁹⁾. El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas, así como la prueba Ji-cuadrada (X^2) para verificar posibles desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, fueron desarrollados usando el procedimiento ALLELE⁽²⁰⁾. Los SNP que resultaron asociados

($P < 0.001$) a los caracteres de LNV1 y LNV2, y que cumplieron con los criterios de frecuencia del alelo menor superior al 10 % ($FAM > 0.10$) y no-desviación del equilibrio Hardy-Weinberg ($X^2 > 0.05$), fueron sometidos a un análisis de validación a través de un estudio asociativo entre genotipo y fenotipo, empleando el procedimiento MIXED para variables de distribución continua. Dicho análisis de validación individual para cada SNP se efectuó a través de un modelo de efectos mixtos, el cual se describe a continuación:

$$Y = Xb + Zs + e$$

Donde:

Y = vector de valores fenotípicos del rasgo de interés (LNV1, LNV2),

X = matriz de incidencia para efectos fijos (genotipo del SNP y edad de la madre),

Z = matriz de incidencia para efectos genéticos aleatorios (padre),

b = vector de coeficientes para efectos fijos,

s = vector de efectos genéticos aleatorios ($s \sim N(0, \sigma_s^2)$),

e = vector de residuos ($e \sim N(0, I\sigma_e^2)$)

Dentro del modelo anterior, σ_s^2 representa la varianza genética del padre, misma que corresponde a $1/4$ de σ_a^2 (varianza genética aditiva). **I** representa una matriz de identidad y, σ_e^2 representa la varianza residual.

Las comparaciones entre medias para los genotipos de los SNP asociados con las variables de LNV1 y LNV2 fueron obtenidas utilizando la opción PDIFF del procedimiento LSMEANS, incluyendo el ajuste Bonferroni, siempre y cuando el término genotipo del SNP resultó ser fuente de variación ($P < 0.05$) en el análisis asociativo. Los efectos de sustitución alélica fueron estimados a través del modelo de efectos mixtos descrito previamente, el cual para este análisis incluyó el término genotipo como covariable. Finalmente, se calcularon los efectos

genéticos de dominancia y aditividad para cada SNP que resultó significativo, utilizando los valores promedio de sus respectivos genotipos⁽²¹⁾.

3.5. Resultados.

En el Cuadro 1 se muestran las estadísticas descriptivas de los caracteres reproductivos en estudio, así como de variables referentes a la viabilidad de los lechones al nacimiento y al destete. Los valores mostrados son muy similares entre el primer y el segundo parto, aunque ligeramente superiores para hembras primerizas.

3.5.1. Análisis del genoma completo.

El análisis genómico asociativo identificó tres SNP asociados a la variable de LNV1 ($P < 0.001$), los cuales se ubican dentro de los cromosomas 6 y 7 (Figura 1); mientras que para LNV2 fueron identificados cinco SNP ($P < 0.001$), localizados dentro de los cromosomas 2, 5, 7 y 8 (Figura 2). Los SNP asociados a LNV1 fueron rs81276080, rs81334603 y rs80947173 ($P < 0.001$). Por otra parte, los SNP asociados a LNV2 fueron rs81364943, rs80859829, rs80895640, rs80893794 y rs81245908 ($P < 0.001$). El número de SNP identificados por variable analizada, así como la ubicación cromosómica de los mismos, se muestran en el Cuadro 2.

3.5.2. Validación de polimorfismos de nucleótido simple (SNP).

Los ocho SNP identificados por su asociación con las variables reproductivas de LNV1 y LNV2, cumplieron con los criterios de no-desviación del equilibrio Hardy-Weinberg ($\chi^2=1.0$, $P > 0.28$) y de frecuencia del alelo menor superior al 10% ($FMA > 0.10$; Cuadro 3). Tres de ellos fueron validados como predictores de la variable LNV1 ($P < 0.01$) y cinco como predictores de la variable LNV2 ($P < 0.01$). En el Cuadro 4 se muestran las medias de cuadrados mínimos para los genotipos de cada uno de los SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2. Los SNP más favorables fueron rs81334603 y rs81364943 ya que mostraron

los valores más altos para LNV1 ($GG = 13.47 \pm 1.11$) y LNV2 ($TT = 16.30 \pm 3.01$), respectivamente; mientras que los SNP menos favorables fueron rs81276080 y rs80859829 ya que mostraron los valores más bajos para LNV1 ($GG = 7.59 \pm 0.61$) y LNV2 ($CC = 5.94 \pm 0.78$), respectivamente. Sin embargo, cada uno de los ocho SNP validados en el presente estudio mostró un genotipo asociado favorablemente a los caracteres reproductivos analizados. Los efectos de sustitución alélica para cada SNP se muestran en el Cuadro 5. Los alelos favorables de los SNP rs81276080, rs81334603 y rs80947173 asociados a LNV1, fueron T, G y A, ya que elevan en 3.28 ± 0.74 , 3.52 ± 0.62 y 2.35 ± 0.68 el número de LNV1, respectivamente ($P < 0.005$). Respecto a los SNP rs81364943, rs80859829, rs80895640, rs80893794 y rs81245908 asociados a LNV2, los alelos favorables fueron T, T, T, C y G, ya que incrementan en 3.66 ± 0.85 , 3.38 ± 0.82 , 1.92 ± 0.58 , 2.64 ± 0.61 y 3.18 ± 0.77 el número de LNV2, respectivamente ($P < 0.005$). Los valores antes descritos indican una contribución favorable de los ocho SNP sobre los caracteres reproductivos evaluados en cerdas infectadas con el virus del PRRS, mostrando cada uno de dichos SNP un efecto genético aditivo.

3.6. Discusión.

Los efectos negativos de la infección por el virus del PRRS sobre el número de lechones nacidos vivos en cerdas de diferente paridad han sido previamente reportados^(22,23). Lewis *et al*⁽²⁴⁾ observaron un incremento en los valores promedio de cerdos momificados y no-nacidos de 0.04 a 1.13 y 0.63 a 1.02, respectivamente, en cerdas infectadas con el virus del PRRS en comparación con cerdas sanas, así como una reducción en el número de cerdos nacidos vivos de 10.3 a 9.8.

Por otra parte, la existencia de variabilidad genética en el desempeño reproductivo de cerdas infectadas con el virus del PRRS también ha sido claramente descrita en varias investigaciones. Al respecto, Rashidi *et al*⁽¹⁵⁾ reportan una variación de 3.83 ± 0.31 en el

número de lechones nacidos vivos en cerdas infectadas con el virus del PRRS, en comparación con una variación de 1.96 ± 0.06 en el número de lechones nacidos vivos en cerdas sanas. La variabilidad antes mencionada, principalmente en las cerdas infectadas con PRRS, sugiere la existencia de una base genética asociada a la respuesta reproductiva ante la enfermedad. Por lo anterior, se ha señalado que una estrategia interesante para reducir el impacto negativo del PRRS en hembras reproductoras, es la identificación de marcadores moleculares que conduzcan a un mejor entendimiento del control genético de la respuesta al virus, y eventualmente, utilizarlos en la implementación de programas de selección asistida por marcadores (SAM)⁽²⁵⁾.

En el presente estudio, el análisis del genoma completo identificó un total de ocho SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2 ($P < 0.001$) en cerdas reproductoras infectadas con el virus del PRRS. Dichos SNP mostraron una frecuencia del alelo menor superior al 10%, lo cual en términos generales es considerado como un requisito para evitar resultados falsos en estudios asociativos entre genotipo y fenotipo⁽²⁶⁾.

En el análisis estadístico individual, los ocho SNP identificados fueron validados como predictores de las variables LNV1 y LNV2, y de los cuales sólo dos de ellos se encuentran dentro de regiones funcionales. Por una parte, el SNP rs81276080 (asociado a LNV1) se localiza en la región 5' del gen TTR (Transthyretin), el cual codifica la síntesis de una proteína transportadora de hormonas tiroideas en plasma y fluido cerebroespinal. El TTR ha sido propuesto como un potencial gen candidato asociado a la respuesta fisiológica de cerdos sometidos a estrés por calor, el cual limita seriamente la capacidad reproductiva⁽²⁷⁾, ya que disminuye la calidad de los ovocitos y la viabilidad embrionaria, exacerbando los efectos negativos del PRRS sobre la fertilidad de cerdas infectadas. Por otra parte, el SNP rs80893794 (asociado a LNV2) se localiza en una región intrónica del gen CWH43 (Cell wall biogenesis

43 C-terminal homolog). El gen CWH43 está involucrado en la remodelación de lípidos de la pared celular de las levaduras⁽²⁸⁾ y se ha reportado que dicho gen es homólogo al PGAP2 (Post-GPI attachment to proteins), el cual está implicado en los ciclos de de-acetilación y re-acetilación de las proteínas que sintetizan Phosphatidyl Inositol (PI) en las células mamíferas⁽²⁹⁾. El PI es una familia de lípidos que participan en el mecanismo de segundo mensajero en la membrana celular, y que es empleado por diversas hormonas, entre ellas la PGF2 α , la cual juega un papel importante en la función ovárica y actividad uterina, y por lo tanto influye directamente en las variables de LNV1 y LNV2.

Los restantes seis SNP se localizan en regiones intergénicas (no-funcionales). Al respecto, es importante puntualizar que, al explorar el genoma completo, resulta complicado detectar una variante causal o directamente responsable de los cambios fenotípicos en las poblaciones; sin embargo, debido a la propiedad del desequilibrio de ligamiento en el genoma, es posible detectar asociaciones indirectas entre diversos SNP y los fenotipos de interés. Lo anterior sustenta la importancia de tomar en cuenta genes con ubicación cromosómica cercana a aquellos SNP que resulten significativos y que tienen posiciones intergénicas (cuando menos en un rango de 100 mil pares de bases; 100 kbp)⁽³⁰⁾. Uno de estos SNP es el rs81334603 asociado a LNV1, mismo que se ubica a una distancia de 40.26 kbp del gen KCNQ4 (Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 4). La expresión de este gen se encuentra disminuida en ganglios linfáticos traqueobronquiales de cerdos infectados con la cepa norteamericana VR-2332 del virus del PRRS⁽³¹⁾. Además, aproximadamente a 72.77 kbp del SNP rs81334603 se localiza el gen CTPS1 (CTP Synthase 1), el cual codifica para la producción de la enzima CTP sintetasa encargada de la biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas (UTP y CTP), así como también para la síntesis de ciclopentenilcitosina, un agente antiviral de amplio espectro⁽³²⁾.

En lo que respecta al SNP rs80947173, también asociado a LNV1, el gen más cercano a su ubicación es FLRT2 (fibronectin leucine rich transmembrane protein 2) localizado a 889.05 kbp de distancia. Si bien es cierto que este gen se encuentra considerablemente alejado del SNP antes mencionado, niveles útiles de desequilibrio de ligamiento (>0.3) parecen extenderse a distancias mayores en cerdos que en ganado Holstein, lo que implica que paneles de SNP menos densos aún pueden brindar resultados confiables en estudios asociativos de genoma completo⁽³³⁾. Por su parte, se ha reportado que el gen FLRT2 se encuentra asociado al número de lechones nacidos vivos en poblaciones de cerdos Large White y Landrace⁽³⁴⁾.

En el caso de los SNP asociados a LNV2, uno de ellos es el rs81364943, ubicado a 88.72 kbp de distancia del gen ISOC1 (isochorismatase domain containing 1) y a 178.67 kbp del gen ADAMTS19 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 19). El gen ISOC1 ha sido vinculado a procesos de actividad catalítica en ovocitos porcinos mediante un estudio de co-expresión genética⁽³⁵⁾, mientras que polimorfismos del gen ADAMTS19 en mujeres, se han relacionado con la presencia del síndrome de ovarios poliquísticos⁽³⁶⁾.

Otro de los SNP asociados a LNV2 fue rs80859829, el cual se posiciona a 31.75 y 177.73 kbp de los genes ADAMTS20 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 20) e IRAK4 (interleukin 1 receptor associated kinase 4), respectivamente. La posible explicación de la asociación de este polimorfismo con el desempeño reproductivo al parto de cerdas reproductoras infectadas con PRRS, se atribuye a que el gen ADAMTS20 se expresa en alto grado en órganos como el cerebro y las gónadas⁽³⁷⁾, mismos que resultan afectados tras la infección por el virus del PRRS⁽³⁸⁾. Del mismo modo, la quinasa asociada al receptor de interleucina-1 (producto proteico del gen IRAK4), se ha visto involucrada en los mecanismos de replicación viral del PRRS, puesto que su producción se limita o disminuye a causa de la acción de un conocido micro RNA (miRNA-373) con efectos provirales⁽³⁹⁾.

El SNP rs80895640 también asociado a LNV2, se encuentra a 34.3 kbp del gen CD83 (CD83 molecule); este gen, ha sido previamente vinculado con el número total de lechones nacidos y el número de lechones nacidos vivos en cerdos híbridos Ibérico X Meishan^(40,41). De manera interesante, dentro del contexto inmunológico, la molécula CD83 ha sido recientemente señalada como una pieza clave del mecanismo de escape ante el sistema inmune que utiliza el virus del PRRS, ya que éste es capaz de regular positivamente la expresión en forma soluble de la molécula CD83 (sCD83), la cual se encuentra asociada a la inmunosupresión de la proliferación de células T en el hospedador⁽⁴²⁾. Similarmente, a 54.05 kbp del SNP rs80895640, se ubica el gen RNF182 (Ring finger protein 182), mismo que se encuentra involucrado en procesos de apoptosis neuronal⁽⁴³⁾, los cuales ocurren comúnmente tras la infección de cepas altamente infecciosas del virus del PRRS⁽⁴⁴⁾.

Finalmente, el SNP rs81245908 (asociado a LNV2) se encuentra a una distancia aproximada de 53.52 kbp del gen FAT4 (FAT atypical cadherin 4). La asociación de este polimorfismo podría explicarse a partir de un estudio que brinda evidencia de que la expresión del gen FAT4 en humanos ha sido identificada en el tejido cerebral fetal y en el cerebro de infantes⁽⁴⁵⁾, mientras que por otra parte, se ha comprobado que la infección materna por PRRS puede afectar el desarrollo neuronal en los lechones, reduciendo el número de neuronas del hipocampo y aumentando el número de glías⁽⁴⁶⁾.

3.7. Conclusiones e implicaciones.

Los datos obtenidos en esta investigación confirman la existencia de una base genética asociada a las variables de lechones nacidos vivos al primer y segundo parto de cerdas reproductoras infectadas con el virus del PRRS. Ello se sustenta en la identificación y validación de ocho marcadores moleculares que mostraron una contribución favorable en la conducta reproductiva de las cerdas con PRRS incluidas en el presente estudio. Por lo tanto, el

uso de tecnologías moleculares novedosas como el análisis de genoma completo y la selección asistida por marcadores, representan una herramienta potencial para entender la variación genética asociada a fenotipos complejos como la fertilidad y/o tolerancia a las enfermedades. Sin embargo, se considera importante realizar estudios adicionales empleando dispositivos para perfil genómico de mayor densidad, y analizando diversos fenotipos asociados a la reproducción y a la respuesta clínica de cerdas infectadas con el virus del PRRS.

Agradecimientos: Laboratorio de Diagnóstico ITSON-UGRPS; Laboratorio de Biotecnología Reproductiva ITSON; Unión Ganadera de Porcicultores del Estado de Sonora; Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Colorado (CSU), Facultad de MVZ de Universidad Autónoma de Sinaloa; y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario 279847/302410).

3.8. Literatura citada.

1. Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, *et al.* Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod* 2013; 21:72–84.
2. Lunney JK, Steibel JP, Reecy JM, Fritz E, Rothschild MF. Probing genetic control of swine responses to PRRSV infection: current progress of the PRRS host genetics consortium. *BioMed Central Ltd* 2011; pp. S30.
3. Boddicker N, Waide EH, Rowland RRR, Lunney JK, Garrick DJ, Reecy JM, *et al.* Evidence for a major QTL associated with hot response to Porcine Reproductive and Respiratory virus syndrome challenge. *J Anim Sci* 2012; 90:1733.
4. Milian-Suazo F, Canto-Alarcón GJ, Weimersheimer-Rubí JE, Coba-Ayala MA, Correa-Girón P, Anaya-Escalera AM. Estudio seroepidemiológico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del Síndrome Disgénésico y Respiratorio del Cerdo en México. *Tec Pecu Mex* 1994;32(3):139-144.
5. Ramírez R, Sierra N, Mota D. Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Arch Med* 2000; 32(1):1-9.
6. Lewis CR, Ait-Ali T, Clapperton M, Archibald AL, Bishop, S. Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol* 2007; 20(3):343-358.
7. Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J* 2008; 177(3):345-351.
8. Royae AR, Husmann RJ, Dawson HD, Calzadanova G, Schnitzlein WM, Zuckermann A. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102:199-216.

9. Reiner G. Genetic resistance - an alternative for controlling PRRS?. *Porcine Health Manag* 2016; 16:22-27.
10. Georges M. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8:131-162.
11. Muñoz G, Ovilo C, Estelle J, Fernandez A, Rodriguez C. Association with litter size of new polymorphisms on ESR1 and ESR2 genes in a Chinese-European pig line. *Genet Sel Evol* 2007;39:195-206.
12. Goddard ME, Hayes BJ. Genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet* 2007; 124:323-330.
13. Long Y, Ruan GR, Su Y, Xiao SJ, Zhan ZY, Ren J, *et al.* Genome-wide association study identifies QTLs for EBV of backfat thickness and average daily gain in Duroc pigs. *Genetika* 2015; 51:371-378.
14. Abella G, Pena R, Nogareda C, Armengol R, Vidal A, Moradell L, *et al.* A WUR SNP is associated with European Porcine Reproductive and Respiratory Virus Syndrome resistance and growth performance in pigs. *Res Vet Sci* 2016; 104:117–122.
15. Rashidi H, Mulder HA, Mathur P, van Arendonk JAM, Knol EF. Variation among sows in response to porcine reproductive and respiratory syndrome. *Anim Sci* 2014; 92:95–105.
16. Halbur PG, Rothschild MF, Thacker BJ, Meng X-J, Paul PS, Bruna JD. Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Anim Breed Genet* 1998; 115:181–189.

17. Petry DB, Holl JW, Weber JS, Doster AR, Osorio FA, Johnson RK. Biological responses to porcine respiratory and reproductive syndrome virus in pigs of two genetic populations. *J Anim Sci* 2007; 83:1494–1502.
18. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81(3):559–575.
19. Littell, R, Stroup W, Freund R. SAS for linear models. 4th Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2002.
20. Saxton AM, Balzarini MG, Cappio-Borlino A, Czika W, Fry JD, Gibson G, *et al.* Genetic analysis of complex traits using SAS. SAS Institute, Inc., North Carolina; 2004.
21. Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, *et al.* Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *J Anim Sci* 2008; 86:11–16.
22. Lewis CRG, Torremorell M, Bishop SC. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the performance of commercial sows and gilts of different parities and genetic lines. *J Swine Health Prod* 2009; 17(3):140–147.
23. Lewis CRG, Torremorell M, Galina-Pantoja L, Bishop SC. Genetic parameters for performance traits in commercial sows estimated before and after an outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Anim Sci* 2009; 87(3):876–884.
24. Lewis CR, Ait-Ali T, Clapperton M, Archibald AL, Bishop S. Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol* 2007; 20(3):343-358.

25. Serão NV, Matika O, Kemp RA, Harding JC, Bishop SC, Plastow GS, *et al.* Genetic analysis of reproductive traits and antibody response in a PRRS outbreak herd. *J Anim Sci* 2014; 92:2905–2921.
26. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Reviews* 2006; 7:781–791.
27. Seibert JT, Graves KL, Hale BJ, Keating AF, Baumgard LH, Ross JW. Characterizing the acute heat stress response in gilts: I. Thermoregulatory and production variables. *J Anim Sci* 2018; 3(96):941-949.
28. Umemura M, Fujita M, Yoko-O T, Fukamizu A, Jigami Y. *Saccharomyces cerevisiae* CWH43 is involved in the remodeling of the lipid moiety of GPI anchors to ceramides. *Mol Biol Cel.* 2007; 18(11):4304-4316. Epub 2007 Aug 29.
29. Ghugtyal V, Vionnet C, Roubaty C, Conzelmann A. CWH43 is required for the introduction of ceramides into GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae* 2007; 65(6):1493-1502. Epub 2007 Aug 21.
30. Abo-Ismael MK, Brito LF, Miller SP, Sargolzaei M, Grossi DA, Moore SS, *et al.* Genome-wide association studies and genomic prediction of breeding values for calving performance and body conformation traits in Holstein cattle. *Genet Sel Evol* 2017; 49(1):49–82.
31. Miller LC, Fleming D, Arbogast A, Bayles DO, Guo B, Lager KM, *et al.* Analysis of the swine tracheobronchial lymph node transcriptomic response to infection with a Chinese highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *BMC Vet Res* 2012; 8(1):208.

32. De Clercq E, Murase J, Marquez VE. Broad-spectrum antiviral and cytotoxic activity of cyclopentenylcytosine, a carbocyclic nucleoside targeted at CTP synthetase. *Biochem Pharmacol* 1991; 41(12):1821–1829.
33. Veroneze R, Bastiaansen JW, Knol EF, Guimarães SE, Silva FF, Harlizius B, *et al.* Linkage disequilibrium patterns and persistence of phase in purebred and crossbred pig (*Sus scrofa*) populations. *BMC Genet* 2014; 15(1):126.
34. Bergfelder-Drüing S, Grosse-Brinkhaus C, Lind B, Erbe M, Schellander K, Simianer H, *et al.* A genome-wide association study in large white and landrace pig populations for number piglets born alive. *PLoS ONE* 2015; 10(3):e0117468.
35. Kimble K. Transcriptome profiles of porcine oocytes and their corresponding cumulus cells reveal functional gene regulatory networks [masters thesis]. Alabama, USA: Auburn University; 2018.
36. Russell DL, Brown HM, Dunning KR. ADAMTS proteases in fertility. *Matrix Biol* 2015;44(46):54–63.
37. Llamazares M, Cal S, Quesada V, López-Otín C. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON-domain. *J Biol Chem* 2003;278(15):13382–13389.
38. Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 1997;71(12):9170–9179.

39. Chen J, Shi X, Zhang X, Wang A, Wang L, Yang Y, *et al.* MicroRNA-373 facilitated the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by its negative regulation of type I interferon induction. *J Virol* 2016; JVI-01311.
40. Noguera JL, Rodríguez C, Varona L, Tomàs A, Muñoz G, Ramírez O, *et al.* A bi-dimensional genome scan for prolificacy traits in pigs shows the existence of multiple epistatic QTL. *BMC Genomics* 2009;10(1):636.
41. Fernandez-Rodriguez A, Munoz M, Fernandez A, Pena RN, Tomas A, Noguera JL, *et al.* Differential gene expression in ovaries of pregnant pigs with high and low prolificacy levels and identification of candidate genes for litter size. *Biol Reprod* 2011;84(2):299–307.
42. Chen X, Zhang Q, Bai J, Zhao Y, Wang X, Wang H, *et al.* The nucleocapsid protein and non-structural protein 10 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus enhance CD83 production via NF- κ B and Sp1 signaling pathways. *J Virol* 2017; JVI-00986.
43. Nakamura N. The role of the transmembrane RING finger proteins in cellular and organelle function. *Membranes*. 2011;1(4):354–393.
44. Chen XX, Quan R, Guo XK, Gao L, Shi J, Feng WH. Up-regulation of pro-inflammatory factors by HP-PRRSV infection in microglia: implications for HP-PRRSV neuropathogenesis. *Vet Microbiol* 2014;170(1):48–57.
45. Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on FAT1, FAT2, FAT3 and FAT4. *Int J Mol Med* 2006;18(3):523–528.
46. Balakrishnan B, Johnson RW. Altered brain development in fetal and neonatal piglets following maternal porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) infection. *Brain Behav Immun* 2015;49:e31.

Cuadros.

Cuadro 1.3. Valores promedio \pm EE para variables reproductivas y de viabilidad asociadas al primer y segundo partos en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.

Parto	Caracter	N	Media \pm EE
Primero	Lechones nacidos totales	100	12.45 \pm 3.56
	Lechones nacidos vivos	100	11.13 \pm 3.59
	Lechones nacidos muertos	100	0.98 \pm 1.02
	Número de lechones destetados	100	10.72 \pm 3.04
	Peso total destetados (kg)	100	65.95 \pm 13.01
	Peso promedio destetados (kg)	100	5.77 \pm 0.85
Segundo	Lechones nacidos totales	100	11.55 \pm 3.10
	Lechones nacidos vivos	100	10.36 \pm 3.59
	Lechones nacidos muertos	100	0.80 \pm 1.03
	Número de lechones destetados	100	10.24 \pm 1.79
	Peso total destetados (kg)	100	55.14 \pm 14.51
	Peso promedio destetados (kg)	100	5.33 \pm 0.81

Cuadro 2.3. Número y localización cromosómica de SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.

Variable	Número de SNP ($P < 0.001$)	Cromosomas
LNV1 ¹	3	6,7
LNV2 ²	5	2,5,7,8

LNV1¹ = Lechones Nacidos Vivos en el 1er. parto; LNV2² = Lechones Nacidos Vivos en el 2do. Parto.

Cuadro 3.3. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP asociados a LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.

Variable	SNP	Posición	Frec. Alélicas		Frec. Genotípicas		
			G	T	GG	GT	TT
LNV1¹	rs81276080	SSA 6	0.1878	0.8122	0.0352	0.3052	0.6596
			A	G	AA	AG	GG
	rs81334603	SSA 6	0.3867	0.6133	0.1467	0.4800	0.3733
			A	C	AA	AC	CC
	rs80947173	SSA 7	0.7431	0.2569	0.5556	0.3750	0.0694
LNV2²			C	T	CC	CT	TT
	rs81364943	SSA 2	0.8266	0.1734	0.6800	0.2933	0.026
	rs80859829	SSA 5	0.3133	0.6867	0.0533	0.5200	0.4267
	rs80895640	SSA 7	0.3379	0.6621	0.1622	0.3514	0.4865
	rs80893794	SSA 8	0.3099	0.6901	0.1268	0.3662	0.5070
				A	G	AA	AG
	rs81245908	SSA 8	0.3000	0.7000	0.0667	0.4667	0.4667

LNV1¹ = Lechones Nacidos Vivos en el 1er. parto; LNV2² = Lechones Nacidos Vivos en el 2do. Parto.

Cuadro 4.3. Medias de cuadrados mínimos \pm EE para los genotipos de los SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.

Variable	SNP	No	Medias por Genotipo \pm EE			Prob
LNV1¹	rs81276080	100	TT 12.33 \pm 1.16 ^a	TG 8.04 \pm 1.08 ^b	GG 7.59 \pm 0.61 ^b	.0001
	rs81334603	100	GG 13.47 \pm 1.11 ^a	AG 10.51 \pm 0.75 ^b	AA 8.56 \pm 0.77 ^b	.0001
	rs80947173	100	AA 12.59 \pm 1.48 ^a	AC 9.81 \pm 0.94 ^b	CC 8.31 \pm 0.68 ^b	.0001
LNV2²	rs81364943	100	TT 16.30 \pm 3.01 ^a	TC 12.94 \pm 0.95 ^a	CC 9.23 \pm 0.62 ^b	.0001
	rs80859829	100	TT 12.21 \pm 3.04 ^a	TC 8.75 \pm 0.69 ^b	CC 5.94 \pm 0.78 ^b	.0001
	rs80895640	100	TT 11.88 \pm 1.06 ^a	TC 9.61 \pm 0.91 ^b	CC 8.11 \pm 0.85 ^b	.0001
	rs80893794	100	CC 13.42 \pm 1.07 ^a	TC 10.08 \pm 0.74 ^b	TT 7.95 \pm 0.84 ^c	.0001
	rs81245908	100	GG 12.25 \pm 2.08 ^a	GA 8.57 \pm 0.74 ^b	AA 7.50 \pm 0.75 ^b	.0001

LNV1¹ = Lechones Nacidos Vivos en el 1er. parto; LNV2² = Lechones Nacidos Vivos en el 2do. Parto.

Cuadro 5.3. Efectos de sustitución alélica para SNP asociados a las variables de LNV1 y LNV2 en cerdas reproductoras infectadas con el virus de campo del PRRS.

Variable	SNP	Alelo Favorable	Efectos de Substitución Alélica		
			<i>Prob</i>	Valor Estimado	EE
LNV1 ¹	rs81276080	T	0.0005	3.28	1.1476
	rs81334603	G	0.0002	3.52	0.6227
	rs80947173	A	0.0013	2.35	0.6870
LNV2 ²	rs81364943	T	0.0001	3.66	0.8525
	rs80859829	T	0.0002	3.38	0.8201
	rs80895640	T	0.0022	1.92	0.5893
	rs80893794	C	0.0001	2.64	0.6162
	rs81245908	G	0.0002	3.18	0.7732

LNV1¹ = Lechones Nacidos Vivos en el 1er. parto; LNV2² = Lechones Nacidos Vivos en el 2do. Parto.

Figuras.

Figura 1.3. Gráfica Manhattan que muestra la ubicación de los SNP asociados a la variable de LNV1 (umbral de significancia fijado a $P < 0.001$).

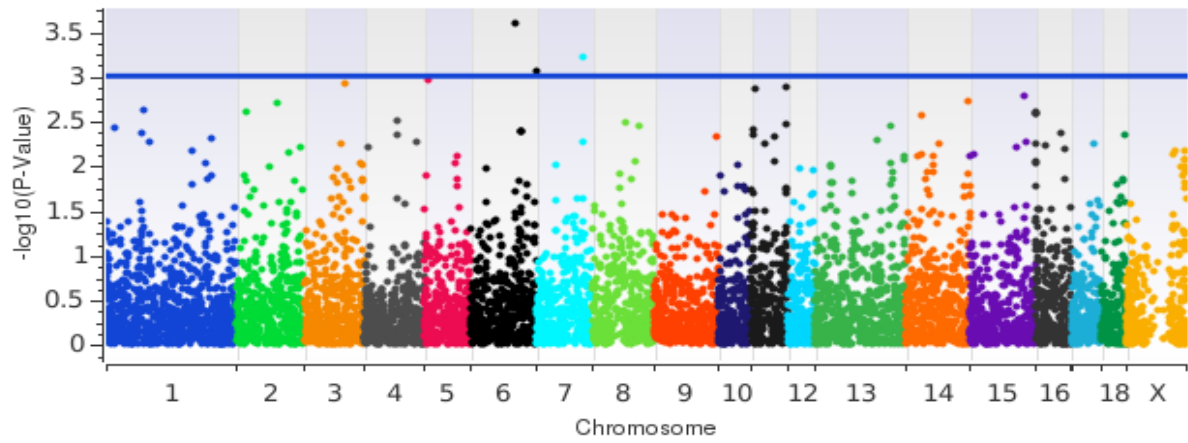
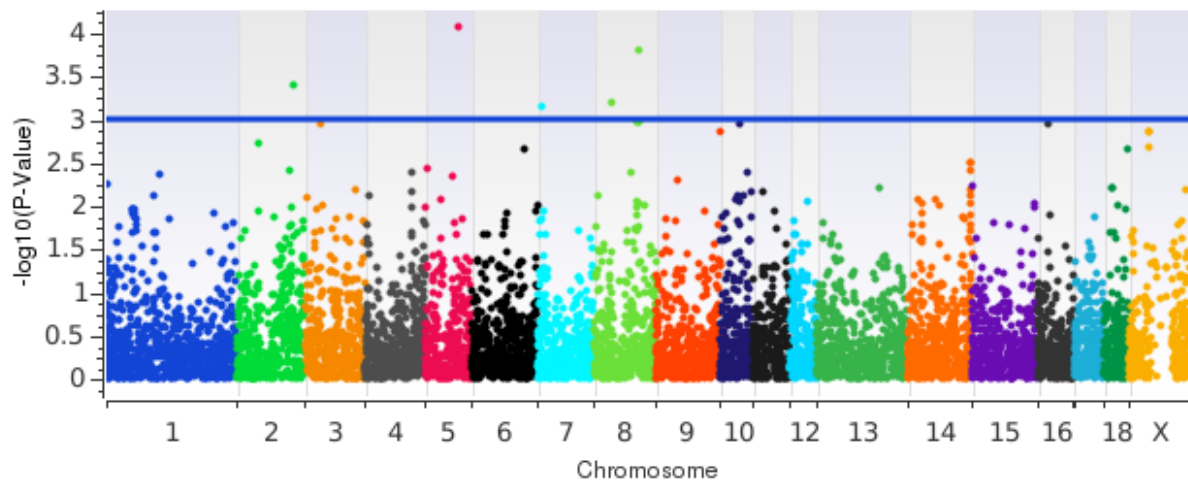


Figura 2.3. Gráfica Manhattan que muestra la ubicación de los SNP asociados a la variable de LNV2 (umbral de significancia fijado a $P < 0.001$).



CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES

En la presente investigación se identificaron 13 polimorfismos de nucleótido simple rs81364943, rs81382736, rs80976363, rs80890869, rs81460050, rs81276080, rs81334603, rs80947173, rs81364943, rs80859829, rs80895640, rs80893794 y rs81245908, que se asociaron con una conducta reproductiva favorable, en cerdas reproductoras expuestas al virus del PRRS en el sur de Sonora, México. Los polimorfismos mostraron una Frecuencia de Alelo Menor por arriba del 10 % y un efecto eficiente con respecto a la media de sus grupos, lo cual significa que éstas mostrarán una mejora significativa en la eficiencia reproductiva, aun estando infectadas con el virus del PRRS.

Los SNPs asociados a la variables reproductivas, cinco de ellos rs81276080, rs80947173, 80895640, rs81460050 y rs80859829 asociados a genes que contribuyen al desempeño reproductivo, la prolificidad, la función ovárica y la actividad uterina en cerdas reproductoras infectadas con PRRS. Por otra parte cinco SNPs; rs81334603, rs81334603, rs81245908, rs80895640 y rs81382736 están asociados a genes que asisten la relación huésped-virus, en función a la capacidad de mantener un estado de homeostasis, como promotores de antivirales, favoreciendo el desarrollo neuronal en los lechones, los cuales ocurren comúnmente tras la infección de cepas altamente infecciosas del virus del PRRS, y por último con el procesamiento de proteínas de exportación y la apoptosis. Se identificaron polimorfismos específicos en genes con funciones aun no descritas, que representan líneas de investigación para entender el comportamiento productivo y reproductivo de cerdas expuestas al virus del PRRS.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se puede proponer que hay regiones dentro del genoma del cerdo que indican una menor o mayor susceptibilidad a la infección del virus del PRRS. Por lo tanto, el uso del análisis de genoma completo y la selección asistida por marcadores, representan una herramienta potencial para entender la variación genética asociada a fenotipos complejos como la fertilidad y/o tolerancia a las enfermedades y especialmente en enfermedades con baja capacidad inmunogénica.

No obstante, es importante realizar estudios adicionales empleando dispositivos para perfil genómico de mayor densidad, analizando diferentes fenotipos asociados a la reproducción y a la respuesta clínica de cerdas infectadas con el virus del PRRS.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Trejo, C.M., K.M. Valerio-Valle., R.L. Luna-Ramirez., G. Luna-Nevarez., J.R. Reyna-Granados., J.A. Romo., M.A. Sanchez-Castro., X. Zeng., R.M. Enns., S.E. Speidel., M.G. Thomas and P. Luna-Nevarez. 2017. Validation of candidate markers associated with reproductive performance in porcine respiratory and reproductive syndrome virus naturally infected replacement gilts in southern Sonora México. *J. Anim. Sci.* 95(4)(Suppl.4):29 (abst.)
- Albina, E, F. Madec., R. Cariolet. and J. Torrison. 1994. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farms units. *Vet Rec.* 134:567-573.
- Albina, E. 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Vet Microbiol.* 55:309-316.
- Alonso, C., M. P. Murtaugh., S. A. Dee and P. R. Davies. 2013. Epidemiological study of air filtration systems for preventing PRRSV infection in large sow herds. *Prev. Vet. Med.* 112(1–2):109–17.
- Andersson, L., C.S. Haley., H. Ellegren., S.A. Knott., M. Johansson., K. Andersson., L. Andersson-Eklund., I. Edfors-Lilja., M. Fredholm., I Hansson., J. Hakansson J. and Lundstrom, K. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in the pig. *Science.* 263:1771.
- Animal Health Australia (AHA). 2004. Disease strategy: Porcine reproductive and respiratory syndrome (Versión 3.0). Australian Veterinary Emergency Plan (AUSVETPLAN) 3ra edición. Primary Industries Ministerial Council, Canberra, ACT.
- Arias, M., J. Barceló., A. Muñoz y J.M. Sánchez-Vizcaíno. 2016. Síndrome respiratorio reproductivo porcino. Sánchez-Vizcaíno JM editor. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. Disponible en <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>.
- Astorga, M. P. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura.* No. 12. Roma, FAO. pp. 277–287.

- Bai, Y. and P. Lindhout. 2007. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future *Annals of Botany*. 100, 1085-1094.
- Barbisan, G. 2014. Análisis de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en genes asociados a la infección por el virus del Papiloma Humano (VPH) y la progresión neoplásica: un modelo poligénico de susceptibilidad al cáncer cervical. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Médicas. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Bautista, C.B.E. 2001. Métodos de diagnóstico para el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS). Saninet. Quito, Ecuador. Investigación Aplicada S.A. de C.V.
- Bavera, G. 2002. Cruzamientos. Cursos de producción bovina de carne, FAV UNRC.
- Benfield, D.A., J. Christopher-Hennings and E.A. Nelson. 1997. Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Proc. Am Assoc Swine Pract.* 28:455-458.
- Benítez, W. y M. Sánchez. 2000. Aspectos generales de la producción porcina tradicional. FAO.
- Benson, J., M. Yaeger., J. Christopher-Hennings., K. Lager and K.J. Yoon. 2002. A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:8–14.
- Bergfelder-Drüing, S., C. Grosse-Brinkhaus., B. Lind., M. Erbe., K. Schellander., H. Simianer and E. Tholen. 2015. A Genome-Wide Association Study in Large White and Landrace Pig Populations for Number Piglets Born Alive. *PLoS ONE*. 10(3).
- Boddicker, N., E.H. Waide., R.R. Rowland., J.K. Lunney., D.J Garrick., J.M. Reecy and J.C. Dekkers 2012. Evidence for a major QTL associated with host response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus challenge. *J. Anim. Sci.* 90:1733–1746.

- Boddicker, N., A. Bjorkquist., R. R. Rowland., J. K. Lunney., J. M. Reecy. and J.C. Dekkers. 2014. Genome-wide association and genomic prediction for host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Evol Health*. 46(1) 18.
- Botner, A. 1997. Diagnosis of PRRS. *Vet Mic*. 55:295-301.
- Bush, W. and J. H. Moore 2012. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Computational Biology*. 8: e1002822.
- Calafell, F., F. Roubinet., A. Ramírez-Soriano., N. Saitou., J. Bertranpetit. and Blancher, A. 2008. Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Human Genetics*. 124:123-35.
- Cano, J., P., S. A. Dee Murtaugh., M. P. Trincado and A. Pijoan. 2007. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res*. 68:565-571.
- Cañón, J. 2006. Utilización de información molecular en programas de mejoramiento animal. *Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 7(1) 5-15.
- Casas, E. 2006. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*. 14: 24-31.
- Chand, R.J., B.R. Tribble and R.R. Rowland. 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr Opin Virol*. (3) 256-263.
- Chareerntanakul, W. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World. J. Virol*. 1(1):23–30.
- Christianson, W. T., C.S. Choi., J.E. Collins., T.W. Molitor., R.B. Morrison and H.S. Joo. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res*. 57:262-268.
- Christopher-Hennings, J., E.A. Nelson., J.K. Nelson., R.J. Hines., S.L. Swenson., H.T. Hill., J.J. Zimmerman., J.B. Katz., M.J. Yaeger and C.C.L. Chase. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol*. 33:1730-1734.

- Collins, J.E., T.W. Mollitor., J.R. Shin, C. Pijoan., M. Casamiglia and V, Kapur. 1999. Necesidad de los Médicos Veterinarios de diagnosticar enfermedades porcinas, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En: Memorias del curso "Actualidades en la Producción Porcina y en el diagnóstico de Enfermedades, México, D.F. p13-18.
- Correa, P, A.M. Anaya., M.A. Coba., J. Weimersheimer., F. Milian., J.G. Canto. y M. Fraire. 1995. Presencia de anticuerpos contra el virus del Aborto Epizootico y Síndrome Respiratorio en cerdos importados y nacionales de varios estados de la república mexicana. Folleto Científico No. 1 Proyecto Vigilancia Epidemiológica.
- De Jong, M.F., W. Cromwijk and Van't-Veld. 1991. Clinical and pathological aspects of porcine reproductive and respiratory syndrome (P.R.R.S.). Minnesota swines for veterinarians, Sept. 15-17; 8p.
- Dee, S. 1997. Effective Strategies for the control of PRRS: A Systems -Based Approach. En: Memorias Seminario Internacional: Diagnóstico y Manejo de las Interacciones infecciosas que inciden en la Producción Porcina. Guadalajara. México.
- Dekkers, J.C.M. 2004. Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: strategies and lessons. J. Anim. Sci. 82 (Suppl): E313-E328.
- Dewey, C. 1997. Global PRSS. Proc. Allen D. Leman Swine Conference; 28-32.
- Diosdado, V.F., E.G. Socci., Z.P. Ojeda. y G.A. Morilla. 1998. Evaluación del coeficiente S/P en animales infectados con el virus del Síndrome Respiratorio del Cerdo (PRRS). En: Memorias del XXXIII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Guanajuato, Gto. México. p 215.
- Done, S.H. 1995. Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Porcino (PRRS). Pigs-Misset, pag 12-15.
- Done, S.H., D.J. Paton and M.E.C. White. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. Br. Vet. J. 152, 153-174.

- Dorado, G., P. Rallo, P. Hernández, M. J. Giménez, Y. Benítez, A. Díaz, R. De la Rosa, J.L. Caballero, J. Muños-Blanco y A. Martín. 2007. ISBN 978-84-96047-57-0, (págs. 539-550). Córdoba, España. I Congreso de la Cultura del Olivo.
- Drogemuller, C., H. Hamann and O. Distl. 2001. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *J. Anim. Sci.* 79: 2565-2570.
- Duinhof, T.F., S.G. Van. E.J. Van and G.J. Wellenberg. 2011. Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Vet. Microbiol.* 150, 180-184.
- Fang, M., M. Braunschweig., X. Hu., L. Hu., J. Feng and C. Wu. 2005. Genetic variation of exon 2 of SLA –DQB gene in Chinese pigs. *Biochemical Genetics.* Vol. 43:120.
- FAO. 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). EMPRES. Issue No. 2. USA.
- Fernández, J, M.A. Toro., F. Gómez-Romano and B. Villanueva. 2016. The use of genomic information can enhance the efficiency of conservation programs. *Animal Frontiers.* 6(1) 59-64
- Fiedler, J. 1991. Report in the Epidemiology of PRRS in Germany. Report on the Seminar: Porcine reproductive and respiratory syndrome (The New Pig Disease) Brussels. 4-5 November; 13-14.
- Filella, X., R. Molina. y A. M. Ballesta. 2002. Estructura y función de las citosinas. *Med Integral.* 39(2): 63-71
- FIRA. 2012. Panorama Agroalimentario. Carne de Porcino, 2012. México.
- FIRA. 2016. Panorama agropecuario, México.
- Flint, A. P. F. and J. A. Woolliams. 2008. Precision animal breeding. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363:573-590.
- Flores-Mendoza, L. y J. Hernández. 2010. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Vet. México.* 41:139-159.
- Geisert, R.D. and R.A.M. Schmitt. 2005. Early embryonic survival in the pig: Can it be improved. *J Anim Sci.* 80(E-Suppl.) E54-E65.

- Gelderman, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods Theor. Appl. Genet. 46, 46319-46330.
- Geldhof, M.F., W.V. Breedam., E. Jong., A.L. Rodriguez., U.U. Karniychuk., M. Vanhee., Jv. Doorselaere., D. Maes and H.J. Nauwynck. 2013. Antibody response and maternal immunity upon boosting PRRSV-immune sows with experimental farm-specific and commercial PRRSV vaccines. *Vet Microbiol.* 167:260–271.
- Goldberg, T.L., J.F. Lowe., S.M. Milburne and L.D. Firkins. 2003. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology.* 317:197-213.
- Green, R. D., M. A. J. A. Qureshi., P.J. Long and D.L. Hamernick. 2007. Identifying the future needs for long-term USDA efforts in agricultural animal genomics. *Int. J. Biol. Sci.* 3:185-191.
- Griffiths, A. 2000. *Genética moderna. Modern genetic analysis.* Madrid. McGraw-Hill. 1a. ed. 676 p. 575.1 G792
- Hanenbergh, E., E. F. Knol and J.W. M. Merks. 2001. Estimates of genetic parameters for reproduction traits at different parities in dutch Landrace pigs. *Livest. Prod. Sci.* 69: 179-186.
- Harding, J.C.S., S.E. Sanford and D.Kern. 1998. Variability of the IDEXX ELISA for measuring PRRS IgG titres in identical sera over time. Proc. of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England.
- Hirshhorn, J. and M. Daly. 2005. Genome-wide Association Studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 6, 95-108.
- Holtkamp, D.J, J.B. Kliebenstein., E.J. Neumann., J.J. Zimmerman, H.F. Rotto., Yoder T.K., Wang C., Yeske P.E., Mowrer C.L. and Haley C.A. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod.* 21:72–84
- Horter, D. C., R.M. Pogranichniy and C.C. Chang. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol.* 86: 213- 228.

- Huiying, L., Q. Zhang and Y. Zhang. 2001. Relative efficiency of marker assisted selection when marker and QTL are incompletely linked. *Chin. Sci. Bull.* 46, 2058-2063.
- Ibanez-Escriche N. and H. Simianer. 2016. Animal breeding in the genomics era. *Animal Frontiers.* 6(1), 4-5.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2007. La porcicultura en Sonora. Censo agropecuario, México
- Joo, H.S. 1994. Serology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Proc. Allen D. Lemman Swine Conference.* 15-16.
- Kato, L. y B. Suárez. 1996. Crisis, apertura y sobrevivencia en la porcicultura mexicana. *Comercio exterior,* 46, 657-663.
- Kleiboeker, S. B., S. K. Schommer., S. M. Lee., S. Watkins., W. Chittick. and D. Polson. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *Brief communication. Journal Vet. Diagn. Invest.* 17:165-170.
- Kolath, Bill. 2009. Feedlot Marker Assisted Management. *Proceedings of the Beef Improvement Federation 41st Annual Research Symposium.* April 30 - May 3, Sacramento, California, USA, pp 103-106.
- Kolb, J.R. PRRS Update-Control Strategies, 1996. *Serodiagnostics and Vaccine Topics. Proc. American Association of Swine Practitioners* :123-130.
- Lande, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. *Genetics.* 124: 743-756.
- Landi, V. y V.J. Quiroz. 2011. Los avances de las nuevas tecnologías genéticas y su aplicación en la selección natural. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal.* 33-43.
- Lewis, T. W, J. Wiseman and J.A. Woolliams. 2005. Genotype by mating type interaction for litter size in Landrace and Large White sows. *Anim. Sci.* 81: 331-335

- Lewis, C.R., T. Ait-Ali., M. Clapperton., A.L. Archibald and S. Bishop. 2007. Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol.* 20(3), 343-358.
- Lewis, C.R., M. Torremorell., P.L. Galina., N. Deeb., M.A. Mellencamp., A.L. Archibald and S. Bishop. 2009. A genomewide association analysis identifying SNPS for PRRS tolerance on a commercial pig farm. *Proc. Assoc. Advmt. J Anim Breed Genet.* (18)187–190.
- Lewis, C. R. G., M. Torremorell., L. Galina-Pantoja and S. C. Bishop. 2009b. Genetic parameters for performance traits in commercial sows estimated before and after an outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Anim Sci.* 87: 876–84.
- Litt, M. and J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:398-401.
- Littell, R., W. Stroup. and R. Freund. SAS for linear models. 4th Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2002.
- López-Fuertes, L., E. Campos., N. Domenech., A. Ezquerro., J.M. Castro., J. Domínguez and F. Alonso. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF- α production in infected macrophages. *Virus Research.* 69, 41-46.
- López- Heydeck, S.M., R.A. Alonso-Morales, R. A. Mendieta-Zeron, y J.C. Vázquez-Chagoyan. 2015. Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Rev. Mex. Cienc. Pecu. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.* 6(1):69-89.
- Luc, D. 2001. Diagnosis and Control of PRRS in PRDC. *American Association of Swine Veterunans.*
- Lunney, J.K. and H. Chen. 2011. Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Research.* 154:161–169.
- Mateu, E. and I. Diaz. 2008. The challenge of PRRS immunology. *Vet J.* 177(3), 345-351.

- McCaw M.B, J. Xu, W.H. Feng., D. Bemfield, J. Torrison and N. Debuse. 1998. Validation of avidin.biotin PRRS IgM antibody capture ELISA. Proc. of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July; 306.
- Meredith, M.J. 1995. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). Boheringer Ingelheim.
- Milián, S.F., A.G. Cantó y R.J. Weimersheimer. 1994. Estudio seroepidemiológico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico del cerdo en México. *Téc Pecu Méx.* 32: 139-144.
- Montaldo, H. y N. Barría. 1998. Mejoramiento genético de animales. *Ciencia al día.* 2, 1-19.
- Morilla, GA, V.F. Dioisdado. y E.G. Socci. 1997. Frecuencia de granjas infectadas con el virus del Síndrome Dosgenésico y respiratorio del Cerdo (PRSS). En: *Memorias del XXXII Congreso Nacional de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos*;10-13; Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero) México.
- Mullis, K., F. Faloona., S. Scharf., R Snikl., G.T. Horn and H. Erlich. 1986. Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology.* 51:263-7.
- Murtaugh, M.P., K.S. Faaberg., S. Yuan and V. Kapur. 1997. Interrelatedness of PRRS virus isolates in North America. Proc. Allen D. Lemay Swine Conference.146-149.
- Neumann, E.J., J.B. Kleibenstein., C.D. Johnson., J.W. Mabry., E.J.A.H. BushSeitzinger., A.L. Green and J.J. Zimmerman. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal Am. Vet. Med. Assoc.* 1; 227(3):385-92.
- Noguera, J.L., L. Varona., L. Gómez–Raya., A Sánchez., D Babot., J Estany., L.A. Messer., M. Rothschild., and M. Perez–Enciso. 2003. Estrogen Receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance. *Livest. Prod. Sci.* 82: 53-59.
- OIE. 2004. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Disponible en <http://web.oie.int/>. Recuperado el 05 abril de 2016.

- Pena, J. 2012. La selección genómica en el ganado Holstein. PV Albeitar. Recuperado el 11 abril de 2016, de <http://albeitar.portalveterinaria.com/>.
- Pérez, R. 2006. Granjas Porcinas y medio ambiente. Contaminación del agua en La Piedad, Michoacán. México, D.F. Plaza y Valdés Editores. F.
- Petry, D.B., J.W. Holl., J.S. Weber., A.R. Doster., F.A. Osorio and R.K. Johnson., 2005. Biological responses to porcine respiratory and reproductive syndrome virus in pigs of two genetic populations. *J Anim Sci.* 83:1494–1502
- Picca, A., M. Helguera., N. Salomón y A. Carrera. 2004. Marcadores Moleculares. En C. R. Editores: V. Echenique, Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte II (págs. 61-68). Argentina: Ediciones INTA.
- Plageman, P.G.W. and V. Moenning. 1992. Lactate dehydrogenase elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhage fever virus: anew group of positive strand RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 41:90-102.
- Quesada, J.M., A. Casado., C. Díaz., L. Barrios., R. Cuenca-Acevedo and G. Dorado. 2004. Allele-frequency determination of *BsmI* and *FokI* polymorphisms of the *vdr* gene by quantitative real time-PCR (QRT-PCR) in pooled genomic DNA samples. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90: 209-214.
- Rallo, O., G. Dorado., R. De la Rosa., A. Díaz., J. Ballesteros y A. Martin. 2003. Desarrollo de la utilización de marcadores microsatélites de olivo. En "Difusión de resultados de investigación del programa de calidad de la producción del aceite de oliva" (págs. 31-38). Madrid: Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- Ramírez-Bello, J., A. Vargas and Z. Tovilla. 2013. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases. *Gac Med Mex.* 149(2):220-8.
- Risch, N. J. 2000. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 405:847–856.
- Robertson, I.B. 1991. The epidemiology of PRRS in the United Kingdom. Report on the seminar: Porcine reproductive and respiratory syndrome (the new pig disease). Brussels 4-5 Nov.; 15-21.
- Rothschild, M., C Jacobson., D Vaske., C Tuggle., L Wang., T Short., 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 201–205.
- Rowland, R.R. 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology*. 2:256–263.
- Rowland, R.R., J. Lunney and J. Dekkers. 2012. Control of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) through genetic improvements in disease resistance and tolerance. *Front Genet*. 3, 260.
- Royae, A. R., R.J. Husmann., H. D. Dawson., G. Calzadanova., W. M. Schnitzlein F. and A. Zuckermann. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*. 102:199-216.
- SAGARPA. 2013. Impulsan SAGARPA y Confederación de Porcicultores Mexicanos consumo de carne de cerdo nacional. México.
- Saxton, A.M., M.G. Balzarini, A. Cappio-Borlino., W. Czika., J.D. Fry and G. Gibson. Genetic analysis of complex traits using SAS. SAS Institute, Inc., North Carolina; 2004.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2013.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2014. Atlas Agroalimentario México 2014. México. D.F. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Serão, N. V. L., O. Matika., R. A. Kemp., J.C. Harding., S. C. Bishop., G. S. Plastow and J. C. M. Dekkers. 2014. Genetic analysis of reproductive traits and antibody response in a PRRS outbreak herd. *J. Anim. Sci*. 92:2905–21.
- Shi, M., T. Lam., C. Hon., M. Murtaugh., P. Davies and Hui. 2010. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of north American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Virology* 84, 8700-8711.
- Sierra N., R. Ramírez y D. Mota. 2000. Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Archivos de medicina veterinaria*. 32(1), 1-9.

- Solís, R. y T. Andrade. 2005. Los marcadores moleculares. La ciencia y el hombre. Universidad Veracruzana. Vol 18.1.
- Sorensen, K. J., A. Botner., E. S. Madsen., B. Strandbygaard and J. Nielsen. 1997. Evaluation of a blocking ELISA for screening of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Microbiol.* 56: 1–8.
- Sorensen, K.J., B. Strandbygaard., A. Botner., E.S. Madsen., J. Nielsen and P. Have. 1998. Blocking ELISAS for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 60, 169–177.
- Sunnucks, P. 2001. Efficient genetic markers for population biology. *Tree.* 15:199–203.
- Sur, J., A.R. Doster., J.S. Christian., J.A., Galeota., R.W. Wills., J.J. Zimmerman and A Osorio. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71:9170-9 179.
- Thanawongnuwecha, R. and S. Suradhatb. 2010. Progress in porcine respiratory and reproductive syndrome virus biology and control. *Virus Res.* 54(1-2):133-140.
- Torres, L., y V.S. Moreno. 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. En F. González-Andrés, y J. M. Pita (eds). Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Valladolid. Publicaciones I.N.E.A. p. 235-252.
- Umesh, S., R. Deb., R. R. Alyethodi., R. Alex., S. Kumar., S. Chakraborty., K. Dhama and A. Sharma. 2014. Molecular markers and their applications in cattle research: A review. *B.G.M.* 6: 49-58.
- Wang, F., H. Qiu., Q. Zhang., Z. Peng and B. Liu. 2012. Association of two porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) receptor genes, CD163 and SN with immune traits. *Mol Biol Rep.* 39 (4), 3971-3976.
- Weimersheimer, J.E., G.J. Cantó., A.M. Anaya., M.A. Coba., F. Milián y P. Correa. 1997. Frecuencia de anticuerpos contra el el virus del Síndrome Disgénésico y Respiratorio en cerdos sacrificados en rastros de México. *Tec Pec México;* 32(3):139.

- Weller, J.I, and M. Ron. 2011. Invited review: Quantitative trait nucleotide determination in the era of genomic selection. *J. Dairy Sci.* 94: 1082–1090.
- Wensvoort, G., C. Terpstra., J.M.A. Pol., T. Laak., N. Bloemraad., E.P. Kluyver., E. Kragten., L. Buiten-Van., A. Besten-Den., F. Wagenaar., J.M. Broehuijsen., G.J., Groenland., J.A. Gennep Van., M. Voest J.H. Verheijden and J. Braamskamp. 1991. Mystery swine disease un the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Quart.* 13(3):121-129.
- Wills, R.W., J.J. Zimmerman., S.L. Swenson., K.J. Yonn., H.T. Hill., D.S. Bundy and M.J. McGinley. 1997. Transmission of PRRSV by direct, close or indirect contact. *Swine Health and Production.* 5(6):213-218.
- Wills, R.W., J.J. Zimmerman and K.J. Yoon. 1997b. Porcine Reproductive RespiratorySyndrome virus: A Persistent infection. *Vet Microbiol.* 55:231-240.
- Woodward, B. W., F.-X. Du., H. Montaldo., K.J., Andersen and S.K. De Nise. 1998. Preliminary evidence for major genes controlling beef carcass traits in Limousin cattle. *Proc. of the 6th Word Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale. NSW. Vol. 25: 157-160.*
- Zimmerman, J.J., K.J. Yoon., R.W. Wills and S.L. Swenson. 1997. General overview of PRRSV: A prespective from the United States. *Vet Microbiol.* 55:187-196.
- Zimmerman, J.J., K.J. Yoon., E.C. Pirtle., R.W. Wills., T.J. Sanderson and M.J. McGinley. 1997b. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in avian species. *Vet Microbiol;* 55:329-336.
- Zimmerman, J.J. 1998. Síndrome Disgenésico y Respiratorio del Cerdo. En: *Memorias del Simposium nacional sobre PRRS. León (Guanajuato) México.* p 158
- Zimmerman, J.J. 1999. What we know about persistent infection whit respect to the epidemiology of PRRS virus. *Proc. American Association of Practitioners.* 311-312.