

Veterinaria México

Volumen **36**
Volume

Número **3**
Number




Julio-Septiembre **2005**
July-September

Artículo:




Frecuencia alélica del síndrome de estrés porcino en Nuevo León, mediante análisis PCR-RFLP

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

Frecuencia alélica del síndrome de estrés porcino en Nuevo León, mediante análisis PCR-RFLP

Allele frequency of porcine stress syndrome in Nuevo Leon by PCR-RFLP analysis

Víctor Manuel Riojas-Valdés* Juan Carlos Canales-Zambrano* Juan Carlos Gómez-de la Fuente*
Guillermo Dávalos-Aranda* Gustavo Hernández-Vidal* José Antonio Salinas-Meléndez*

Abstract

Porcine stress syndrome (PSS), caused by a point mutation in the gene coding for the ryanodine receptor (locus *ryr-1*), is one of the problems the pork industry is facing today. PSS, also known as malignant hyperthermia, causes death in animals or lower meat product quality. These problems arise in the affected animals when they are under stressful conditions, such as during transportation. Currently, there are no data on the gene frequency of the condition in Nuevo Leon; however, anecdotal evidence points to a frequency similar to that of countries in which data do exist for the Landrace, Duroc, Large White and Hampshire breeds. In the present study a molecular biology technique was used to determine the genotype of animals for the syndrome, based on the polymerase chain reaction and the digestion of its products with a restriction enzyme (PCR-RFLP). A total of 77 animals were analyzed, of which 23 presented the recessive allele (29.9%); according to the genotype, 26% were carriers (N/n) and 3.9% were affected (n/n); the rest, 54 animals (70.1%), had a normal genotype (N/N). There was no significant difference in mutation frequency between males (33.4%) and females (26.3%), although there were more affected females than males (nn). Genotype frequencies found were 0.70 (54/77) for the dominant homozygote (NN), 0.26 (20/77) for the heterozygote (Nn) and 0.04 (3/77) for the recessive homozygote. Frequencies were 0.17 for the recessive allele (n) and 0.83 for the dominant one (N).

Key words: PORCINE, STRESS SYNDROME, PCR-RFLP.

Resumen

El síndrome de estrés porcino (PSS), causado por una mutación de punto en el gen que codifica para el receptor de la rianodina (locus *ryr-1*), es uno de los problemas que enfrenta la industria porcícola. El PSS, también conocido como hipertermia maligna, causa la muerte de los animales o una disminución de la calidad de sus productos cárnicos. Estos problemas surgen en los animales afectados cuando están bajo condiciones de estrés, como el originado durante el transporte. Actualmente no existen datos sobre la frecuencia del alelo mutado en Nuevo León; sin embargo, la evidencia anecdótica sugiere que existe una frecuencia similar a la encontrada en otros países en las razas Landrace, Duroc, Large White y Hampshire en los que existen datos sobre la mutación. Para el presente estudio se usaron técnicas de biología molecular a fin de determinar el genotipo de los animales para el síndrome, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa y en el polimorfismo de longitud de fragmentos de digestión (PCR-RFLP). Se analizaron 77 animales, de éstos 23 presentaron el alelo mutado (29.9%); de acuerdo con el genotipo, 26% fueron portadores (N/n) y 3.9% fueron afectados (n/n). Los otros 54 animales (70.1%) tuvieron un genotipo normal (N/N). La frecuencia del alelo mutado no tuvo diferencias significativas en machos (33.4%) que en hembras (26.3%), aunque hubo mayor número de hembras afectadas (n/n). Las frecuencias de los genotipos fueron 0.70 (54/77) para el homocigoto dominante (NN), 0.26 (20/77) para el genotipo heterocigoto (Nn) y 0.04 (3/77) para el genotipo homocigoto recesivo. La frecuencia encontrada para el alelo recesivo (n) fue de 0.17 y la frecuencia para el alelo dominante (N) fue de 0.83. Los resultados

Recibido el 6 de septiembre de 2004 y aceptado el 18 de marzo de 2005.

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Universitaria Mederos, 64930, Monterrey, Nuevo León, México.

se encuentran en el rango de la mayoría de las razas, aunque superior a valores para cerdos cruzados que han sido notificados en otros resultados.

Palabras clave: PORCINO, SÍNDROME DE ESTRÉS, PCR-RFLP.

Introduction

The porcine stress syndrome (PSS), also known as malignant hyperthermia, is a physiopathological state with severe consequences because it affects the quality of meat and its products in some cases, can produce death and bring forth economic losses. Signs include sudden death and meat is pale, soft and exudative. These reactions are the result of activities that produce stress or intense physical activity such as transportation, excessive environmental heat or copulation.¹

There is evidence that the disease is caused by a mutation in the gene for the calcium (Ca^{2+}) excretion channel in skeletal muscle also known as the ryanodine receptor (*ryr-1*). The mutation causes a hypersensitive opening of the calcium channel and prevents its closure. The chromosome location of the gene locus has been denominated Hal due to the fact that short controlled exposure to halothane gas in animals produces muscular contractions, hypermetabolism and an increase in body temperature therefore, identification of affected individuals is possible.² Nevertheless, by this method it is not possible to differentiate between resistant dominant homozygous individuals from asymptomatic heterozygous carriers. Therefore, a sire that is apparently free from the disease can pass on the recessive allele to its descendants. A reliable way to determine the Hal genotype in animals is through progeny tests.^{3,4}

A point mutation, which causes porcine stress, originates the change of pyrimidine for another in the DNA (cytosine for thymine: C-T transition) at nucleotide 1843 of the *ryr-1* gene. This suppresses a restriction site of the *Hin* PI enzyme and creates one for the *Hgi* AI enzyme. In order to carry out the analysis through polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) a segment of DNA of the *ryr-1* gene is amplified, which includes the nucleotide where the mutation occurs. This DNA fragment is subject to digestion with the *Hgi* AI enzyme in order to give rise to three fragments of 358, 166 and 135 base-pairs in affected animals (n/n), whereas in carrier individuals four fragments are observed (524, 358, 166 and 135 base-pairs) and in dominant homozygous individuals fragments of 524 and 135 base-pairs are observed.^{1,5}

The frequencies that have been found of the porcine stress syndrome vary in relation to breed.

Introducción

El síndrome de estrés porcino (PSS), también llamado hipertermia maligna, es un estado fisiopatológico con desarrollo de graves consecuencias, pues afecta la calidad de la carne y subproductos y, en ciertos casos, origina la muerte, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas. Los síntomas son carne pálida, suave y exudativa, así como muerte súbita. Estas reacciones son resultado de actividades que producen estrés o actividad física intensa, como el transporte, calor ambiental excesivo o la cópula.¹

Existe evidencia de que la enfermedad es causada por una mutación en el gen del canal de salida de calcio (Ca^{2+}) del músculo esquelético, también llamado receptor de la rianodina (*ryr-1*). La mutación causa una apertura hipersensitiva del canal de calcio e impide que se cierre. La localización cromosómica del locus de este gen se ha denominado Hal debido a que la exposición corta y controlada de los animales al gas anestésico halotano, les produce contracciones musculares, hipermetabolismo y elevación de la temperatura corporal, con lo cual se puede identificar a los individuos afectados.² Sin embargo, por este método no es posible diferenciar a los animales homocigotos dominantes resistentes de los portadores heterocigotos asintomáticos. Por tanto, un semental que aparentemente esté libre de la enfermedad puede pasar el alelo recesivo a sus descendientes. Una forma confiable de determinar el genotipo Hal de los animales es mediante las pruebas de progenie.^{3,4}

La mutación de punto, causante del estrés porcino, origina el cambio de una pirimidina por otra en el ADN (citosina por timina: transición C/T) en el nucleótido 1843 del gen *ryr-1*, lo cual suprime un sitio de restricción para la enzima *Hin* PI y crea uno para la enzima *Hgi* AI. Para realizar el análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el polimorfismo de longitud de fragmentos de digestión (PCR-RFLP) se amplifica un segmento de ADN del gen *ryr-1*, que incluye el nucleótido en el que ocurre la mutación. Este fragmento de ADN es sometido a digestión con la enzima de restricción *Hgi* AI, para originar tres fragmentos de 358, 166 y 135 pares de bases en los animales afectados (n/n), mientras que en los animales portadores se observan cuatro fragmentos (524, 358, 166 y 135 pares de bases) y en los animales homocigotos dominantes se observan los fragmentos de 524 y 135 pares de bases.^{1,5}

Allele frequencies ranging from 97% in the Pietrain breed, 35% in Landrace, 15% in Duroc, 19% in Large White, 14% in Hampshire, 19% in Yorkshire and 16% in mixed breeds have been recorded.^{6,7} In order to reduce the influence of this mutation and to eradicate it from the porcine population in Mexico, the selection of animals to be bred is required. In view of the molecular biology techniques available now, it is possible to diagnose individuals that have the mutation, both in terms of those affected, as well as the carriers.^{2,8-11}

Recent studies have found different mutations in the *ryr-1* gene that produce the stress syndrome in humans.¹¹⁻¹⁵ The stress syndrome has also been detected in canines¹⁶ and the *in vitro* contraction test has been established for diagnosing the disease.¹⁷ In swine with the mutation, the physiological causes that originate the loss of meat quality have been demonstrated.^{18,19}

The objective of the present work was to determine the allele frequency of the mutation that causes PSS in Nuevo Leon and to establish the methodology for its molecular diagnosis. In this way, the diagnostic service for the disease could be provided to swine producers in Nuevo Leon which would allow them to carry out genetic selection in order to eliminate individuals that are carriers of the mutation (heterozygous) from their breeding programs and thus reduce the frequency of affected individuals (recessive homozygous) from their herds. This problem is important in Nuevo Leon since the swine industry faces difficult environment conditions with high temperatures most of the year.

Material and methods

Samples and DNA extraction

Random samples of peripheral blood (with anticoagulant) and semen (frozen insemination straws) were obtained from 77 pigs of farms located outside the metropolitan area of Monterrey, Nuevo Leon, Mexico. The animals were mixed breeds used for production. Genomic DNA was extracted from each of the samples through a salt-protocol.

PCR conditions

The PCR primers used were the following: Ryr1-p-f: 5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3' (forward), nucleotides 500 to 523 of the *ryr1* porcine cDNA; and Ryr1-p-r: 5'-TTCACCGGAGTGAGTCTCTGAGT-3' (reverse), nucleotides 1 134 to 1 157 of the *ryr1* cDNA.¹

For amplifying the segment of the *ryr-1* gene we

Las frecuencias del síndrome de estrés porcino que se han encontrado varían según la raza. Se han registrado frecuencias de alelos que van desde 97% en la raza Pietrain, 35% en Landrace, 15% en Duroc, 19% en Large White, 14% en Hampshire, 19% en Yorkshire y 16% en razas cruzadas.^{6,7} Con el fin de reducir la influencia de esta mutación y erradicarla de la población porcina en México, se requiere la selección de los animales que se utilizarán como pie de cría. Debido a las técnicas de biología molecular ahora es posible diagnosticar a los individuos que presentan mutación, tanto a los portadores como a los afectados.^{2,8-11}

Estudios recientes han encontrado mutaciones diferentes en el gen *ryr-1* que producen el síndrome de estrés en el humano.¹²⁻¹⁵ También se ha detectado el síndrome de estrés en caninos¹⁶ y se ha establecido la prueba de contractura *in vitro* para el diagnóstico de la enfermedad.¹⁷ En porcinos se han demostrado las causas fisiológicas que originan la pérdida de la calidad de la carne en los animales que presentan la mutación.^{18,19}

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia alélica de la mutación causante de la PSS en Nuevo León y establecer la metodología para su diagnóstico molecular. Así se podrá brindar el servicio de diagnóstico de la enfermedad a los porcicultores en Nuevo León, lo cual les permitirá realizar la selección genética para eliminar a los individuos portadores de la mutación (heterocigotos) de los programas de crianza, y reducir la frecuencia de los individuos afectados (homocigotos recesivos) en los hatos porcícolas. Este problema es importante en Nuevo León, ya que la industria porcina se enfrenta a condiciones ambientales difíciles por sus altas temperaturas durante la mayor parte del año.

Material y métodos

Muestras y obtención de ADN

Se obtuvieron al azar muestras de sangre periférica (con anticoagulante) y semen (pajillas de inseminación congeladas) de 77 porcinos en granjas localizadas fuera del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. Los animales fueron de razas cruzadas utilizadas para la producción. Se aisló el ADN genómico de cada una de las muestras mediante el método de desalado.

Condiciones de PCR

Los iniciadores para PCR son los siguientes: Ryr1-p-f: 5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3' (adelante), nucleótidos 500 a 523 del ADNc porcino *ryr1*;

used the following conditions: initial denaturing at 94°C during 5 min; then 30 cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min and an extension at 72°C for 1 min; followed by a final extension at 72°C for 10 min. Each 5 µl sample of genomic DNA diluted to a 20 ng/µl concentration was added to a mixture composed of 5 µl PCR buffer solution (1 X), 1 µl of each primer (20 pM), 2 µl of dNTP (10 mM), 3 µl MgCl (1.5 mM), 2.5 U of Taq polymerase and 33 µl ultrapure water (50 µl final volume). The reactions were carried out in a heated-lid thermocycler.^{1*}

Restriction enzyme digestion and electrophoresis

A 10 µl aliquot of the PCR products obtained was subjected to digestion with the HgiAI restriction enzyme and incubated for 1 hour at 65°C.¹

In order to identify the amplified products an electrophoresis with Nu-Sieve agarose gels and DNA staining with ethidium bromide was carried out, visualization was done in an ultraviolet light transilluminator according to conventional methods. Interpretation of the results was done through base-pair size estimation of the PCR-amplified fragments by comparison with a molecular weight marker. Frequency was then estimated by direct count.

The frequencies of the three possible genotypes according to conventional nomenclature (NN: dominant homozygote, healthy; Nn: heterozygote, carrier; nn: recessive homozygote, affected) were calculated through direct count of the animals in relation to the molecular diagnosis, dividing the number of animals with each genotype by the total number of animals analyzed. The frequency of the recessive allele (n) was determined by adding half the heterozygous genotype frequency with the frequency of the recessive heterozygous genotype; the frequency of the dominant allele (N) was calculated by subtracting the recessive allele frequency from 1: $n = 0.5 (Nn) + (nn)$; $N = 1 - n$.²⁰

Results

Of the 77 animals analyzed, 23 had the mutant allele (29.9%). Among the animals with the mutation, 20 were carriers (26%) and three were affected (3.9%). A total of 54 individuals (70.1%) had a normal genotype. In relation to sex, the mutation had more frequency in males (33.4%) than in females (26.3%) due to a larger number of carrier males. Nevertheless, there were more affected females than males (Table 1). In Figure 1 an example of the genotype determination in an agarose gel is shown.

The frequency found for the recessive allele (n) was 0.17 and the frequency for the dominant allele

y Ryr1-p-r: 5'-TTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAGT-3' (reversa), nucleótidos 1 134 a 1 157 del ADNc ryr1.¹

Para la amplificación del segmento del gen ryr-1 se utilizaron las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por un min, hibridación a 52°C por un min y extensión a 72°C por 1 min; una extensión final a 72°C por 10 min. A cada muestra de 5 µL de ADN genómico diluido a 20 ng/µL se le agregó una mezcla de reacción compuesta de 5 µL de solución amortiguadora PCR (1 X), 1 µL de cada iniciador de PCR (20 pM), 2 µL de dNTP (10 mM), 3 µL MgCl (1.5 mM), 2.5 U de polimerasa Taq y 33 µL de agua ultrapura (mezcla total de 50 µL). Las reacciones se efectuaron en un termociclador con tapa térmica.^{1*}

Digestión con enzimas de restricción y electroforesis

Una alícuota (10 µl) de los productos de PCR obtenidos se sometió a digestión y se incubó por una hora a 65°C en presencia de la enzima de restricción HgiAI.¹

Para identificar los productos amplificados se realizó electroforesis en gel de agarosa Nu-Sieve, marcando el ADN con bromuro de etidio y visualizándolos mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador, de acuerdo con la metodología convencional. La interpretación de estos resultados se efectuó mediante la estimación del tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados mediante PCR; se compararon con un marcador de peso molecular, para posteriormente estimar la frecuencia por cuenta directa.

Las frecuencias de los tres genotipos posibles de acuerdo con la nomenclatura convencional (NN: homocigoto dominante, sano; Nn: heterocigoto, portador; nn: homocigoto recesivo, afectado) se calcularon mediante el conteo directo de los animales de acuerdo con el diagnóstico molecular, dividiendo el número de animales con cada genotipo entre el número total de individuos analizados. La frecuencia del alelo recesivo (n) se determinó sumando la mitad de la frecuencia del genotipo heterocigoto con la frecuencia del genotipo homocigoto recesivo y la frecuencia del alelo dominante (N) se calculó restando a 1 la frecuencia del alelo recesivo: $n = 0.5 (Nn) + nn$; $N = 1 - n$.²⁰

Resultados

De los 77 animales analizados, 23 presentaron el alelo

*M.J. Research, PTC-100 M.R.

Cuadro 1

NÚMERO Y PORCENTAJE DE INDIVIDUOS, SEGÚN SU GENOTIPO DE SÍNDROME DE ESTRÉS PORCINO Y SEXO

NUMBER AND PERCENTAJE OF INDIVIDUALS ACCORDING TO PORCINE STRESS SYNDROME GENOTIPE AND SEX

Genotype	Males		Females		Total	
	Number	%	Number	%	Number	%
N/N	26	66.6	28	73.7	54	70.1
N/n	12	30.8	8	21.0	20	26.0
n/n	1	2.6	2	5.3	3	3.9
Total	39	50.6	38	49.4	77	100

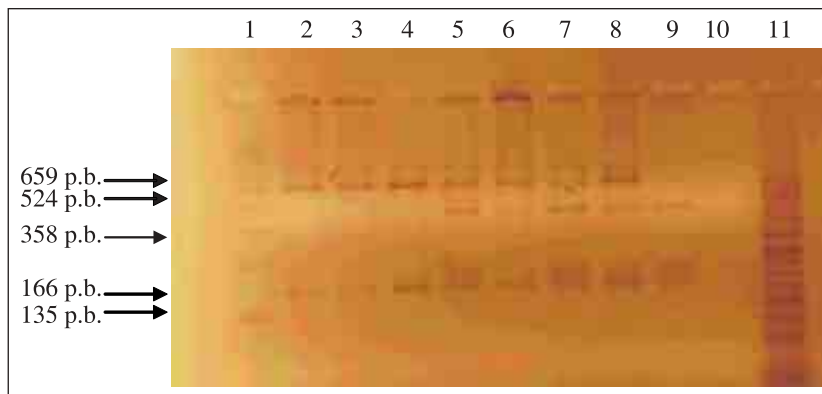


Figura 1. Ejemplo de visualización en gel de agarosa de los tres genotipos del síndrome de estrés porcino. Carriles 1 y 11: marcadores de peso molecular; carriles 2, 3 y 4: individuos N/N; carriles 5, 6, 7 y 8: individuos N/n; carril 9: individuo n/n; carril 10: testigo negativo.

Figure 1. Visualization in agarose gel of porcine stress syndrome genotypes. Lanes 1 and 11: molecular weight markers; lanes 2, 3 and 4: animals N/N; lanes 5, 6, 7 and 8: animals N/n; lane 9: animal n/n; lane 10: negative control.

(N) was 0.83 (Table 2).

In relation to sex, in males, the genotype frequencies were: dominant homozygote (NN), 0.67 (26/39); heterozygote (Nn), 0.31 (12/39); recessive homozygote (nn), 0.02 (1/39). The calculated allele frequencies were 0.175 for the recessive allele (n) and 0.825 for the dominant one (N). In females the genotype frequencies were: dominant homozygote (NN), 0.74 (28/38); heterozygote (Nn), 0.21 (8/38); recessive homozygote (nn), 0.05 (2/38). The calculated allele frequencies were 0.155 for the recessive allele (n) and 0.845 for the dominant one (N) (Table 2).

In relation to the source of the samples, there was no difference between those obtained from blood or semen in terms of purified DNA quality or PCR amplification. Nevertheless, the technique for extracting DNA from semen is intensive labor intensive, therefore, its use is recommended only in case there are no blood samples.

Discussion

In several reports on the porcine stress syndrome in scientific literature it is indicated that frequencies of animals that present the mutation vary in terms of country and breed analyzed. Frequencies have been

mutante (29.9%). Entre los animales con la mutación, 20 fueron portadores (26%) y tres afectados (3.9%). Cincuenta y cuatro animales (70.1%) tuvieron un genotipo normal. De acuerdo con el sexo, la mutación fue más frecuente en los machos (33.4%) que en las hembras (26.3%), debido a un mayor número de machos portadores; sin embargo, hubo mayor número de hembras afectadas que de machos (Cuadro 1). En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la determinación de los genotipos de los animales en un gel de agarosa.

La frecuencia encontrada para el alelo recesivo (n) fue de 0.17 y la frecuencia para el alelo dominante (N) fue de 0.83 (Cuadro 2).

Con respecto al sexo, en los machos las frecuencias de los genotipos fueron: Homocigoto dominante (NN), 0.67 (26/39); heterocigoto (Nn), 0.31 (12/39); homocigoto recesivo (nn), 0.02 (1/39). Las frecuencias alélicas calculadas fueron 0.175 para el alelo recesivo (n) y 0.825 para el dominante (N). En las hembras las frecuencias de los genotipos fueron: Homocigoto dominante (NN), 0.74 (28/38); heterocigoto (Nn), 0.21 (8/38); homocigoto recesivo (nn), 0.05 (2/38). Las frecuencias alélicas calculadas fueron 0.155 para el alelo recesivo (n) y 0.845 para el dominante (N) (Cuadro 2).

Cuadro 2

FRECUENCIA DE ALELOS Y GENOTIPOS DE SINDROME DE ESTRES PORCINO DE ACUERDO CON EL SEXO

ALLELE AND GENOTIPIC FREQUENCIES OF PORCINE STRESS SYNDROME BY SEX

	<i>Males</i>	<i>Females</i>	<i>Total</i>
N	0.825	0.845	0.83
n	0.175	0.155	0.17
NN	0.67	0.74	0.70
Nn	0.31	0.21	0.26
nn	0.02	0.05	0.04

reported, according to the breed, in ranges from 97% in the Pietrain breed, 35% in Landrace, 15% in Duroc, 19% in Large White, 14% in Hampshire, 19% in Yorkshire to 16% in mixed breeds.^{4,6}

In this study, we found a frequency of carrier and recessive allele homozygous individuals of 29.9%, which represents a value close to that of other studies, except in the Pietrain breed where the frequency is very high. Nevertheless, the value stated in literature for mixed breeds (16%) is less than that which was found in the present study (29.9%), where we also analyzed individuals from different breed mixes.

The results found in this study indicate that in this population the frequency of the porcine stress syndrome in Nuevo Leon, Mexico is greater than in other countries. Therefore, we recommend a wider study be carried out in order to confirm this result and from there take steps to improve the genetic composition, based on the genotype of the animals, with a trend to eradicate the mutation from local as well as national herds, as has been recommended in other studies.^{2,6,9}

Acknowledgements

This research project was funded by PRODUCE Nuevo Leon, A. C. Foundation; the Alianza por el Campo Program (Project 26, 2000 submissions) and the Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) of the Autonomous University of Nuevo Leon, 2001 submissions; it was carried out in collaboration with the Regional Pig Livestock Producer's Union of Nuevo Leon.

Referencias

1. MacLennan DH. The genetic basis of malignant hyperthermia. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13:329-334.
2. Ball SP, Johnson KJ. The Genetics of malignant hyperthermia. *Med Genet* 1993; 30:89-93.

Respecto de la procedencia de las muestras, no hubo diferencia entre las obtenidas de sangre o de semen en cuanto a la calidad del ADN purificado o de la amplificación mediante PCR. Sin embargo, la técnica para la obtención de ADN a partir de semen es más laboriosa, por lo que su uso se recomienda sólo en caso de que no se disponga de muestra de sangre.

Discusión

Diversos informes de la literatura científica sobre el síndrome de estrés porcino indican frecuencias de animales que presentan la mutación que varían según el país y la raza analizada. Se ha informado de frecuencias que van, de acuerdo con la raza, desde 97% en Pietrain, 35% en Landrace, 15% en Duroc, 19% en Large White, 14% en Hampshire, 19% en Yorkshire y 16% en razas cruzadas.^{4,6}

En el presente estudio se encontró una frecuencia de animales portadores y homocigóticos del alelo recesivo de 29.9%, lo cual representa un valor cercano a lo registrado en otros estudios, excepto para la raza Pietrain, en la cual la frecuencia es muy elevada. Sin embargo, el valor referido en la literatura para razas cruzadas (16%) es menor que el que se encontró en el presente estudio (29.9%), en el cual también se analizaron individuos pertenecientes a diferentes cruza.

Los resultados encontrados en el presente estudio indican que en esta población la frecuencia del síndrome de estrés porcino en Nuevo León, México, es mayor que en otros países, por lo que es recomendable realizar un estudio más amplio para confirmar este resultado y, en caso de ser así, tomar medidas para procurar el mejoramiento genético basado en el genotipo de los animales, tendiente a la erradicación de la mutación en los hatos locales y nacionales, como lo recomiendan diversos autores.^{2,6,10}

3. Otsu K, Khanna VK, Archibald A L, MacLennan DH. Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable casual mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. *Genomics* 1991; 11:744-750.
4. Rudolph JA, Spier J, Byrns G, Rojas CB, Bernoco D, Hoffman EP. Periodic Paralysis in Quarter Horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nat Genet.* 1992; 2:144-147.
5. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, DeLeon S, Khanna VK, Weiler JE, *et al.*, Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 1991; 253:448-451.
6. Houde A, Pommier SA, Roy R. Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in purebred swine populations. *Anim Sci* 1993; 71:1414-1418.
7. O'Brien PJ, Shen H, Cory CR, Zhang X. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. *Am Vet Med Assoc* 1993; 203:842-851.
8. Brem G, Brening B. Use of molecular genetic diagnosis of malignant hyperthermic syndrome (MHS) in selection of pigs. *Genetika* 1993; 29:1009-1013.
9. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. *Molecular biology of the gene.* 4th ed. Menlo Park, California, U.S.A. Ed. Benjamin/Cummings Publishing Co. 1987; 668-670.
10. Womack J E. Molecular genetics arrives on the farm. *Nature* 1992; 360:108-109.
11. Oyamada H, Oguchi K, Saitoh N, Yamazawa T, Hirose K, Kawana Y, *et al.* Novel mutations in C-terminal channel region of the ryanodine receptor in malignant hyperthermia patients. *Jpn J Pharmacol* 2002; 88:159-166.
12. Girard T, Urwyler A, Censier K, Mueller CR, Zorzato F, Treves S. Genotype-phenotype comparison of the Swiss malignant hyperthermia population. *Hum Mutat* 2001; 18: 357-358.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación fue financiado por la Fundación PRODUCE Nuevo León, A. C., Programa Alianza por el Campo (Proyecto 26, convocatoria 2000) y por el Programa de Apoyo a la Investigación

13. Galli L, Orrico A, Cozzolino S, Pietrini V, Tegazzin V, Sorrentino V. Mutations in the RYR1 gene in Italian patients at risk for malignant hyperthermia: evidence for a cluster of novel mutations in the C-terminal region. *Cell Calcium* 2002; 32: 143-151.
14. Brown RL, Pollock AN, Couchman KG, Hodges M, Hutchinson DO, Waaka R, *et al.* A novel ryanodine receptor mutation and genotype-phenotype correlation in a large malignant hyperthermia. *New Zealand Maori pedigree.* *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1515-1524.
15. Roberts MC, Mickelson JR, Patterson EE, Nelson TE, Armstrong PJ, Brunson DB, *et al.* Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by a mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel (RYR1). *Anesthesiology* 2001; 95: 716-725.
16. Ruffert H, Olthoff D, Deutrich C, Thamm B, Froster U. *In vitro* contracture test and gene typing in diagnosing malignant hyperthermia. Each as an appropriate complement to the other method. *Anesthesist* 2000; 49: 113-120.
17. Maddock RJ, Bidner BS, Carr SN, McKeith FK, Berg EP, Savell JW. Creatine monohydrate supplementation and the quality of fresh pork in normal and halothane carrier pigs. *J Anim Sci* 2002; 80: 997-1004.
18. Hamilton DN, Ellis M, Millar KD, McKeith FK, Parrett DF. The effect of the Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *J Anim Sci* 2000; 78: 2862-2867.
19. Weaver RF, Hedrick PW. *Genetics.* Wm C. Brown Publishers, U.S.A. 1989.