

**DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL MICROSATÉLITE ST DEL
GEN LEPTINA BOVINO EN LAS RAZAS CRIOLLAS COLOMBIANAS CHINO
SANTANDEREANO, ROMOSINUANO Y SINTÉTICA VELÁSQUEZ**

PAULA ANDREA ANGEL MARÍN

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
ARMENIA-QUINDÍO
2006**

**DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL MICROSATÉLITE ST DEL
GEN LEPTINA BOVINO EN LAS RAZAS CRIOLLAS COLOMBIANAS CHINO
SANTANDEREANO, ROMOSINUANO Y SINTÉTICA VELÁSQUEZ**

PAULA ANDREA ANGEL MARÍN

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar título de
Licenciada en Biología y Educación Ambiental**

DIRECTORA

ESPERANZA TRUJILLO Biol. MSc.

Grupo Genética y Mejoramiento Animal

Instituto Biología Universidad de Antioquia

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE EDUCACIÓN

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA Y EDUCACIÓN AMBIENTAL

ARMENIA-QUINDÍO

2006

Nota de aceptación

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Armenia, 15 Marzo del 2006

DEDICATORIA

*Dedico mi esfuerzo y empeño por terminar mi carrera a todos aquellos que hicieron posible los medios para alcanzar mi meta. A mi madre Yolanda Marín, a quien agradezco su dedicación, su paciencia, respeto, y amor. Este triunfo es para ustedes, y mi corazón les ama.
Dios les Bendiga Grandemente.*

Paula Andrea Ángel Marín

AGRADECIMIENTOS

Es lindo pensar que la montaña que decidí escalar hace 5 años era la correcta y la que finalmente me daría la satisfacción que buscaba dentro de la academia, el compañerismo, la amistad y mis logros personales. Siempre que iniciamos una carrera, surgen mil preguntas acerca de si es lo mejor, lo mas adecuado o lo mas apropiado para defendernos como personas competentes. Hoy puedo decir, que las dudas fueron quedando atrás a medida que pasaron los semestres, aferrándome de la pasión que llevo dentro para lograr a cabalidad cada una de las cosas que me propongo y la ayuda y colaboración de cada uno de los que estuvieron en mi acompañamiento, los cuales fueron piezas claves en la victoria de llegar hasta la cima de la montaña, desde la que pienso divisar mejor mis caminos trazados y darle un vistazo a aquellas montañas que siguen por escalar.

Gracias a Dios por permitirme la vida y la realización de mis sueños, por bendecirme con mi carrera, el trabajo en el laboratorio y lo que se añade a medida que voy viviendo.

Guillermo Gutiérrez, gran amigo y apoyo incondicional en mi travesía por la U, gracias por estar ahí cuando mis fuerzas se ausentaban y el desierto llegaba, gracias por ayudarme a encontrar el oasis.

Mi familia, quienes me conocen y aceptan con mi cielo de virtudes y mi mar de defectos. Gracias por amarme tal cual soy. Gracias por todo lo que hacen por mi, son una bendición.

Esperanza Trujillo Biol. MSc., directora del Grupo de Genética y Mejoramiento Animal de la Universidad de Antioquia. Por ser mi directora y acompañante en el desarrollo del proyecto, por creer en mi y en lo que hago. Gracias por ser tan humana, por enseñarme tanto, y por su paciencia, mil gracias. El recibirme en su laboratorio fue maravilloso y de gran crecimiento personal e intelectual.

Doctor Mario Fernando Cerón Muñoz, Gracias por su colaboración y aportes; fue grandioso contar con su especial compañía en las salidas de campo.

A todo el grupo de genética y mejoramiento animal. Compañeros, amigos y colaboradores en el desarrollo de este proyecto, gracias por hacer que mi paso por el laboratorio fuera más divertido.

A mis amigos y compañeros, por estar presentes cuando la victoria se veía venir, y por ser apoyo cuando las fuerzas se me escapaban.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS	15
1.1 Objetivo general	15
1.2 Objetivos específicos	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. ESTADO DEL ARTE	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Muestra poblacional	24
4.2 Extracción ADN	25
4.3 Genotipificación	25
4.4 Métodos estadísticos	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES	34
8. RECOMENDACIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Regulación de la expresión de leptina y desarrollo de la obesidad	20
Esquema 2. Leptina en adipositos y regulación de la masa del tejido adiposo	21
Esquema 3. Organización del gen leptina	23

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Frecuencias alélicas para ST	27
Tabla 2. Frecuencias genotípicas para ST	28
Tabla 3. Frecuencias alélicas para ST en dos subpoblaciones Rimosinuano	29
Tabla 4. Frecuencias genotípicas para ST en dos subpoblaciones Rimosinuano	30
Tabla 5. Estimación de los valores de heterocigocidad en cada Población	30
Tabla 6. Estimación de los valores de heterocigocidad para dos Subpoblaciones Rimosinuano	30
Tabla 7. Estimación de los valores FIS	31
Tabla 8. Valores FIS para cada población Rimosinuano	31

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Raza sintética Velásquez	36
Figura 2. Raza criolla Chino Santandereano	37
Figura 3. Raza criolla Romosinuano	38
Figura 4. Fotografía polimorfismos ST en poliacrilamida 6%	39

RESUMEN

La leptina es una proteína que interviene en la regulación del apetito y en el metabolismo energético de varias especies animales incluidos los bovinos. Esta proteína es producida por el gen obeso y se ha encontrado que el alto polimorfismo en los marcadores entre y adyacentes al gen de la leptina han permitido estudios de asociación con diferentes niveles de grasa de la carne en canal.

En este estudio fueron determinados los polimorfismos para el microsatélite ST (o BM1500) ubicado flanqueando el extremo 3' del gen leptina (G18586). Fueron evaluados animales de las razas criollas Chino santandereano (24), Romosinuano (40) de la cual se consideraron 2 subpoblaciones (Urabá y Valle) y sintética Velásquez (52). Se encontraron 4 alelos diferentes para el total de la población analizada, siendo las razas más polimórficas Velásquez y Romosinuano con 4 alelos, y la menos polimórfica Chino santandereano con 3 alelos de los cuatro establecidos. Las poblaciones de Chino santandereano y Romosinuano se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para el microsatélite ST mientras que la población de Velásquez presentó desviación del equilibrio ($p < 0.05$).

Palabras claves: microsatélite, gen obeso, ST, leptina

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores asociados positivamente con el potencial productivo de los bovinos es su capacidad para consumir alimentos. En forma simplificada, los animales con mayor "apetito" producen más. Si bien la cantidad de alimento consumido por el animal depende de una gran cantidad de factores propios (raza, edad, estado sanitario, condición fisiológica, etc.), y del ambiente (tipo de alimento, disponibilidad, época del año, etc.), también está determinado por la genética¹.

Durante décadas los investigadores se propusieron establecer los factores fisiológicos que regulan el apetito en los animales y en el hombre, es así como a finales de 1994 se publicó por primera vez la existencia de una proteína, la que se le llamó LEPTINA, la cual interviene en la regulación del apetito en ratones y es producida por el gen obeso (*ob*)². Trabajos posteriores demostraron que la leptina es una pieza clave en el complejo mecanismo de regulación del apetito y en el metabolismo energético de varias especies animales, incluidos los bovinos¹.

La leptina es una hormona producida principalmente por el adiposito según Houseknecht y colaboradores³ y está involucrada en el control del balance energético, el consumo de alimento y la composición corporal. Se produce a partir de un precursor de 167 aminoácidos, con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de que la leptina pase a la sangre².

El gen leptina en bovinos ha sido mapeado en el cromosoma 4^{4,5}; consta de 3 exones y 2 intrones; pero solo 2 exones codifican para la proteína. La región

promotora del gen leptina contiene aproximadamente 3 Kb, y estudios realizados en *Bos indicus* han demostrado una alta variabilidad o polimorfismo⁶, además estudios in vitro, sugieren que la leptina puede modular directamente el metabolismo en tejido periférico y puede antagonizar la actividad de la insulina en adipositos y músculo^{7,8}.

Las propiedades fisiológicas de la leptina dan soporte para considerar el gen obeso como un gen candidato en la evaluación de polimorfismos genéticos que pueden afectar el contenido de grasa de la canal en ganado. El alto polimorfismo en los marcadores entre y adyacente al gen de leptina bovino facilitarán los estudios genéticos para determinar su acción y papeles específicos en calidad de carne en ganado. Se ha encontrado que polimorfismos en la región codificante del gen, están asociados con las concentraciones de leptina en el suero^{9,10} producción de leche^{11,9} y grasa corporal^{12,13}. Geary y colaboradores¹⁴ en el 2003 determinaron que las concentraciones de leptina en el suero se encuentran significativamente asociadas con la composición de la canal y grado de calidad de la carne.

Se han descrito alelos de regiones específicas en este gen que identificarían individuos con diferente capacidad de retención de grasa y marmoreo en la carne¹². En estudios realizados por Stone y colaboradores⁴ en 1996, un microsatélite compuesto por 5' GATA(CA)_nCTAG 3' fue detectado flanqueando el extremo 3' del gen de la obesidad [GenBank acceso No. G18586], así mismo Fitzsimmons y colaboradores¹⁵ en 1998, encontraron 4 alelos para este marcador BM1500, y reportaron la asociación de dos de estos alelos 138 y 147 con la medida de grasa en la canal en una población de 158 toros para carne de las razas Angus, Charolais, Hereford y Simmental.

El objetivo del presente trabajo fue el determinar, las frecuencias alélicas y genotípicas para el microsatélite ST que flanquea el extremo 3' del gen leptina, en las razas criollas Chino Santandereano, Romosinuano y sintética Velásquez;

además, determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg para éste microsatélite en dichas poblaciones.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de los polimorfismos del microsatélite ST (Stone o BM1500) del gen leptina bovino, en las razas criollas: Chino Santandereano, en una población del departamento de Santander (Cimitarra), Romosinuano, en una población del departamento de Antioquia (Urabá) y Valle (Restrepo), y la raza sintética Velásquez, en una población del departamento de Caldas (La Dorada).

1.2 Objetivos específicos

- Estandarización de la técnica de genotipificación.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos del microsatélite ST, del gen leptina en las razas criollas: Chino Santandereano, Romosinuano y sintética Velásquez.
- Determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg para los resultados obtenidos.

2. JUSTIFICACIÓN

La calidad de la carne es un factor muy importante para la industria ganadera. Los consumidores citan la terneza, la jugosidad y el sabor como factores que son inconsistentes al escoger la carne. La grasa intramuscular o marmoreo, contribuye a aumentar estas características, por consiguiente, es beneficioso para los productores desarrollar un método de clasificación de los animales con características económicamente importantes tales como marmoreo y terneza¹⁶. Acerca de este tema existen estudios para determinar la significancia de la concentración de la leptina en sangre y las características de las canales. También se ha encontrado, que el ganado con composición corporal magra puede ser seleccionada usando marcadores en el locus de leptina, resultando una canal con alto o bajo grado de marmóreo y alto grado de calidad¹⁷. En la producción de carne, la determinación del genotipo permite predecir el comportamiento del animal durante el engorde y la calidad de la canal¹.

Colombia es un país importante, por megadiversidad y recursos genéticos en microorganismos, vegetales y animales, no solamente en el ámbito silvestre sino también de los recursos domésticos, hasta el punto de ocupar el primer lugar en Latinoamérica en cuanto a la diversidad de animales domésticos criollos¹⁸.

Los animales criollos colombianos como las razas Chino Santandereano, Romosinuano, sintética Velásquez, entre otras, poseen una amplia adaptación (climática, reproductiva, nutricional, sanitaria) a la variación ecológica, principalmente en las áreas de clima cálido; poseen una capacidad natural de aprovechamiento de recursos naturales pobres y de residuos de cosecha, capacidad de supervivencia con limitados recursos alimenticios disponibles, responden bien a los sistemas de ceba intensiva y se pueden explotar en sistemas

extensivos, con disminución de la inversión y de los costos de producción. Tienen unos niveles productivos aceptables (carne, leche, tracción) en áreas geográficas difíciles y les generan sostenibilidad a los pequeños y medianos productores¹⁹.

De allí la importancia de mejorar las razas criollas colombianas, puesto que un animal adaptado genéticamente a su ambiente puede producir al máximo, con un costo mínimo y sostenible a largo plazo; contribuir a la diversidad alimentaria, agrícola y cultural²⁰.

Finalmente, trabajos existentes sobre el gen obeso (ob) y que han sido enfocados hacia su importancia en cuanto al potencial productivo del ganado vacuno, teniendo en cuenta características de importancia económica como el área del ojo del lomo, grasa subcutánea y grado de marmoreo entre otras, han demostrado la existencia de relaciones estrechas entre este gen y dichas características.

3. ESTADO DEL ARTE

Los factores de importancia económica para producción animal, pueden ser influenciados por la inclusión de la leptina en la conversión eficiente de alimento y grasa intramuscular, lo cual es considerado en el mejoramiento de la carne como características importantes^{21,22}. De acuerdo con esto, muchos autores han documentado la importancia de la terneza en la palatabilidad de la carne^{23,24,25} determinando ésta como el punto más importante en cuanto a calidad de carne se refiere. El grado de marmoreo ha sido usado en la industria americana como predictor primario en la palatabilidad de la carne entre las canales con características de madurez similar²⁶, y la leptina ha sido relacionada con el marmoreo respecto a esta característica²⁷.

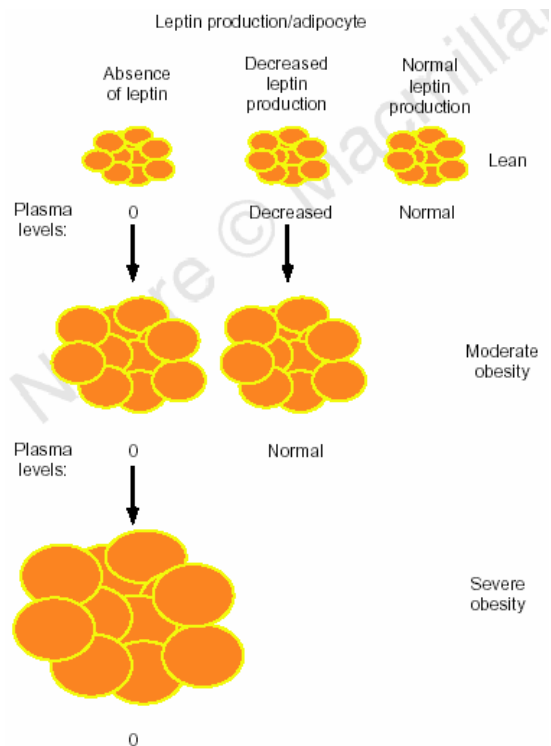
La leptina es una hormona proteica, de reciente descubrimiento y codificada por el gen *ob*; está compuesta por 167 aminoácidos y su síntesis ocurre principalmente a nivel del tejido adiposo^{2,28}, con un peso molecular de 16 kDa^{29,30}. Su nombre se deriva de la raíz griega *leptos* que significa delgado²⁸, lo que se debe a su evidente función en el control del peso corporal a través de la regulación del apetito y la termogénesis^{28,31,32}. Estudios recientes realizados *in vitro* e *in vivo* demuestran que la hormona se expresa en adipositos, en las células trofoblásticas y en las del amnios, elevando sus concentraciones durante el embarazo, sobre todo en el 2º y 3er trimestre y, en condiciones anormales, en los cultivos de células de la mola hidatiforme y el coriocarcinoma³³, además se expresa en el cerebro³⁴. Muchos autores coinciden en plantear al hipotálamo como el principal órgano diana^{35,36}, consideran a este como una señal que informa a los centros reguladores del balance energético, la cantidad de tejido graso almacenado, lo que trae consigo la disminución de la ingesta calórica y el aumento del gasto energético³⁶. Por otra parte, se ha reportado que la secreción de la leptina es

altamente correlacionada con la masa de grasa corporal en ratones²⁸ humanos^{1,30,33} y rumiantes^{34,37,38,39} (Esquema 1)

Adicionalmente a estos papeles, como señales de retroalimentación en la regulación del balance energético, la leptina puede tener múltiples acciones fisiológicas. Esto muestra, que los efectos de la leptina en ingestión de alimentos son mediados a través de sus receptores en el hipotálamo⁴⁰. Los receptores de la leptina se encuentran no solo en el cerebro sino que también en muchos otros tejidos incluyendo pulmones, riñones, ovarios, hígado y músculo esquelético^{40,41,42}. (Esquema 2)

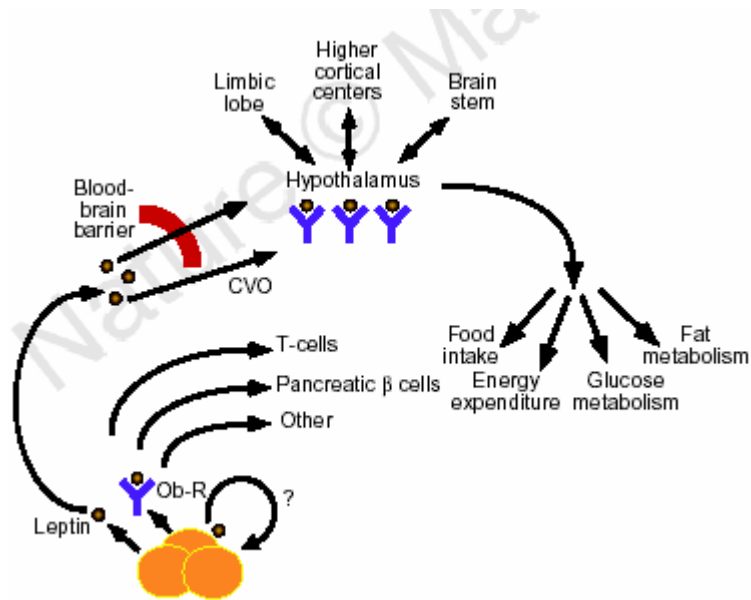
Además del control del balance energético y maduración del sistema reproductivo⁴³, se encuentra una relación de la leptina con distintos procesos biológicos; la falta de leptina induce a la esterilidad en los ratones machos y su administración restaura la fertilidad⁴⁴, también puede acelerar la edad en la cual comienza la pubertad en ratones normales⁴⁵, actúa en la inhibición de secreción de insulina de las células del páncreas⁴⁶, estimula la utilización de la glucosa⁴⁷, estimulación de transporte de azúcar a través del intestino delgado⁴⁸, como señal en el sistema inmune⁴⁹ y en el desarrollo del cerebro⁵⁰.

Esta proteína ha sido detectada en vertebrados mamíferos como ratones, cerdos, bovinos y humanos, con una alta homología en su secuencia de bases^{51,52,53,54}. En cerdos, se ha demostrado que existen diferencias significativas en los niveles de ésta, para cerdos magros y cerdos obesos, aunque no se ha establecido de qué manera esto afecta la ingesta de alimento⁵⁴. La leptina se encontrado en vertebrados no mamíferos como pollos⁵⁵, peces⁵⁶, ranas, lagartijas y serpientes⁵⁷. Investigaciones en ganado para carne⁵⁸ soportan el concepto que existe una relación positiva entre la leptina circulante y contenido de grasa intramuscular.



Esquema 1. Regulación de la expresión de la leptina y desarrollo de la obesidad. En Friedmann y Halaas, 1998⁵⁹.

La leptina también muestra ser regulador de la respuesta inmune⁶⁰; alteraciones en la inmunidad y la inflamación han sido encontradas en animales deficientes de leptina o de su receptor, así como ocurre en estados de inanición y mal nutrición, dos condiciones caracterizadas por bajos niveles de leptina. La hormona ejerce una actividad proliferativa y antiapoptótica en varios tipos de células, incluyendo los linfocitos T, las células leucémicas y las células progenitoras hematopoyéticas. La leptina también influye en la producción de citoquinas, en la activación del sistema macrófagos-monocíticos y en la reparación de heridas. Además, la producción de leptina se incrementa durante la infección y la inflamación⁶¹.



Esquema 2. Leptina en adipositos y regulación de la masa del tejido adiposo. En Friedmann y Halaas, 1998⁵⁹.

Algunos estudios han determinado la significancia de concentración de la leptina en características de canales en ganado. Geary y colaboradores¹⁴ también afirmaron que las concentraciones de leptina en el suero están significativamente asociadas con la composición de la canal y grado de calidad; estos trabajos concluyen que la leptina puede ser beneficiosa como un indicador adicional de contenido de grasa en ganado. Al ser una hormona secretada por el tejido adiposo, la concentración de leptina en sangre es mayor, cuanto mayor sea la proporción de grasa corporal, tanto en vacas^{62,63} como en ovejas⁶⁴. Cassady⁶⁵ demostró que cuando el contenido de grasa corporal del vacuno desciende por debajo del 12,1%, la actividad reproductiva cesa, lo que corrobora la importancia de la leptina en la regulación de la reproducción.

Thomas y colaboradores⁶⁶ en 2002, sugirieron que la leptina es un predictor de peso corporal, circunferencia escrotal y concentración en suero de testosterona en toros, el cual provee las bases para investigar la interacción entre el crecimiento y reproducción en ganado.

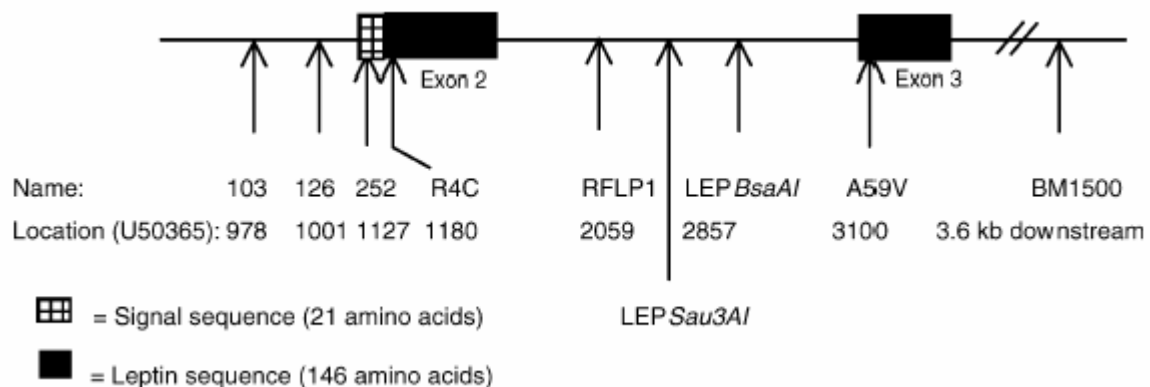
Son muchas las investigaciones que se han realizado en diferentes partes del mundo sobre la leptina, tanto en animales, como en humanos. Diferentes investigadores sobre este tema, han descubierto que la hormona es versátil y está relacionada con muchas funciones. La leptina en humanos posee una gran importancia, ya que interviene en una serie de procesos fisiológicos; regula la masa corporal y el gasto energético debido a su incidencia directa en el hipotálamo, además es capaz de estimular la glándula pituitaria para que secrete las hormonas gonadotrópicas, y a las gónadas directamente para su desarrollo, por lo que desempeña un papel importante en el inicio de la pubertad, está relacionada con la remodelación del hueso y es capaz de inhibir la secreción de insulina. Durante el embarazo regula la angiogénesis, la hematopoyesis y la biosíntesis hormonal dentro de la unidad feto-placentaria⁶⁷.

Dentro del cerebro las diferentes señales siguen caminos semejantes pero opuestos, y se integran en el núcleo arqueado del hipotálamo, debido a que es precisamente allí donde se encuentran los receptores específicos que permite la visualización de los intermediarios leptina e insulina, que son los encargados de dar la información del estado nutricional y el nivel de energía almacenada al neuropéptido hipotalámico Y (NPY). Se conoce que la leptina, a través de receptores que utilizan la vía Jak Stat (que traduce las señales intracelulares), modifica la expresión y activación de numerosos péptidos hipotalámicos^{68,69} y se plantea que tiene un papel importante en la patogenia de la obesidad al informar al hipotálamo del contenido de grasa corporal, regular la ingesta alimentaria y el gasto energético. Estos conocimientos se basan en las diferentes investigaciones que se han realizado a partir de la clonación del gen ob en ratones, ratas y humanos^{70,71}.

Los ratones homocigóticos con un gen ob defectuoso (ratón ob/ob) se transforman en obesos después de comer, así mismo se torna obeso el ratón que presenta alteraciones en el gen db (ratón db/db), que codifica al receptor de la leptina, pues

aunque las concentraciones de la hormona estén elevadas, ésta no puede llegar a estimular las áreas hipotalámicas debido a la falta de su receptor⁶⁷.

En el ganado el gen leptina ha sido mapeado en el cromosoma 4q32 (Gen Bank secuencia U50365)¹⁰ (Esquema 3). Respecto a este gen se han utilizado diversos marcadores que permitan asociar su efecto con diferentes características de importancia económica en ganado, con respecto a esto, el microsatélite, BM1500 (ST), situado a 3.6 kb del codón de parada¹⁵ puede ser asociado con concentraciones de leptina en suero en ganado lechero⁹ (Esquema 3). Fitzsimmons y colaboradores⁵⁹ en 1998 reportaron que alelos del microsatélite ST en este gen fueron asociados con medida de grasa en la canal en una población de 158 toros para carne en las razas Angus, Hereford, Charolais y Simmental. Igualmente Buchanan y colaboradores¹² en 2002 determinaron que la sustitución de una citosina (C) por timina (T) en el exón 2 del gen leptina que a su vez conduce a la sustitución de una Arginina por una Cisteína en la proteína correspondiente tiene efectos fisiológicos en el organismo, indicando que el alelo T se encuentra asociado con alto nivel de grasa en la canal y el alelo C con el efecto opuesto. Esto nos abre paso a futuros estudios relacionados con mejoramiento en la calidad de la carne.



Esquema 3. Organización del gen leptina en bovinos y ubicación del microsatélite ST (BM1500). En Liefers et al., 2005⁷²

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestra Poblacional

Para este estudio fueron seleccionadas las razas criollas colombianas de ganado vacuno: Chino santandereano y Romosinuano, y la raza sintética Velásquez. Fueron evaluados 52 individuos de la raza sintética Velásquez, provenientes de la Finca África ubicada en La Dorada (Caldas), a 5°27' de latitud norte y a 74°40' de longitud oeste, a una altura de 200 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media de 27°C, la máxima de 35°C y la mínima de 18°C, humedad relativa de 75 a 90% en época de lluvia, y en sequía de 65%; la precipitación pluvial es de unos 2500-3500 mm anuales. Esta raza fue formada por el cruce de tres razas como son: Cebú (origen indico), Romosinuano (ganado criollo) y Red Poll (ganado ingles); y es caracterizada por reunir las condiciones necesarias para sobrevivir a condiciones extremas de calor, alta humedad y parasitismo existentes en las tierras bajas de Colombia, además de reproducirse excepcionalmente con producciones de carne y leche aceptables¹⁹ (Figura 1)

De la raza Chino Santandereano se seleccionaron 24 individuos provenientes de la finca La Granja ubicada en el municipio de Cimitarra (Santander). Esta raza descende de los ganados de origen ibérico en la región centro-oriental de Colombia, correspondiente a los departamentos del Norte de Santander, Santander y parte de Boyacá; se caracteriza por tener gran suficiencia fisiológica ante el ambiente que la rodea. Aun, sin haber experimentado una selección adecuada, esta raza revela un cuerpo equilibrado, compacto y fino¹⁹ (Figura 2)

De la raza Romosinuano fueron evaluados 14 individuos provenientes de la finca El Espejo ubicada en Urabá (Antioquia) y 26 individuos provenientes de la Hacienda Cardosa ubicada en Restrepo (Valle), las cuales fueron clasificadas como subpoblación 1 (RU) y 2 (RV) respectivamente. Esta raza posee propiedades extraordinarias de adaptación a las condiciones ambientales de la zona cálida húmeda del país, reflejadas especialmente en su comportamiento reproductivo y por su gran aporte a la producción de híbridos de excelentes rasgos productivos. Conocido también como Coastal polled o Morunosinuano, fue desarrollado en el valle del Sinú al Norte de Colombia. Esta raza se originó a finales de 1800 a partir del Costeño con Cuernos (Sinú con cuernos)¹⁹ (Figura 3)

4.2 Extracción de ADN

De cada animal fueron colectados aproximadamente 4 ml de sangre de la vena yugular o arteria coccígea, en tubos que contenían anticoagulante EDTA K3, estos fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento. Posteriormente se utilizó el método de “Salting out”⁷³ para la extracción del ADN, y almacenándose a -20°C en TE.

4.3 Genotipificación

Para la amplificación del microsatélite ST se utilizaron los primers ST-1 **GATGCAGCAGACCAAGTGG** y ST-2 **CCCATTGCTAGAACCCAGG** [GenBank Acceso No. G18586]⁴, utilizando el kit para PCR de fermentas, con un perfil térmico de 94°C (30 segundos), 56°C (30 segundos) y 72°C (1 minuto) por 31 ciclos con una extensión final de 72°C (7 minutos). La amplificación se efectuó en un Termociclador T-Personal 48 (Biometra® GMBH, D-37079 Goettingen, Germany).

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 2% que contenía Bromuro de etidio (BrEt) (0,7 µg/ml), corrido a 70 voltios durante 15 minutos. Para

la genotipificación en gel de poliacrilamida al 6% (Acrilamida/Bisacrilamida (19:1)) se tomaron 2.5 µl del producto de PCR y 2 µl de buffer de carga; se corrieron a 1900 voltios/40wats por 80 minutos aproximadamente; posteriormente se realizó tinción con plata, utilizando el kit de PROMEGA.

4.4 Métodos estadísticos

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico GENEPOP versión 3.3 ⁷⁴, para estimar las frecuencias alélicas y genotípicas de este microsatélite. Además, se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg en cada una de las tres razas criollas.

7. RESULTADOS

Estudios previos han identificado diferentes marcadores para el gen leptina en distintas razas de ganado de carne. Entre estos se encuentran los microsatélites ST (o BM1500) que se ubica flanqueando el extremo 3' del gen leptina, en una región no codificante, WD⁶ ubicado en la región 5'UTR y varios SNP (polimorfismos de un único nucleótido) en diferentes regiones de este gen^{12,75} que han sido asociados con calidad de carne.

La genotipificación para el marcador ST en las razas criollas objeto del presente estudio, Chino Santandereano, Romosinuano y la raza sintética Velásquez dio como resultado la identificación de cuatro alelos diferentes de 135, 144, 147 y 150 pares de bases (Figura 4). Los alelos más frecuentes fueron 135 en Romosinuano (0.550), 144 en Chino Santandereano (0.604) y los alelos 135 y 147 en Velásquez (0.337 y 0.308). El alelo menos frecuente para las tres razas es 150 con un valor de 0.058, 0.042 y 0.050 en Velásquez, Chino Santandereano y Romosinuano respectivamente, el alelo 147 no se presentó en la raza Chino santandereano (tabla 1)

Tabla 1. Frecuencias alélicas para ST

Alelo	Ve (n = 104)	Ch (n = 48)	Ro (n = 80)
135	0.337	0.354	0.550
144	0.298	0.604	0.387
147	0.308	0.000	0.013
150	0.058	0.042	0.050

Alelo = Alelos detectados en la genotipificación

n = Numero de alelos en cada población

Ve = Raza sintética Velásquez

Ch = Raza criolla Chino Santandereano

Ro = Raza criolla Romosinuano

Se detectaron 9 combinaciones genotípicas para el marcador ST en la raza Velásquez, 4 en Chino santandereano y 6 en Romosinuano. El heterocigoto 135/144 se presentó con mayor frecuencia en las razas Chino Santandereano y Romosinuano (0.38 y 0.43). En Chino se presentó con una alta frecuencia el homocigótico 144/144 (0.38) y la raza sintética Velásquez mostró mayor número de combinaciones genotípicas, siendo la frecuencia más alta para el heterocigótico 135/147 con un valor de 0.19 (tabla 2)

Tabla 2. Frecuencias genotípicas para ST

Genotipos	Población		
	Ve (N = 52)	Ch (N = 24)	Ro (N = 80)
135/135	0.15	0.16	0.30
135/144	0.13	0.38	0.43
144/144	0.17	0.38	0.15
135/147	0.19	0.00	0.03
144/147	0.09	0.00	0.00
147/147	0.13	0.00	0.00
135/150	0.04	0.00	0.05
144/150	0.01	0.08	0.05
147/150	0.06	0.00	0.00

N = Numero de muestras analizadas

Genotipos = Combinaciones genotípicas mas frecuentes

Ve = Raza sintética Velásquez

Ch = Raza criolla Chino Santandereano

Ro = Raza criolla Romosinuano

Debido a que las subpoblaciones de Romosinuano provienen de 2 regiones ubicadas muy apartadas geográficamente, se realizaron análisis de ambas poblaciones de manera separada. Estas dos subpoblaciones compartieron los alelos 135 y 144 de la totalidad que fueron determinados. El 135 fue el más frecuente para la subpoblación 1 (RU) (0.75) y los alelos 135 y 144 tuvieron las frecuencias mas altas en la subpoblación 2 (RV) con unos valores de 0.442 y 0.462 respectivamente (Tabla 3)

Tabla 3. Frecuencias alélicas para ST en dos subpoblaciones Romosinuano

Alelo	RU (n = 28)	RV (n = 52)
135	0.750	0.442
144	0.250	0.462
147	0.000	0.019
150	0.000	0.077

Alelo = Alelos detectados en la genotipificación
n = Numero de alelos en cada población
RU = Romosinuano Urabá
RV = Romosinuano Valle

Se presentaron dos combinaciones genotípicas diferentes en RU y 6 combinaciones en RV. Los genotipos 135/135 y 135/144 se encontraron con igual frecuencia (0.5) en RU, mientras que en RV, el heterocigótico 135/144 se presentó con una frecuencia menor (0.38) a la encontrada en RU (Tabla 4)

En las tablas 5 y 6 se muestran los valores estimados de la heterocigocidad observada y esperada para cada una de las razas estudiadas, como también para las dos subpoblaciones de Romosinuano. Así mismo, la estimación de los valores FIS se muestran en las tablas 7 y 8 para cada una de las poblaciones y las dos subpoblaciones de Romosinuano, respectivamente.

A partir del equilibrio de Hardy-Weinberg se determinó que las poblaciones de Chino Santandereano y Romosinuano se encontraron en equilibrio para el microsatélite ST, la población Velásquez presentó desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$). Respecto a las dos subpoblaciones de Romosinuano se encontró que ambas poblaciones independientemente se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$).

Tabla 4. Frecuencias genotípicas para ST en dos subpoblaciones Romosinuano

Genotipos	Población	
	RU (N = 14)	RV (N = 26)
135/135	0.50	0.19
135/144	0.50	0.38
144/144	0.00	0.23
135/147	0.00	0.04
135/150	0.00	0.08
144/150	0.00	0.08

N = Numero de muestras analizadas

Genotipos = Combinaciones genotípicas mas frecuentes

RU = Romosinuano Urabá

RV = Romosinuano Valle

Tabla 5. Estimación de los valores de heterocigocidad en cada población

Raza	ST	
	Ho	He
Velásquez	0.53*	0.70
Chino Santandereano	0.45 ^{ns}	0.51
Romosinuano	0.55 ^{ns}	0.55

^{ns} = no significativa, * significativa (p = 0.05)

ST = microsatélite (Stone et al., 1997)

Ho = Heterocigocidad observada

He = Heterocigocidad esperada

Tabla 6. Estimación de los valores de heterocigocidad para 2 subpoblaciones Romosinuano

Población	ST	
	Ho	He
Romo Urabá	0.5 ^{ns}	0.38
Romo Valle	0.57 ^{ns}	0.59

^{ns} = no significativa

ST = microsatélite (Stone et al., 1997)

Ho = Heterocigocidad observada

He = Heterocigocidad esperada

Tabla 7. Estimación de valores FIS en cada población

Población	Locus ST
	FIS
Ve (N = 52)	+0.240*
Ch (N = 24)	+0.118 ^{ns}
Ro (N = 40)	+0.003 ^{ns}

^{ns} = no significativa, * significativa (p < 0.05)

N = Número de muestras analizadas

Ve = Raza sintética Velásquez

Ch = Raza criolla Chino Santandereano

Ro = Raza criolla Romosinuano

Tabla 8. Valores FIS para cada población Romo

Población		
Locus	Romo (Urabá)	Romo (Valle)
ST	-0.300 ^{ns}	+0.034 ^{ns}

^{ns} = no significativa

N = Número de muestras analizadas

Romo Urabá = Subpoblación 1

Romo Valle = Subpoblación 2

8. DISCUSIÓN

La raza Velásquez fue la más polimórfica para el microsatélite ST de las tres analizadas, la menos polimórfica fue Chino Santandereano, presentando solo 3 alelos de los 4 encontrados en las 3 poblaciones. Los resultados en Chino Santandereano no muestran concordancia con el hecho de que, los animales muestreados en su mayoría provienen de cruces con Rubio Gallego, lo que aportaría un incremento en el número de alelos y en la frecuencia de heterocigóticos.

En investigaciones previas se encontraron los alelos 138, 140, 147 y 149 en las razas Angus, Charolais, Hereford y Simmental¹⁵ en las cuales se asociaron los alelos 138 y 147 con altos y bajos niveles de grasa en la canal respectivamente. En otros estudios Tessanne y colaboradores¹⁷ encontraron los alelos 135 y 144 en la raza Angus. En esta investigación fueron detectados los alelos 135, 144, 147 y el 150. Este último fue reportado en el 2005⁷⁶ en otras razas criollas como Hartón del Valle y Blanco orejinegro; también fueron determinados 7 alelos, de los cuales 132, 138, y 141 no se detectaron en las razas de este estudio.

Las combinaciones genóticas encontradas en Chino Santandereano, Romosinuano y Velásquez no son similares a lo reportado para otras razas criollas como Hartón del Valle y BON⁷⁶, donde las frecuencias más altas fueron para el homocigótico 144/144; mientras que en las razas evaluadas en este estudio, las más altas frecuencias se presentaron para el heterocigótico 135/144, y 135/147.

En el análisis de las frecuencias alélicas en cada una de las subpoblaciones de Romosinuano, la subpoblación 2 (RV) presentó mayor polimorfismo que la

subpoblación 1 (RU), esta última solo presentó los alelos 135 y 144. Este resultado quizás se deba a la ubicación geográfica de este grupo racial, que dificulta el intercambio con otros grupos (Tabla 3). En la subpoblación 1 el bajo número de combinaciones genotípicas encontradas (Tabla 4), quizás se deba a un incremento en los niveles de consanguinidad en los núcleos que se manejan en esta región. La subpoblación 2, presenta un valor mayor de heterocigocidad, lo que podría indicar un mayor intercambio con otros núcleos. La subpoblación 1 (RU), que mostró equilibrio de Hardy-Weinberg a pesar de la ausencia del alelo 144 en forma homocigótica, podría explicarse por el bajo número de animales que conforman la muestra, donde el número de heterocigóticos iguala el número de homocigóticos con ausencia del 144/144.

Los valores de heterocigocidad observada y esperada para este microsatélite (ST), en las tres razas evaluadas, y la estimación de los valores FIS mostraron que la raza Velásquez presentó un déficit de heterocigóticos ($p < 0.05$), producido posiblemente por incremento en cruces consanguíneos y durante muchos años (Tabla 5). Las otras dos razas, Romosinuano y Chino santandereano no presentaron déficit de heterocigotos con un valor significativo ($p < 0.05$) (tabla 6).

Para las dos subpoblaciones de Romosinuano los valores de heterocigocidad observada y esperada y la estimación de los valores FIS mostraron similitud, y las diferencias no fueron significativas.

Respecto a la comparación de las frecuencias de los polimorfismos encontrados para el microsatélite ST en las tres poblaciones, estas difieren para el marcador con una probabilidad altamente significativa ($p \leq 0.001$). Ahora, considerando las dos subpoblaciones de la raza Romosinuano, las frecuencias difieren con un valor significativo ($p < 0.05$)

9. CONCLUSIONES

- Los polimorfismos encontrados para las tres razas presentan frecuencias diferentes en cada población, siendo más frecuente el alelo 135 en Romosinuano, 144 en Chino santandereano y, los alelos 135 y 147 en Velásquez
- De las tres razas estudiadas, la raza sintética Velásquez fue la más polimórfica y Chino santandereano la menos polimórfica
- En cuanto a las frecuencias genotípicas en las tres razas, la más alta fue para los heterocigóticos 135/144 y 135/147
- La raza sintética Velásquez en este estudio presentó desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$)
- Las tres poblaciones difieren para este marcador con un valor altamente significativo ($p < 0.001$) presentándose esta diferencia también entre las dos subpoblaciones de Romosinuano
- Con este trabajo se logra darle un gran significado a las razas criollas colombianas en relación con marcadores que están involucrados en calidad de carne y se abre un espacio para seleccionarlas productivamente, dándoles el valor que hasta ahora no se les ha dado.

8. RECOMENDACIONES

- Aunque los resultados obtenidos en este estudio, para el número de alelos determinados coinciden con los reportados en la literatura, es necesario aumentar el número de individuos muestreados con el fin de corroborar los resultados
- Teniendo en cuenta la necesidad que existe actualmente en la economía colombiana de exportar carne con mayor calidad, se hace importante continuar estudios, que involucren la asociación de este y otros marcadores y características en calidad de carne.

LISTA DE FIGURAS



Figura 1. Raza sintética Velásquez



Figura 2. Raza criolla Chino Santandereano



Figura 3. Raza criolla Romosinuano

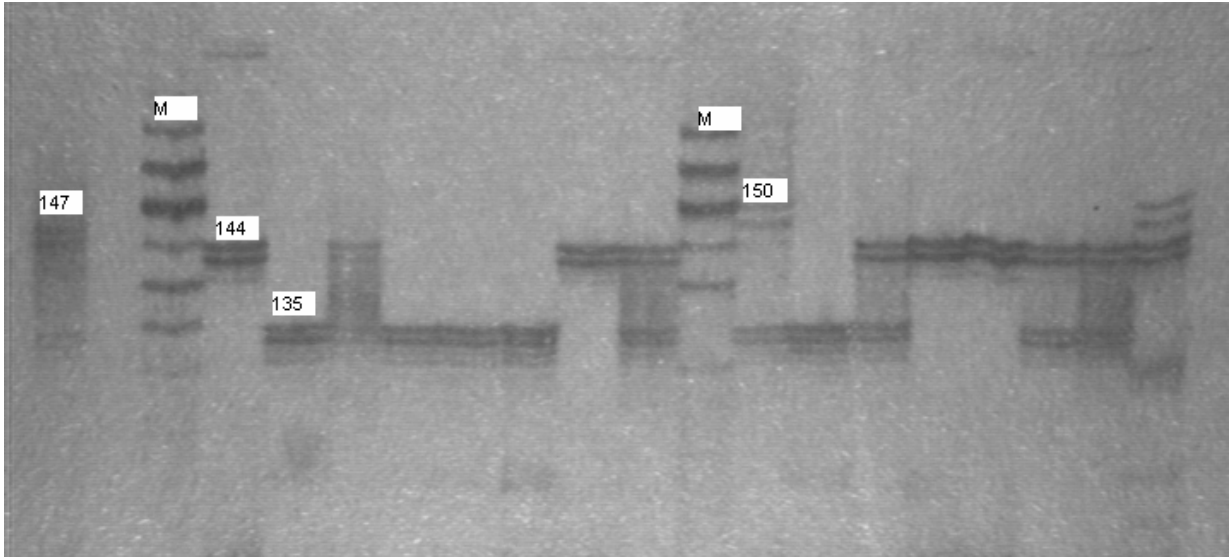


Figura 4. Fotografía polimorfismos ST en poliacrilamida 6%

BIBLIOGRAFÍA

1. Marcantonio, Sergio. Para predecir el potencial productivo. Año VIII –N° 114 - Marzo de 2004
2. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Borone, M., Leopold, L., Friedman, JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32
3. Houseknecht, KL., Portocarrero, CP. 1998. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic Anim. Endocrinol.* 15: 457–475.
4. Stone, RT., Kappes, SM., Beattie, CW. 1996. The bovine homologue of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genome.* 7:399-400.
5. Pomp, D., Zou, T., Clutter, AC., Barendse, W. 1997. Rapid communication: Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *J. Anim. Sci.* 75:1427.
6. Wilkins, RJ., Davey, HW. 1997. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. *Animal Genetics* 28:376.
7. Muller, G., Ertl, J., Gerl, M., Preibisch, G. 1997. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes, *J. Biolog. Chem.* 272:10585-10593.
8. Muoio, DM., Dohm, GL., Tapscott, EB., Coleman, RA. 1999. Leptin opposes insulin's effect on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice, *Am. J. Physiol.* 276:913-921.
9. Liefers, SC., Te Pas, MFW., Veerkamp, RF., Van Der Lende, T. 2002. Associations Between Leptin Gene Polimorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake and Fertility in Holstein Heifers. *Journal of Dairy Science* 85:1633-1638
10. Oprzadek, J., Flisikowski, K., Zwierzchowski, L., Dymnicki, E. 2003. Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black and White bulls. *Anim. Sci. Papers and Rep.* 21:135–145.

11. Buchanan, FC., Van Kessel, AG., Waldner, C., Christensen, DA., Laarveld, B., Schmutz, SM. 2003. Hot Topic: An Association Between a Leptin Single Nucleotide Polymorphism and Milk and Protein Yield. American Dairy Science Association. J. Dairy Sci. 86:3164–3166.
12. Buchanan, FC., Fitzsimmons, CJ., Van Kessel, Andrew, G., Thue, TD. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. INRA, EDP Sciences. Genet. Sel. Evol. 34:105_116.
13. Nkrumah, JD., Li, C., Basarab, JA., Guercio, S., Meng, Y., Murdoch, B., Hansen, C., Moore, SS. 2004. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, growth, feed efficiency, feeding behaviour and carcass merit. Can. J. Anim. Sci. 84:211–219.
14. Geary, TW., McFadin, EL., MacNeil, MD., Griggs, EE., Short, RE., Funston, RN., Keisler, DH. 2003. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. J. Anim. Sci. 81:1-8.
15. Fitzsimmons, CJ., Schmutz I, SM., Bergen, RD., McKinnon, JJ. 1998. Effects of the obese gene in beef cattle on carcass fat characteristics. San Diego, Calif. *Plant and Animal Genome*. VI, Jan 18-22.
16. Hale, CS., Herring, WO., Johnson, GS., Shibuya, H., Lubahn, DB., Keisler DH. 1998. Evaluation of the leptin gene as a possible marker of carcass traits in angus cattle. UMC Animal Sciences Departmental Report. 25 – 27
17. Tessanne, K., Hines, HC., Davis, ME. 1999. Relationships of Polymorphisms in the Bovine Leptin Gene with Differences in Beef Carcass Traits. Research and Reviews: *Beef and Sheep. Special Circular*.170.
18. Moreno, F. 2001. Diversidad genética y relaciones filogenéticas del ganado criollo colombiano. Revista CORPOICA. Volumen 3, numero 2, julio 2002, pag 17-25. Bogota-Colombia
19. Asocriollo, 2002-2003. Razas Criollas y Colombianas mas puras. Memoria convenio 135-01.
20. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. www.fao.org/index_es.htm
21. Savell, JW., Cross, HR. 1998. The role of fat in the palatability of beef, pork, and lamb. In: Designing Foods, Animal Product Options in the arketplace, pp. 345–55. National Academic Press, Washington, D.C.

22. Wheeler, TL., Cundiff, LV., Koch, RM. 1994. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos Taurus* and *Bos Indicus* cattle. *Journal of Animal Science* 72, 3145–51.
23. Miller, MF., Huffman, KL., Gilbert, SY., Hamman, LL., Ramsey, CB. 1995. Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *J. Anim. Sci.* 73:2308-2314.
24. Savell, JW., Cross, HR., Francis, JJ., Wise, JW., Hale, DS., Wilkes, DL., Smith, GC. 1989. National consumer retail beef study: Interaction of trim level, price and grade on consumer acceptance of beef steaks and roasts. *J. Food Qual.* 12:251-274.
25. Smith, GC., Savell, JW., Cross, HR., Carpenter, ZL., Murphey, CE., Davis, GW., Abraham, HC., Parrish, FC., Jr., Berry, BW. 1987. Relationship of USDA quality grades to palatability of cooked beef. *J. Food Quality.* 10:269-286. Smith et al. (1984)
26. United States Department of Agriculture. 2001a. United States standards for grades of carcass beef. Available at <http://www.ams.usda.gov/lsg/stand/standards/beefcar>. PDF Accessed: March 13, 2003.
27. Hossner, KL. 1998. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production. *Canadian Journal of Animal Science* 78, 463-472.
28. Halaas, JL., Gajiwala, KS., Maffei, M. 1995. Weight reducing effects of the plasma protein encode by the obese gene. *Science* 269:543-6
29. Madij, T., Boguski, MS., Bryant, SH. 1995. The reading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* 373:13-8.
30. Rock, FL., Altmann, SW., van Heek, M., Kastelein, RA., Bazan, JF. 1996. The leptin haemopoietic cytokine fold is stabilized by an intrachain disulfide bond. *Horm Metabol Res* 28:649-52.
31. Campfield, LA., Smith, FJ., Guisez, Y., Devos, R., Burn, P. 1995. Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-9.
32. Caro, JF., Sinha, MK., Kolaczynski, JW., Zhang, PL., Considine, RV. 1996. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes* 45:1455-62.
33. Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta derived hormone in humans. *Nature Med* 3:1029-33.

34. Esler, M., Vaz, M., Collier, G. 1998. Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidneys. *Lancet* 351:870.
35. Jeanrenaud, FR., Jeanrenaud, B. 1996. Obesity, leptin and the brain. *N Engl J Med* 334:324-5.
36. Schwartz, MW., Seeley, RJ., Campfield, LA., Burn, P., Baskin, DG. 1996. Identification of targets for leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98:1101-6.
37. Blum, WF., Englaro, P., Hanitsch, S., Juul, A., Hertel, NT., Muller, J. 1997. Plasma leptin levels in health children and adolescents: Dependence on body mass index, body fat mass, gender pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metabol* 82:2904-10.
38. García-Mayor, RV., Andrade, MA., Rios, M., Lage, M., Dieguez, C., Casanueva, FF. 1997. Serum leptin levels in normal children: Relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metabol* 82:2849-55.
39. St George, IM., Willians, S., Silva, PA. 1994. Body size and the menarche: The Dunedin study. *J Adolesc Health* 15:573-6.
40. Tartaglia, LA., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos R et al., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor. *OB-R Cell* 83(7):1263–71.
41. Cioffi, JA., Shafer, AW., Zupancic, TJ., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D. 1996. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2:585-589.
42. Tartaglia LA. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272(10):6093–6.
43. Marcajova, M., Lamosova D. y Zeman. 2004. Role of leptin in farm animals: a Review. *J.Vet Med A* 51, 157-166
44. Mounzih, K., Lu, R., Chehab, FF. 1997. Leptin treatment rescues sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 138:1190-1193
45. Chehab, FF., Mounzih, R Lu., Lim, ME. 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* (Wash., DC 271:994-996)
46. Fehmann, HC., Peiser, C., Bode, HP. 1997. Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* 18: 1267-1273

47. Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, JL. 1997. Acute stimulation of glucosa metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389,374-377
48. Lostao, MP., Urdaneta, E., Martinez-Anso, E. 1998. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effects on sugar absorption. *FEBS Lett.* 423, 302-306.
49. Lord, GM., Matareser, G., Howard, JK., Baker, JR., Bloom, SR., Lechler, LI. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897-901
50. Ahima, RS., Bjorbaek, C., Osei, SY., Filer, JS., 1999. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology.* 140:2755-2762
51. Bidwell, CA., Ji, S., Frank, GR., Cornelius, SG., Willis, GM., Spurlock, ME. 1997. Cloning and expression of the porcine obese gene. *Animal Biotechnology* 8:191–206.
52. Ji, S., Willis, GM., Scott, RR., Spurlock, ME. 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Anim. Biotechnol.* 9:1–14.
53. Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazadi, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosada, K., Yoshimasa, Y., Jingami, H., Kawada, T., Nakao, K. 1995. Human obese gene expression: Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44: 855-858
54. Ramsay, TG., Yan, X., Morrison, C. 1998. The obesity Gene in Swin: Sequence and expression of porcine Leptine. *J. Anim Sci.* 76:484-490.
55. Taouis, M., Derouet, M., Chevalier, B., Simon, J. 1993. Corticosterone effect on insulin receptor number and kinase activity in chicken muscle and liver. *Gen Comp Endocrinol* 89: 167-175
56. Johnson, RM., Johnson, TM., Londrville, RI. 2000. Evidence for leptin expression in fishes. *J Exp Zool* 286:718-724
57. Muruzábal, FJ., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Archanco, M., Burrel, MA. 2002. Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gen Comp Endocrinol* 128: 149-152
58. Tokuda, T., Matsui, T., Yano, H. 1999. Leptin concentrations in the blood of ruminants. *South African Soc Anim Sci* 29:211–2.
59. Friedman, JM & Halaas, JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* Vol 395. 22 October 1998 www.nature.com

60. Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Sánchez-Margalet, V. 1999. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell. Immunol.* 194:6–11.
61. Fantuzzi, G., Faggioni, R. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*; 68(4):437-46.)
62. Chilliard, Y., Ferlay, A., Delavaud, CY, Bocquier, F. 1998. *Int. J. Obesity.* 22 (Suppl. 3): S171 (Abstract).
63. Ji, SQ., Willis, GM., Scott, RR., Spurlock, ME. 1997. *J. Anim. Sci.* (Supl. 1):167 Abstrac
64. Kumar, B., Francis, SM., Suttie, JM., Thompson, MP. 1998. *Comp. Biochem. Physiol.* 120: 543-548.
65. Cassady, JM. 2000. Initial body composition modulates reproductive response of heifers to nutritional manipulation. M.Sc. Thesis, University of Minesota
66. Thomas, MG., Enns, RM., Hallford, DM., Keisler, DH., Oseidat, BS., Morrison, CD., Hernandez, JA., Bryant, WD., Flores, R., Lopez, R., Narro, L. 2002. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. *J. Anim. Sci.* 80: 757–767.
67. Álvarez Expósito, D., Domínguez Ronquillo, D.; Estrada Viamontes, R., Ventura Combarro, E., Vega Marrero, N. 2005. Fisiología de la hormona Leptina. Revisión bibliográfica Revista Estudiantil de las Ciencias Médicas 16 de abril. URL: <http://www.16deabril.sld.cu/>
68. Aizawa-Abe, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Nakao, K. 2000. Ob gene. *Nippon Rinsho*; 58 Suppl 1:551-5.
69. Woods, SC., Seeley, RJ. 2000. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 16(10):894-902.
70. Anon., 1999. Regulación de la adiposidad corporal y del balance energético. *Rev. Cuba endocrinol.* 10(3):165-6.
71. Woods, SC., Schwartz, MW., Baskin, DG., Seeley, RJ. 2000. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 51:255-77.
72. Liefers, SC., Veerkamp, RF., Te Pas, MFW., Chilliard, Y., Van Der Lende, T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* 29 :227-238

73. Miller, SA., Dykes, DD., Poletsky, HF. 1988. A Simple Salting Out Procedure For Extracting DNA From Human Nucleated Cells. *Nucl Acids Res* 16: 1215.
74. Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (versión 3.3): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Heredity* 86:248-249
75. Haegeman, A., van Zeveren, A., Peelman, LJ. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Anim. Genet.* 31 (2000) 79.
76. Guerra, MT., Trujillo, E., Cerón-Muñoz, M. 2005. Estimación de polimorfismos del gen leptina bovino en poblaciones de las razas criollas Hartón del Valle, Blanco Orejinegro (BON) y en la raza Brahman. *Rev Col Cienc Pec Vol.* 18:3, pag. 215-221