



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS**

## **CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

### **EVALUACION DEL POLIMORFISMO DEL GEN LEPTINA EN BOVINOS EN EL SISTEMA DOBLE PROPOSITO EN CHIAPAS, MEXICO**

**JORGE ALBERTO ORTIZ SALAZAR**

#### **T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2011**

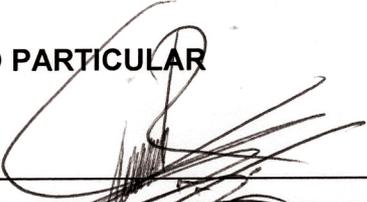
La presente tesis titulada: "EVALUACION DEL POLIMORFISMO DEL GEN LEPTINA EN BOVINOS EN EL SISTEMA DOBLE PROPOSITO EN CHIAPAS, MEXICO", realizada por el alumno: JORGE ALBERTO ORTIZ SALAZAR, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



---

DR. CESAR CORTEZ ROMERO

ASESOR



---

DR. JAIME GALLEGOS SANCHEZ

ASESOR



---

DR. BENIGNO RUIZ SESMA

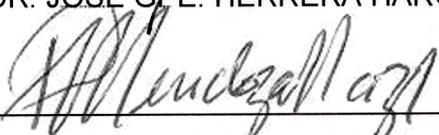
ASESOR



---

DR. JOSE GPE. HERRERA HARO

ASESOR



---

DRA. PAULA MENDOZA NAZAR

ASESOR



---

DR. CLEMENTE LEMUS FLORES

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2011.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico que hizo posible mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, por haberme brindado la oportunidad de obtener una formación académica de excelencia en su postgrado.

A la línea de investigación número 11 “Sistemas de producción agrícola, pecuaria, forestal, acuícola y pesquera”, sublínea de investigación; “Sistemas de Producción Intensivo, extensivo, en vida libre y traspatio”, por brindarme el financiamiento del proyecto de investigación.

Así mismo, a la línea de investigación No. 5 (LPI-5): Biotecnología microbiana, vegetal y animal, por el apoyo brindado con financiamiento de reactivos y material de laboratorio durante el presente trabajo.

Al Dr. Benigno Ruiz Sesma, por su amistad sincera, sus valiosas enseñanzas y su apoyo incondicional y económico para la realización de este trabajo. Mi más grande admiración y respeto.

Mi Consejero Dr. Cesar Cortez Romero, por sus valiosas enseñanzas y observaciones e incondicional disposición en la organización, dirección y culminación del presente trabajo.

Al Dr. José Gpe. Herrera Haro por sus consejos profesionales y personales, por su apoyo y disposición en la revisión de este trabajo.

A los miembros de mi Consejo Particular: Dr. Jaime Gallegos, Dra. Paula Mendoza Nazar, Dr. Juan Salazar Ortiz y el Dr. Clemente Lemus Flores. Gracias por sus observaciones, consejos y valiosas sugerencias.

# DEDICATORIA

A mis padres:

† Salvador Ortiz y Ma. Santos Salazar

Por darme su confianza incondicional para seguir adelante en mi superación. Mi agradecimiento por siempre con mucho AMOR

A todos mis hermanos por el apoyo y confianza que me han brindado para alcanzar mis sueños

A mis amigos del Colegio y del alma: Benigno, Paula, Sonora, Toño (borrego), Juanjo, Cigarroa, Charly, Edwin, Ivan Gutierrez, Jorge Villarreal, Jaime Sánchez, Alejandra Herrera, Nallely, Dianita, Toño (frijol) Enrique Hernández, Huguito, Mich, Vlady y a todos los integrantes del equipo de futbol de Ganadería quienes me brindaron su amistad y apoyo incondicional y compartir tantos momentos inolvidables durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2011.**

**EVALUACION DEL POLIMORFISMO DEL GEN LEPTINA EN BOVINOS EN EL SISTEMA DOBLE PROPOSITO EN CHIAPAS, MEXICO**

Jorge Alberto Ortiz Salazar, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011.

**RESUMEN**

La leptina es una hormona proteica de 16 KDa, compuesta de 146 aminoácidos y es sintetizada principalmente por el tejido adiposo. En el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, la leptina juega un papel muy importante en la regulación de la reproducción de los mamíferos. La mutación del gen leptina TT está asociado con la calidad de la carne y leche en bovinos. El objetivo de este estudio fue estimar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) del gen leptina en el exon 2, en vacas y sementales del sistema de producción doble propósito en el estado de Chiapas, México. El polimorfismo fue determinado mediante la técnica Tetra Primers Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction (AMRS-PCR). Se evaluaron 120 vacas y 21 sementales, las frecuencias genotípicas y alélicas para cada raza, fueron analizadas con la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg por el método de las cadenas de Markov. El 40 % de las vacas fueron raza Suizo Americano, 20 % Simmental y el 14.2 % de Cruzas raciales de dichas razas (*Bos taurus x Bos indicus*). Los sementales evaluados fueron de la raza Suizo Americano (48%) y Suizo Americano X *Bos indicus* (52%). El análisis de resultados para el polimorfismo del gen leptina mostró al genotipo TT (gen modificado o mutado) con el 0.22 y 0.28 para las vacas y sementales, respectivamente; y el genotipo CC (gen común u homocigótico) presentó el 0.36 y 0.05, respectivamente. El genotipo CT se observó en mayor frecuencia en todas las razas, cruas y sexo evaluados, con respecto a los genotipos CC y TT ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ). Probablemente la baja frecuencia del genotipo TT se debe principalmente, al criterio de selección y reemplazo de vaquillas y toretes; sin considerar la información de los registros genealógicos e indicadores productivos de calidad de carne y que posiblemente estén asociados al polimorfismo TT del gen leptina.

Palabras clave: gen leptina, polimorfismo, doble propósito, técnica ARMS-PCR.

## EVALUATION OF LEPTIN GENE POLYMORPHISM IN THE BOVINE DUAL PURPOSE SYSTEM IN CHIAPAS, MEXICO

Jorge Alberto Ortiz Salazar, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011.

### ABSTRACT

Leptin is a protein hormone of 16 kDa, composed by 146 amino acids and is predominantly synthesized by adipose tissue. In the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, the leptin plays an important role in the regulation of mammalian reproduction. TT mutation of the leptin gene is associated with meat and milk quality in cattle. The aim of this study was to estimate the genotypic and allelic frequencies of the polymorphism (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) in exon 2 of leptin gene in cattle dual purpose system production in Chiapas México. The polymorphism was determined by Tetra Primers Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction (AMRS-PCR) test. 120 cows and 21 sires were evaluated and genotypic and allelic frequencies for each breed were analyzed by Hardy-Weinberg equilibrium method by the Markov chains test. 40% of the cows were Swiss Brown American and 20% Simmental breed and 14.2% of Racial Crossbreed (*Bos taurus* x *Bos indicus*). The sires were Swiss Brown American (48%) and crossbreed (*Bos indicus* X Swiss Brown American, 52%). Results for the leptin gene polymorphism TT genotype (modified gene) showed 0.22 and 0.28 for cows and sires, respectively; and the CC genotype (homozygous gene) had 0.36 and 0.05, respectively. CT genotype was frequently observed in all breeds, crossbreed and sex evaluated with respect to the CC and TT genotypes ( $\chi^2$ ,  $P>0.05$ ). Probably, low frequency of TT genotype is due mainly to the selection criteria and replacement heifers and steer, without considering information from genealogical records and productive indicators of meat quality, and likely to be possibly are associated with leptin gene polymorphism TT.

Key words: leptin gen, polymorphisms, dual purpose system, ARMS-PCR test.

## CONTENIDO

	Pag.
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISION DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. Sistema de producción doble propósito en América Latina .....	4
2.1.1. Viabilidad, rentabilidad y cambio técnico de los sistemas de doble propósito .....	6
2.1.2. Desafíos de los sistemas doble propósito en México .....	7
2.2. Mejoramiento genético y selección animal .....	8
2.3. Selección asistida por marcadores moleculares .....	10
2.3.1. Uso de marcadores moleculares en el área animal .....	11
2.3.2. Selección tradicional, selección asistida por marcadores, genes y QTL .....	13
2.3.3. Uso comercial de marcadores genéticos en especies zootécnicas .....	16
2.4. Técnicas moleculares en el análisis y tipificación del ADN .....	19
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	19
2.4.2. Detección del SNP .....	23
2.4.3. Sistema de Amplificación Refractario de Mutaciones (ARMS- PCR) .....	24
2.5. Genes candidatos .....	26
2.6. El gen leptina y su receptor .....	27
2.7. El polimorfismo del gen leptina en bovinos .....	30
2.8. Función de la leptina en reproducción animal .....	30
2.8.1. Relación de la leptina con el inicio de la pubertad .....	32
2.8.2. Leptina y sus efectos en la pubertad .....	34

2.8.3. Sitios de acción y función hipotalámica de la leptina .....	35
2.8.4. La leptina y su relación con la secreción de hormonas hipofisiarias .....	36
2.8.5. La expresión de los receptores de leptina y su función en la esteroidogénesis ovárica .....	37
2.8.6. Efectos de la leptina en la ovulación .....	38
2.8.7. Función de leptina en desarrollo embrionario e implantación ..	40
2.8.8. Expresión de receptores y función de la leptina en el testículo.	38
2.8.9. Efectos inhibitorios de la leptina en testículo .....	41
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>43</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1. Localización del área de estudio .....	45
4.2. Animales y muestras de sangre .....	46
4.3. Preparación de las muestras para PCR .....	46
4.4. Procedimiento de la técnica ARMS-PCR .....	47
4.5. Análisis Estadístico .....	53
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
5.1. Frecuencias genotípicas de leptina .....	54
5.2. Frecuencias alélicas del gen leptina .....	56
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Marcadores utilizados a escala comercial para ser tomados en cuenta en la selección de individuos asistida por marcadores-genes .....	17
Cuadro 2. Frecuencias genotípicas del gen leptina de vacas en el municipio de Villaflores, Chiapas .....	58
Cuadro 3. Frecuencias genotípicas del gen leptina de toros en el municipio de Villaflores, Chiapas .....	59
Cuadro 4. Frecuencias alélicas del gen leptina de vacas en el municipio de Villaflores, Chiapas .....	60
Cuadro 5. Frecuencias alélicas del gen leptina de toros en el municipio de Villaflores, Chiapas .....	60

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Diagrama representativo de identificación de un SNP del gen leptina mediante la técnica ARMS-PCR .....	25
Figura 2. Isoformas del receptor de leptina y algunas mutaciones en roedores utilizados como modelos de obesidad .....	28
Figura 3. Localización del receptor de leptina en el cerebro de rata .....	29
Figura 4. Localización del municipio de Villaflores, Chiapas .....	48
Figura 5. Extracción de sangre de la arteria coccígea de vacas .....	49
Figura 6. Procedimiento para la extracción del ADN a partir de sangre de vacas. a) Tubos con muestras de sangre con EDTA b) Colocación de la sangre en tubos de eppendorf y agua fría c) Mezclado en vortex de solución lisis y suero para desintegrar pastilla d) Centrifugado de tubos eppendorf y recuperación de pastilla e) Secado de la pastilla de ADN en estufa a 37 °C y f) Almacenamiento de ADN resuspendido .....	51
Figura 7. Esquema de la acción de los Primers para la identificación de alelos de un SNP y genotipos del Gen Leptina en vacas (CC; CT y TT) .....	53
Figura 8. Preparación de las muestras de ADN para su amplificación en la técnica AMRS-PCR. a) Preparación de la mezcla con primers y reactivos en microtubos de digestión de PCR b) Colocacion de microtubos de digestión de PCR en el Termociclador c) Depósito del producto final de PCR en los pozos del gel de agarosa d) Cámara de electroforesis cargada con los productos de PCR e) Fotodocumentador para visualización del gel de agarosa f) Gel de agarosa en el fotodocumentador .....	55
Figura 9. Ejemplo de los resultados de la amplificación del ADN del gen leptina en ARMS-PCR por electroforesis en gel de agarosa, mostrando las frecuencias: leptina común (CC, 239 y 164 pb), leptina heterocigoto (CT, 239, 164 y 131 pb) y leptina modificada o mutada (TT, 239 y 131 pb), usando un marcador de 100 pb y un testigo en blanco .....	57

## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas existe un gran interés a nivel internacional, en desarrollar estrategias para transformar la ganadería extensiva tradicional, modulando y mejorando los sistemas de producción y conservando los recursos naturales, obtener mayor eficiencia biológica, económica y de autoconsumo en producción de carne, leche, lana y subproductos de origen animal (Speeding, 1995; Heitschmit *et al.*, 1996). En América tropical, uno de los sistemas ganaderos predominantes es el doble propósito semi-intensivo, en ranchos de pequeño a mediano tamaño y comúnmente asociados a cultivos agrícolas (Toledo, 1994).

En México, la región tropical ocupa aproximadamente el 25% del territorio nacional; además, cuenta con un inventario de ganado de aproximadamente 12 millones de cabezas en condiciones de pastoreo (40% del inventario nacional), que producen el 39% de la leche que se consume en México (INEGI, 2004).

El trópico mexicano ha sido una de las regiones, que por su gran riqueza de recursos naturales, ha constituido una de las principales zonas para impulsar la producción de alimentos en especial de origen animal. Así, a partir de la década de los 60's la economía regional opera un cambio sustancial, ya que el trópico se convierte en el pivote de la ganadería bovina nacional (Osorio, 1998). Particularmente, en el estado de Chiapas, la ganadería de doble propósito tiene gran importancia económica y social, y aporta el 92% del volumen total de leche producida, y por incluir el 60% de los bovinos en esta actividad productiva (INEGI, 2004).

En los últimos años, en el país se han desarrollado nuevas disciplinas y conocimientos vinculados con la biotecnología animal, que están modificando significativamente los avances de la industria pecuaria. Su impacto en la ganadería de los países desarrollados es evidente, mientras que en los países en vías de desarrollo dicho impacto apenas comienza a apreciarse (CONARGEN, 2000).

En este sentido, se ha desarrollado una estrategia denominada Selección Asistida por Marcadores (SAM), que ofrece beneficios potenciales cuando se incluyen caracteres de baja heredabilidad, difíciles y costosos de medir o que se evalúan en animales adultos o que ya se han expresado las características de interés. Estas metodologías pueden contribuir a una mejor selección de características como: resistencia a enfermedades, calidad de la canal, fertilidad, eficiencia productiva, calidad y cantidad de leche, habilidad materna y crecimiento, entre otras.

Mediante la ayuda de marcadores genéticos se facilita emprender programas de mejoramiento genético más efectivos. Además, es posible la búsqueda, clonación y aprovechamiento de genes novedosos, que pueden ser importantes en la producción animal, en general, y en la industria de la biotecnología, en particular.

En los programas de mejoramiento genético es importante la participación y consenso de los criadores de ganado de registro, técnicos e instituciones de educación y de las instituciones del sector público, como la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), para lograr un mayor avance genético por generación de selección. Así mismo, es importante invertir en proyectos de investigación orientados a la evaluación de la capacidad

productiva y diversidad genética; y la identificación y utilización de genes que participan en rasgos económicamente productivos. Bajo este contexto, se tiene como objetivo estimar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo del gen leptina en el ganado de doble propósito en Chiapas (Suizo Americano y cruza racial), prospectos a reproductores de los sistemas de producción bovina de doble propósito.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Sistema de producción doble propósito en América Latina

En Latinoamérica la producción ganadera bovina tradicionalmente ha sido una de las principales actividades productivas del sector agrícola, lo cual obedece en gran parte a la abundante disponibilidad de recursos forrajeros y extensos pastizales nativos con que cuenta la región. Por esta circunstancia, América Latina y el Caribe (ALC) actualmente tiene un área total en forrajes permanentes de 602 millones de hectáreas y un inventario bovino de 359 millones de cabezas, del cual 40 millones (11.1%) corresponde a vacas en ordeño (FAO, 2002).

La franja tropical de ALC, contabiliza la mayor parte de los recursos forrajeros y ganaderos: el 72% de los pastos, el 82% del ganado total y el 88% de las vacas en ordeño. En 2001, la producción bovina de América Latina Tropical equivalía al 13% del valor de la producción ganadera mundial y al 35% al conjunto de países en desarrollo. A pesar de su enorme dotación de recursos forrajeros, la ganadería de los trópicos latinoamericanos enfrenta agudos problemas relacionados con la cantidad, calidad y producción de forrajes; en particular, durante los prolongados períodos secos. Este es un problema a gran escala y obedece en gran parte, a que una elevada fracción de la base forrajera disponible está conformada por pastos nativos, adaptados pero de baja producción, y por especies introducidas altamente degradadas (FAO, 2002).

En la ganadería tropical coexisten múltiples sistemas de producción en diferentes pisos térmicos, distintos grados de intensificación y ubicados en ambientes socioeconómicos de muy diversa naturaleza. Pero dentro de esta amplia gama,

sobresale por su magnitud y dinámica de crecimiento, el doble propósito o producción mixta de carne y de leche (Rivas y Holmann, 2002).

Desde el punto de vista socioeconómico es pertinente resaltar que en los sistemas ganaderos de doble propósito predominan los pequeños y medianos productores, con recursos físicos, técnicos y financieros muy limitados y frecuentemente ubicados en áreas de producción marginales, bien sea por su ubicación geográfica o por la pobre calidad de sus recursos productivos. Dentro de la producción lechera se distinguen dos modalidades, el doble propósito y los sistemas especializados. En ambos grupos se observan diferentes grados de intensificación, pero los últimos se destacan por su mayor nivel tecnológico, volumen de inversión y alta calidad de sus recursos productivos (Rivas, 1992).

Aspectos técnicos y económicos ampliamente estudiados, explican la racionalidad del doble propósito y su perdurabilidad aún en las condiciones económicas más adversas. Las consideraciones sobre su baja rentabilidad pierden fuerza ante su gran viabilidad para los pequeños y medianos productores. El uso intensivo de mano de obra familiar, el empleo de recursos de limitados usos alternativos, y en consecuencia de bajo costo de oportunidad y la característica especial del doble propósito de ser una fuente de ingreso, empleo y capitalización para grupos de población de bajos ingresos, hacen que la aplicación de políticas económicas y tecnológicas que afecten a los sistemas mixtos, tengan implicaciones importantes sobre los niveles de pobreza, el empleo rural, la equidad social y la conservación de los recursos naturales (Holmann, 1998).

### **2.1.1 Viabilidad, rentabilidad y cambio técnico de los sistemas de doble propósito**

Una idea generalizada es que el doble propósito es una actividad económica de baja productividad y rentabilidad. Este razonamiento surge al comparar su desempeño productivo y económico con el de los sistemas especializados de producción de carne y leche. Este punto de vista es algo superficial, dado que no toma en cuenta las circunstancias técnicas, económicas y aún sociales específicas, de los diferentes modos de producción ganadera.

Una de las principales características de los suelos en las regiones tropicales, particularmente los de las áreas de pastizales, es su baja fertilidad, asociada con problemas físicos y químicos como la acidez, la susceptibilidad a la erosión y en general, la fragilidad de su estructura física. Muchos de ellos no son apropiados para la siembra de cultivos, por lo cual, la ganadería extensiva se constituye en casi su única forma de explotación comercial.

Al utilizar adecuadamente los recursos naturales disponibles y de bajo costo de oportunidad, el doble propósito se ajusta perfectamente a la dotación de recursos de la región. Los sistemas ganaderos especializados generalmente se ubican en las tierras de mejor calidad y alto precio, con buena infraestructura de vías y fácil acceso a los principales mercados. Presentan una mayor inversión en infraestructura física y equipos, su hato ganadero es altamente especializado y con frecuencia enriquecen la dieta suministrando concentrados y subproductos de las cosechas. Bajo estas circunstancias, establecer comparaciones de rentabilidad entre los diferentes sistemas sin considerar la calidad y cantidad de recursos que controlan, puede conducir a conclusiones erradas (Rivas y Holmann, 2002).

### **2.1.2 Desafíos de los sistemas doble propósito en México**

En México, las tendencias poblacionales y de urbanización son similares a las de Latinoamérica (CONARGEN, 2000), lo cual constituye un reto para el sector ganadero, que deberá contribuir con productos pecuarios de alto valor que la población demanda, sin soslayar los retos que impone la globalización de los mercados. Por otro lado, las regiones tropicales (seca y húmeda) tienen un gran potencial para producir carne y leche y satisfacer el mercado nacional. Las zonas tropicales ocupan aproximadamente el 25% del territorio nacional (INEGI, 2004) y cuentan con abundantes recursos para contribuir a satisfacer la demanda local y pueden ser un detonante para el desarrollo socioeconómico regional.

El uso ordenado del suelo, agua, planta es prioritario tanto a nivel mundial como nacional (Nicholson *et al.*, 1995; Blake y Nicholson, 2002; Gómez *et al.*, 2002; Tewolde *et al.*, 2002; Boyazoglu y Nardote, 2003) y deben ser considerados como piezas fundamentales para las políticas y programas de desarrollo de las regiones tropicales orientadas a aumentar la producción de leche y carne de bovino. Además, hay que reconocer que en estas regiones la estacionalidad (época de seca) es uno de los factores ecológicos más crítico de la productividad de los sistemas de producción de rumiantes en pastoreo, lo que sugiere que el principal objetivo de las tecnologías sea mejorar la eficiencia en la utilización de los recursos alimenticios disponibles durante el año para producir más leche y carne.

La baja eficiencia reproductiva de los hatos de doble propósito en esta región influye directamente en la productividad individual y del hato (Magaña y Delgado, 1998; Osorio y Segura, 2002; Teyer *et al.*, 2003; Parra-Bracamonte *et al.*, 2005). La

principal causa de la baja fertilidad se asocia a fallas en el manejo nutricional, reflejándose en condición corporal y peso vivo bajos al parto y en pérdidas durante el posparto, lo que contribuye a que el intervalo parto-concepción sea mayor a 120 días posparto en más del 50% de las vacas y esta condición reduce el número potencial de vacas a ordeñarse al año (Magaña *et al.*, 1996; Magaña y Delgado, 1998; Delgado, 2000; Delgado *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 2002).

A pesar de las bondades y oportunidades que representa el trópico para incrementar la producción de leche nacional, existe una falta de información sobre costos y beneficios comparativos de las alternativas tecnológicas disponibles para aumentar la producción de leche por lactancia. Esta falta de información limita el desarrollo y mejoramiento integral del sistema bovino de doble propósito.

## **2.2 Mejoramiento genético y selección animal**

El Mejoramiento Genético Animal (MGA) consiste en aplicar principios biológicos, económicos y matemáticos, con el fin de encontrar estrategias óptimas para aprovechar la variación genética existente en una especie de animales 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 MGA involucra procesos de evaluación genética y difusión del material genético seleccionado, en los cuales se pueden usar tecnologías reproductivas artificiales tales como la inseminación artificial (IA), la ovulación múltiple y transferencia embrionaria (OMTE), la fertilización *in vitro* de embriones, así como el uso de marcadores de ADN (Montaldo, 1993).

La herramienta que más ha impactado el mejoramiento animal es el control de producción. La medición objetiva de la producción de los animales sirve para hacer evaluaciones de los mismos para la selección, evaluar las razas y cruzas, estimar los parámetros requeridos para los programas genéticos, medir aspectos económicos y optimizar el proceso (Henderson, 1984).

La aplicación de la genética cuantitativa en el mejoramiento de los animales de interés zootécnico, permite obtener reproductores sobresalientes en características de importancia económica de interés al productor. Así, en la mayoría de los sistemas de producción se evalúan y seleccionan reproductores para reemplazo utilizando la información derivada del comportamiento individual del animal y de sus parientes cercanos (Díaz, 1994; Bourdon, 1998). La calidad genética es el resultado de diferentes combinaciones genotípicas y del ambiente en que se desarrolla (Falconer, 1981; Curtís et al., 2001). Esta información permite la estimación del valor genético de un animal utilizando procedimientos basados en modelos mixtos (Díaz et al., 2000; Herrera et al., 2003).

La genética cuantitativa tiene éxito en áreas que incluyen el análisis de las bases genéticas de la variación morfológica, para el desarrollo de estrategias para la caracterización de genes que se puedan “cuantificar”, *loci* de caracteres cuantitativos (QTL-Quantitative Trait Loci); la selección asistida por marcadores (SAM), en el caso de características influenciadas por varios genes (poligénicas) y la selección asistida por genes (SAG), en el caso de características influenciadas por un solo gen ó monogénicas. La SAM y la SAG son dos herramientas poderosas en el mejoramiento de plantas y animales (de Vienne, 2003; Dekkers, 2004; Makker, 2005).

La selección animal aprovecha la gran variabilidad genética de las poblaciones, escogiendo líneas maternas y paternas que incluyen a los mejores animales en función de objetivos predefinidos y adecuadamente valorados (Montaldo y Barría, 1998). Algunas características motivo de selección no se pueden medir con precisión, razón por la cual, es común utilizar otros caracteres asociados, los cuales son económicamente importantes y fáciles de medir, además de estar correlacionados (Falconer, 1996; Thallman, 2004; Martínez y Parra, 2008).

### **2.3 Selección asistida por marcadores moleculares**

En los últimos años, la genética molecular ha generado importantes avances en la evaluación de reproductores, incorporando técnicas de análisis de ADN que han ayudado a identificar, de forma eficiente, diferencias a nivel de secuencias de nucleótidos entre individuos. Entre las técnicas básicas se incluyen la caracterización de la secuencia de ADN, análisis del genoma, clonación de genes, y mapeo y determinación de polimorfismos (Davis y DeNise, 1998; Casas, 2006).

Casas (2006) y Fujita (2007) señalan que la selección de animales sobresalientes está actualmente relacionada con tecnologías de genética molecular apoyadas en la genética cuantitativa. Así, en la industria comercial bovina la Selección Asistida por Marcadores (SAM) es una de las técnicas que se ha incorporado al diagnóstico e identificación de características de importancia económica, como las relacionadas con aspectos reproductivos, identidad genética, biodiversidad y genética funcional (San Primitivo, 2001; Thallman, 2004).

### **2.3.1 Uso de marcadores moleculares en el área animal**

Un marcador molecular se define como una región del genoma, generalmente de posición conocida, que presenta polimorfismo (Kappes *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 2001). El posicionamiento de marcadores moleculares tiene importantes aplicaciones en el mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL), pruebas de paternidad y estudios de ligamiento. Estos marcadores genéticos se han clasificado de acuerdo al método de selección de polimorfismos (Kappes *et al.*, 1997; Casas, 2006).

Los marcadores moleculares se aplican en diferentes campos de la investigación animal, y se utilizan en el aislamiento de genes con función desconocida, debido al conocimiento de su posición en el genoma, mediante la comparación de mapas genéticos para la ubicación de las alteraciones estructurales del genoma que ocurren durante la diversificación de un género o familia. El campo más favorecido por los marcadores moleculares es la genética cuantitativa, considerada como una “ciencia de las ingenierías” debido a que es más utilizada por los criadores que por los investigadores (de Vienne, 2003).

La clasificación por los criterios moleculares considera dos grupos de marcadores: a) Las secuencias múltiples (incluyendo inserciones y eliminaciones); Polimorfismo en la Longitud de un Segmento Amplificado (AFLP), Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD), Polimorfismo de la Longitud de un Fragmento de Restricción (RFLP), Microsatélites (SSR), Sitios Etiquetados para la Expresión (EST); y b) Polimorfismo de Nucleótido Simple o único (SNP). Las ventajas y desventajas de su uso y aplicación se han discutido recientemente (Zavala-Páramo *et al.*, 2002; Makker, 2005). La identificación de estos marcadores moleculares ha permitido la

determinación del genotipo actual en un locus o loci específico sin errores debidos a los efectos ambientales. En este sentido se pueden identificar genotipos en loci cuyos genes tienen efectos directos sobre una característica particular (Van der Werf, 2000).

Los marcadores genéticos tienen diferentes aplicaciones potenciales en la ganadería como son: el establecimiento de paternidad, identificación oportuna de defectos, identificación de características como la presencia de cuernos o pelaje, identificación de enfermedades genéticas, entre otras (Salazar-Marroquín *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2006). Por otro lado, la respuesta biológica de los individuos en un ambiente dado se establece gracias a uno o un grupo de genes que son los responsables de que un animal sea inferior o superior en cuanto a producción se refiere; que manifieste un color u otro, un incremento en la masa muscular, producción de leche y prolificidad. Independientemente de cuales sean los que se utilicen, los marcadores genéticos pueden aplicarse para identificar algún locus del genoma, que se encuentre cerca de un gen específico que codifique una característica en particular (Anderson, 2001).

Actualmente, con los avances existentes en la selección asistida por marcadores en la producción animal, se comienza a tener una demanda muy localizada y, al mismo tiempo, masiva de genotipados de marcadores situados en las llamadas regiones QTL o loci que afectan o influyen en caracteres cuantitativos, y de genes denominados mayores por ejercer una significativa influencia sobre caracteres productivos (Dekkers, 2004). Al mismo tiempo, los avances en los proyectos genoma están proporcionando abundante información sobre variantes nucleotídicas del ADN,

junto con los registros sistemáticos de fenotipos dentro de grandes grupos de familias, está permitiendo obtener un conocimiento sobre las regiones del ADN (QTLs) que ejercen influencia significativa sobre gran cantidad de caracteres de producción (Knott y Haley, 1992; Haley, 1995; Goddard *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2001; Misztal, 2006; Montaldo y Barria, 1998).

### **2.3.2 Selección tradicional, selección asistida por marcadores, genes y QTL**

La crianza animal moderna comenzó con la utilización de sistemas de cruce entre animales para satisfacer necesidades humanas inmediatas, posteriormente la genética animal moderna surgió cuando los cruzamientos se operaron para el logro de metas bien establecidas: mayor producción de leche y carne, producción eficiente, y camadas más numerosas (Casas, 2004). Estos cruzamientos se realizaban entre individuos cuya información productiva o fenotípica contribuía a identificar los genes que expresan rasgos productivos (Van der Werf, 2000). De este modo, la selección tradicional se basaba en el modelo poligénico de características cuantitativas (BLUP por sus siglas en inglés; best lineal 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).

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 (Montaldo y Meza-Herrera, 1998), así como herramientas para inferir el mérito genético de los animales (diferencia esperada en la progenie [DEP] en bovinos de carne; evaluación genética integral en ganado bovino de leche, comportamiento productivo en cerdos, ovinos y cabras).

Estas herramientas son útiles para el mejoramiento de características productivas en animales de granja, sin embargo, no se sabe cuáles genes son los que contribuyen para una DEP dada, más aún porque las características complejas como peso al nacer, peso al destete, producción de leche, producción de huevo, reproducción, calidad de canal, entre otros, están controlados por muchos genes y también se ven afectados por el medio ambiente (por ejemplo, condiciones de alimentación), por lo que el estudio de la variación dentro de genes está teniendo un gran impacto sobre el fenotipo de animales de granja (Casas, 2006). Si se considera el aspecto genético de una característica, se sabe que los genes se heredan por una misma vía: el individuo recibe dos copias, una del lado paterno y otra del lado materno, el o los alelos que controlan la característica en estas copias pueden ser idénticos o bien diferir uno de otro, por lo que el resultado de su expresión para un fenotipo de interés productivo puede ser positivo o negativo.

Por otro lado, cuando se tiene una DEP positiva para cierta característica se considera correcta porque está basada en el pedigrí (árbol genealógico) y en el fenotipo, y su grado de herencia es mayor que el número promedio de variantes genéticas de cada gen que afecta la característica en particular. El éxito de las herramientas mencionadas se basa en la creencia de que hay un grupo de genes que contribuyen cada uno con poco efecto a tal o cual característica; tal es el caso de los caracteres complejos (como el de crecimiento) que son producto de la expresión de varios genes ligados, cuya expresión individual disminuye notablemente el fenotipo. A este modelo se le conoce como infinitesimal y también

se basa en la selección de los posibles progenitores a través de valores de crianza o cruza cuyo modelo se basa en BLUP (Dekkers, 1999).

La nueva información generada con marcadores genético-moleculares, genes candidatos y QTL, cada vez es más abundante, y ésta puede ser utilizada para diseñar un esquema de SAM o SAG (Dekkers, 2004). Los genes principales (genes mayores) son genes individuales que contribuyen con una proporción significativa en la variación de características económicamente importantes. La biología molecular puede utilizarse para identificar y caracterizar a estos genes. Las decisiones de selección tomadas sobre otras técnicas o modelos de selección como las DEP, cuyo valor económico estriba en estimar el valor de crianza de todos los genes “no marcados” que contribuyen con la característica dada han sido muy útiles, pero si a estas se les agrega la detección o la presencia de un marcador genético-molecular, la selección animal se ejerce con mayor precisión. Sin embargo, la SAM es una herramienta que asiste pero no reemplaza las técnicas tradicionales de selección animal (Van Eenennaam, 2006).

La SAM permite realizar una selección objetiva y confiable de las variaciones específicas del ADN que se encuentran asociadas con una diferencia cuantificable o efecto sobre un determinado carácter o complejo de caracteres. Es importante considerar que la realización de SAM funciona mejor cuando se efectúa en características complejas, como el crecimiento y el marmoleo (distribución de grasa en las fibras musculares en el ganado bovino), las cuales se encuentran asociadas con varios genes que contribuyen juntos para estas características. Esta contribución es particularmente mayor por uno de estos genes el cual es el marcador en cada

caso. Sin embargo, la presencia o ausencia de los genes “no marcadores” y el ambiente determinan si el animal posee el fenotipo deseado (alto peso al destete, alto marmoleo, entre otros) (Casas, 2006; Van Eenennaam, 2006).

### **2.3.3 Uso comercial de marcadores genéticos en especies zootécnicas**

En la actualidad se cuenta con marcadores genéticos confiables que son útiles para la genotipificación y la detección de los individuos que son portadores de genes para producir, con predisposición para desarrollar algún proceso patológico, o genes que confieren resistencia a ciertas enfermedades. Al identificar a los individuos poseedores de estos marcadores se pueden comenzar a diseñar sistemas de mejora genética. En el Cuadro 1 se citan algunos marcadores, genes o QTL que están disponibles a nivel comercial para identificar a aquellos individuos bovinos, porcinos u ovinos portadores de rasgos productivos deseables (miostatina en bovino, gen boorola en ovino) o indeseables (por ejemplo, la rianodina, el gen de hipertermia maligna en cerdo y el gen del síndrome de patas de araña en ovino). Una vez obtenida esta información genética, la misma se puede aplicar para llevar programas de cruzamiento o de mejora genética que incrementen la productividad animal, y eliminen los animales portadores de genes indeseables.

El uso de estas pruebas ayuda a identificar individuos portadores de un marcador para decidir su selección o eliminación según sea la característica probada y deseada.

**Cuadro 1. Marcadores utilizados a escala comercial para ser tomados en cuenta en la selección de individuos asistida por marcadores-genes.**

<b>Especie</b>	<b>Locus/Gen/QTL</b>	<b>Nombre/Función</b>	<b>Características afectadas</b>
<b>Bovino</b>	DGAT1	Diacilglicerol-acetiltransferasa	Composición de la leche
	CAPNI CAST LEP TG	$\mu$ -Calpaina Calpastatina Leptina Tiroglobulina	Terneza de la carne Terneza de la carne Engrasamiento de la canal Engrasamiento intramuscular Doble musculatura
	MSTN IFNG GHR	Miostatina Interferón gama Receptor de la hormona GH	Resistencia a nemátodos Peso al destete y canal
<b>Porcino</b>	HAL/R Yor1	Receptor de rianodina o hipertermia maligna	Rendimiento en canal PSE
	CAST HFABP	Calpastatina Proteína de ligamiento de ácidos grasos	Terneza de la carne 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
	ACT1 ACT2	$\alpha$ -actina $\gamma$ -actina	Fertilidad del verraco Calidad espermática
<b>Ovino</b>	PRNP	Proteína prión	Resistencia/susceptibilidad de scrapie
	CLPG	Gen Callipyge (nalgón)	Producción de músculo/carne
	BOF FGFR3	Gen Boroola Síndrome de patas de araña	Fecundidad/prolificidad Anormalidad esquelética
	IFNG	Interferón gama	Resistencia a nematodos

*Modificado y adaptado de Cokett et al., 1999; Switowski, 2002; Casas et al., 2003; Tupac-Yupanqui et al., 2004; Charon, 2005; Whimmers et al., 2005; Casas 2006.*

La incorporación de la selección asistida por marcadores, dentro de programas de mejora tradicionales, se justifica en los casos de baja eficiencia de los

índices de selección: caracteres difíciles de medir, que manifiesten heredabilidades bajas, que se expresen en un solo sexo o muy tarde en la vida de un animal, y presenten correlaciones genéticas negativas entre caracteres, varianza genética no aditiva e introgresión (Meuwissen *et al* 1994; Haley, 1995; Janss *et al.*, 1995; Goddard, 1992; Cañon, 2006).

La selección asistida por marcadores puede potencialmente contribuir a una mayor ganancia genética por unidad de tiempo al lograr un aumento de la precisión del valor genético al combinar la información fenotípica disponible con la información que proporcionan los marcadores, permitir un incremento de la intensidad de selección al ser posible la selección de individuos sin información fenotípica y reducir el intervalo generacional al disponer de información de selección, incluso antes de que el animal haya nacido (Knott y Haley, 1992; Meuwissen *et al.*, 1992; Meuwissen *et al.*, 1996).

Un ejemplo extremo planteado ya hace más de 10 años bajo el nombre de velogenética (combinación de la SAM y la manipulación de la línea germinal), es la posibilidad de combinar la información fenotípica, la que proporcionan los marcadores moleculares y técnicas de fertilización *in vitro* de ovocitos obtenidos de animales antes de la pubertad, incluso de fetos, el intervalo generacional podría llegar a ser tan reducido como 3-6 meses en el caso de vacuno lechero (Georges y Massey, 1991). La velogénesis proporciona nuevas posibilidades a la selección asistida por marcadores reduciendo los intervalos entre generaciones y permitiendo una mayor velocidad de introgresión de QTLs de interés en diferentes fondos genéticos. Estos métodos de introgresión, al contrario de lo que ocurre con la

transgénesis, respetan tanto la organización como localización cromosómica evitando patrones de expresión aberrantes (Georges y Massey, 1991; Ruane *et al.*, 1997; Wakayama *et al.*, 1998; Cañon 2006; Misztal, 2006; Guillaume *et al.*, 2008).

## **2.4 Técnicas moleculares en el análisis y tipificación del ADN**

Las técnicas de análisis molecular que permiten la detección de la variabilidad genética directamente a nivel de la molécula de ADN, se basan en diferentes tipos de marcadores moleculares. Estos marcadores genéticos se utilizan en la construcción de mapas genómicos de las diferentes especies animales, con vistas a la detección y manipulación de efectos génicos individuales de naturaleza cuantitativa en programas de mejoramiento animal, o cualitativos en estudios de resistencia a enfermedades, pureza racial o verificación de la ascendencia. Esto se hace posible hoy en día, debido a las nuevas tecnologías moleculares desarrolladas, con las cuales se logra la identificación de genotipos y el monitoreo de animales en poblaciones a partir de marcadores ligados a rasgos cuantitativos (Fries *et al.*, 1993).

### **2.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado en forma exponencial, con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo, utilizando una polimerasa termoestable (Taq Polimerasa), (Edel, 1998).

La PCR es una técnica de la biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades íntimas de un acierto de ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención. La reacción consta, por lo regular, de una

treintena de ciclos repetitivos conformado cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrogeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante una fórmula, pero generalmente, oscila entre 50 y 60 °C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena actual como molde (Giovambattista, 2001; Rojas, 2004).

Para realizar la PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearan a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro dNTPs en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua destilada para complementar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100  $\mu$ l) y finalmente, la enzima ADN polimerasa termoestable (White *et al.*, 1998; Jiménez y Collada, 2000; Giovambattista, 2001; Rojas, 2004). A continuación se describe la importancia de los componentes involucrados.

**Magnesio.** El ión magnesio y el manganeso tienen una función importante en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila entre 0.5 y 2.5 mM.

Concentraciones insuficientes de  $Mg^{+2}$  dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

**dNTPs.** Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son las bases o pilares con los que se forman las nuevas cadenas de ADN. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. Los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de  $Mg^{+2}$  sea 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs (Valadez y Günter, 2000).

**Cebadores o iniciadores.** Son el componente más sensible que determina el éxito de la prueba PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G + C de 50-75 %. La concentración a la que suelen emplearse en la reacción de PCR es de 0.1 – 0.5  $\mu$ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN. El extremo 3' induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores entre sí, para que la polimerasa los extienda y genere así, pequeños amplicones referidos como dímeros de cebadores. Estos dímeros son productos cortos que se amplifican eficientemente, reduciendo la cantidad de cebadores disponibles en la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicón de interés (Olive, 1999; Vaughan, 2000; Abd-Elsalam, 2003).

**ADN polimerasa.** Proveniente de la bacteria termofílica (*Thermus aquaticus*), su temperatura óptima de catálisis oscila alrededor de los 72°C, temperatura a la cual

incorpora aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estable a altas temperaturas, incluso por encima de 92° C. Esta enzima es una proteína que consta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 95 kDa, cuenta con una actividad de exonucleasa 5' – 3'. Su fidelidad de replicación depende de la concentración del ión Mg<sup>+2</sup> y de los dNTPs, así como de que exista o no balance en la concentración de estos últimos (Maniatis, 1982; Valadez y Günter, 2000).

**Agua.** Se utiliza como solvente del resto de los ingredientes y de preferencia debe ser desionizada (Rojas, 2004).

**ADN.** Puede ser de un ng en el caso de material genético clonado o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, siempre y cuando se elimine en lo más posible la presencia de inhibidores de la polimerasa (Vaughan, 2000).

**Adyuvantes de la PCR.** Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. El adyuvante más extendido y utilizado es la BSA (Albúmina Sérica Bovina – Bovine Serum Albumin) a concentraciones mayores de 0.8 µg/µl; la BSA incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa (Cartwright, 1994; Vaughan, 2000; Álvarez *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004; Rojas, 2004).

Debido al complejo de interacciones entre los componentes de la PCR y la amplia variedad de aplicaciones en las que esta técnica se ha usado, no hay un

listado único de condiciones que puedan ser las óptimas para todas las posibles reacciones.

#### **2.4.2 Detección del SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple)**

Se consideran la más reciente generación de marcadores moleculares, basados en la identificación de la sustitución de un nucleótido por otro, representando solamente dos alelos simples. Ellos incluyen la técnica clásica de RFLPs, pero no detectando la aparición o abolición de un sitio de restricción (Rafalski, 2002).

El método más directo para detectarlos es la secuenciación de segmentos de ADN, previamente amplificados por PCR de varios individuos que representen la diversidad de la población. Se diseñan cebadores para amplificar fragmentos de ADN de 400-700 pb, derivados fundamentalmente de genes de interés o de secuencias reportadas en bases de datos correspondientes a secuencias expresadas (EST). Los productos amplificados se secuencian en ambas direcciones y sus secuencias se comparan en busca de polimorfismos (Cornide, 2002).

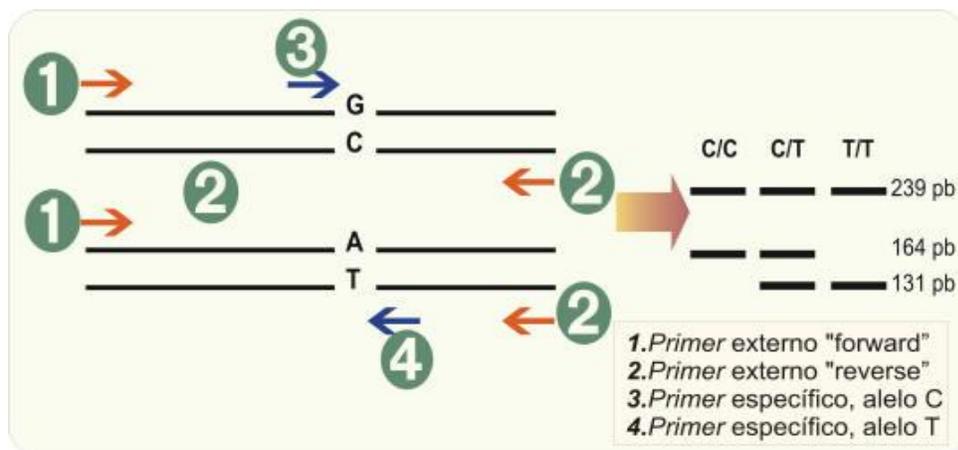
La mayoría de los métodos de detección de SNPs se basan en la amplificación usando una secuencia diana y la hibridación con oligonucleótidos anclados al "arreglo", cada uno de los cuales está terminado en un nucleótido polimórfico. Un paso sencillo de extensión del *primer* se lleva a cabo sobre el arreglo, usando una mezcla de cuatro oligonucleótidos marcados con fluorescencia. Las marcas se adicionan a los cebadores que se unen perfectamente al ADN, no siendo así con aquellos que no lo hacen en el extremo 3'. La lectura de la presencia o ausencia de fluorescencia en el "arreglo" permite obtener el tipo de cada SNP.

Cualquiera de los cuatro oligonucleótidos puede estar presente en cualquier posición en el genoma, por lo tanto se debe suponer que cada SNP tendría cuatro alelos. Teóricamente esto es posible, pero en la práctica la mayoría de los SNP tienen solamente dos variantes, la secuencia original y la versión mutada. Esto se debe a la vía en que estos aparecen y se distribuyen en una población. Un SNP se origina cuando una mutación puntual ocurre en el genoma, convirtiendo un nucleótido en otro. Los SNP pueden aparecer tanto en regiones fuera de los genes (que no afecten la producción o función de alguna proteína) como en un gen específico, donde pueden ubicarse en regiones codificantes (relacionados con cambios en la cantidad de proteína producidas) o no codificantes (que afectan solo la secuencia de aminoácidos). Estos han sido empleados como marcadores para el diagnóstico de rasgos específicos (Jordan y Humphries, 1994) por ser abundantes en el genoma bovino (Heaton *et al.*, 2002), genéticamente estables (Markovstka *et al.*, 2000) y de análisis fácilmente automatizable (Lindblan-Toh, 2000), lo que ha permitido además, su uso como marcadores para pruebas de paternidad en ganado bovino (Heaton *et al.*, 2002).

### **2.4.3 Sistema de Amplificación Refractario de Mutaciones (ARMS-PCR)**

Un método de genotipado simple y económico de SNP que implica una sola reacción de PCR seguida de la comprobación por electroforesis del gel de agarosa, es la técnica nombrada *tetra-primer* ARMS-PCR, esta adopta ciertos principios del método del *tetra-primer* PCR (Newton *et al.*, 1989) y del sistema de amplificación refractario de la mutación (ARMS) (Ye *et al.*, 1992). Esta técnica no requiere digestión con enzimas de restricción y solo utiliza oligonucleótidos específicos para

alelos normal y mutado (Figura 1). La PCR estándar utiliza *dos primer* para amplificar las dos cadenas de ADN y se basa en el hecho de que cada *primer* amplificará de forma fiable la cadena diana.



**Figura 1. Diagrama representativo de identificación de un SNP del gen leptina mediante la técnica ARMS-PCR. Tomado de Corva et al., 2004.**

Sin embargo, la PCR puede realizarse con el *primer* alelo específico que amplificará solamente un alelo de un gen diana. Esto significa que si un *primer* contiene una secuencia que reconoce una mutación, solo hibridará con el ADN mutante. Por lo tanto, sólo el ADN que contiene la mutación se amplificara con este *primer*. El *primer* alelo-específico tiene los nucleótidos del extremo 3' como los que detectan la mutación, ya que el ADN polimerasa requiere la hibridación completa del *primer* y del molde del extremo 3' del *primer*. Este método se aplica para detectar mutaciones específicas de un único gen. Este tipo de PCR se le denomina sistema de amplificación refractario de mutaciones (ARMS amplification refractory mutation

system) ya que, en ausencia del alelo mutante, la amplificación por PCR será refractaria, es decir no se producirá (Ye *et al.*, 2001; Chiapparino *et al.*, 2004).

El principio de esta técnica se basa en la incapacidad de la enzima Taq ADN polimerasa para extender un «primer» con un mal apareamiento en el extremo 3' del mismo. Si un individuo es homocigótico para metionina no amplifica con el codón de la treonina y lo opuesto sucede si es homocigótico para treonina. Sólo si es heterocigótico, en ambas reacciones ocurrirá la amplificación. Esta técnica es capaz de detectar mutaciones puntuales en el ácido desoxirribonucleico (ADN). La selección de los oligonucleótidos adecuados hace posible que se puedan amplificar o detectar determinadas secuencias mutantes o normales de ADN (Ye *et al.*, 2001; Chiapparino *et al.*, 2004).

## **2.5 Genes candidatos**

La justificación del enfoque de genes candidatos afirma que un componente importante de la variación genética cuantitativa de fenotipo bajo investigación, es causada por una mutación funcional del gen putativo. Los genes candidatos son generalmente los genes con función biológica conocida, directa o indirectamente regulan los procesos de desarrollo de los rasgos o atributos investigados, lo que podría ser confirmada por la evaluación de los efectos de las variantes del gen causante de un análisis de asociación. Sin embargo, el enfoque del gen candidato ha sido criticado debido a la baja replicación de los resultados y su limitada capacidad para incluir a todos los posibles genes causantes. Por otra parte, este enfoque es por necesidad muy subjetivo en el proceso de elección de candidatos específicos del número de posibilidades potenciales. La principal desventaja es que requiere que la

información que proviene de la existencia de conocimientos fisiológicos, bioquímicos o funcionales, tales como la regulación hormonal, el metabolismo bioquímico, etc, que generalmente es finito o, a veces no está disponible en absoluto. Los genes candidatos se clasifican tanto por la posición que ocupa en el mapa genómico (*candidato posicional*) como por las propiedades de la proteína que codifica (*candidato funcional*) (Tabor *et al.*, 2002).

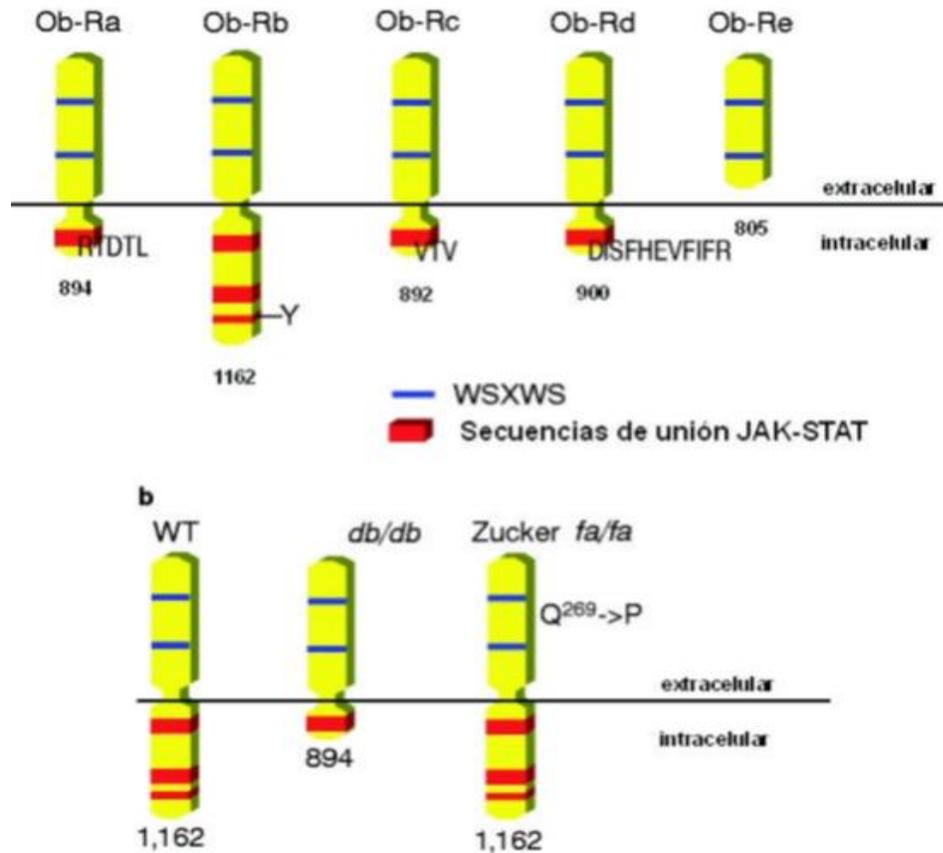
## **2.6 El gen leptina y su receptor**

La leptina es una hormona proteica de 16 KDa, compuesta de 146 aminoácidos y es sintetizada principalmente por el tejido adiposo. Esta hormona es codificada por el gen *ob*, identificado originalmente al estudiar las causas de la obesidad en el ratón *ob/ob* (Zhang *et al.*, 1994) y de su receptor Ob-R, en ratones (Tartaglia *et al.*, 1995). Los ratones *ob/ob* sufren una mutación en la expresión del gen de leptina que los hace infértiles y la observación que recuperaban la fertilidad al ser tratados con leptina, permitió vincular esta hormona con los procesos de regulación de la reproducción.

Las isoformas de receptores de leptina (Figura 2), incluyen receptores de forma larga (Ob-Rb) y varios receptores de forma corta (Ob-Ra, Ob-Rc, y Ob-Rd), así como el receptor soluble (Ob-Re) que se encuentra en plasma circulante (Tartaglia *et al.*, 1995; Tartaglia, 1997).

La proteína o el RNAm de receptores de leptina han sido encontrados en gran variedad de tejidos, incluyendo los tejidos adiposos blanco y pardo, el páncreas, intestino, hígado, músculo esquelético, placenta, cerebro, glándula mamaria, corteza adrenal, en las células de la granulosa, células de la teca y en el cuerpo lúteo del

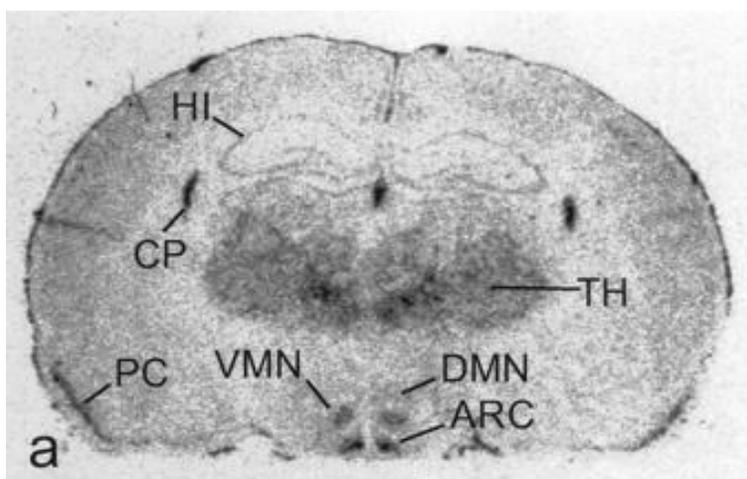
ovario y en los espermatozoides y células de Leydig de los testículos (Ruiz-Cortes *et al.*, 2003; Ruiz-Cortes *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2000).



**Figura 2. Isoformas del receptor de leptina y algunas mutaciones en roedores utilizados como modelos de obesidad.**

A. Existen al menos 5 isoformas del receptor de leptina. Sus dominios extracelulares de unión a leptina son idénticos. Solo el ObRb posee todas las secuencias capaces de activar la vía de señalización JAK-STAT. El Ob-Re no posee dominio transmembrana y es soluble. B. Mutaciones en el Ob-R en ratones *db/db* y ratas Zucker *fa/fa*. WT – genotipo silvestre (Tomado de Zabeau *et al.*, 2003).

Dentro del cerebro, el receptor de leptina se expresa en la corteza, el tálamo, el hipocampo y el hipotálamo (Figura 3). Sin embargo, es el hipotálamo, sobre todo el núcleo arcuato, la zona del cerebro que tiene mayor concentración de receptores de leptina (Ob-Rb), y es también la más estudiada (Schwartz *et al.*, 1996).



**Figura 3. Localización del receptor de leptina en el cerebro de rata.**

Experimento de hibridación *in situ* frente al mRNA del receptor de leptina (detecta todas las isoformas del receptor) en un corte sagital del cerebro de rata. TH: tálamo, HI: hipocampo, CP: plexo coroideo, ARC: núcleo hipotalámico arcuato, VMN: núcleo hipotalámico ventromedial, DMN: núcleo hipotalámico dorsomedial, PC: corteza piriforme (Tomado de Schwartz *et al.*, 1996).

En los núcleos hipotalámicos la leptina afecta la actividad de una gran variedad de neuronas, promoviendo la liberación de neuropéptidos oréxicos (anabólicos), entre los que se encuentran el neuropéptido Y (NPY), las orexinas, la hormona concentradora de melanina (MSH) y las galaninas; y la regulación de los péptidos anoréxicos (catabólicos), dentro de los que se incluyen la hormona liberadora de corticotropinas (CRH) y la hormona liberadora de tirotropinas (TRH) entre otros (Ahima y Hileman, 2000; Bartha *et al.*, 2005; Bjorbaek y Kahn, 2004). Estas señales a su vez activan otras vías neuronales, que permanecen aún por dilucidar y controlan el sistema neuroendocrino y el metabolismo energético (Fei *et al.*, 1997; Elmquist *et al.*, 1998).

## **2.7 El polimorfismo del gen leptina en bovinos**

Se han descrito alelos de este gen que identifican individuos con diferente capacidad de retención de grasa y veteado (Buchanan *et al.*, 2002). Si bien se han identificado diferentes polimorfismos en su secuencia, el que tiene efectos fisiológicos es la sustitución de citosina (C) por timina (T) en el exón 2, que a su vez conduce a la sustitución de Arginina por Cisteína en la proteína correspondiente. El alelo T corresponde a un mayor nivel de grasa en la canal y es asociada con canales de animales gordos y el alelo C con animales flacos (Buchanan *et al.*, 2002; Geary *et al.*, 2003; Corva *et al.*, 2004).

La diferencia en el tipo de leptina puede ser responsable de las variaciones en cuanto a la prontitud con que la vaca retorna a un balance energético positivo después del parto y expresa su potencial genético para producción de leche, alcanzando la máxima producción al pico de lactancia. El genotipo L-TT corresponde a vacas con mayor capacidad de consumo y que alcanzan tempranamente el pico de producción de leche con mayor producción de proteína y grasa láctea (kg y %) además, retornan a balance energético positivo más pronto. Por el contrario, el genotipo L-CC tiende a un menor consumo de materia seca en el posparto hasta alcanzar el pico de producción de leche y a una menor producción de leche y de los componentes lácteos. Son vacas que demoran en lograr el retorno al balance energético positivo (Marcantonio, 2004; Cerón *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2008).

## **2.8 Función de la Leptina en Reproducción animal**

En el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG), la leptina juega un papel muy importante en la regulación de la reproducción de los mamíferos. Esta hormona

actúa en la regulación y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo (Barb y Kraeling, 2004; Williams *et al.*, 2002) y en la hipófisis modula la secreción de la hormona luteinizante (LH), como sucede en algunas especies animales tales como la oveja (Malven *et al.*, 1992), los cerdos (Barb *et al.*, 2001; Barb *et al.*, 2005), los primates (Kaynard *et al.*, 1990), los roedores (Kalra, 1993) y los rumiantes (Williams *et al.*, 2002).

En las hembras de ganado bovino, la leptina está relacionada con la regulación del ciclo estral y probablemente involucrada en el control de la reproducción. Existe una relación positiva entre los niveles de leptina en el suero y los del fluido folicular. Además, hay una relación negativa entre el incremento de los niveles de leptina y los niveles de estrógenos (Gurbuz *et al.*, 2005). Según Williams *et al.*, (2002), la leptina circulante disminuye durante la fase lútea y folicular del ciclo estral en vacas y novillas sexualmente maduras. Además, en algunos estudios se ha encontrado que las concentraciones sistémicas de leptina incrementan durante la pubertad en machos y hembras, tanto en humanos (Horlick *et al.*, 2000), como en muchas especies domesticas tal como el cerdo (Qian *et al.*, 1999), ratones (Cheung *et al.*, 1997) y ganado bovino (Garcia *et al.*, 2002); pero el incremento sólo se mantiene en las hembras, porque en los machos los niveles de leptina disminuyen después de la pubertad, disminución que puede ser debida a que la testosterona inhibe la secreción de la leptina (Spicer, 2001).

El mecanismo de acción de la leptina en el sistema reproductivo de los machos ha sido muy discutido por diferentes autores (Tena-Sempere *et al.*, 1999;

2000; 2001), quienes indican su gran complejidad, no sólo por sus efectos inhibitorios sino también por sus efectos estimuladores del eje gonadal.

### **2.8.1 Relación de la leptina con el inicio de la pubertad**

Por definición, un macho o una hembra han llegado a la pubertad cuando son capaces de liberar gametos y mostrar un comportamiento sexual. El inicio de la pubertad está regulado por la madurez del eje hipotalámico-adenohipofisario más que por la incapacidad de la hipófisis para producir gonadotropinas o por una insensibilidad ovárica o testicular (Knobil y Neill, 1988). Wolf *et al.* (1965), definieron la pubertad como la edad cuando el ternero produce el primer eyaculado que contiene al menos  $50 \times 10^6$  espermatozoides y que estos posean una movilidad progresiva mayor al 10%.

La hembra prepúber responde a la secreción pulsátil de gonadotropinas, secretando estrógeno de manera gradual. En las ovejas y las vaquillas, aumentan la frecuencia de picos de LH, seguida de una elevación transitoria en la descarga preovulatoria de LH. Esto está asociado con el comportamiento estral durante este periodo. Los machos prepúberes secretan testosterona progresivamente en respuesta a la estimulación de gonadotropinas. Cada pulso de gonadotropinas es seguido a intervalos de una hora por una elevación transitoria en la secreción de testosterona. Conforme la pubertad progresa, el incremento de testosterona en sangre causa un descenso en la secreción de gonadotropinas mediante un efecto de retroalimentación negativa (Hafez y Hafez, 2000).

Desde el punto de vista económico, la edad a la cual los animales alcanzan la pubertad es una de las características más importantes en producción animal. Sin

embargo, en el ganado *Bos indicus*, la selección ha enfatizado las características de crecimiento dejando marginada la selección basada en la capacidad reproductiva. Varios estudios han demostrado diferencias significativas en la edad a la pubertad entre razas de ganado *Bos taurus* y *B. indicus* (Fields *et al.*, 1982; Morris *et al.*, 1989). Estas diferencias están asociadas a la selección de los sementales, que en el ganado *B. taurus*, ha permitido mejorar apreciablemente las características reproductivas. Al contrario, en el ganado *B. indicus* la ausencia de selección con base en la precocidad sexual es responsable, en un alto grado, de la característica de pubertad retardada que se cita en este ganado (Fields *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1980).

El desarrollo testicular se relaciona directamente con la producción de espermatozoides, la calidad del eyaculado y la fertilidad. La medida de la circunferencia escrotal (CE) es el mejor indicador del tamaño testicular en toros. La medida de CE tiene una asociación negativa con la edad a la pubertad y positiva con la capacidad de producción de espermatozoides de los sementales (Hueston *et al.*, 1988) y la edad a la pubertad de las hijas del toro (Smith *et al.*, 1989). La medida de CE es fácil de obtener, confiable y repetible. Además presenta un coeficiente de heredabilidad entre moderado y alto (Coulter y Foote, 1979; Knights *et al.*, 1984).

En toros jóvenes, el periodo prepúber se caracteriza por el inicio de la espermiogénesis, que está influenciada gradualmente por aumentos en los pulsos de secreción de LH. La espermatogénesis se inicia cuando las células germinales se dividen y forman la espermatogonia, luego se da un aumento en la diferenciación hacia otro tipo de células como los espermatoцитos. Cuando el espermatozoide, la

célula germinal más diferenciada, se presenta por primera vez en el lumen de los túbulos seminíferos, el animal alcanza la pubertad (Amann, 1983; Curtis y Amann, 1981).

Al parecer, el consumo de calorías, la condición corporal o la relación tejido graso y músculo, ejercen de algún modo un control sobre la secreción hipotalámica de la GnRH y pueden constituir un factor permisivo en el inicio de la pubertad y su completo desarrollo tanto en las diferentes especies animales como en los humanos (Aguilar *et al.*, 1984). Este tejido graso se comporta como un gran órgano endocrino, en el que se sintetiza en su mayor parte la hormona leptina, esta hormona se encuentra muy relacionada, según varios autores, con el inicio de la pubertad (Bronson, 2001; Cheung *et al.*, 1997).

### **2.8.2 Leptina y sus efectos en la pubertad**

Un adelanto significativo del inicio de la pubertad se ha logrado con la administración de leptina en ratones hembras normales, lo que ha permitido proponer que la leptina sería una señal metabólica para el inicio de la pubertad (Barash *et al.*, 1996; Chehab *et al.*, 1996). En ratas hembras se ha observado que las concentraciones plasmáticas de leptina aumentan durante el desarrollo puberal y que la administración central en ratas hembras con restricción alimenticia severa, es capaz de inducir la pubertad a pesar de la restricción alimenticia y de la pérdida de peso corporal, lo que sugiere que en esta especie, la leptina sería una poderosa señal para el inicio de la pubertad (Cheung *et al.*, 1997). Otros estudios no han permitido relacionar los cambios en la leptina circulante y la pubertad, tanto en

machos primates como en roedores (Bronson, 2001; Cheung *et al.*, 2001; Plant y Durrant, 1997).

García *et al.* (2002), estudiaron la leptina en el suero y la expresión del gen de la leptina en el desarrollo puberal, durante el ciclo estral y diferentes estaciones en ganado bovino, encontrando un marcado incremento, durante el desarrollo puberal en hembras bovinas, tanto de la hormona leptina en la circulación como de la expresión del gen de la leptina en los adipocitos, lo que estaba asociado con incrementos del peso corporal y del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I, del inglés *Insulin-like growth factor I*) en el suero. También se ha reportado que la edad al inicio de la pubertad está afectada por el consumo de energía en la dieta, la tasa de crecimiento y la adiposidad. Las concentraciones de leptina incrementan linealmente de la semana 16 hasta la semana 1, antes de la ovulación en novillas primíparas, lo que coincide con el inicio de su madurez sexual (Williams *et al.*, 2002).

### **2.8.3 Sitios de acción y función hipotalámica de la leptina**

El hipotálamo presenta unos sitios de acción de la leptina, cuyos Ob-R, están localizados en áreas hipotalámicas asociadas con el control del apetito, gasto energético, la reproducción y el crecimiento (Lin *et al.*, 2000; Tartaglia *et al.*, 1995). De ahí que, la distribución de los receptores OB-rb se ha detectado en los núcleos ventromedial y arcuato del hipotálamo, los cuales han sido propuestos como un importante sitio de acción de la leptina, acción que es suficiente para mediar la homeostasis de la glucosa y la actividad locomotora (Coppari *et al.*, 2005; Cunningham *et al.*, 1999). De esta manera, la leptina puede actuar en forma directa en el sistema nervioso central, regulando la expresión y secreción de muchos

neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas hipotalámicas, incluyendo el neuropéptido Y (NPY), las orexinas, el factor regulador de la transcripción de anfetaminas (CART), la cocaína, la galanina (Gal), la hormona concentradora de melanina (MCH) (Ahima *et al.*, 2000; Ingvarsen y Boisclair, 2001), la GnRH (Smith *et al.*, 2002), la hormona liberadora de corticotropinas (CRH), la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), la somatostatina (SS) y la TRH (Barb *et al.*, 2001; Houseknecht *et al.*, 1998). La leptina regula también la neurotensina (NT), la proopiomelanocortina (POMC) y el ácido gama aminobutírico (GABA) (Cunningham *et al.*, 1999; Iqbal *et al.*, 2001; Sullivan y Moenter, 2004).

#### **2.8.4 La leptina y su relación con la secreción de hormonas hipofisarias**

En la hipófisis, la leptina modula la LH (Carbone *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2002), la hormona del crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la FSH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Barb y Kraeling, 2004; Houseknecht *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2002). En mamíferos, los cambios agudos en el balance energético afectarían el eje HHG. Es así como en varias especies, el ayuno y la restricción calórica han sido encontradas como causa de la supresión de la secreción pulsátil de la LH, lo que ocurre por la inhibición de la secreción de la GnRH regulada por la leptina. Dichos mecanismos probablemente previenen el gasto energético para la reproducción. En contraste, la excesiva energía almacenada y la obesidad interfieren con la correcta regulación del eje reproductivo (Caprio *et al.*, 2001).

La actividad del gen leptina y la concentración en la circulación sanguínea de la leptina en ganado bovino, cambian asociadas con la respuesta a estímulos ambientales, nutricionales y de maduración sexual. Sin embargo, estudios

descriptivos indicaron que tanto la actividad del gen (transcripción y traducción) como las concentraciones de leptina en el suero, aumentaron antes de la pubertad en novillas. Otros estudios informan acerca de la habilidad de la leptina exógena para estimular la secreción de LH en ganado con ayuno pero no en ganado con un consumo óptimo de alimento, y demuestran que estos efectos están mediados principalmente en la adenohipófisis (Williams *et al.*, 2002).

### **2.8.5 La expresión de los receptores de leptina y su función en la esteroidogénesis ovárica**

Varias investigaciones indican que la leptina tiene una acción directa en el ovario. Las células de la granulosa y las células de la teca expresan fuertemente receptores de leptina. Los ARNm de receptores de leptina han sido identificados en el ovario, este es un órgano blanco para la leptina.

En el ovario bovino, la leptina antagoniza directamente el efecto estimulador de la insulina en la esteroidogénesis de células de la teca y granulosa, y en la ausencia de insulina, la leptina tiene poco o ningún efecto en la esteroidogénesis de células de la granulosa (Spicer *et al.*, 2000; Spicer y Francisco, 1997).

La concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de la leptina en las células de la teca para la producción de androstenediona es más o menos 10 ng/ml (Spicer y Francisco, 1998). La leptina también inhibe el IGF-I y además la LH, hormona inductora de la producción de androstenediona por células de la teca humanas (Agarwal *et al.*, 1999), pero no en células de la teca bovinas (Spicer *et al.*, 2000).

En el folículo ovárico, la leptina en concentraciones fisiológicas, estimula la actividad aromatasa ejercida por la enzima citocromo P<sub>450</sub>, pero las altas

concentraciones de leptina en el folículo ovárico y en líquido folicular, pueden llegar a bloquear la esteroidogénesis y relacionarse con bajas concentraciones de oxígeno intrafolicular, impidiendo al ovocito desarrollar su competencia temprana en el embrión (Ruiz-Cortes *et al.*, 2003).

### **2.8.6 Efectos de la leptina en la ovulación**

La expresión del receptor de leptina se encuentra en células foliculares, incluidas las células de la granulosa, teca y células intersticiales (Lukaszuk *et al.*, 1998; Geisthovel *et al.*, 1998). La leptina se encuentra en el líquido folicular con niveles similares a los que se encuentran en el suero (Cioffi *et al.*, 1997; Agarwal *et al.*, 1999). Así mismo, los niveles de leptina en sangre varían a lo largo del ciclo estral (Lukaszuk *et al.*, 1998; Messinis *et al.*, 1998), con niveles en horas pico similares a los de 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona en la fase lútea.

Gurbuz *et al.* (2005), estudiaron la relación de la leptina en el suero y el fluido folicular y los niveles de esteroides ováricos en respuesta a la inducción de la ovulación en ciclos de fertilización *in vitro*, encontrando un incremento en los niveles de leptina en el suero durante la hiperestimulación ovárica controlada, indicando otro papel de la leptina en la función reproductiva. El aumento en los niveles de leptina se correlaciona negativamente con la respuesta ovárica, evaluada mediante la producción de estrógenos y el número de ovocitos recuperados. Esto puede ser debido a la reducción de la respuesta ovárica a través de una retroalimentación negativa de la leptina a niveles altos en los ovarios.

Los efectos de la leptina en la ovulación son tanto estimulantes como inhibitorios. Además de los efectos en el eje hipotálamo-hipófisis, se puede

mencionar algunas acciones negativas: (i) la leptina puede inhibir directamente insulina, a través del factor de crecimiento análogo a insulina I (IGF-I), la transformación del factor de crecimiento-b y la esteroidogénesis inducida por glucocorticoides de células de la granulosa del ovario de la rata (Zachow y Magoffin, 1997; Barkan *et al.*, 1999; Brannian *et al.*, 1999; Zachow *et al.*, 1999) o humano (Agarwal *et al.*, 1999) y (ii) la administración aguda de leptina en ratas inhibe la ovulación (Duggal *et al.*, 2002). Así mismo, la leptina es capaz de producir algunos efectos positivos: (i) la leptina acelera la aparición de la pubertad en los roedores (Ahima *et al.*, 1997; Almog *et al.*, 2001) y los seres humanos (Clement *et al.*, 1998; Strobel *et al.*, 1998); (ii) la leptina induce la ovulación en ratones deficientes a GnRH (Barkan *et al.*, 2005) y eCG / hCG en ratas (Roman *et al.*, 2005). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la leptina afecta el proceso de ovulación todavía es desconocido.

La ovulación es un proceso complejo que involucra las gonadotropinas, las hormonas esteroideas y muchos mediadores comunes de las reacciones inflamatorias, como las citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, el plasminógeno, el óxido nítrico y la histamina. Prostaglandinas (PGF<sub>2</sub>α) y el óxido nítrico (NO) son de particular interés, ya que desempeña un papel importante en la ruptura del folículo (Brannstrom y Janson, 1991; Ellman *et al.*, 1993; Shukovski y Tsafiriri, 1994). En un estudio previo, se demostró que durante el proceso de ovulación, el aumento en el ovario de óxido nítrico sintetasa (NOS) resulta del aumento de NO, que estimula la producción de PGF<sub>2</sub>α y mejora el proceso inflamatorio, lo que facilita la ruptura del folículo (Faletti *et al.*, 1999).

### **2.8.7 Función de leptina en el desarrollo embrionario e implantación**

En un estudio (Antczac y Van Blerkom, 1997) demostraron que la leptina y la proteína STAT3 fueron inmunolocalizadas en ovocitos del ratón y del humano y en embriones preimplantados. Ambas (leptina y STAT3) fueron encontradas de manera polarizada en el ovocito, y las diferencias en la asignación de estas proteínas se produjo entre los blastómeros después de la primera división celular. Un posible papel de estas proteínas en el desarrollo embrionario temprano ha sido estudiado en la fase de mórula, donde los blastómeros contienen poca leptina/STAT3, mientras que las células externas contienen más leptina como STAT3. Así mismo, los ovocitos de ratón en estadio de metafase II (MII) expresan el ARNm de leptina. Además, la concentración fisiológica de leptina causa fosforilación de la tirosina de STAT3 en ovocitos de ratones en metafase II. Por lo tanto, la leptina podría tener un papel en varios aspectos de la maduración de ovocitos mediante la activación en la transducción de señales de la proteína STAT3 (Matsuoka *et al.*, 1999). Por lo tanto, la leptina probablemente es un regulador importante en el desarrollo de los ovocitos.

La producción embrionaria *in vitro* (PIV) en el ganado bovino, incluyendo la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), es una herramienta crucial para la conservación y reproducción de mamíferos. Aunque la eficiencia de entre especies en el nacimiento de crías vivas todavía es bajo. La maduración citoplasmática y nuclear de los ovocitos es un paso limitante para determinar la capacidad de sobrevivencia de los ovocitos, sometidos a la reprogramación, división y desarrollo del embrión. Los factores de crecimiento y citoquinas promueven una maduración citoplasmática y nuclear de los ovocitos a través de una compleja red (Greenwald y Roy, 1994).

Recientemente, se ha encontrado que los suplementos de leptina promueven la maduración y desarrollo del ovocito así como la preimplantación de embriones. Se ha demostrado que los suplementos de leptina 10-100ng/mL estimula la maduración de los ovocitos porcinos (Craig *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). Además, la leptina en embriones preimplantados de ratón promueve el desarrollo embrionario *in vitro* en dosis dependientes (Kawamura *et al.*, 2002). En bovinos, la adición de leptina durante la maduración de ovocitos ha sido utilizada para aumentar la proporción de ovocitos desarrollados en etapa de blastocisto después de la fertilización *in vitro* para reducir la proporción de células apoptóticas (Boelhauve *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados sobre el efecto de la leptina en la maduración meiótica de ovocitos bovinos y el desarrollo previo a la implantación han sido insuficientes. (Kawamura *et al.*, 2002; Fedorcsak y Storeng, 2003; Zagal *et al.*, 2004).

### **2.8.8 Expresión de receptores y función de la leptina en el testículo**

Los ratones con la mutación *ob/ob* (con deficiencia total de leptina), sufren de hiperfagia, obesidad mórbida e infertilidad. En estos machos una vez que se les administra leptina exógena no sólo se obtiene una disminución del apetito y del peso corporal sino también un aumento del peso del testículo, de las vesículas seminales, y del número de espermatozoides en el eyaculado (Barash *et al.*, 1996; Chehab *et al.*, 1996).

En niños con pubertad precoz, la reducción de los niveles de testosterona como resultado del tratamiento con análogos de la GnRH, eleva las concentraciones de leptina (Palmert *et al.*, 1998). Por otro lado, en hombres hipogonádicos se ha logrado una reducción de los niveles séricos de la leptina, tras la administración del

tratamiento sustitutivo con testosterona (Jockenhovel *et al.*, 1997). Esto permite sugerir que la interacción testosterona-leptina podrá ser parte del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas-tejido adiposo, que involucra el mantenimiento del peso corporal y la función reproductiva.

Los receptores de leptina y su RNAm en el testículo han sido encontrados en células de Leydig de ratón (El-Hefnawy *et al.*, 2000) y de rata (Caprio *et al.*, 2003; Caprio *et al.*, 1999; Tena-Sempere *et al.*, 2001) y en equinos (Buff *et al.*, 2002), en el plasma seminal, los espermatozoides y en los túbulos seminíferos de humanos (Glander *et al.*, 2002; Jope *et al.*, 2003).

Tena-Sempere *et al.* (2001) estudiaron el desarrollo y la regulación hormonal del RNAm del Ob-R en el testículo de rata y encontraron que la expresión del RNAm de la isoforma específica Ob-Rb fue significativamente alta durante el periodo de desarrollo testicular puberal, pero disminuyó en los adultos. Además, hallaron una expresión abundante de RNAm de la isoforma Ob-Rb, una expresión moderada de los subtipos Ob-Ra, Ob-Rf, una expresión baja de la isoforma Ob-Rc; y no hallaron expresión de la isoforma Ob-Re. En un estudio de la expresión de Ob-R en células de Leydig de rata, se concluyó que la interacción leptina-Ob-R en diferentes sitios anatómicos es compleja y se indicó que este sistema puede regular la función de las células de Leydig. Este sistema Ob→Ob-R en el testículo puede servir para regular negativamente la producción de testosterona por las células de Leydig durante la vida adulta, pero no se presentó en la vida prepuberal y podría tener una función durante la embriogénesis testicular y en la maduración de las células de Leydig en la vida prenatal (Caprio *et al.*, 2003).

En el caso de El-Hefnawy *et al.* (2000), evidenciaron la expresión del receptor de leptina durante el desarrollo de células germinales en el testículo de ratón y concluyeron que hay una distribución del Ob-R y una relación de su expresión con el desarrollo y la diferenciación de las células germinales. La leptina puede actuar en células no diferenciadas (espermatogonia A) permitiendo su diferenciación en espermátocitos y puede asistir a la célula a través de toda su diferenciación y maduración hacia espermátides; además, induce la fosforilación de STAT3 (Proteína Tirosina Quinasa de Transcripción) en los túbulos seminíferos y la fosforilación de STAT3 y la proteína activadora - mitogénica (MAP) en las células intersticiales, lo que sugiere que tienen efectos biológicos en estas células.

Otros autores estudiaron el receptor soluble de leptina en el plasma seminal y en espermatozoides de humano, demostraron la presencia del Ob-R por inmunofluorescencia microscópica y la leptina y el receptor soluble en el plasma seminal por Western blot. Las muestras de semen con baja calidad de espermatozoides, además, contenían baja cantidad de receptores y baja capacidad de unión de la leptina. Estos resultados pueden ayudar a explicar la relación entre la leptina y los receptores de leptina en el plasma seminal y en los espermatozoides humanos (Jope *et al.*, 2003).

Glander *et al.* (2002) encontraron leptina en el plasma seminal en humanos con o sin vasectomía y concluyeron que la circulación de leptina en el plasma seminal es demasiado compleja y está negativamente relacionada con el porcentaje de movilidad espermática y la velocidad rectilínea. Al parecer, la cantidad de leptina en el tracto genital, incluyendo en los túbulos seminíferos, podría influenciar los

mecanismos involucrados en el desarrollo de la movilidad espermática. La secreción de leptina por el espermatozoide sugiere que el gameto macho puede ser capaz de modular su metabolismo de manera independiente, por el sistema leptina. Estos datos abren una nueva consideración acerca de la significancia de la leptina en la fertilidad del macho (Aquila *et al.*, 2005).

### **2.8.9 Efectos inhibitorios de la leptina en testículo**

La leptina podría inhibir la esteroidogénesis en el testículo como similarmente lo realiza en la glándula adrenal, probablemente por medio de la disminución de la expresión de los genes  $P_{450scd}$  y StAR tanto en el testículo como en la glándula adrenal (Tena-Sempere *et al.*, 2001). Los datos obtenidos por Tena-Sempere *et al.* (1999) proporcionaron evidencia de la función inhibitoria directa de la leptina en el control de la secreción de testosterona testicular estimulada por la hCG (Gonadotropina Corionica Humana) y basal, en ratas adultas. Esta acción inhibitoria se presenta de manera independiente del estado nutricional y no fue observada en el testículo de ratas prepúberes. La acción de la leptina en el sistema reproductivo es probablemente llevada a diferentes niveles del eje hipotálamo - hipofisario - testicular. Tena-Sempere *et al.* (2000) utilizaron un péptido sintético de leptina 116-130 en ratas adultas, para demostrar la habilidad de la leptina para inhibir la secreción de testosterona *in vitro*, lo cual implica una acción positiva de esta molécula sintética en la función en el testículo.

Mientras tanto, Luukkaa *et al.* (1998) estudiaron el efecto de la administración de testosterona exógena en la producción de leptina en hombres y encontraron que las concentraciones de leptina en el suero vuelven a ser las mismas que en el

periodo pretratamiento después de interrumpir el tratamiento con testosterona. Estos autores concluyeron que la testosterona suprime la producción de la hormona leptina y es reflejado por los niveles de esta hormona en la circulación. Por su parte, Tena-Sempere y Barreiro (2002), concluyen que hay una evidencia compilada que la leptina participa en la regulación funcional del eje gonadal del macho. Esto parece ser por una acción regulada fuertemente, llevada a cabo en diferentes niveles del sistema hipotálamo - hipofisario – testicular.

En un estudio sobre el efecto de la deficiencia de leptina en la morfología, el desarrollo de células germinales y la actividad apoptótica con células germinales de testículo de ratón, sugirieron que la deficiencia de leptina en ratones está asociada con un daño en la espermatogénesis, un incremento de células germinales apoptóticas y una sobre regulación de la expresión de genes pro-apoptóticos en el testículo (Bhat *et al.*, 2006).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

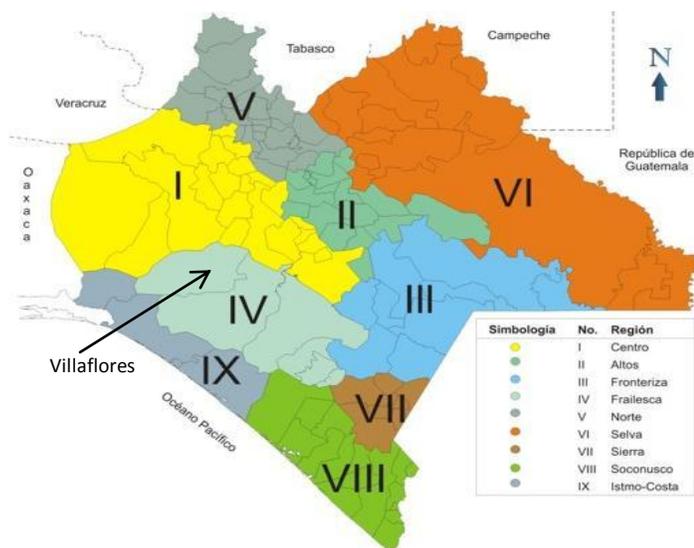
La ganadería bovina de doble propósito tiene gran importancia en el proceso económico de las regiones tropicales en México, particularmente en el estado de Chiapas. Una estrategia de desarrollo a seguir para transformar la ganadería extensiva hacia un sistema eficiente es conciliar el mejoramiento de los sistemas productivos y la conservación de los recursos naturales para obtener productos de origen animal a bajo costo y de calidad; así como favorecer la equidad de los beneficios entre los productores. La ganadería de doble propósito se diferencia en función de las características socioeconómicas, disponibilidad de recursos naturales y heterogeneidad ecológica, que condicionan el desarrollo tecnológico de los sistemas. Por ello, es imprescindible mejorar la productividad del sistema e incrementar los beneficios económicos, lo cual podría iniciarse mejorando genéticamente la base de reproductores y con ello, las características productivas de los hatos. Sin embargo, el hecho de que el sistema de producción de doble propósito presente bajos indicadores reproductivos y productivos, ocasiona que el tamaño de la población con posibilidades de reemplazo sea bajo al momento de selección y se tenga que incorporar a la mayoría de las hembras al hato, ocasionando una intensidad de selección baja de reproductores. Ante tal situación, una forma de incrementar el progreso genético de los hatos, es mediante el uso de hembras donadoras de embriones e incorporando sementales superiores al promedio de los hatos donde van a ser utilizados. Para lograr estos objetivos, es necesario que la fertilidad de los reproductores sea, sin duda, una importante característica que debe acompañar a su calidad genética. En forma adicional, la información sobre genes

candidatos relacionados con algún proceso fisiológico en el animal y que impacten en alguna característica de importancia económica y productiva, contribuirá hacer más eficiente la ganadería de doble propósito. En este sentido, con la identificación y evaluación del polimorfismo del gen leptina en la población de ganado Suizo Americano y sus cruzas raciales, permitirá seleccionar reproductores a temprana edad y con mayor valor genético. Además, se pueden identificar otros genes de importancia económica en reproductores de los hatos, que puedan ser transmitidos a las generaciones siguientes e impactar a corto plazo en la mejora del sistema de producción.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Localización del área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Villaflores, Chiapas, localizado en los límites de la Depresión Central y de la Sierra Madre del Sur (Region IV Frailesca). Geográficamente se sitúa entre los paralelos 15° 35' y 16° 33' de latitud norte y entre los meridianos 92° 12' y 93° 45' de longitud oeste. Su extensión territorial es de 1,232.1 km<sup>2</sup> y su altitud es de 540 msnm (Figura 4). El clima varía de cálido subhúmedo a semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano. La precipitación y temperatura media anual promedio es de 1,200 mm y 24.9 °C, respectivamente (García, 1981).



**Figura 4. Localización del municipio de Villaflores, Chiapas.**

Su extensión territorial es de 1,232.1 km<sup>2</sup> y su altitud es de 540 msnm. El clima varía de cálido subhúmedo a semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano. La precipitación y temperatura media anual promedio es de 1,200 mm y 24.9

°C, respectivamente. En el municipio hay nueve Grupos Ganaderos, integrados por 160 productores, los cuales cuentan con 3,769 cabezas de bovinos, en una superficie de 2,398 hectáreas.

#### **4.2 Animales y muestras de sangre**

Se evaluaron 120 vacas entre 3 y 6 años de edad con peso promedio de  $470 \pm 20$  kg, y 21 sementales activos con peso promedio de  $650 \pm 30$  kg entre 2 y 4 años de edad. Tanto a vacas como sementales se les extrajo 7 ml de sangre de la arteria coccígea media y se colocaron en tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA; ethylene diamine tetra-acetic acid), a razón de 5 mg de EDTA por cada 2.5 ml de sangre. Posteriormente, los tubos fueron almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento (Figura 5).



**Figura 5. Extracción de sangre de la arteria coccígea de vacas.**

#### **4.3 Preparación de las muestras para PCR**

La extracción de ADN se efectuó mediante la metodología descrita por Miller *et al.*, (1988), con las siguientes modificaciones. Se colocaron 300  $\mu\text{l}$  de sangre con

anticoagulante EDTA en tubos Eppendorf de 1.5 ml; se agregaron 1000  $\mu$ l de agua destilada fría (4 °C), se mezcló y agitó en vortex (Modelo MS1 Minishaker, Marca IKA®) durante 5 minutos (min). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, el sobrenadante se eliminó y se dejó únicamente el sedimento. Este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, se agregaron 1000  $\mu$ l de solución Lisis (Tris HCl pH 8, NaCl 5 M, EDTA .5 M pH 8, SDS, H<sub>2</sub>O), se agitó con un vortex hasta obtener una completa disolución de la pastilla. Enseguida, se adicionaron 3  $\mu$ l de proteinasa K (50 mg/ml), dejando en incubación a 65 °C durante una hora. Posteriormente, se agitó con un vortex hasta deshacer la pastilla, se adicionó un volumen final de NaCl 2M, se mezcló en vortex durante 15 segundos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. El sedimento se recuperó en un tubo de 1.5 ml, se precipitó con isopropanol frío (-20 °C) y se dejó reposar durante 30 min a -20 °C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y se eliminó el sedimento. Con el propósito de obtener la pastilla más limpia, ésta se lavó resuspendiéndola en 300  $\mu$ l de etanol al 70 % frío (-20 °C), se agitó hasta disolverla, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se dejó secar en la incubadora (Boekel Scientific; BOEKEL®) a 37 °C por 12 h. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y se almacenó a -20 °C para su uso posterior (Figura 6).

#### **4.4 Procedimiento de la técnica de ARMS-PCR**

El polimorfismo del gen leptina se determinó mediante la técnica de ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction) descrita por Ye *et al.* (2001).



**Figura 6. Procedimiento para la extracción del ADN a partir de sangre de vacas. a) Tubos con muestras de sangre con EDTA b) Colocación de la sangre en tubos de eppendorf y agua fría c) Mezclado en vortex de solución lisis y suero para desintegrar pastilla d) Centrifugado de tubos eppendorf y recuperación de pastilla e) Secado de la pastilla de ADN en estufa a 37 °C y f) Almacenamiento de ADN resuspendido.**

Esta técnica es una modificación de la técnica de amplificación alelo específica ARMS-PCR, en la cual se usaron dos pares de cebadores para amplificar dos alelos distintos en la misma reacción de amplificación, los cuales se pueden diferenciar por el tamaño de los productos amplificados.

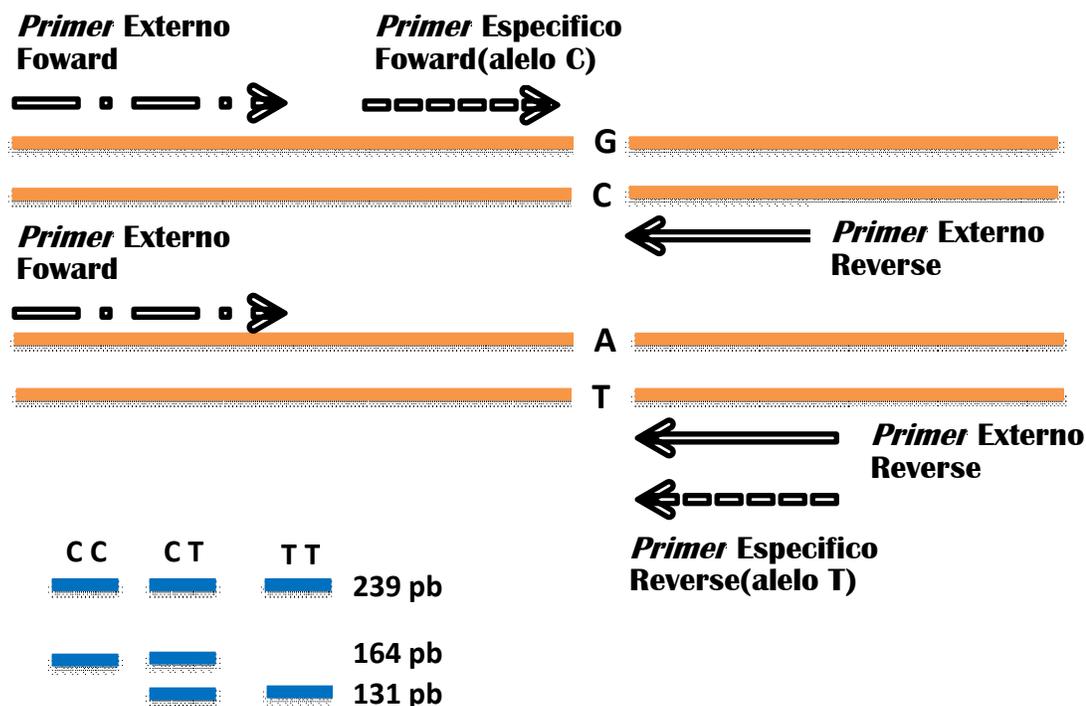
Se utilizaron dos cebadores (primer's) externos que amplifican los dos alelos; y dos cebadores internos, cada uno específico de uno de los alelos, que amplifica junto con uno de los cebadores externos, para obtener un producto determinado alelo específico.

Las secuencias de los primer's utilizados fueron los siguientes: Cebador interno ida para el alelo T: 5'- TGT CTT AGG TGG AGG CTG TGC CCA TCT -3' cebador interno inversa para el alelo C: 5'- AGG GTT TTG GTG TCA TCC TGG ACC TTT CG -3' cebador externo ida: 5'- GAC GAT GTG CCA CGT GTG GTT TCT TCT GT -3' cebador externo inversa: 5'- CGG TTC TAC CTC GTC TCC CAG TCC CTC C -3' (Modificado de Corva *et al.*, 2004), acceso GenBank U50365 (Figura 7).

En la cuantificación del ADN, se utilizó el método de absorbancia en un espectrofotómetro con luz ultravioleta (Mod. Lamda Bio10 Perkin-Elmer®). Se calculó el contenido de ADN asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN de doble cadena.

Para la amplificación, las reacciones de la PCR se realizaron con 5 µl de ADN de doble cadena adicionados a 20 µl de solución de amplificación, conteniendo: 2.08 µl MgCl<sub>2</sub> (30 mM); 2.5 µl Buffer (Biogenica 10 X. "100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 µg ml<sup>-1</sup> gelatina, 1.5 mg ml<sup>-1</sup> BSA; 1% Tritón X100"); 1.5 µl dNTPs

(Biogenica, 200 mM de cada uno); 1  $\mu\text{l}$  Cebador interno ida para el alelo T (10 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ); 1  $\mu\text{l}$  Cebador interno reversa para el alelo C (10 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ); 1  $\mu\text{l}$  Cebador externo



**Figura 7. Esquema de la acción de los Primers para la identificación de alelos de un SNP y genotipos del Gen Leptina en vacas (CC; CT y TT). Modificado de Corva et al., 2004.**

Forward (10 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ); 1  $\mu\text{l}$  Cebador externo Reverse (10 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ); 0.2  $\mu\text{l}$  Taq ADN polimerasa (Biogenica 5 unidades  $\mu\text{l}^{-1}$ ); y 9.72  $\mu\text{l}$  de agua desionizada.

Las muestras fueron desnaturalizadas a 94 °C por 3 min, seguido por una serie de ciclos térmicos diferentes; dos ciclos (desnaturalización a 94 °C por 15 seg, hibridación a 76 °C por 45 seg y extensión 72 °C por 1 min), otros dos (94 °C por 15 seg, 74 °C por 45 seg y 72 °C por 1 min) y uno más (94 °C por 15 seg, 72 °C por 45 seg y 72 °C por 1 min), seguido por 29 ciclos más (94 °C por 15 seg, 70 °C por 1 min

45 seg y 72 °C por 1 min), y por último una extensión final de 72 °C por 5 min en un termociclador (Techne ® Incorporated Modelo TC-512) (Modificado de Ruiz *et al.*, 2009).

Al final, se verificó el producto de la PCR de las muestras, en gel de agarosa al 3% en buffer TBE 1X (Tris Borato-EDTA), por medio de una electroforesis, utilizando una cámara modelo 75.1214 - 20D (Continental Lab Products División Apollo ®). El gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg ml<sup>-1</sup> antes de depositarlo en la cámara. En cada pozo se depositó un volumen final de 15 µl (3 µl de colorante azul de bromofenol y xileno cianol, además 12 µl de producto de PRC), usando como buffer de corrida TBE 1 X. Las condiciones de electroforesis fueron de 3 horas 10 minutos a 76 voltios. Las bandas amplificadas fueron visualizadas en un fotodocumentador (Bio Rad – Mod. Gel Doc 2000) en el programa Quantityone (Figura 8).



**Figura 8. Preparación de las muestras de ADN para su amplificación en la técnica AMRS-PCR. a) Preparación de la mezcla con primers y reactivos en microtubos de digestión de PCR b) Colocación de microtubos de digestión de PCR en el Termociclador c) Depósito del producto final de PCR en los pozos del gel de agarosa d) Cámara de electroforesis cargada con los productos de PCR e) Fotodocumentador para visualización del gel de agarosa f) Gel de agarosa en el fotodocumentador.**

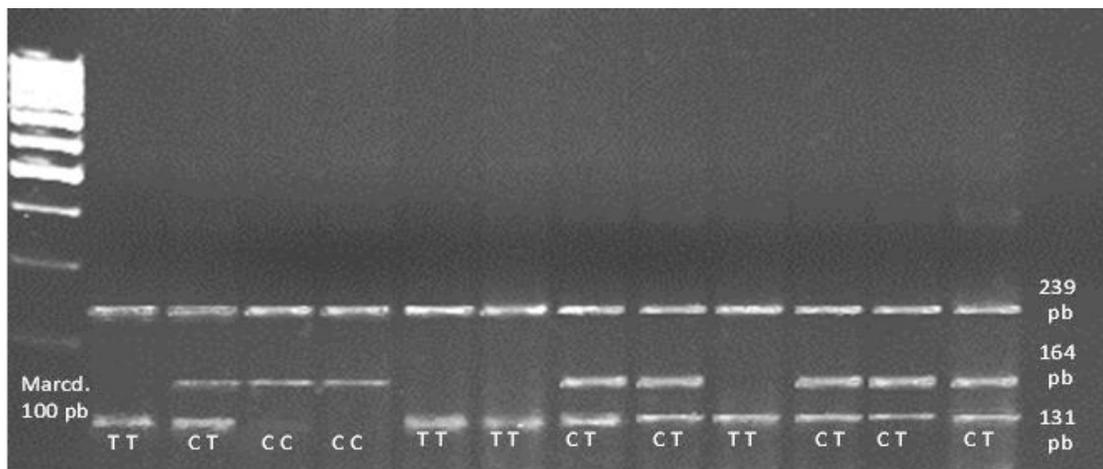
#### **4.5 Análisis estadístico**

Para la estimación del polimorfismo del gen leptina, se evaluaron las frecuencias genotípicas CC, CT y TT y alélicas C y T (Buchanan *et al.*, 2002). Después de asignar el genotipo de cada uno de los animales, se estimó mediante la prueba de ajuste del equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas y alélicas (Crow, 2008), comparándose mediante la prueba de Chi Cuadrada (SAS, 2000).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Frecuencias genotípicas del gen Leptina

Para evaluar las frecuencias genéticas y alélicas del gen leptina en vacas y toros, se realizó la amplificación de ADN por la técnica de ARMS-PCR. Las muestras que se consideraron, fueron aquellas en las cuales se detectaron las bandas específicas a 239 y 164 pb (CC), 239, 164 y 131 pb (CT) y 239 y 131 pb (TT) correspondientes a las frecuencias genotípicas y, las bandas de 239 pb y 131 pb a las frecuencias alélicas (Figura 9).



**Figura 9. Ejemplo de los resultados de la amplificación del ADN del gen leptina en ARMS-PCR por electroforesis en gel de agarosa, mostrando las frecuencias: leptina común (CC, 239 y 164 pb), leptina heterocigoto (CT, 239, 164 y 131 pb) y leptina modificada o mutada (TT, 239 y 131 pb), usando un marcador de 100 pb y un testigo en blanco.**

De las vacas evaluadas, la principal raza fue Suizo Americano con 40 %, seguido por la raza Simmental con 20 %, las cruza raciales (*Bos taurus* con *Bos indicus*) representaron el 14.2 %. Las razas Limousin, Aberdeen Angus y Charolais constituyeron el 26 % restante. Las frecuencias genotípicas generales registraron un

22 % de vacas con el genotipo TT, 36 % genotipo CC y un 42 % de individuos heterocigotos CT. El genotipo CT presentó el mayor porcentaje en las vacas de raza Suizo Americano, Simmental y cruzas raciales (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Frecuencias genotípicas del gen leptina de vacas en el municipio de Villaflores, Chiapas.**

Raza		Frecuencia genotípica			Frecuencia racial
		CC	CT	TT	
Suizo	n	18	21	9	48
	*	0.37	0.44	0.19	40 %
Simmental	n	8	10	6	24
	*	0.33	0.42	0.25	20 %
Cruzas	n	6	7	4	17
	*	0.35	0.41	0.24	14.17 %
Brahman	n	6	6	0	12
	*	0.50	0.50	0.0	10 %
Angus	n	1	4	5	10
	*	0.10	0.40	0.50	8.33 %
Limousin	n	3	2	2	7
	*	0.44	0.28	0.28	5.84 %
Charolais	n	1	1	0	2
	*	0.50	0.50	0.0	1.66 %
Total	n	43	51	26	120
	*	0.36	0.42	0.22	100 %

\* Equilibrio Hardy-Weinberg. ( $\chi^2$ ,  $P > 0.05$ ).

En los sementales evaluados, solo la raza Suizo americano y la cruce entre Suizo con *Bos indicus* se encuentra presente en este estudio. La raza Suizo americano con 48 % y la cruce Suizo con *Bos indicus* el 52 %. Las frecuencias genotípicas fueron 28 % de toros con el genotipo TT, 5 % genotipo CC y un 67 % de individuos heterocigotos CT. El genotipo CT presentó el mayor porcentaje en toros de ambas razas (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Frecuencias genotípicas del gen leptina de toros en el municipio de Villaflores, Chiapas.**

Raza	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Racial	
		CC	CT		TT
Suizo	n	1	6	3	10 48 %
	*	0.10	0.60	0.30	
Suizo X <i>Bos indicus</i>	n	0	8	3	11 52 %
	*	0.0	0.72	0.28	
Total	n	1	14	6	21 100 %
	*	0.04	0.68	0.28	

\* Equilibrio Hardy-Weinberg. ( $\chi^2$ ,  $P > 0.05$ ).

Se debe tomar en cuenta que la selección en el ganado bovino se basa principalmente en rasgos cuantitativos tales como rendimiento de grasa, proteína y leche, los cuales se asume que están controlados por *loci* múltiples. La mejora genética de estos rasgos es relativamente lenta pues los caracteres productivos solamente pueden ser medidos en un sexo, están afectados por numerosos genes y los factores ambientales ejercen una influencia importante en su expresión. Todo esto disminuye la exactitud en la evaluación genética de los animales. Además, estos rasgos productivos solamente pueden ser medidos en animales adultos, lo cual incrementa el intervalo entre generaciones y disminuye el progreso genético por año (Ávila y Gasqué, 2002).

## 5.2 Frecuencias alélicas del gen Leptina

Las frecuencias del alelo T en vacas (Cuadro 4) fueron mayores en las razas productoras de carne como Angus y Simmental. Al igual, las cruza raciales (*Bos taurus X Bos indicus*) también presentaron frecuencias mayores. Mientras que la Suizo Americano, Limousin, Charolais y Brahman presentaron frecuencias alélicas

menores. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $X^2$ ,  $P > 0.05$ ) para las frecuencias alélicas.

**Cuadro 4. Frecuencias alélicas del gen leptina de vacas en el municipio de Villaflores, Chiapas.**

Raza	Frecuencia Alélica (%)	
	C	T
Suizo	0.59	0.41
Simmental	0.54	0.46
Cruzas	0.56	0.44
Brahman	0.75	0.25
Angus	0.30	0.70
Limousin	0.58	0.42
Charolais	0.75	0.25
Total	0.57	0.43

Equilibrio Hardy-Weinberg ( $X^2$ ,  $P > 0.05$ ).

En toros, las frecuencia del alelo T fue mayor en la craza Suizo con *Bos indicus*, aunque no hubo diferencia significativa ( $X^2$ ,  $P > 0.05$ ) para las frecuencias alélicas de ambas razas (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Frecuencias alélicas del gen leptina de toros en el municipio de Villaflores, Chiapas.**

Raza	Frecuencia Alélica (%)	
	C	T
Suizo	0.40	0.60
Suizo x <i>Bos indicus</i>	0.36	0.64
Total	0.38	0.62

Equilibrio Hardy-Weinberg ( $X^2$ ,  $P > 0.05$ ).

En la presente investigación los resultados de la baja frecuencia del alelo T podría ser el resultado del criterio de los ganaderos al adquirir a sus reproductores con base al fenotipo del animal, sin considerar información de los registros genealógicos y productivos.

En las razas productoras de carne se ha realizado mayor selección para eficiencia alimenticia y ganancia de peso, por esta razón la frecuencia del alelo T es mayor al encontrado en este estudio. Al respecto, Buchanan *et al.* (2002) encontraron el alelo T con mayor frecuencia en animales de raza Angus y Herford (0.58 y 0.55, respectivamente); los cuales presentaron canales más grasosas que aquellas de animales con genotipo CC y concluyeron que el promedio y la calidad de grasa son afectados significativamente por el genotipo. Así mismo, Montoya *et al.* (2009) reportaron frecuencias para el alelo T de 0.66 y 0.53 en razas Criollas Colombianas (Sanmartinero y Romosinuano, respectivamente). Por su parte, Schenkel *et al.* (2005), encontraron resultados similares con 0.51, 0.51, 0.54 y 0.65 para las razas Angus, Limousin, Charolais y Simmental respectivamente para el alelo T. Sin embargo, los resultados encontrados para la frecuencia del alelo T en el área de estudio, coinciden con lo registrado por Buchanan *et al.*, (2003), quienes reportan frecuencias alélicas T de 0.46, 0.62, 0.45, 0.11, 0.06 y 0.53 para las razas lecheras Holstein, Ayrshire, Suizo Americano, Canadiense, Guernsey y Jersey, respectivamente.

Estudios recientes demuestran que el gen mutado TT presenta mejores resultados con respecto a los genotipos CC y CT, en el apetito, composición de la canal, grosor de grasa, marmoleo y porcentaje de grasa en costilla (Buchanan *et al.*,

2002; Chilliard *et al.*, 2005; Cerón-Muñoz *et al.*, 2009). De manera similar, Fitzsimons *et al.* (1998) encontraron que animales con genotipo CC, presentan menor proporción de grasa que aquellos con genotipo TT y los animales heterocigóticos CT presentaron un valor intermedio. Por lo tanto, la baja frecuencia de este genotipo (TT) en este estudio afecta al mejoramiento genético del hato y la eficiencia de las unidades de producción. Las frecuencias genotípicas promedio encontradas en este estudio, TT de 0.36, son mayores a los reportados por Chebel *et al.* (2008) con frecuencia genotípica TT de 0.17 para ganado lechero Holstein.

Por su parte, Corva *et al.* (2004) reportaron frecuencias menores para el genotipo TT (0.37) en la raza Angus, que las encontradas en este estudio para la misma raza Angus (TT= 0.50). Estos mismos investigadores registraron una frecuencia genotípica TT de 0.10 para cruzas raciales (*Bos taurus* X *Bos indicus*), valor inferior a lo encontrado en esta investigación para cruzas raciales (TT= 0.24). Sin embargo, Montoya *et al.* (2009) encontraron el genotipo TT en bajas frecuencias para las cinco razas criollas evaluadas (0.38, 0.29, 0.08, 0.08 y 0.0), resultados similares en este estudio para el mismo genotipo. Ciertamente, dadas las condiciones de producción de la ganadería de doble propósito en esta región, se requiere más estudios que evalúen más indicadores de la eficiencia productiva para las diferentes razas y así determinar cuál frecuencia o genotipo sería la deseable.

## VI. CONCLUSIONES

La proporción encontrada de vacas de raza Suizo Americano, Simmental y Cruzas raciales, 48, 24 y 17 %, respectivamente; se debe a que estas razas se adaptan en mayor medida a climas cálidos húmedos característicos de la ganadería de doble propósito en el estado de Chiapas.

Se sabe que diversos polimorfismos del gen leptina pueden afectar las características productivas del ganado lechero. Sin embargo, estos resultados no han sido consistentes. En este estudio, el genotipo mutado TT presentó menor frecuencia debido en gran medida al criterio del productor para la selección y reemplazo de vaquillas y toretes, sin considerar la información de los registros genealógicos y productivos. La mayor frecuencia de los genotipos CC y CT en las vacas, puede deberse a los ambientes adversos y los problemas de manejo a los que son sometidas, lo que no permite expresar su potencial genético, ocasionando que las unidades de producción sean menos eficientes. Así mismo, la presencia de los genotipos CT y CC en sementales utilizados como reproductores en los sistemas de producción de doble propósito en la región, produce la diseminación de genes no deseables en la descendencia, que no están relacionados con la producción, calidad de leche y carne, ocasionando que sean menos eficientes.

## VII. LITERATURA CITADA

- Abd-El Salam, K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr. J. of Biotechnol.* 2 (5):91-95.
- Agarwal, S.K., K. Vogel, S.R. Weitsman, and D.A. Magoffin. 1999. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1072-1076.
- Aguilar, E, L., R. Pinilla, D. Guisado, D. González, and F. López. 1984. Relation between body weight, growth rate, chronological age and puberty in male and female rats. *Rev Esp Fisiol.* 40: 83-86.
- Ahima, R.S., Dushay, J., Flier, S.N. 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J. Clin. Invest.* 99, 391 – 395.
- Ahima, R.S., and J.S. Flier. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*; 11:327-332.
- Ahima, R.S., and S.M. Hileman. 2000. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. *Regul Pept*: 92:1-7.
- Ahima, R.S., C.B. Saper, J.S. Flier, and J.K. Elmquist. 2000. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 21:263-307.
- Almog, B., Gold, R., Tajima, K., Dantes, A., Salim, K., Rubinstein, M., Barkan, D., Homburg, R., Lessing, J.B., Nevo, N., Gertler, A., and Amsterdam, A. 2001. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 183, 179–191.
- Álvarez, J.D.C., M.F.C. Munoz, W. Burgo, A. Montoya, E. Arboleda, M.A. Moreno, and O. Vergara. 2008. Estrategias para el mejoramiento genético en ganado criollo In: *Perspectivas de Conservación Mejoramiento y Utilización de Recursos Genéticos Criollos y Colombianos en los Nuevos Escenarios del Mejoramiento Animal*, 2008, Palmira-Valle del Cauca. pp.106 – 114.
- Álvarez, S., M.S. Mesa, F. Bandrés, and E. Arroyo. 2001. C282Y and H63D mutation frequencies in a population from central Spain. *Disease Markers.* 17:111– 114.
- Amann, R.P. 1983. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in holstein bulls. *J Dairy Sci*; 66:2606-2622.
- Anderson, L. 2001. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat. Rev. Genet.* 2: 130-138.
- Antczak, M. and J.V. Van Blerkom. 1997. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 1067 – 1086.
- Aquila, S., M. Gentile, E. Middea, S. Catalano, and C. Morelli. 2005. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:4753-4761.
- Barash, I.A., C.C. Cheung, D.S. Weigle, Ren H, Kabigting EB, *et al.* Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137:3144-3147.
- Barb, C.R., J.B. Barrett, and R.R. Kraeling. 2004. Role of leptin in modulating the hypothalamic-pituitary axis and luteinizing hormone secretion in the prepuberal gilt. *Domest Anim Endocrinol.* 26:201-214.

- Barb CR, J.B. Barrett, R.R. Kraeling, and G.B. 2001. Rampacek. Serum leptin concentrations, luteinizing hormone and growth hormone secretion during feed and metabolic fuel restriction in the prepuberal gilt. *Domest Anim Endocrinol.* 20:47-63.
- Barb, C.R., G.J. Hausman, K. Czaja. 2005. Leptin: a metabolic signal affecting central regulation of reproduction in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29:186-192.
- Barb, C.R., G.J. Hausman, and K.L. Houseknecht. 2001. Biology of leptin in the pig. *Domest Anim Endocrinol.* 21:297-317.
- Barb, C.R., and R.R. Kraeling. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci.* 82-83:155-167.
- Barkan, D., Hui, J., Dantes, A., Vardimon, L., Amsterdam, A., Rubinstein, M. 1999. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology.* 140:1731–1738
- Barkan D, Hurgin V, Dekel N, Armsterdam A & Rubinstein M 2005 Leptin induces ovulation in GnRH-deficient mice. *FASEB Journal* 19 133–135.
- Brannstrom, M., Norman, R.J. 1993. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod* 8:1762–1775.
- Bartha, T., A. Sayed-Ahmed, P. Rudas. 2005. Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. *Domest Anim Endocrinol.* 29:193-202.
- Bhat, G.K., T.L. Sea, M.O. Olatinwo, D. Simorangkir, and G.D. Ford. 2006. Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse. *J Androl.* 27:302-310.
- Bjorbaek, C., and B.B. Kahn. 2004. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 59:305-331.
- Blake, R. W. and C. Nicholson. 2002. Livestock, land usage and environmental outcomes in the developing world. *In:* Eds: BSAS Publication 33. Nottingham University Press. p:133-153.
- Bourdon, R.M. 1998. Shortcomings of current genetic evaluation systems. *J. Anim. Sci.* 76:2308-2323.
- Boelhaue, M., Sinowatz, F., Wolf, Paula-Lopes, F.F. 2005. maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts. *biology of reproduction*, 73: 737-744.
- Boyazoglu, J. and A. Nardote. 2003. The relationship between environment and animal production. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 11(1):57-64.
- Brannian, J.D. Zhao, Y. and McElroy, M. 1999. Leptin inhibits and gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum. Reprod.* 14, 1445 – 1448.
- Bronson, F.H. 2001. Puberty in female mice is not associated with increases in either body fat or leptin. *Endocrinology.* 142:4758-4761.
- Buchanan, F.C., C.J. Fitzsimmons, A.G. Van Kessel, T.D. Thue, D.C. Windkelman-Sim, S.M. Schmutz. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sci. Evol.* 34: 105-116.

- Buchanan, F.C., A.G. Van Kessel, C. Waldner, and D. A. Christensen. 2003. Hot Topic: An Association Between a Leptin Single Nucleotide Polymorphism and Milk and Protein Yield. *J. Dairy Sci.* vol. 86, p.3164–3166.
- Buff, P.R., A.C. Dodds, C.D. Morrison, N.C. Whitley, E.L. McFadin. 2002. Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J Anim Sci.* 80:2942-2948.
- Cañón, J. 2006. Utilización de información molecular en programas de mejoramiento animal. *Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7(1): 5-15.
- Caprio, M., A.M. Isidori, A.R. Carta, C. Moretti, M.L. Dufau. 1999. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology.* 140:4939-4947.
- Caprio, M., E. Fabbrini, A.M. Isidori, A. Aversa, and A. Fabbri. 2001. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* 12:65-72.
- Caprio, M., E. Fabbrini, G. Ricci, S. Basciani, and L. Gnessi 2003. Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biol Reprod.* 68:1199-1207.
- Carbone, S., B. Szwarcfarb, R. Reynoso, G. Bollero, and O. Ponzio. 2005. Leptin stimulates LH secretion in peripubertal male rats through NMDA receptors. *Endocrinol Res.* 31:387-396.
- Ávila, S. y R. Gasque. 2002. Grupos genéticos de ganado bovino destinados a la producción de leche. *Enciclopedia Temática Pecuaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.*
- Casas, E., S.N. White, T.L. Wheeler, S.D. Shakelford, M. Koomarie, D.G. Riley, C.C. Chase Jr, D.D. Johnson and T.P.L. Smith. 2006. Effects of calpastatin and m-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84: 520-525.
- Casas, E., S.D. Shekelford, J.W. Keele, M. Koomarie, T.P.L. Smith and R.T. Stone. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 2976-2983.
- Casas, E. 2006. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, Vol. 14, No. 1. pp. 24-31.
- Cerón, M.M., B.E. Trujillo, and J.D. Corrales. 2008. Leptin gene polymorphisms and beef longissimus muscle association in Hartón Del Valle and Blanco Orejinegro cattle. *Livestock Research for Rural Development.* Vol. 20 (7): 105:1-6.
- Cerón, M.M., F. A. E. Montoya-Atehortua, E. R. Trujillo-Bravo, E. J. Ramírez-Toro, y Z. I. Monsalve-Fonnegra. 2009. Marcadores del gen leptina en bovinos cruzados con angus, cebú, romosinuano y blanco orejinegro. *Revista Científica, FCV-LUZ.* Vol. XIX, N° 4, p. 371-381.
- Charon, M.K. 2004. Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. *Anim. Sci. Paip. and Rep.* 22(1): 135-139.
- Chebel, R.C., F. Susca, and J. E. P. Santos. 2008. Leptin Genotype Is Associated with Lactation Performance and Health of Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* Vol. 91: 2893 – 2900.
- Chehab, F.F., M.E. Lim, and R. Lu. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet.* 12:318-320.
- Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, *et al.* Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997; 138:855-858.

- Cheung, C.C., J.E. Thornton, S.D. Nurani, D.K. Clifton, and R.A. Steiner. 2001. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*. 74:12-21.
- Chiapparino, D. L., and P. Donini. 2004. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. Molecular Research Group, NIAB, Huntingdon Road, Cambridge CB3 0LE, U.K. Published on the NRC Research Press Web site at <http://genome.nrc.ca>.
- Chilliard, Y., C. Delavaud, and M. Bonnet. 2005. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Dom Anim Endocrinol* vol. 29, p. 3-22.
- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P. and Guy-Grand, B. 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392 398-401.
- Cokett, N.E., T.L. Shay, J.E. Beever, D. Nielsen, J. Albretsen, M. Georges, K. Peterson, A. Stephens, W. Vernon, O. Timofeevskata, S South, J. Mork, A. Macilius, and T. D. Bunch. 1999. Localization of the locus causing spider lamb syndrome to the distal end of ovine chromosome 6. *Mamm. Gen.* 10: 35-38.
- Coppari, R., M. Ichinose, C.E. Lee, A.E. Pullen, and C.D. Kenny. 2005. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* 1:63-72.
- Cornide, M. T. 2002. Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba.
- Corva, P.M., M.G. Fernández, M. Motter, L. Soria, E.L. Villarreal, A. Schor, C. Mezzadra, L.M. Melucci, and M.C. Miquel. 2007. Efecto de polimorfismos en el gen de leptina sobre aptitudes carniceras de novillos correspondientes a biotipos europeos y cebuinos. *Revista Argentina de Producción Animal.*, vol. 27, supl. 1. p. 243-244.
- Corva, P.M., L.M. Melucci, M.B. Ganovelli, G. Masa, N. Norero, C. Mezzadra, and M. Grave. 2004. Efectos de un polimorfismo en el gen de leptina en toros de razas carniceras en condiciones de pastoreo. 27 Congreso Argentino de Producción Animal. Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal.*, GM6, p.1-6.
- Craig, J., Zhu, H., Dyce, P.W., Petrik, J., and Li, J. 2004. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *endocrinology*, 145: 5355-5363.
- Crow, J.F. 1999. Hardy, Weinberg and Language Impediments. *Genetics* **152**: 821-5.
- Coulter, G.H., and R.H. Foote. 1979. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: A review. *Theriogenology*. 11:297-311.
- Cunningham, M. J., D.K. Clifton, and R.A. Steiner. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod.* 60:216-222.
- Curtis, S.K., and R.P. Amann. 1981. Testicular development and establishment of spermatogenesis in holstein bulls. *J Anim Sci.* 53:1645-1657.
- Davis, G.P., and S.K. DeNise. 1998. The impact of genetic markers on selection. *J. Anim. Sci.* 76 (3):2331-2339.

- Delgado, R. 2000. Comportamiento reproductivo de bovinos productores de leche (doble propósito) en el trópico. Factores que lo afectan. En: Ed: J. Santos. Alternativas para la intensificación de sistemas ganaderos de doble propósito en el trópico. Memoria de conferencia internacional. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Mérida, México. pp: 23-33.
- Delgado, R., J.G. Magaña, C. Galina and J.C. Segura. 2004. Effect of body condition at calving and its changes during early lactation on postpartum reproductive performance of Zebu cows in a tropical environment. *J. Appl. Anim. Res.* 26:23-28.
- 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.
- Dekkers, J.C.M. 1999. Breeding values for identified quantitative trait loci under selection. *Genet. Sel. Evol.* 31: 421-436.
- de Vienne D. 2003. Molecular markers in plant genetics and biotechnology. D. de Vienne Ed. Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA, Plymouth, UK. pp. 1-2.
- Díaz, M.C. 1994. Evaluación genética en la raza Avileña Negra-Iberica. *Bovis.* 59:47-58.
- Díaz, M.C., A. Moreno, and M.J. Carabaño. 2000. Primeros pasos del programa de mejora genética de Limusín en España. *FEAGAS*, Julio-Diciembre, 18:54-59.
- Ding, C., E. Maier, A. Roscher, A. Braun, and C.R. Cantor. 2004. Simultaneous quantitative and allele-specific expression analysis with real competitive PCR. *BMC Genetics*. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/5/8>).
- Duggal, P.S., Ryan, N.K., Van der Hoek, K.H., Ritter, L.J., Armstrong, D.T., Magoffin, D.A. Norman, R.J. 2002. Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leukocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles. *Reproduction* 123 891–898.
- Edel, V. 1998. Polymerase Chain Reaction in Mycology in Overview. CAB International. Applications of PCR in Micology. 357 pp.
- Ellman, C., Corbett, J.A., Misko, T.P., McDaniel, M. and Beckerman, K.P. 1993. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary. A potential role for nitric oxide in the ovulatory process. *Journal of Clinical Investigation* 92 3053–3056.
- Elmqvist, J., C. Bjorbaek, R. Ahima, J. Flier, C. Saper. 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 395:535-47.
- El-Hefnawy, T., S. Loffe, and M. Dym. 2000. Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology.* 141:2624-2630.
- Estrada, R., M. Parra, J. G. Magaña, J. Santos and C. Aguilar. 2002. Estimation of apparent energetic and economic efficiency of cows with different levels of *Bos taurus*/*B. indicus* blood, using a simulation model, on dual purpose herds in the tropics of Mexico. *In*: Eds: E.Owen, T. Smith, M.A. Steele, S. Anderson, A.J. Duncan, M. Herrero, J.D. Leaver, C.K. Reynolds, J.I. Richards and J.C. Kú-Vera. Responding to the livestock revolution: the role for globalization and implication for poverty alleviation. BSAS Publication 33. Nottingham University Press. p:51-52.

- Faletti, A., Pe´rez-Martínez, S., Perotti, C. and Gimeno, M.A.F. 1999. Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOS) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 3 330–347.
- Falconer, D.S. 1981. Introduction to quantitative genetics. 2a. Ed. Longman Ltd. Londres.
- Falconer, D. S., and T. C. F. McKay. 1996. Introduction to genetics. 4ª ed. Edit. Harlow Longman.
- FAO. 2002. FAOSTAT Data base.
- Fedorcsak, P., and Storeng, R. 2003. Effects of leptin and leukemia inhibitory factor on preimplantation development and stat3 signaling of mouse embryos *in vitro*. *biology of reproduction*, 69: 1531-1538.
- Fei, H., H.J. Okano, C. Li, G.H. Lee, C. Zhao, R. Darnell, and J.M. Friedman. 1997. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7001-5.
- Fields, M.J., J.F. Hentges Jr., and K. W. Cornelisse. 1982. Aspects of the sexual development of Brahman versus Angus bulls in Florida. *Theriogenology*. 18:17-31.
- Fitzsimmons, C.J., S. M. Schmutz, R.D. Bergen, and J.J. McKinnon. 1998. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle, *Mamm Genome*. 9: 432-434.
- Fries, R., A. Eggen, and J.E. Womack. 1993. The bovine genome map. *Mamm Genome*;4 (8):405-28.
- Fujita, R. 2007. Genómica y su aplicación en producción animal. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Vol. 15 (Supl. 1) pp: 67-68.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. UNAM. México. 252 p.
- García, M.R., M. Amstalden, S.W. Williams, R.L. Stanko, and C.D. Morrison. 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci*. 80:2158-2167.
- Georges, M., J.M. Massey. 1991. Velogenetics or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenol*. 25:151-159.
- Geary, T.W., E.L. McFadin, M.D. MacNeil, E.E. Grings, R.E. Short, R.N. Funston, and D.H. Keisler. 2003. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J. Anim. Sci.* vol. 81 p. 1-8.
- Gelderman, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. *Methods Theor. Appl. Genet*. 46: 46319-46330.
- Giovambattista, G., M.V. Ripoli, J.P. Lirón, M.E. Kienast, C.E.E. Villegas, F.N. Dulout, and G.P. Peral. 2001. Aplicación de las Técnicas de Polimorfismo de DNA en la Resolución de Casos de Abigeato, Identificación Individual y Determinación de Paternidad. *Analecta vet*. 21(1): 5 – 11.
- Glander, H.J., A. Lammert, U. Paasch, A. Glasow, and J. Kratzsch. 2002. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia*. 34:227-233.
- Goddard, M. E. 1992. A mixed model for analyses of data on multiple genetic markers. *Theor. Appl. Genet*. 83: 878-886.

- Goddard, M. E., S.A. Barwick, and B.P. Kinghorn. 1998. Breeding objectives for meat animals: development of a profit function. *Animal Production in Australia* **22**: 90-94.
- Gómez, C. H., A. Tewolde y J. Nahed, T. 2002. Análisis de los sistemas ganaderos de doble propósito en la zona centro del estado de Chiapas, México. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 10(3):175-182.
- Greewald, G.S., and Roy, S.K. 1994. follicular development and its control. in: knobill & neill jd (eds), *the physiology of reproduction*, raven press, new york: 629-724.
- Guillaume, F., S. Fritz, D. Boichard, and T. Druet. 2008. Short Communication: Correlations of Marker-Assisted Breeding Values with Progeny-Test Breeding Values for Eight Hundred Ninety-Nine French Holstein Bulls. *J. Dairy Sci.* 2008. 91:2520-2522.
- Gurbuz, B., S. Yalti, C. Ficicioglu, and S. Tasdemir. 2005. The relation of serum and follicular fluid leptin and ovarian steroid levels in response to induction of ovulation in in vitro fertilization cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 118:214-218.
- Hafez, E.S.E., and B. Hafez. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 ed. México: McGraw- Hill.
- Haley, C.S. 1995. Livestock QTLs ? bringing home the bacon?. *Trends Genet.* 11(12):488-492.
- Heaton, M.P., G.P. Harhay, G.L.Bennett, R.T. Stone, W.M. Grosse, E. Casas, J.W. Keele, T.P. Smith, C.G. Chitko-McKown, and W.W. Laegreid. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome.*; 13(5):272-81.
- Heitschmid, R. K., R. E. Short, and E. E. Grings. 1996. Ecosystems, sustainability, and animal agriculture. *J. Anim. Sci.* 74:1395-1405.
- Henderson, C. R. 1984. Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph, Ontario, Canada.
- Herrera, H.J.G., F.C. Lemus, and S.A. Barreras 2003. Mejoramiento Genético Animal. Un enfoque aplicado. 1ª edición. Ganadería IREGEP. Texcoco, Edo de México. Pp:151.
- Horlick, M.B., M. Rosenbaum, M. Nicolson, L.S. Levine, and B. Fedun. 2000. Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:2509-2518.
- Houseknecht, K.L., and C.P. Portocarrero. 1998. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol.* 15:457-475.
- Houseknecht, K.L., C.A. Baile, R.L. Matteri, and M.E. Spurlock. 1998. The biology of leptin: a review. *J. Anim Sci.* vol. 76 p. 1405–1420.
- Hueston, W.D., D.R. Monke, and R.J. Milburn. 1988. Scrotal circumference measurements on young Holstein bulls. *J Am Vet Med Assoc.* 192:766-768.
- Holmann, F. 1998. Evaluación Económica de Sistemas de Producción de Leche en el Trópico, en: *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, volumen 6, número1, suplemento1. Publicación de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal.

- 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.
- INEGI. 2004. Anuarios Estadísticos de los Estados, 2004. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 2004. p. 197.
- Magaña, J. G., y R. Delgado. 1998. Algunas observaciones sobre el comportamiento reproductivo de vacas Pardo Suizo en el trópico subhúmedo de México. *Rev. Biomédicas.* 9:197-203.
- Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Poletsky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988, vol. 16 p. 1215.
- Ingvarsen, K.L., and Y.R. Boisclair. 2001. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest Anim Endocrinol.* 21:215-250.
- Iqbal, J., S. Pompolo, T. Murakami, E. Grouzmann, and T. Sakurai. 2001. Immunohistochemical characterization of localization of long-form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus. *Brain Res.* 920:55-64.
- Janss, L. L. G., R. Thompson, and J.A.M. van Arendonk. 1995. Application of Gibbs sampling for inference in a mixed major gene-polygenic inheritance model in animal populations. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1137-1147.
- Jiménez, P., y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest. Agr. Sist Recur. For.* 3:253-268.
- Jockenhovel, F., W.F. Blum, E. Vogel, P. Englaro, and D. Muller-Wieland . 1997. Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2510-2513.
- Joep, T., A. Lammert, J. Kratzsch, U. Paasch, and H.J. Glander. 2003. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl* 2003; 26:335-341.
- Jordan, S.A., and P. Humphries. 1994. Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. *Hum. Mol. Genet.* 3 (10): 1915.
- Kalra, S.P. 1993. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev.* 14:507-538.
- Kappes, S.M., J.W. Keele, R.T. Stone, R.A. McGraw, S.T. Sonstegard, T.P.L. Smith, N. Lopez-Corrales, and C.W. Beattie. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research.* (7): 235-249
- Kaynard, A.H., K.Y. Pau, D.L. Hess, and H.G. Spies. 1990. Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology.* 127:2437-2444.
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A. and Tanaka, T. 2002. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *endocrinology*, 143: 1922-1931.
- Knights, S.A., R.L. Baker, D. Gianola, and J.B. Gibb. 1984. Estimates of heritabilities and of genetic and phenotypic correlations among growth and reproductive traits in yearling Angus bulls. *J Anim Sci.* 58:887-893.

- Knott, S.A., and C.S. Haley. 1992. Aspects of maximum likelihood methods for the mapping quantitative trait loci in line crosses. *Genet. Res.* 60: 139-151.
- Knobil, E., and J. Neill. 1988. *The physiology of reproduction*. New York: Raven.
- Lin, J., C.R. Barb, R.L. Matteri, R.R. Kraeling, and X. Chen. 2000. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. *Domest Anim Endocrinol.* 19:53-61.
- Lindblad-Toh, K., E. Winchester, M.J. Daly, D.G. Wang, and J.N. Hirschhorn. 2000. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphism in mouse. *Nat. Genet.* 24: 381-386.
- Luukkaa, V., U. Pesonen, I. Huhtaniemi, A. Lehtonen, and R. Tilvis. 1998. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:3243-3246.
- Magaña, J. G., E. Valencia y R. Delgado. 1996. Efecto del amamantamiento restringido y la crianza artificial sobre el comportamiento de vacas Holslein y sus crías en el trópico subhúmedo de México. *Veterinaria México.* 27:271-278.
- Makker, H.P.S. 2005. Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. IAEA/FAO. Proceedings of international symposium on biotechnology in food and agriculture. Springer. Netherlands. Conf 10.
- Montaldo, V.H.H., y P.N. Barría. 1998. Mejoramiento genético de animales. *Ciencia al Día.* 2(1):1-19.
- Malven, P.V., S.A. Haglof, and H. Degroot. 1992. Effects of intracerebral administration of neuropeptide-Y on secretion of luteinizing hormone in ovariectomized sheep. *Brain Res Bull.* 28:871-875.
- Maniatis, T., F.E. Frittsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Marcantonio, S. 2004. Test de ADN para predecir el potencial productivo. *Súper campo* (114). Pp.: 88-90.
- Martínez, G.J.C., y B.G.M. Parra. 2008. Mejoramiento genético del ganado Brahman en México. *Tu Revista Digital. UAT.* Vol. 2 Núm. 4. pp:1-16.
- Marskovtsova, L., P. Marjoram, S. Tavare. 2000. The age of a unique event polymorphism. *Genetics,* 156:401-409.
- Matsuoka, T., Tahara, M., Yokoi, T., Masumoto, N., Takeda, T., Yamaguchi, M., Tasaka, K., Kurachi, H., and Murata. Y. 1999. tyrosine phosphorylation of stat3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochemical and biophysical research communications,* 256: 480-484.
- Meuwissen, T. H. E. and J.A.M. van Arendonk. 1992. Potential improvements in rate of genetic gain from marker assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *J. Dairy Sci.* **75**: 1651-1659.
- Meuwissen, T. H. E. and M.E. Goddard. 1996. The use of marker-haplotypes in animal breeding schemes. *Genet. Sel. Evol.* **28**:161-176.
- Misztal, I. 2006. Challenges of application of marker assisted selection – a review. Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, Poland. *Animal Science Papers and Reports.* Vol. 24. No.1pp: 5-10.
- Montaldo, H.H., and C. Meza-Herrera. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electr. J. Biot.* 1(2).

- Montaldo, H. 1993. Biotecnología y mejoramiento genético animal en México. En: (M. Arenas, L. F. Bojalil y L. Hernández Comp. Las profesiones en México: Agronomía, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Universidad de Colima, México, D. F. pp 90-108).
- Montoya, A.E., M.F Cerón-Muñoz, B.E. Trujillo, T.E. Ramírez, y M.P. Angel. 2009. Frecuencia de los marcadores del gen leptina en razas bovinas criollas y colombianas: I. Romosinuano, Chino Santandereano, Sanmartinero y Velásquez. *Revista Científica, FCV-LUZ*. Vol. 19: 38 – 48.
- Morris, C.A., N.G. Cullen, S.M. Hickey, A.M. Crawford, D.L. Hyndman, C.D.K. Bottema, and W.S. Pitchford. 2001. Progress in DNA marker studies of beef carcass composition and meat quality in New Zealand and Australia. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.*, Queenstown, NZ, 14: 17-22.
- Morris, D.L., C.L. Tyner, P.G. Morris, R.L. Forgason, and J.L. Forgason. 1989. Correlation of scrotal circumference and age in American Brahman bulls. *Theriogenology*. 31:489-494.
- Newton, G.R., K.K. Schillo, and L.A. Edgerton, 1988. Effects of weaning and naloxone on luteinizing hormone secretion in postpartum ewes. *Biology of Reproduction*, 39: 532-535.
- Nicholson, C. 1995. Mexico's Dairy Sector in the 1990's: A Descriptive Analysis. Department Agricultural Resources and Managerial Economics, Research Bulletin 95-05. Cornell University, Ithaca, N. Y.
- Olive, M.D., and P. Bean. 1999. Minireview. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *American Soc. Microbiol.* 37(6):1661-1669.
- Osorio, A. M. M. 1998. Caracterización de los sistemas bovinos de doble propósito en el trópico. Observaciones sobre el comportamiento productivo de grupos raciales. Memoria. Cuarto foro de análisis de los recursos genéticos: Ganadería bovina de doble propósito. SAGAR. Villahermosa, Tabasco, México. p. 8-28.
- Osorio, M. and J.C. Segura. 2002. Reproductive performance of dual purpose cows in Yucatán, Mexico. *Livestock Research for Rural Development* 14(3).
- Palmert, M.R., S. Radovick, and P.A Boepple. 1998. The impact of reversible gonadal sex steroid suppression on serum leptin concentrations in children with central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:1091-1096.
- Plant, T.M., and A.R. Durrant. 1997. Circulating leptin does not appear to provide a signal for triggering the initiation of puberty in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*. 138:4505-4508.
- Parra-Bracamonte, G. M., J.G. Magaña, R. Delgado, M. Osorio and J.C. Segura. 2005. Genetic and non-genetic effects on productive and reproductive traits of cows in dual purpose herds in Southeastern Mexico. *Genet. Mol. Res.* 4(3):482-490.
- Qian, H., C.R. Barb, M.M. Compton, G.J. Hausman, and M.J. Azain. 1999. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. *Domest Anim Endocrinoly.* 16:135-143.
- Rafalski, J. A. 2002. Amplification of single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*; 5:94-100.

- Rivas, R. L., 1992. El sistema Ganadero de Doble Propósito en América Tropical: Evolución Perspectivas y Oportunidades. Simposium Internacional sobre Alternativas y Estrategias en producción Animal, Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Zootecnia, México Abril 6-9.
- Rivas, L., and F. Holmann. 2000. Early adoption of *Arachis pintoii* in the humid tropics: the case of dual - purpose livestock systems in Caquetá, Colombia, in: *Livestock Research for Rural Development* (12)
- Rojas, M.R.I. 2004. Introducción a la Biología Molecular. Manual de Curso FIT-624. Introducción a la Biología Molecular. Colegio de Postgraduados. México. 80 pp.
- Roman, E.A., Ricci, A.G. and Faletti, A.G. 2005. Leptin enhances ovulation and attenuates the effects produced by food restriction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 242 33 – 41.
- Ruane, J., G. Klemesdal and E. Sehested. 1997. Views on the potential impact of cloning on animal breeding and production. *Acta Agric. Scand.* **47**: 209-212.
- Ruiz, S.B., H.J.G. Herrera, M.R. Rojas, H.H. Ruiz, N.P. Mendoza, G.M. Olivia, M.F. Gutierrez, T.G. e M.C. Ibarra. 2009. Estimación de polimorfismos del gen de leptina de sementales en el sistema doble proposito bovino, en villaflores, Chiapas, México. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN: 1695-7504. Vol. 10, No 12.
- Ruiz-Cortes, Z.T., Y. Martel-Kennes, N.Y. Gevry, B.R. Downey, and M.F. Palin. 2003. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 2003; 68:789-796.
- Ruiz-Cortes, Z.T., T. Men, M.F. Palin, B.R. Downey, and D.A. Lacroix. 2000. Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary. *Mol Reprod Dev* 56:465-474.
- SAS User's Guide: Statistics, Version 8 Edition. 2000. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Salazar-Marroquín, E.L., P.M. González, G.A. Del Bosque, D. Rezéndez-Pérez, S.H. Barrera y R.A.M. Sifuentes. 2004. Evaluación de marcadores microsatélites para la verificación de parentesco en ganado Beefmaster y Charolais en el noreste de México. *Tec. Pec. Mex.* 42: 429-435.
- San Primitivo, T.F. 2001. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo XX. *Arch. Zootec.* 50:517-546.
- Schenkel, F.S., Miller, S.P., Ye, X., Moore, S.S., Nkrumah, J.D., Li, C., Yu, J., Mandell, I.B., Wilton, J.W. y Williams, J.L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci.* vol. 83, p. 2009-2020.
- Scheaffer, R.L., W. Mendenhall, L. Ott. 1987. Elementos de muestreo. Traducción de; Elementary Survey Sampling; traducido por: G. Rendón Sánchez y J.R. Gómez Aguilar. México. Grupo Editorial Iberoamérica. 321 p.
- Schneider, J.E., D. Zhou, R.M. Blum. 2000. Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm Behav.* 37:306-326.
- Schwartz, M.W., R.J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn, and D. G. Baskin. 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 98:1101-6.

- Shukovski, L. and Tsafiri, A. 1994. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 135 2287–2290.
- Smith, B.A., J.S. Brinks, G.V. Richardson. 1989. Relationships of sire scrotal circumference to offspring reproduction and growth. *J Anim Sci.* 67: 2881-2885.
- Smith, G.D., L.M. Jackson, and D.L. Foster. 2002. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology.* 57:73-86.
- Speeding, C. R. W. 1995. Sustainability in animal production systems. *Anim.Sci.* 61:1-8.
- Spicer, L.J. 2001. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol.* 21:251-270.
- Spicer, L.J., C.S. Chamberlain, and C.C. Francisco. 2000. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine.* 12:53-59.
- Spicer, L.J., and C.C. Francisco. 1997. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 138:3374-3379.
- Spicer, L.J., and C.C. Francisco. 1998. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod.* 58:207-212.
- Stewart, T.S., C.R. Long, and T.C. Cartwright. 1980. Characterization of cattle of a five-breed diallel. III. Puberty in bulls and heifers. *J Anim Sci.* 50:808-820.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M. and Strosberg, A.D. 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genetics* 18 213–215.
- Sullivan, S.D., and S.M. Moenter. 2004. Gamma-aminobutyric acid neurons integrate and rapidly transmit permissive and inhibitory metabolic cues to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 145:1194-1202.
- Switonski, M. 2002. Molecular genetics in beef cattle breeding-a review. *Anim. Sci. Pap. and Rep.* 20(1): 7-18.
- Tabor, H.K., N.J. Risch, and R.M. Myers. 2002. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations . *Nat Rev Genet.* 3 :391-397.
- Tartaglia, L.A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, and J. Culpepper. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 83:1263-1271.
- Tartaglia, L.A. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem.* 272:6093-6096.
- Tena-Sempere, M., L. Pinilla, L.C. Gonzalez, C. Dieguez, and F.F. Casanueva. 1999. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol* 161:211-218.
- Tena-Sempere, M., L. Pinilla, L.C. Gonzalez, J. Navarro, C. Dieguez. 2000. In vitro pituitary and testicular effects of the leptin-related synthetic peptide leptin(116-130) amide involve actions both similar to and distinct from those of the native leptin molecule in the adult rat. *Eur J Endocrinol.* 142:406-410.
- Tena-Sempere, M., L. Pinilla, F.P. Zhang, L.C. Gonzalez, and I. Huhtaniemi 2001. Developmental and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Biol Reprod.* 64:634-643.
- Tewolde, A., J. C. Martínez, G. E. Gutiérrez y J.G. Magaña. 2002. Utilización estratégica de los recursos genéticos para la intensificación de los sistemas de

- producción bovina de doble propósito. Memorias. IX Curso Internacional de Reproducción Bovina. UNAM-FMVZ-División de Educación Continua-Departamento de Reproducción. México, D. F. p. 121-134.
- Teyer, B. R., J.G. Magaña, J. Santos y J.C. Aguilar. 2003. Comportamiento productivo y reproductivo de vacas de tres grupos genéticos en un hato de doble propósito en el sureste de México. *Rev. Cubana de Ciencia Agric.* 37(4):363-370.
- Thallman, R.M. 2004. DNA testing and marker assisted selection. *Proc. Beef Improv. Fed. 36th Ann. Res. Symp. Ann. Meet. USA.* Pp. 20-25.
- Toledo, M. J. 1994. Ganadería bajo pastoreo: Posibilidades y parámetros de sostenibilidad. In: *Ganadería y recursos naturales en América Central: Estrategias para la sostenibilidad.* E.J. Homan (Ed.) San José, Costa Rica. p. 141-162.
- Tupac-Yupanqui, I., J.A. Baro, and S. Dunner. 2007. Effects of DGAT1 alleles in milk components traits in Spanish Holstein breed. *Arc. de Zoot.* 53: 293-299
- Valadez, M.E., and K. Günter. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Editorial Mundi-Prensa. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 147 p.
- Vaughan, P. 2000. DNA Repair Protocols. Prokaryotic Systems (Methods in Molecular Biology). Humana Press. Hardcover. 220 pp.
- Van der Werf, J. 2000. Basics of Marker assisted selection. Memories of QTL Course: Identifying and incorporating genetic markers and major genes in animal breeding programs. Sao Paulo, Brasil. Chapter 15. pp 119-127.
- Van Eenennaam, A. 2006. DNA-based technologies. pp. 66-73. En: *Beef sire selection manual.* National beef cattle evaluation consortium (Eds.), USA
- Wakayama, T., A. C. F. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson and R. Yanagimachi. 1998. Fullterm development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394**: 369-373.
- Whimmers, K., C.L. Lin, E. Tholen, D.G.J. Jennen, K. Schellender and S. Ponsuksili 2005. Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. *Anim. Gen.* 36: 152-155.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1998. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications.* CAB International. 357 pp.
- Williams, G.L., M. Amstalden, M.R. Garcia, R.L. Stanko, S.E. Nizielski. 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 339-349.
- Wolf, F.R., J.O. Almquist, and E.B. Hale. 1965. Prepuberal Behavior and Puberal Characteristics of Beef Bulls on High Nutrient Allowance. *J Anim Sci* 24:761-765.
- Ye, S., S. Humphries, and F. Green. 1992. Allele specific amplification by tetra- "primer" PCR. *Nucleic Acids Res.* 20:1152.
- Ye, S., S. Dhillon, X. Ke, A.R. Collins, and I.N. Day. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* vol. 29, n° 88, p. 1-8.

- Zabeau, L., D. Lavens, F. Peelman, S. Eyckerman, J. Vandekerckhove, and J. Tavernier. 2003. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett.* 546:45-50.
- Zachow, R.J. and Magoffin, D.A. 1997. Direct intraovarian effects of leptin impairment synergistic action of insulin-like growth factor I on follicle stimulating hormone-dependent estradiol 17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 138, 847 – 850.
- Zavala-Páramo, M.G., H. Cano-Camacho, J.J. Valdez-Alarcón y J. López-Meza. 2002. Marcadores moleculares: revisión y aplicaciones prácticas en animales. *Cien. Nico.* 32: 99-109.
- Zhang, K., Wang, S., Ma, Y., Lou, Y., Wei, H., Sun, X., Zhao, Y., Li, Y., Dai, Y., Zhang, L., and Li, N. 2007. effects of leptin supplementation in *in vitro* maturation medium on meiotic maturation of oocytes and preimplantation development of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. *animal reproduction science*, 101: 85-96.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, and L. Leopold. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432.
- <http://inegi.org.mx/inegi/default.aspx>