



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

IDENTIFICACIÓN DE ALELOS POLIMÓRFICOS EN EL GEN LEPTINA DE OVINOS KATAHDIN

EDGAR VALENCIA FRANCO

T E S I S

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

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **Identificación de alelos polimórficos en el gen leptina de ovinos Katahdin**, realizada por el alumno: **Edgar Valencia Franco**, 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 GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR

Dr. Omar Hernández Mendo

ASESOR

Dr. Emilio M. Aranda Ibáñez

ASESOR

Dr. René Pinto Ruiz

ASESOR

Dr. Alejandro Ley de Coss

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2016.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, en especial al área de Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad Ganadería por la confianza otorgada durante mi formación.

A cada uno de los profesores que compartió su experiencia y conocimientos de manera desinteresada.

Al personal administrativo y a todos aquellos que me brindaron su amistad.

A los miembros del Comité Particular por sus acertados consejos y sugerencias.

Gracias a todos.

DEDICATORIA

A mis padres Lucina y Arturo:

Por apoyarme a seguir adelante y estar siempre presentes en los momentos malos y menos malos, además, de ser la fuente de inspiración y motivación para superarme cada día más.

A mis hermanos Arturo y Ana Patricia:

Por su compañía y apoyo incondicional en cada decisión.

A los miembros más jóvenes de la familia mis sobrinos Ángel y Sofía los quiero mucho.

A mis amigos:

Que estuvieron, que están y continúan a mi lado, con los que he compartido tantas experiencias y desveladas, gracias por su amistad.

A Liliana Galicia por darme la alegría más grande de mi vida Santiago los amo.

Contenido

Página

ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN GENERAL	X
GENERAL ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. CAPÍTULO I	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 SITUACIÓN DE LA OVINOCULTURA EN MÉXICO.....	4
2.2 MEJORAMIENTO GENÉTICO Y SELECCIÓN ANIMAL	5
2.3 SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES (MAS)	5
2.4 POLIMORFISMO DE CONFORMACIÓN DE CADENA ÚNICA (SSCP)	6
2.5 GEN LEPTINA.....	7
2.6. POLIMORFISMOS DEL GEN LEPTINA EN OVINOS	9
2.7. OVINOS KATAHDIN	10
2.8 REFERENCIAS	11
3. CAPÍTULO II.....	17
IDENTIFICACIÓN DE ALELOS POLIMÓRFICOS EN EL GEN LEPTINA DE OVINOS KATAHDIN	18

3.1 RESUMEN	18
3.2 ABSTRACT	18
3.3 INTRODUCCIÓN.....	19
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.4.1 Animales y extracción de ADN	20
3.4.2 Amplificación del exón 3 del gen leptina.....	21
3.4.3 Polimorfismo de Conformación de Cadena Única (SSCP).....	22
3.4.4 Análisis de secuenciación.....	22
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.6 CONCLUSIONES	27
3.7 REFERENCIAS	28
4. CAPÍTULO III	32
EL GEN LEPTINA Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DE LA CARNE EN	
RUMIANTES.....	33
4.1 RESUMEN	33
4.2 CALIDAD DE LA CARNE DE RUMIANTES Y SU RELACIÓN CON EL GEN	
LEPTINA	33
4.3 RECEPTORES DE LEPTINA.....	35
4.4 LEPTINA Y APETITO	38
4.5 LEPTINA Y GENOTIPOS EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL	40
4.6 CONCENTRACIONES DE LEPTINA EN SANGRE Y CARACTERÍSTICAS DE	
LA CANAL	41

4.7 IMPLICACIONES	42
4.8 REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Frecuencias de los alelos más comunes del gen Leptina en diferentes razas de ovinos.	10
2	SNPs y alelos identificados del gen leptina exón 3 en secuencias de ovinos Katahdin.	24
3	Homología del exón 3 del gen leptina de ovinos Katahdin con secuencias depositadas en el NCBI.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Representación esquemática del fundamento de la técnica de SSCP durante la electroforesis en un gel no desnaturizante. La movilidad electroforética de cada fragmento depende del auto plegamiento de acuerdo a la formación de estructuras secundarias.	7
2	Estructura del gen leptina.	8
3	Producto de PCR del gen leptina en muestras de sangre de ovinos Katahdin. Pozo 1) Marcador Φ X174, pozos 2, 3, 4, 5 y 6) gen leptina fragmento de 471 pb.	23
4	Producto de PCR-SSCP por electroforesis en gel de poliacrilamida 12 % (37:1) para el gen leptina exón 3 en ovinos Katahdin.	24
5	Árbol filogénico gen leptina, secuencias encontradas en ovinos Katahdin en comparación con los genes leptina de <i>Capra hircus</i> , <i>Bos taurus</i> y <i>Bubalus bubalis</i> .	26
6	Estructura de la leptina, de sus receptores y mecanismos de señalización intracelular. JAK2, <i>Janus kinase 2</i> . IRS-2, <i>insulin receptor substrate-2</i> . PI3K, <i>phosphoinositide 3-kinase</i> . STAT3, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> .	37
7	Factores orexigénicos y anorexigénicos relacionados con la hormona leptina.	39

RESUMEN GENERAL

El gen leptina se encuentra en el cuarto cromosoma del genoma ovino y bovino. Su receptor presenta seis isoformas a partir de un mismo ARNm. Se han identificado receptores para la hormona leptina en el hipotálamo y otros tejidos periféricos. La hormona leptina, participa en procesos fisiológicos relacionados con la regulación del metabolismo energético, consumo de alimento, deposición de grasa, reproducción e inmunidad, entre otros. En especies zootécnicas como bovinos y cerdos, se identifican polimorfismos del gen leptina asociados con la ingesta de alimentos, características de crecimiento y de la canal, y la calidad de la carne, los cuales son de interés para los productores pecuarios. El objetivo de esta investigación fue identificar polimorfismos del gen leptina en el exón 3 de ovinos Katahdin. El estudio consistió en un muestreo de 234 animales con una edad entre 3 y 18 meses, a los cuales se les extrajeron 5 mL de sangre de la vena yugular. La extracción de ADN a partir de sangre se realizó usando el kit Wizard® Genomic ADN Purification (PROMEGA). Para la amplificación del fragmento del gen leptina (Gen Bank: AJ512639) se utilizaron los primers con las siguientes secuencias Forward: 5'-AGGAAGCACCTCTACGCTC-3', Reverse: 5'-CTTCAAGGCTTCAGCACC-3. El tamaño del producto amplificado fue de 471 pb. La variación alélica del gen leptina se obtuvo por PCR-SSCP y el análisis de secuenciación confirmó polimorfismos del nucleótido simple (SNPs) en el exón 3 del gen leptina. Las secuencias identificadas comparten alta similitud con las secuencias de leptina publicados en otras razas de ovinos. Los resultados confirman la presencia de tres polimorfismos (alelos 01, G y T), que corrobora la variación de tres alelos del exón 3 del gen leptina de ovinos Katahdin. Sin embargo es necesario identificar la presencia de SNPs y validar la asociación con los

genotipos en ovinos Katahdin, antes de la implementación de programas en mejoramiento animal.

Palabras clave: ADN, polimorfismo, SNP, exón, ovinos Katahdin, consumo.

GENERAL ABSTRACT

The leptin gene is located on the fourth chromosome in the ovine and bovine genome. There are six different isoforms of the leptin receptor expression of same mRNA. Leptin receptors have been identified for the hormone leptin in the hypothalamus and other peripheral tissues. Leptin is a hormone involved in physiological processes related to the regulation of energy metabolism, feed intake, fat deposition, reproduction and immunity, among others things. In farm animals species such as cattle and swine, leptin gene polymorphisms was associated with feed intake, growth and carcass composition, and meat quality, which are of interest to livestock producers. The aim of this research was to identify polymorphisms of the leptin gene in exon 3 of Katahdin sheep. The study consisted of a sample of 234 animals with aged between 3 and 18 months, which were extracted 5 mL of blood from the jugular vein. DNA extracted from blood was performed using the Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega). For amplification of the leptin gene (GenBank: AJ512639) primers were used with the following sequences Forward: 5'-AGGAAGCACCTCTACGCTC-3 'Reverse: 5'-CTTCAAGGCTTCAGCACC-3. The size of the amplified product was 471 bp Allelic variation leptin gene was obtained by PCR-SSCP and sequence analysis of single nucleotide polymorphisms confirmed (SNPs) in exon 3 of the leptin gene. The identified sequences share high similarity with published sequences of leptin in other sheep breeds. The results confirm the presence of three polymorphisms (alleles 01, G and T), which bear out of three alleles in exon 3 of the leptin gene in Katahdin sheep. However it is necessary to identify the presence of SNPs and validate the association with genotypes in sheep Katahdin, before implementing livestock breeding programs.

Keywords: DNA, polymorphism, SNP, exon, Katahdin sheep, intake.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La explotación de ovinos en México se realiza a lo largo y ancho del país, siendo la producción de carne el objetivo principal, en su gran mayoría las explotaciones ovinas presentan índices de producción deficientes, algunas alternativas para resolver esta problemática es la implementación de técnicas y métodos moleculares, los cuales están dirigidos a intensificar el mejoramiento y la multiplicación de razas e individuos de calidad genética superiores, que conlleve a un incremento en el progreso genético de la especie o raza en cuestión.

El empleo de marcadores moleculares permite la selección temprana y específica de individuos para la introducción rápida de genes favorables. Estos marcadores funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma, se utilizan en estudios de diversidad, identificación de grupos de genes, *loci* de caracteres cuantitativos (QTL), variantes o polimorfismos de genes con efectos significativos en los sistemas de producción animal, uno de estos genes está relacionado con la regulación fisiológica del consumo de alimento, crecimiento, gasto de energía, fertilidad y funciones del sistema inmune, es la leptina producto del gen *ob*, el cual es un polipéptido de 146 aminoácidos, con peso molecular de 16 kDa sintetizada y secretada por los adipocitos (Zhang *et al.*, 1994).

El gen leptina está localizado en el cromosoma 4 del genoma bovino y ovino, investigaciones previas muestran que el gen leptina controla la ingesta de alimento y regula el peso corporal en mamíferos. Los polimorfismos del gen leptina en bovinos, están asociados con el consumo de alimento (Lagonigro *et al.*, 2003), la producción de leche (Buchanan *et al.*, 2003), calidad de la canal y la carne (Schenkel *et al.*, 2005). Las diferencias genéticas en el gen de la leptina se observaron primero en ratones (Hamann y Matthaei, 1996).

La asociación de los polimorfismos ha sido investigada con énfasis en bovinos, no obstante, en ovinos la información es muy limitada, por lo que para confirmar el papel que desarrolla el gen leptina en ovinos, este tiene que ser identificado, así como la presencia del polimorfismo (Zhou *et al.*, 2009). En ovinos, la raza Katahdin, desarrollada en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica se ha caracterizado, por su buen desarrollo productivo y reproductivo en condiciones tropicales y áridas (Burke y Apple, 2007). Las características de los ovinos Katahdin son: amplia estacionalidad, rusticidad para el pastoreo y prolificidad (Cuéllar, 2007). En México es la raza con mayor número de animales registrados (UNO, 2013).

La presente tesis está conformada en capítulos el capítulo 1, presenta una revisión de la situación de la ganadería ovina en México, la selección asistida por marcadores moleculares, método de detección de polimorfismos, descripción del gen leptina y de ovinos Katahdin, el capítulo 2, muestra los resultados obtenidos en el estudio denominado “Identificación de alelos polimórficos del gen leptina en ovinos Katahdin”, finalmente se presenta en el Capítulo 3, una revisión del “Gen leptina y su relación con la calidad de la carne en rumiantes”.

2. CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Situación de la ovinocultura en México

Todas las entidades del país producen carne de ovino, destacando Hidalgo y el Estado de México, los cuales participan con el 27.3 y 32.2 % del valor generado (SIAP, 2014). La ovinocultura se puede dividir en dos sistemas de producción, el extensivo e intensivo, aunque en últimas fechas una combinación de ambos ha tenido buenos resultados (Arteaga, 2003).

El inventario de ganado ovino en el país incrementó 25 % entre 2003 y 2014, alcanzando 8,575,908 de cabezas en 2014 (SIAP, 2014). Sin embargo, esto no ha logrado satisfacer la creciente demanda nacional, que se calcula en un consumo anual de cordero en 114,167 t (SIAP, 2014), la producción nacional solo abastece el 57 % con un déficit del 43 % que se cubre con ovinos en pie proveniente de los Estados Unidos de América y de carne congelada de países como Australia y Nueva Zelanda (Arteaga, 2003; Gómez, 2009). Debido a este déficit de producción, el precio del borrego en pie y canal se ha elevado y está muy por encima del precio en comparación a otras especies pecuarias (Cuellar, 2007).

Lo anterior indica condiciones de mercado favorables para el desarrollo de la ovinocultura en el país, por lo que los sistemas de producción ovina demandan cada vez una mayor eficiencia productiva, lo que con lleva a optimizar los recursos genéticos, ambientales y de espacio en las explotaciones (Gómez, 2009).

2.2 Mejoramiento genético y selección animal

El mejoramiento genético animal ha evolucionado de manera especializada a través de los años, las mejoras en el ganado suelen ser de caracteres cuantitativos o complejos, como la producción de leche o la calidad de la carne (Oikonomou *et al.*, 2008). La evaluación y selección de los fenotipos, tiene que estimar diversos parámetros genéticos y describir los componentes genéticos del carácter a seleccionar (Cañon, 2009; Uffo, 2011).

Una herramienta para el análisis de genotipos y la selección de los mejores individuos la constituyen los marcadores moleculares, que aporta información sobre la estructura genómica de las diferentes especies y permiten conocer con exactitud la localización de genes controladores de caracteres de interés para la selección (Parra-Bracamonte *et al.*, 2011).

2.3 Selección asistida por marcadores moleculares (MAS)

El progreso alcanzado por la biología molecular permite utilizar la genómica como una herramienta para la evaluación genética, logrando identificar genes y su variación para el mejoramiento del ganado (Montaldo, 1998). Desde el punto de vista molecular, esta variación, también denominada “polimorfismo” producto de cambios espontáneos en el ADN, puede identificarse a través de diferentes técnicas, los cambios van desde la substitución de un nucleótido, que representa el tipo más común de mutación y que puede ser detectado a través del estudio y análisis de los polimorfismos de base única (SNP), hasta mutaciones que involucren mayores números de sitios nucleotídicos (Dodgson *et al.*, 1997).

Para efectuar estos estudios, ha sido de gran importancia el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis *et al.*, (1986). Los marcadores moleculares definen una región del genoma, generalmente de posición conocida, que presenta

polimorfismo, y estos son etiquetas a lo largo del genoma que indican directa o indirectamente un cambio fenotípico (Zhao *et al.*, 2004; López *et al.*, 2007). Su aplicación en producción animal van desde pruebas de paternidad, estudios de descendencia, mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL), detección de genes ligados a características productivas, identificación de animales portadores de enfermedades o mutaciones, así como en programas de cruzamiento y selección genética (Uffo, 2011).

La mayor parte de estos marcadores se ha desarrollado a partir de la estrategia de genes candidatos, en la que se conoce previamente la función del gen y en consecuencia resulta predecible su influencia en el carácter estudiado (Becerra y Paredes, 2000).

2.4 Polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP)

El SSCP es un método de barrido para la detección rápida de mutaciones o variaciones de un sólo nucleótido en un segmento de ADN. El fundamento del método SSCP se basa en que bajo condiciones no desnaturalizantes, una hebra individual de ADN adopta una conformación espacial que es específica de la composición de su secuencia en los nucleótidos (Fig. 1), esta conformación sería dependiente de la hibridación entre distintas regiones de un segmento de ADN replegado sobre sí mismo. La configuración diferente es provocada por el cambio de una sola base, entonces podría ser detectada en algunas condiciones de migración electroforética en un gel de poliacrilamida (Orita *et al.*, 1989).

Las ventajas de esta técnica son la sencillez y la posibilidad de valorar simultáneamente gran número de muestras, su limitación consiste en que la mutación no es localizada, detecta la presencia de alteración en determinado fragmento de ADN, pero su posición exacta y el tipo de mutación sólo pueden determinarse por secuenciación (Castaño *et al.*, 1997).

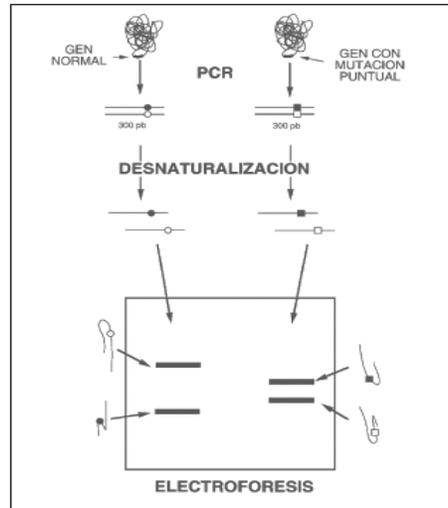


Figura 1. Representación esquemática del fundamento de la técnica de SSCP durante la electroforesis en un gel no desnaturalizante. La movilidad electroforética de cada fragmento depende del auto plegamiento de acuerdo a la formación de estructuras secundarias, Castaño *et al.* 1997.

2.5 Gen leptina

La palabra leptina proviene del griego “*leptos*” que significa delgado. En 1994 Zhang y colaboradores descubren el producto del gen mediante análisis de clonación y secuenciación, dicho producto es la hormona leptina secretada por los adipocitos, la cual es un componente del sistema homeostático que con una señal aferente al sistema nervioso central, informa al hipotálamo de las reservas de tejido adiposo, éste a su vez regula el apetito y el gasto energético (Friedman y Halaas, 1998; Delavaud *et al.*, 2002).

Esta hormona genéticamente está relacionada con la obesidad en los animales y humanos, lo cual ha convertido a la leptina en uno de los mejores marcadores biológicos en el control del peso corporal, el consumo de alimento, el gasto energético (Dai *et al.*, 2007), la reproducción

(Zieba *et al.*, 2005), la deposición de grasa (Buchanan *et al.*, 2002; Nkrumah *et al.*, 2005), la producción lechera (Buchanan *et al.*, 2003) y de algunas funciones del sistema inmune (Lord *et al.*, 1998).

El gen leptina en ovinos y bovinos se encuentra localizado en el cromosoma cuatro (Reicher *et al.*, 2011), su secuencia contiene más de 15 000 pares de bases, su estructura se conforma de tres exones separados por dos intrones, el exón dos y tres codifica para la expresión de 167 aminoácidos, con una secuencia de 21 aminoácidos que se separa antes de que la leptina pase al torrente sanguíneo para dejar una proteína 16.7 kD de 146 aminoácidos. La estructura cuenta con cuatro hélices siendo similar a las citoquinas (Zhang *et al.*, 1994). Aunque el tejido adiposo es la fuente primaria de la leptina su producción también se ha documentado en; el estómago, músculo esquelético, cartílago fetal, pituitaria, tejido mamario y la placenta (Zieba *et al.*, 2005).

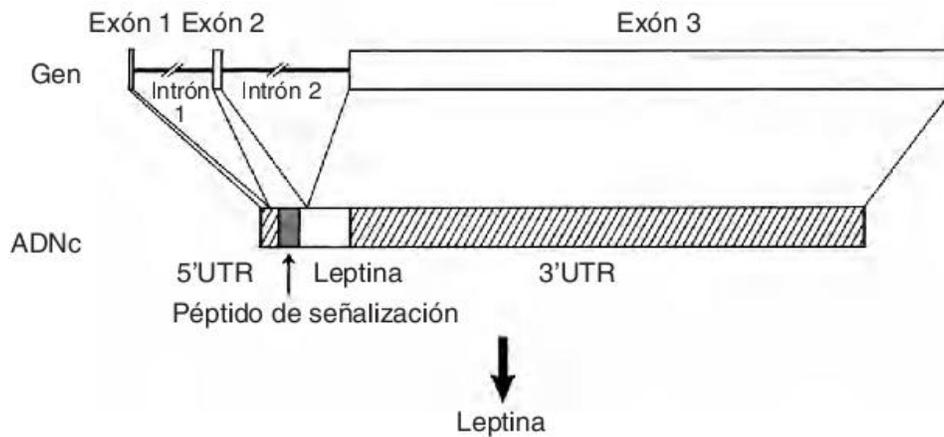


Figura 2. Estructura del gen leptina, Henríquez *et al.* 2006.

2.6. Polimorfismos del gen leptina en ovinos

Polimorfismos del nucleótido simple (SNPs) del gen leptina han sido identificados en intrones y exones en diferentes razas de ganado (GreGreen *et al.*, 1995), se han descrito alelos de este gen, que identifican individuos con diferente capacidad de retención de grasa y marmoleo (Buchanan *et al.*, 2002), estos se han asociado en características productivas así como de interés económico (Wylie *et al.*, 2011).

Zhou *et al.* (2009) describen variación del gen leptina en ovinos; cuatro polimorfismos del nucleótido simple (SNPs) en el exón 3 del gen, tres de estos SNP son no sinónimos y dan lugar a cambios de aminoácidos en posiciones de codón 105, 120 y 144. La actividad de la leptina se localiza, al menos en parte, al dominio entre los residuos de aminoácidos 106-140, es especulado que las sustituciones dentro o alrededor de esta región puede afectar a la actividad biológica de la leptina.

Hashemi *et al.* (2013) en ovinos “Makoei” reportan la variación del gen leptina obteniendo tres alelos (A, B, y C) y cinco genotipos (AC, AB, BB, BC y CC) para el exón 3 del gen leptina. Moslem *et al.* (2010) también asocian el polimorfismo del gen leptina con características de crecimiento en ovejas “Kermani” e indican que el gen puede utilizarse como un criterio de selección genético para mejorar el peso corporal.

Cuadro 1. Frecuencias de los alelos más comunes del gen Leptina en diferentes razas de ovinos

Raza	Frecuencia de alelos							Autor
	A	B	C	D	E	F	G	
Kermani	0.381	0.227	0.239	0.021	0.058	0.073	s/d	Moslem <i>et al.</i> , 2010
Shal	0.74	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	0.26	Barzehkar <i>et al.</i> , 2009
Zel	0.82						0.65	Barzehkar <i>et al.</i> , 2009
Zandi	0.85						0.15	Barzehkar <i>et al.</i> , 2009
Makoei	0.15	0.37	0.48	s/d	s/d	s/d	s/d	Hashemi <i>et al.</i> , 2011

s/d=sin datos

2.7. Ovinos Katahdin

La raza Katahdin fue desarrollado en Maine, EUA en los años 1950, con el objetivo de producir carne, a partir de cruza con diversas razas británicas, en particular la raza Wiltshire Horn, Isla Virginia Blanco y Suffolk. La conformación y características de la raza Katahdin han sido para tasa de crecimiento, conformación de cordero, canales magras, tolerancia a parásitos, prolificidad, sin cuernos y lana. Los animales preferentemente son blancos, aunque son aceptados multicolores, su peso vivo oscila desde 55 hasta 73 kg en ovejas y 68 a 90 kg en los carneros en edad adulta (Rasali *et al.*, 2006; Wildeus, 1997). La raza Katahdin ha sido evaluada en el crecimiento, conformación de la canal y características sensoriales en la cruza con otras razas mejorando el desempeño y rendimiento en las características evaluadas (Wildeus *et al.*, 2005; Shackelford *et al.*, 2012).

2.8 Referencias

- Arteaga, C. J. de D. 2003. La industria ovina en México. In: Memorias del primer simposium internacional de ovinos de carne. Desafíos y oportunidades para la ovinocultura en México ante los nuevos esquemas de mercado abierto. Pachuca de Soto, Hgo. pp.: 1-7.
- Barzehkar, R., Salehi, A., Mahjoubi, F. 2009. Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. Iranian Journal of Biotechnology. 7: 241-246.
- Becerra, V. y Paredes, M. 2000. Marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica. 60:270-281.
- Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A. G., Thue, T. D., Winkelman-Sim, D.C. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genetics Selection Evolution. 34:105–116.
- Buchanan, F. C., van Kessel, A. G., Waldner, C., Christensen, D. A., Laarveld, B., Schmutz, S. M. 2003. An Association Between a Leptin Single Nucleotide Polymorphism and milk and protein yield. Journal Dairy Science. 86: 3164-3166.
- Burke, J.M., Apple, J. K. 2007. Growth performance and carcass traits of forage-fed hair sheep wethers. Small Ruminant Research. 67: 264-270.
- Cañon, J. 2009. Utilización de información molecular en programas de mejoramiento animal. Revista Corpoica–Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 7(1):5-15.
- Castaño, L., Bilbao, J. R. 1997. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (4): estudio de mutaciones de ADN amplificado por PCR. Anales Españoles de Pediatría. 46 (3): 305-310.

- Cuellar, A. 2007. Perspectivas de la producción ovina en México para el año 2010. *Revista del Borrego*. 47: 14-18.
- Dai, H. C., Long, L. Q., Zhang, X. W., Zhang W. M., Wu. X. X. 2007. Cloning and expression of the Duck leptin gene and the effect of leptin on food intake and fatty deposition in mice. *Asian-Aust. Journal of Animal Science*. 20:850-855.
- Delavaud, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Kann, G., Chilliard, Y. 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *Journal of Animal Science*. 80:1317-1328.
- Dodgson, J. B., Cheng, H. H., Okimoto, R. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*. 76: 1108-1114.
- Friedman, J. M. and Halaas ,J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395: 763-770.
- Gómez, M. J. 2009. Alternativas de mercado para la carne ovina en México. In H. Peláez (Ed.). *Memorias del II Seminario Internacional de Ovinocultura*. Cholula, Puebla, México.
- GreGreen, E.D., Maffei, M., Braden, V.V., Proenca, R., De Silva, U., Zhang, Y., Chua, S. C., Leibe, R.L., Weissenbach, J., Friedman, J. M. 1995. The human obese (OB) gene: RNA Expression. Pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Research*. 5: 5-12.
- Hamann, A. and Matthaei, S. 1996. Regulation of Energy Balance by Leptin. *Experimental and Clinical Endocrinology y Diabetes*. 104: 293-300.
- Hashemi, A., Mardani, K., Farhadian, M., Ashrafi, I., Ranjbari, M. 2013. Allelic polymorphism of Makoei sheep leptin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *African Journal of Biotechnology*. 10(77): 17903-17906.

- Lagonigro, R., Wiener, P., Pilla, F., Woolliams, J. A. Williams, J. L. 2003. A New Mutation in the Coding Region of the Bovine Leptin Gene Associated with Feed Intake. *Animal Genetics*. 34: 371-374.
- López, Z. R., Cano, C. H., Chassin, N.O., Zavala, P. M. G. 2007. Selección asistida por marcadores genéticos moleculares en especies animales de interés pecuario. *C. Nicolaita*.46: 43-56.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S.R., Lechler, R. I. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 394: 897–901.
- Macías, C. U., Álvarez, V. F. D., Rodríguez, G. J., Correa, C. A., Torrentera, O. N. G., Molina, R. L., Avendaño, R. L. 2010. Crecimiento y características de canal en corderos Pelibue y puros y cruzados F1 con razas Dorper y Katahdin en confinamiento. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42 (3): 147-154.
- Montaldo, H. H., Meza, H. C.A. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology*.1 (2): 15-16.
- Moslem, S., Mohammad, A., Asadi, F.M., Dayani, O., Khezri, A., Masoumeh, A. 2011. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2(2): 67-73.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.

- Nkrumah, J. D., Li, C., Yu, J., Hansen, C., Keisler, D. H. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behaviour, and measures of carcass merit. *Journal of Animal Science*. 83:20–28.
- Oikonomou, G., Angelopoulou, K., Arsenos, G., Zygoyiannis D., Banos, G. 2008. The effects of polymorphisms in the DGAT1, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. *Animal Genetics*. 40: 10–17.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 86: 2766-2770.
- Parra-Bracamonte, G. M., Sifuentes, R. A. M., Reyna, R., Arellano Vera, W. 2011. Avances y perspectivas de la biotecnología genómica aplicada a la ganadería en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14(3): 1025-1037.
- Rasali, D. P., Shrestha, J. N. B., Crow, G. H. 2006. Development of composite sheep breeds in the world: A review. *Canadian Journal of Animal Science*. 86(1), 1-24.
- Reicher, S., A. Gertler, E. Seroussi, M. Shpilman and E. Gootwine. 2011. Biochemical and in vitro biological significance of natural sequence variation in the ovine leptin gene. *General and Comparative Endocrinology*. 173: 63–71.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Ye, X., Moore, S. S., Nkrumah. J. D. 2005. Association of Single Nucleotide Polymorphism in the Leptin Gene with Carcass and Meat Quality Traits of Beef Cattle. *Journal of Animal Science*. 83: 2009-2020.

- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2014. SAGARPA. Resumen Nacional Ovinos producción, precio, valor, animales sacrificados y peso de carne en canal 2005-2014 disponible <http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/ovino.pdf> Consultada el 1 de noviembre de 2015.
- Shackelford, S. D., Leymaster, K. A., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M. 2012. Effects of breed of sire on carcass composition and sensory traits of lamb. *Journal of animal science*, 90(11): 4131-4139.
- Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W. 1996. The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genome*. 7: 399–400.
- Uffo, O. 2011. Producción animal y biotecnologías pecuarias: nuevos retos. *Revista de Salud Animal*. 33 (1): 8-14.
- Wildeus, S. 1997. Hair Sheep Genetic Resources and Their Contribution to Diversified Small Ruminant Production in the United States. *Journal of Animal Science*. 75:630–640.
- Wildeus, S., Turner, K. E., Collins, J. R. 2005. Growth Performance of Barbados Blackbelly, Katahdin and St. Croix Hair Sheep Lambs Fed Pasture-or Hay-based Diets. *Publications from USDA-ARS/UNL Faculty*, 458.
- Wylie, A. R. G. 2011. Leptin in farm animals: where are we and where can we go?. *Animal*, 5(02): 246-267.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425–432.
- Zhao, Q., Davis, M.E., Hines, H.C. 2004. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. *Journal of Animal Science*. 82: 2229–2233.

Zhou, H., Hickford, J. G. H., Gong, H. 2009. Identification of Allelic polymorphism in the Ovine Leptin Gene. *Molecular Biotechnology*. 41: 22–25.

Zieba, D.; Amstalden, A., Williams, M. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*. 29:166-185.

3. CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN DE ALELOS POLIMÓRFICOS EN EL GEN LEPTINA DE OVINOS

KATAHDIN

3.1 Resumen

La leptina es una hormona de la familia de las citoquinas derivada de los adipocitos implicada en diversos procesos fisiológicos de numerosas funciones biológicas, neuroendocrinas y de función inmune se relaciona con el estado nutricional. En especies zootécnicas, se identifican polimorfismos del gen leptina asociados con características como el consumo de alimento, eficiencia alimenticia, balance energético, la fertilidad y la eficiencia reproductiva. El objetivo del estudio fue identificar polimorfismos del gen leptina en el exón 3 de ovinos Katahdin. El ADN fue extraído a partir de muestras de sangre recolectada de la vena yugular de 234 ovinos. La variación alélica del gen leptina se obtuvo por PCR-SSCP el análisis de secuenciación confirmó polimorfismos del nucleótido simple (SNPs) en el exón 3 del gen leptina. Las secuencias identificadas comparten una alta similitud con las secuencias de leptina publicados en otras razas de ovinos. Los alelos O1, T y G indica frecuencias de 51.28, 45.3 y 3.42 %, respectivamente. Los resultados confirman la presencia de tres polimorfismos (alelos O1, G y T), que corrobora la variación en el exón 3 del gen leptina de ovinos Katahdin.

Palabras clave: ADN, polimorfismo, SNP, exón, ovinos Katahdin.

3.2 Abstract

Leptin is an adipocyte-derived hormone/cytokine that influences the physiological control of numerous biological functions and links nutritional status with both neuroendocrine and

immune functions. In farm animals, leptin gene polymorphisms have been shown to be involved in variation of traits such as feed intake, feed efficiency, energy balance, fertility, and reproductive efficiency. The objective of this study was to identify polymorphisms of the leptin gene in exon 3 of Katahdin sheep. The DNA was extracted from blood samples collected on the jugular vein of 234 sheep. The allelic variation in the leptin gene was examined by PCR-SSCP and sequence analysis revealed single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 3 of the ovine leptin gene. All of the sequences identified here shared high similarity with the published leptin sequences from breed sheep. Alleles 01, T and G indicated frequencies of 51.28, 45.3 and 3.42 %, respectively. The results confirm the presence of three alleles in exon 3 of the leptin gene in Katahdin sheep.

Keywords: DNA, polymorphism, SNP, exon, Katahdin sheep.

3.3 Introducción

La leptina es una hormona de la familia de las citoquinas tiene un peso 16.7 kDa, se sintetiza y secreta principalmente en el tejido adiposo y es un marcador biológico que indica la cantidad de grasa corporal, también participa en la homeostasis de energía y regula el consumo de alimento (Zhang *et al.*, 1994). En ovinos y bovinos, este gen se localiza en el cromosoma 4, se compone de tres exones y dos intrones, se codifica en una proteína de 167 aminoácidos (AA), de los cuales, pierde 21 AA en su forma activa, el exón 2 contribuye con los primeros 48 AA y el exón 3 con los 119 AA restantes. La forma madura circulante de la proteína se obtiene después de la eliminación del péptido señal de 21 AA (Reicher *et al.*, 2011; 2012).

Los polimorfismos en diferentes regiones del gen leptina, se han utilizado como un predictor de diferencias productivas entre los individuos (Mahmoud *et al.*, 2014). Esta variación genética en los exones, intrones y las regiones promotoras, ha sido asociada en bovinos y cerdos

con producción de leche, reproducción, calidad de la carne y la canal (van Der Lende *et al.*, 2005). En ovinos, el gen que codifica para la leptina se han reportado cuatro polimorfismos del nucleótido simple (SNP) en el exón 3, cuatro, no sinónimos (107^{C/T}, 271^{G/A}, 316^{C/A}, 387^{G/T}) (Zhou *et al.*, 2009), algunos de ellos han sido asociados con el crecimiento muscular, el grosor del tejido adiposo y el peso de la canal en ovinos (Barzehkar *et al.*, 2009, Hajihosseini *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2014). El gen leptina es un gen que puede ser usado como un marcador molecular los estudios reportados refieren a características en la calidad de la carne.

Los ovinos Katahdin se caracterizan por tener índices de prolificidad, rusticidad, adaptabilidad y producción de canales magras, con respecto a otra razas de pelo (Wildeus *et al.*, 2005) lo que ha permitido su desarrollo en ambientes adversos de EUA y México. Esta raza se usa frecuentemente en programas de cruzamiento para mejorar la calidad de la carne (Wildeus, 1997; Partida *et al.*, 2012), pero no existen evidencias de estudios en polimorfismos del gen. De esta manera, el objetivo de nuestro estudio fue identificar alelos polimórficos del gen leptina en ovinos Katahdin.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Animales y extracción de ADN

Se seleccionó una población al azar de ovinos Katahdin (n=234) de ambos sexos, con una edad entre 3 y 18 meses de edad, se identificaron en el suroeste de México (16°38', 16°51' y 93°02' , 94°15'), a una altitud de 522 m. Las condiciones de alimentación se basaron en el pastoreo de gramíneas introducidas y suplementación con un concentrado comercial con 18 % proteína.

Las muestras sanguíneas de la población se recolectaron en la vena yugular, utilizando el método vacutainer[®] con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La extracción de ADN se realizó a partir de leucocitos, mediante las instrucciones del fabricante con el kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega[®], USA). El ADN se cuantificó con el Nanodrop 200 (Thermo Scientific, USA) y se comprobó la calidad mediante electroforesis con un gel de agarosa (Sigma Aldrich, USA) al 1 %, teñido con bromuro de etidio (Promega[®], USA) y visualizado en el transiluminador A323 (Bio-Imaging Systems, Israel).

3.4.2 Amplificación del exón 3 del gen leptina

La amplificación del gen leptina (Gen Bank: ID443534) se realizó mediante la técnica PCR, con los iniciadores F: 5'-AGGAAGCACCTCTACGCTC-3' y R: 5'-CTTCAAGGCTTCAGCACC-3 (Bahrami *et al.*, 2013), del exón 3. La mezcla de PCR contenía un volumen final de 25 μ L por reacción, 0.75 unidades de Taq DNA Polimerasa (Thermo Scientific, USA), 1X buffer (Thermo Scientific, USA), 1.25 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific, USA), 0.1 mM de dNTPs (sales de sodio de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a 25 mM en agua a pH 7.5; Biolabs[®] Inc, New England), 0.3 pM de iniciadores y 50 ng de ADN. Las condiciones del ciclo térmico consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 59 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final de 72 °C por 5 min, utilizando el Termociclador Modelo CG1 (Corbett Research, UK). Los productos amplificados por PCR se verificaron mediante electroforesis con un gel de agarosa (Amresco, USA) al 2 % teñido con bromuro de etidio (Promega[®], USA) y visualizado en el Transiluminador A323 (Bio-Imaging Systems, Israel).

3.4.3 Polimorfismo de Conformación de Cadena Única (SSCP)

El método SSCP se fundamenta en los cambios de conformación que presentan dos cadenas sencillas de ADN que difieren entre sí en un único nucleótido (Orita *et al.*, 1989). Para visualizar estos cambios, se utilizaron 5 μ L de producto de PCR, mezclados con 10 μ L de solución desnaturizante (95 % de formamida, 25 mM EDTA, 0.025 % xileno cianol y 0.025 % de azul de bromofenol, Sigma Aldrich, USA), se calentó la mezcla durante 10 min a 95 °C y se enfrió en hielo. Las muestras desnaturizadas de ADN, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % (37:1) (Promega[®], USA) con 280 V por 7 h. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con 0.1 % de nitrato de plata (Sigma Aldrich, USA) y se detectaron patrones de bandas en los geles.

3.4.4 Análisis de secuenciación

Una vez agrupados, se tomaron 20 muestras de cada patrón de las variantes observadas en la técnica SSCP estas fueron secuenciadas para identificar el polimorfismo del nucleótido simple que se obtuvo por la migración de los fragmentos del gen leptina. Los productos amplificados por PCR del gen leptina exón 3 se purificaron con el kit Wizard SV and PCR Clean-up System[®] (Promega, USA). Las secuencias se realizaron por duplicado en ambas direcciones con el Genetic Analyzer modelo 3130[®] (Applied Biosystem[®], USA). Estas fueron ensambladas y editadas con software BioEdit v7.0.9.1, para obtener las secuencias consenso. Posteriormente, dichas secuencias fueron comparadas con la base de datos del National Center of Biotechnology (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para identificar las secuencias homólogas se utilizó el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

3.5 Resultados y discusión

La extracción de ADN en leucocitos se completó en todas las muestras. Los resultados de electroforesis mostraron que la calidad de ADN fue apropiada para utilizar la técnica de PCR, los iniciadores produjeron un fragmento de 471pb (Figura 3) correspondiente al gen leptina.

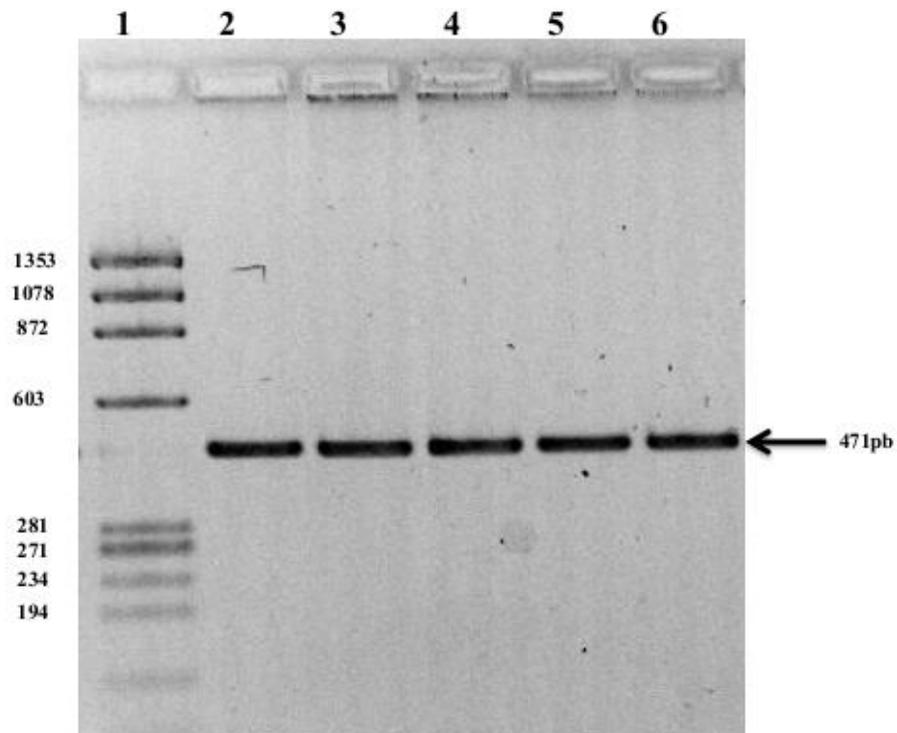


Figura 3. Producto de PCR del gen leptina en muestras de sangre de ovinos Katahdin. Pozo 1) Marcador Φ X174, pozos 2, 3, 4, 5 y 6) gen leptina fragmento de 471 pb.

La técnica PCR-SSCP confirmó tres patrones del gen leptina exón 3; los cuales fueron los alelos 01, T y G con frecuencias de 51.2, 45.3 y 3.4 %, respectivamente, mismas que fueron confirmados por la secuenciación (Figura 4).

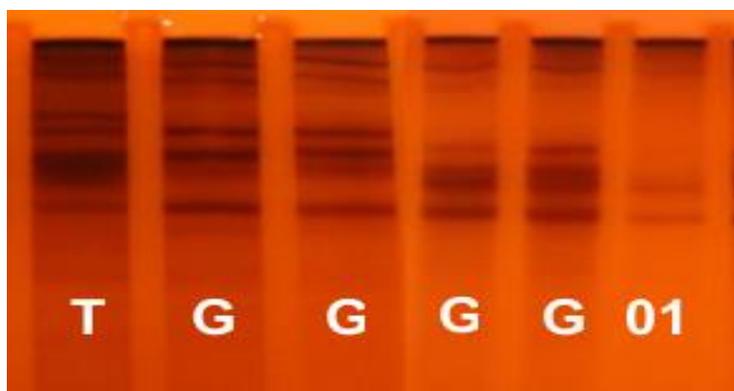


Figura 4. Producto de PCR-SSCP por electroforesis en gel de poliacrilamida 12 % (37:1) para el gen leptina exón 3 en ovinos Katahdin.

A este respecto Cauveri *et al.* (2014) reportaron que el exón 3 del gen leptina contiene 2731 pb de longitud y que de acuerdo a Zhou *et al.* (2009), existen cinco secuencias alélicas (EF524370-EF534374), que revelan polimorfismos del nucleótido simple (SNPs). En nuestro estudio se confirma la presencia de tres polimorfismos no sinónimos 387^{G/T}, 462^{G/A}, 464^{C/T} y un sinónimo 463^{G/C} en este exón (Cuadro 2).

Cuadro 2. SNPs y alelos identificados del gen leptina exón 3 en secuencias de ovinos Katahdin

Posición SNP	Alelo		
	EF534370(01)	KJ918739(G)	KJ918740(T)
107 C/T	C	C	C
271 G/A	G	G	G
316 C/A	C	C	C
387 G/T	G	G	T
462 G/A	A	G	A
463 G/C	G	C	C
464 C/T	C	C	T

El análisis de BLAST mostró una homología del 100 % con el alelo 01 secuencia del exón 3 (EF524370) reportado por Zhou *et al.* (2009). Adicionalmente, dos secuencias homólogas de los alelos G y T con la raza Katahdin fueron depositadas en la base de datos del NCBI por Meena *et al.* (2014) con los números de acceso KJ918739 y KJ918740.1 (Cuadro 3), confirmando la presencia de los tres alelos polimórficos en la raza Katahdin.

Cuadro 3. Homología del exón 3 del gen leptina de ovinos Katahdin con secuencias depositadas en el NCBI.

Secuencia más relacionada en NCBI	Máxima Identidad	Secuencia
<i>Ovis aries</i> raza Malpura gen leptina exón 3, alelo T. ID. KJ918740.1	100 %	CCCTGGGCTCCACCCTCTCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCA GACATTGGCAATCTACCAACAGATCCTCGCCAGTCTGCCTC CAGAAATGTGATCCAAATATCTAATGACCTGGAGAACCCTC GGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCTCCAAGAGCTGCCCT TGCCGCA
<i>Ovis aries</i> gen leptina exón 3, alelo 01. ID. EF534370.1	100 %	GTCCCTTCTCTGCATAGCAGTCCGTCTCTCCAACAGA GGGTCAGTGGTTGGACTTCATCCCTGGGCTCCACCCTCTCC TGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCAATCTACCAA CAGATCCTCGCCAGTCTGCCTTCCAGAAATGTGATCCAAAT ATCTAATGACCTGGAGAACCCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCT GGCCGCTCCAAGAGCTGCCCTTGGCCGAGGTGAGGGCC TGGAGAGCTTGGAGAGCTGGGCGTCTGCTGGAAGCTCC CTCTACTCCACCGAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTACAGGG GTCTCTACAGGACAGTGGGCGAGTTTGGG
<i>Ovis aries</i> raza Malpura gen leptina, exón 3, alelo G. ID. KJ918739	100 %	TACGCTCGAGGAAAGGCGGAGTTGGGGGAGCTCTGAGGA GCTGCCCTCTCCCACTGAGCTCTTGATGCCCTTCTCTCT GCATAGCAGTCCGTCTCTCCAACAGAGGGTCACTGGTT GGACTTCATCCCTGGGCTCCACCCTCTCTGAGTTTGTCCAA GATGGACCAGACATTGGCAATCTACCAACAGATCCTCGCCA GTCTGCCTTCCAGAAATGTGATCCAAATATCTAATGACCTG GAGAACCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCTCCAA GAGCTGCCCTTGGCCGAGGTGAGGGCCCTGGAAGCTTGG AGAGCTGGGCGTCTGGAAGCTCCCTCTACTCCACC GAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTACAGGG

La Figura 5 muestra la posición filogenética de las tres secuencias del gen leptina EF524370, KJ918739 y KJ918740.1 encontradas en ovinos Katahdin, con una distancia genética estrecha que se obtuvo utilizando el agrupamiento Neighbor-Joining. Es interesante observar que al comparar con el gen leptina de *Capra hircus*, existe una homología del 100 % con respecto a las secuencias reportadas, mientras que con el gen leptina en *Bos taurus* y *Bubalus bubalis*, la

homología es de 98 % entre estas dos especies. Estas distancias se obtuvieron por el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980), usando el software MEGA 6 (Tamura, 2013).

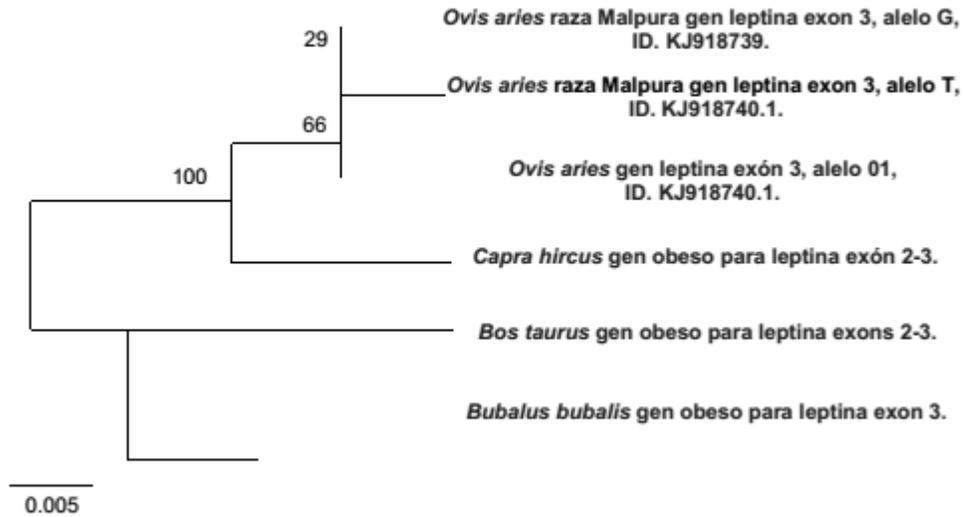


Figura 5. Árbol filogenético gen leptina secuencias encontradas en ovinos Katahdin en comparación con los genes leptina de *Capra hircus*, *Bos taurus* y *Bubalus bubalis*.

Se ha reportado que la variación en la región exónica del gen leptina, puede conducir a cambios en los aminoácidos alterando las funciones reguladas por esta hormona leptina (Zhang *et al.*, 1994, Reicher *et al.*, 2011), lo cual permite identificar individuos con diferente capacidad de retención de grasa (Buchanan *et al.*, 2002). Ante este panorama, se considera que el gen leptina es un gen candidato para la elección de reproductores en la mejora de retención de grasa (van Der Lende *et al.*, 2005).

En bovinos de distintas razas, se determinó que el alelo T del exón 2 se asocia con canales grasas y el alelo C a canales magras (Buchanan *et al.*, 2002, Kononoff *et al.*, 2005). Mientras que en ovinos Boucher *et al.* (2006) asociaron el alelo G del gen leptina con el

crecimiento muscular en la raza Suffolk y con el espesor de la grasa en la canal de ovinos Dorset. Así mismo, Barzehkar *et al.* (2009) asociaron el alelo G con el peso de la canal y el grosor del tejido adiposo en ovinos Shal y Zel. Por su parte Zhou *et al.* (2009) reportaron la variación 387^{G/T} la cual se ha identificado en ovinos de lana, carne y doble propósito de razas en Nueva Zelanda, esta mutación segregada genéticamente en razas ovinas remotas apunta que surgió a principios de la domesticación de los ovinos (Reicher *et al.*, 2011).

Los resultados de investigaciones realizadas en diferentes razas de ovinos y la influencia del alelo G en el crecimiento muscular, el espesor de grasa y la segregación del gen y el peso de la canal, sugieren que la presencia de este polimorfismo en ovinos Katahdin, podría tener alguna correlación positiva con respecto a la calidad de la canal.

3.6 Conclusiones

Los resultados confirman la presencia de tres polimorfismos (alelos 01, G y T), que corroboran la variación en el exón 3 del gen leptina de ovinos Katahdin. Sin embargo es necesario identificar la presencia de SNPs y validar la asociación con los genotipos en ovinos Katahdin antes de la implementación de programas en mejoramiento animal.

3.7 Referencias

- Bahrami, A., Behzadi, Sh., Miraei-Ashtiani, S. R., Roh, S. G., Kato, K. 2013. Genetic polymorphisms and protein structures in growth hormone, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 1 and leptin in Mehraban sheep. *Gene*. 527: 397-404.
- Barzehkar, R., Salehi, A., Mahjoubi, F. 2009. Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. *Iran Journal Biotechnology*. 7: 241-246.
- Boucher, D., Palin, M. F., Castonguay, F., Gariépy, C., Pothier, F. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian Journal of Animal Science*. 86: 31–35.
- Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A. G., Thue, T. D., Winkelman-Sim, D. C. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*. 34: 105–116.
- Cauveri, D., Sivaselvam, S. N., Karthickeyan, S. M. K., Tirumurugaan, K. G., Kumanan, K. 2014. Allelic polymorphism of exon 3 of leptin gene in nilagiri sheep identified by sequencing and pcr-rflp. *International Journal Science Environment and Technology*. 3 (3): 951– 955.
- Eveline, M., Awemu, I., Kgwatalala, P. and Zhao, X., 2008. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig, *Mammalian Genome*, 19, 591–617.

- Hajihosseini, A., Hashemi, A. and Sadeghi, S. 2012. Association between polymorphism in exon 3 of leptin gene and growth traits in the Makooei sheep of Iran. *Livestock Research for Rural Development*. 24, Article #166. Available at [<http://www.lrrd.org/lrrd24/9/haji24166.htm>.].
- Kimura, M. A. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution*. 2: 111-120.
- Kononoff, P. J., Deobald, H. M., Stewart, E. L., Laycock, A. D. and Marquess, F. L. S. 2005. The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. *Journal of Animal Science*. 83: 927-932.
- Mahmoud, A. H., Saleh, A. A., Abou-tarboush, F. M., Shafey, T. M. and Abouheif, M. A. 2014. Nucleotide sequence polymorphism within exon 3 region of leptin and prolactin genes in Herri sheep. 2014. *Research Journal Biotechnology*. 9: 69-72.
- Meena, A. S., Bhatt, R. S. and Sahoo, A. 2014. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Available at [[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ918740.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ918740.1)]. Accessed June 1, 2015.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2766-2770.
- Partida, J. A., Vázquez, E., Rubio, M. S. and Méndez, D. 2012. Effect of Breed of Sire on Carcass Traits and Meat Quality of Katahdin Lambs. *Journal Food Research*. 1: 141-149.
- Reicher, S., Ramos-Nieves, J. M., Hileman, S. M., Boisclair, Y. R., Gootwine, E. and Gertler, A. 2012. Nonsynonymous natural genetic polymorphisms in the bovine leptin gene affect

- biochemical and biological characteristics of the mature hormone. *Journal of Animal Science*. 90: 410–418.
- Reicher, S., Gertler, A., Seroussi, E., Shpilman, M. and Gootwine, E. 2011. Biochemical and in vitro biological significance of natural sequence variation in the ovine leptin gene. *General and Comparative Endocrinology*. 173: 63–71.
- Sadeghi, S., Hajhosseinlo, A. and Bohlouli, M. 2014. Haplotype Association of ovine leptin gene on breeding value of body measurements in Makoei sheep breed. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 30: 233-242.
- Shojaei, M., Abadi, M.M., Fozzi, M.A., Dayani, O., Khezri, A. and Akhondi, M., 2010. Association of growth trait and leptin gene polymorphism in Kermani sheep, *Journal of Cell and Molecular Research*, 2, 67-73.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- van der Lende, T., Te Pas, M. F. W., Veerkamp, R. F. and Liefers, S.C. 2005. Leptin Gene Polymorphisms and Their Phenotypic Associations. *Vitam. Horm.*, 71: 373-404.
- Wildeus, S. 1997. Hair Sheep Genetic Resources and Their Contribution to Diversified Small Ruminant Production in the United States. *Journal of Animal Science*. 75: 630–640.
- Wylie, A. R. G. 2011. Leptin in farm animals: where are we and where can we go?. *Animal*, 5(02): 246-267.
- Wildeus, S., Turner, K. E., & Collins, J. R. 2005. Growth Performance of Barbados Blackbelly, Katahdin and St. Croix Hair Sheep Lambs Fed Pasture-or Hay-based Diets. *Publications from USDA-ARS/UNL Faculty*, 458.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425–432.

Zhou, H., Hickford, H. and Gong, H. 2009. Identification of Allelic polymorphism in the ovine leptin gen. *Molecular Biotechnology*. 41: 22-25.

4. CAPÍTULO III

EL GEN LEPTINA Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DE LA CARNE EN RUMIANTES

4.1 Resumen

El gen leptina se encuentra en el cromosoma 4 en el genoma ovino y bovino, su estructura es de tres exones y dos intrones. Su receptor presenta seis isoformas a partir de un mismo ARNm. Se han identificado receptores para leptina en el hipotálamo y otros tejidos periféricos que contribuyen a la regulación del balance energético, procesos reproductivos y de termorregulación. Las concentraciones de leptina podrían ser un marcador fisiológico útil para el crecimiento y la eficiencia alimenticia en la finalización de ganado de carne. Se han descrito varios SNPs en la región de codificación del gen leptina en ovinos y bovinos asociados con la ingesta de alimentos, características de crecimiento, características de la canal y la calidad de carne. Las concentraciones plasmáticas de leptina se correlacionan positivamente con el espesor de grasa, rendimiento en canal y grado de marmoleo.

Palabras clave: consumo, exón, calidad de la carne, marmoleo

4.2 Calidad de la carne de rumiantes y su relación con el gen leptina

En los sistemas pecuarios la meta es incrementar la producción de carne. La deposición de grasa en la carne influye en la calidad y la elección de los consumidores. El espesor de grasa dorsal está fuertemente asociado, con un recorte de esta grasa que se traduce en pérdida de peso de la carne (Fortes *et al.*, 2009). Además la cantidad de grasa intramuscular conocida como marmoleo, afecta de manera positiva el sabor, la jugosidad y la terneza de la carne (Chung *et al.*, 2008). Esta problemática ha sido estudiada por numerosos investigadores que se han centrado en

la asociación de polimorfismos de nucleótido único (SNP) del gen leptina con características económicamente relevantes en la canal.

La leptina (del griego *leptos* = delgado), es una hormona polipeptídica de 167 aminoácidos (16 kDa), conformada por cuatro α -hélices (A, B, C y D), pertenece a la familia de las citoquinas, sintetizada normalmente en tejido adiposo, aunque es producida en pequeñas cantidades en músculo esquelético, placenta, glándulas mamarias e hipófisis (Zhang *et al.*, 1994; Caprio *et al.*, 2001).

En rumiantes se han identificado receptores para leptina en hipotálamo (Dyer *et al.*, 1997), glándula mamaria (Kawachi *et al.*, 2007), ovario periféricos que contribuyen a la regulación del balance energético, intervienen en procesos reproductivos y de termorregulación (Echeverry *et al.*, 2015; Otero *et al.*, 2006). La cantidad de ARNm de leptina en tejido adiposo y las concentraciones de la proteína en sangre se correlacionan positivamente con el peso corporal y la cantidad de grasa almacenada en roedores y humanos (Friedman y Halaas, 1998; Houseknecht *et al.*, 1998), estas concentraciones de leptina podrían ser un marcador fisiológico útil en el crecimiento y la eficiencia alimenticia en finalización de ganado productor de carne (Ghoneima *et al.*, 2015).

Los polimorfismos del gen leptina se han analizado en diferentes especies de interés zootécnico, el patrón polimórfico se ha demostrado que se asocia con el balance de energía, la producción de leche, el peso corporal en vivo y la eficiencia reproductiva (Ghoneim *et al.*, 2015). Este gen se puede utilizar como un gen marcador para mejorar la productividad, la calidad del ganado en carne y leche, también es un gen candidato para la selección asistida por marcadores (MAS), y ha sido empleado para una selección más eficiente en numerosos países (Agarwal *et al.*, 2009).

El gen leptina se encuentra en el cromosoma 4 del genoma ovino y bovino, su estructura es de tres exones y dos intrones. La estructura del gen, intrón/exón así como la secuencia de aminoácidos, está altamente conservada en los mamíferos (Moravčíková *et al.*, 2012).

Zhou *et al.* (2009) describen SNPs en la región de codificación del gen leptina en ovinos y Liefers *et al.* (2002) los asocian con la ingesta de alimentos, mientras Hajihosseini *et al.* (2012) con características de crecimiento y Barzehkar *et al.* (2009) con características de la canal y la calidad de la carne.

El gen leptina en ganado bovino ha mostrado una estrecha relación en características de interés económico como la calidad de la canal (Pinto *et al.*, 2011; Woronuk *et al.*, 2012), rendimiento de carne magra (Schenkel *et al.*, 2005), la producción de leche (Buchanan *et al.*, 2003; Anton *et al.*, 2012) y el crecimiento (Lusk, 2007).

4.3 Receptores de leptina

El receptor de la leptina es una proteína transmembrana, con una estructura similar a los receptores de citoquinas. Para los primeros estudios de aislamiento del receptor de leptina utilizaron leptina marcada e identificaron su existencia en los plexos coroideos del ratón, denominándolo Ob-R. Se han descrito al menos seis isoformas de las variantes del ARNm del gen que codifica para el receptor de leptina Ob-R (Tartaglia *et al.*, 1995). Estas isoformas comparten un dominio extracelular idéntico localizado en el extremo aminoterminal de los receptores, donde se encuentra el sitio de unión con la leptina y difieren en su porción carboxilo-terminal. Cinco de las seis isoformas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf) poseen dominios transmembranales (Figura 6), pero solo Ob-Rb contiene el segmento intracelular necesario para la activación de las cinasas, llamado región Box 2, que permite la activación de Janus cinasa

(JAK) (Kawachi *et al.*, 2007). La regulación de la leptina está altamente relacionada con el almacenamiento de triglicéridos y con la masa de tejido adiposo, ambos aspectos son importantes para definir la expresión del gen en el adipocito (Noon *et al.*, 2006). La expresión del gen leptina es regulada negativamente por el receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ) y positivamente por C/EBP α , ambos actúan como factores de transcripción que se encargan del control de la diferenciación del adipocito. La expresión del gen *ob* es inducida por C/EBP α , mientras que PPAR γ además de regular la diferenciación del adipocito dirige una respuesta sistémica que consiste en un decremento en los niveles de leptina y a su vez en el consumo de alimento, que servirá de sustrato para el almacenamiento de grasa en los adipocitos (Lefebvre *et al.*, 1998).

En la Figura 6 se muestra la estructura de la leptina, de sus receptores y mecanismos de señalización intracelular: La estructura está constituida por 167 aminoácidos (aa), de los cuales los primeros 21 aa forman el péptido señal, el cual determina el procesamiento de esta hormona y su posterior secreción a la circulación en sangre. La estructura secundaria de la leptina es similar a las citoquinas de cadena larga helicoidal, constando de 4 alfa hélices. Los receptores de leptina son codificadas por un único gen (LEPR) que da origen a 6 isoformas (lepRa a lepRf), todas ellas tienen distinto número de aminoácidos y comparten los dominios extracelular y transmembrana, la excepción es Lep Re, que carece del dominio transmembrana y se encuentra soluble en plasma circulante. Lep Rb es la isoforma más larga y es la única que tiene los elementos estructurales necesarios para la activación de cascadas de señalización intracelular, en particular los residuos tirosina (Y) 985, 1077 y 1138, esenciales para la interacción con otras proteínas intracelulares. Cuando se da la unión de leptina al segundo dominio de homología a receptor de citoquina del dominio extracelular de lep Rb, se induce dimerización en la superficie

celular y asociación de JAK2 al dominio intracelular en la región “box 1”, la asociación induce un cambio conformacional, potenciando su actividad quinasa de residuos tirosina, resultando en fosforilación de Y985, Y1077, Y1138 y autofosforilación de JAK2, lo que genera nuevos sitios de unión para proteínas intracelulares que transducen señales, tales como STAT3 e IRS-2. STAT3 también es fosforilado por JAK2, tras lo cual forma un homodímero que se trasloca al núcleo celular en donde se une a secuencias nucleotídicas específicas en las regiones reguladoras de los genes controlados por leptina. IRS-2 también es fosforilado por el receptor de insulina, siendo un punto de unión entre las dos vías de señalización.

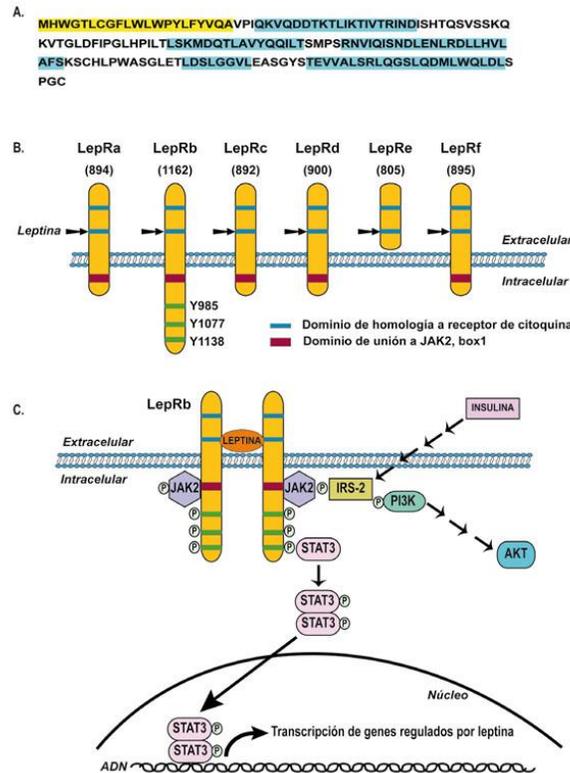


Figura 6. Estructura de la leptina, de sus receptores y mecanismos de señalización intracelular. Abreviaturas: JAK2, Janus kinase 2. IRS-2, insulin receptor substrate-2.PI3K, phosphoinositide 3-kinase. STAT3, signal transducer and activator of transcription 3, Goldenberg *et al.*, 2014.

4.4 Leptina y apetito

Una de las funciones más estudiadas de la leptina es la regulación en la ingesta de alimentos, el peso corporal, las reservas de grasa y en consecuencia regula procesos de homeostasis energética (Otero *et al.*, 2006). El receptor de leptina de tipo Ob-Rb se expresa ampliamente en las neuronas de varios núcleos hipotalámicos y todos estos núcleos están relacionados con la regulación de la ingesta de alimento y balance energético (Almanza-Pérez *et al.*, 2008). La leptina circulante sirve para comunicar el estado de energía del cuerpo al sistema nervioso central para suprimir la ingesta de alimentos y el gasto energético (Myers *et al.*, 2008). Los niveles de leptina tienen un fuerte efecto sobre la secreción del neuropéptido Y (NPY). El núcleo arcuato sintetiza al neurotransmisor cerebral denominado NPY, que actúa como estimulador central del consumo alimenticio (Thomas *et al.*, 1999). El NPY aumenta la ingesta y disminuye la termogénesis, el principal mecanismo por el que la leptina regula el apetito es inhibiendo la síntesis y secreción del NPY, además estimula la termogénesis periférica (Kolaczynski *et al.*, 1996).

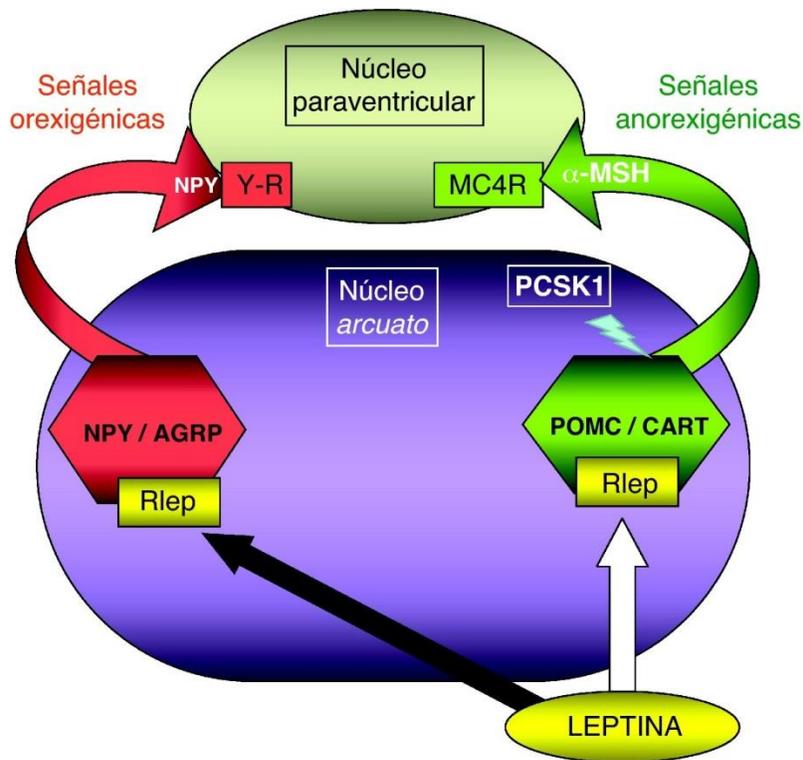


Figura 7. Factores orexigénicos y anorexigénicos relacionados con la hormona leptina, Almanza-Perez *et al.*, 2008; Martos-Moreno y Argente, 2011.

La Figura 7 representa el circuito cerebral a nivel hipotalámico de leptina, y efectos que desencadenan al unirse a su receptor en cada región del cerebro. Una vez unido a su receptor, la leptina inhibe a NPY (neuropéptido Y) y AGRP (proteína liberadora agouti), con esto se activa POMC (propiomelanocortina) y CART (transcrito regulador de anfetaminas); estos cuatro factores tienen efecto sobre MCH (hormona concentradora de melanina) y las orexinas, a nivel del hipotálamo lateral y sobre CRH (hormona liberadora de corticotropina) y TRH (hormona liberadora de tirotrópina), a nivel de núcleo paraventricular. Esta regulación iniciada por la leptina causa disminución en la insulina, glucosa, lípidos, así como incremento de las hormonas tiroideas y reproductivas, estimulando la termogénesis y la saciedad (Almanza-Perez *et al.*, 2008; Martos-Moreno y Argente, 2011).

4.5 Leptina y genotipos en las características de la canal

El gen leptina codifica una proteína compuesta de 146 aminoácidos, dicha proteína actúa como una hormona que induce la saciedad, regula el consumo de alimento y el equilibrio energético. En rumiantes, las concentraciones de leptina han sido asociadas positivamente con el grosor de grasa, rendimiento y grado de marmoleo en canal (Foote *et al.*, 2015). En bovinos, el gen leptina se encuentra en el cromosoma 4, compuesto por tres exones y dos intrones, en el segundo exón se ha identificado una mutación puntual (C/T), en donde el aminoácido arginina cambia a cisteína (R25C) en la proteína resultante. El genotipo TT resulta una ventaja cualitativa en los parámetros de calidad de carne, terneros con mejor peso al destete y mayor cantidad de grasa intramuscular, en comparación con los individuos CC o CT (Buchanan *et al.*, 2002; Lusk, 2007; Di Stasio *et al.*, 2007; DeVuyst *et al.*, 2008). En individuos con genotipo TT Nkrumah *et al.*, (2004; 2005) reportaron un incremento en la concentración de leptina en suero (48 y 39 %), espesor de grasa dorsal (39 y 31 %), grado de marmoleo (13 y 9 %), con respecto a individuos con genotipo CC o CT respectivamente, en novillos homocigotos reportaron para el alelo T mayor espesor de grasa dorsal, por su parte Kononoff *et al.* (2013) encontraron en novillos con alelo T un mayor grado de rendimiento que los novillos CC (5.4 vs 2.7 %), mientras que para el sabor de la carne el genotipo TT, han reportado 0.21 unidades más en paneles de degustación, con respecto a los genotipos CC o CT (Gill *et al.*, 2009).

Otros autores han reportado los marcadores 1457 (Liefers *et al.*, 2005), A59V (Haegeman *et al.*, 2000), y BM1500 (Fitzsimmons *et al.*, 1998) en el gen leptina y han sido asociados a importantes características económicas en bovinos. Silva *et al.* (2014) asociaron el espesor de grasa dorsal y color de músculo con el SNP A59V, en periodo de engorda y asociaron el

microsatelite BM1500 con el espesor de grasa subcutánea, peso de animales, así como longitud de canal, en bovinos Nellore.

Por su parte, Barzehkar *et al.* (2009) proponen una asociación significativa entre el SNP del gen leptina y ciertas características de la canal de ovinos, ya que relacionan al SNP A113G con un incremento en el peso de la canal fría, porcentaje de grasa en la parte posterior y peso de la grasa corporal total. En contraste, Boucher *et al.* (2006) reportan un efecto negativo de SNP A103G en el desarrollo muscular de corderos Suffolk, referido como una menor área de ojo de chuleta (- 137.58 mm²), porcentaje de carne magra (- 1.36 mm), aumento en la fuerza de corte (+ 1.091 kg) y pH (+ 0.168).

4.6 Concentraciones de leptina en sangre y características de la canal

Las concentraciones de leptina en sangre han sido relacionadas con cambios en las características de la canal (Nkrumah *et al.*, 2005). Wegner *et al.* (2001) reportan, en bovinos Wagyu en finalización, una correlación positiva ($r = 0.51$) entre las concentraciones plasmáticas de leptina y lípidos totales del músculo *longissimus*. En bovinos se reporta una correlación negativa con el área de músculo *longissimus* ($r = -0.25$) y correlación positiva con espesor de grasa en 12^{va} costilla ($r = 0.43$), rendimiento en canal ($r = 0.43$) y grado de marmoleo ($r = 0.28$) (Foote *et al.*, 2015).

Campbell *et al.* (2003) evaluaron niveles de leptina en ovinos Coopworth y reportaron que la profundidad de grasa dorsal y el sexo tenían efectos significativos sobre la concentración de leptina en suero, siendo de 2.69 ng mL⁻¹ para la línea grasa y de 2.19 ng mL⁻¹ para perfil magro. La concentración de leptina en suero se relacionó positivamente con el espesor de grasa dorsal de manera tal que cada aumento de milímetro de espesor de grasa dorsal se asoció con

0.15 ng mL⁻¹ de incremento de la concentración de leptina en suero. Además, las hembras presentaron 0.49 ng mL⁻¹ concentración de leptina en suero más que los machos en el perfil graso.

4.7 Implicaciones

Diversos investigadores han demostrado que la leptina, actúa de manera directa en el núcleo ventromedial (centro de saciedad) y arqueado paraventricular (centro de consumo) controlando el metabolismo de la energía a través del consumo de alimentos, su función biológica y la variación del gen leptina, así como las concentraciones de la hormona, que están asociados en animales de interés zootécnico con rasgos productivos como mayor peso al destete, espesor de grasa dorsal, en la calidad de la carne se ha visto favorecido en paneles de degustación, color del músculo y marmoleo, estas características son de gran relevancia para los productores, podrían ayudar en la selección genética para cubrir las necesidades de los consumidores. Sin embargo, la información analizada muestra que los resultados no son uniformes y se requiere de más trabajo de investigación en la raza o población donde se pretenda implementar la selección asistida por marcadores, utilizando como un gen candidato a la leptina.

4.8 Referencias

- Agarwal, R., Rout, P.K., Singh, S.K. 2009. Leptin: a biomolecule for enhancing livestock productivity. *Indian Journal of Biotechnology*. 8: 169–176.
- Almanza-Pérez, J. C., Blancas-Flores, G., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F. J., y Cruz, M. 2008. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gaceta Médica de México*. 144(6): 535-542.
- Anton, I., Kovács, K., Holló, G., Farkas, V., Szabó, F., Egerszegi, I., Brüssow, K. P. 2012. Effect of DGAT1, leptin and TG gene polymorphisms on some milk production traits in different dairy cattle breeds in Hungary. *Archives Animal Breeding*. 55: 307-414.
- Barzehkar, R., Salehi, A., Mahjoubi, F. 2009. Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. *Iran Journal Biotechnology*. 7: 241-246.
- Boucher, D., Palin, M. F., Castonguay, F., Gariépy, C., Pothier, F. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian Journal of Animal Science*. 86: 31–35.
- Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C.J., Van Kessel, A.G. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*. 34(1):105.

- Buchanan, F.C., Kessel Van, A.G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B., Schmutz, S.M. 2003. Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal Dairy Science*. 86: 3164–3166.
- Campbell, A. W., Broad, T., Jopson, N. B., Burkin, H. R., Dodds, K. G., Veenvliet, B. A., Bain, W. E. 2003. Lack of genetic association of markers near the leptin gene with carcass fat content in Coopworth sheep lines selected for and against fatness. In *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 63: 176-178.
- Caprio, M., Fabbrini, E., Isidori, M.A., Aversa, A., Fabbri, A. 2001. Leptin in reproduction. Review. *Trends in Endocrinology Metabolism*. 12 (2): 65–72.
- Chung, E. R., Shin, S. C., Shin, K. H., & Chung, K. Y. 2008. SNP discovery in the leptin promoter gene and association with meat quality and carcass traits in Korean cattle. *Asian-Aust. Journal Animal Science*. 21(12): 1689-1695.
- DeVuyst, E.A., Bauer, M.L., Cheng, F.C., Mitchell, J., Larson, D. 2008. The impact of a leptin gene SNP on beef calf weaning weights. *Animal Genetics*. 39: 284–286.
- Di Stasio, L., Brugiapaglia, A., Galloni, M., Destefanis, G., Lisa, C. 2007. Effect of the leptin c.73T4C mutation on carcass traits in beef cattle. *Animal Genetics*. 38: 316–317.
- Dyer, C. J., Simmons, J. M.; Matteri, R. L.; Keisler, D. H. 1997. cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, npy-y1 receptor and npy-y2 receptor. *Domestic Animal Endocrinology*. 14: 295-303.

- Echeverry, D., Ruiz-Cortés, Z. T. 2015. Expresión de receptores de leptina en glándula mamaria de bovinos lactantes y no lactantes. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. 18(1): 171-179.
- Fitzsimmons, C. J., Schmutz, S. M., Bergen, R. D., McKinnon, J. J. 1998. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome*. 9(6): 432-434.
- Foot, A. P., Hales, K. E., Kuehn, L. A., Keisler, D. H., King, D. A., Shackelford, S. D., Freetly, H. C. 2015. Relationship of leptin concentrations with feed intake, growth, and efficiency in finishing beef steers. *Journal of Animal Science*. 93 (9): 4401-4407.
- Fortes, M. R. S., Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Silveira, A. C., Assumpção, M. E. O. D., Visintin, J. A., Oliveira, H. N. D. 2009. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. *Genetics and Molecular Biology*. 32:75–82.
- Friedman, J. M. and Halaas, J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763–770.
- Ghoneima, M.A., Ogaly, H.A., Gouda, E.M., El-Behairy, A.M. 2015. Prediction of desirable genotype patterns in Baladi beef cattle and water buffalo by identification of new leptin gene SNPs. *Livestock Science*.
- Goldenberg, D., Santos, J. L., Hodgson, M. I., Cortés, V. A. 2014. Nuevas proyecciones fisiológicas, patológicas y terapéuticas de la leptina. *Revista Médica de Chile*. 142(6): 738-747.

Haegeman, A., Van Zeveren, A., Peelman, L. J. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Animal Genetics*. 31(1): 79-79.

Hajihosseini, A., Hashemi, A. and Sadeghi, S. 2012. Association between polymorphism in exon 3 of leptin gene and growth traits in the Makooei sheep of Iran. *Livestock Research for Rural Development*. 24, Article #166. Disponible en [http://www.lrrd.org/lrrd24/9/haji24166.htm].

Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L., Spurlock, M. E. 1998. The biology of leptin: a review. *Journal of Animal Science*. 76 (5): 1405-1420.

Kawachi, H., Yang, S. H., Hamano, A., Matsui, T., Smith, S. B., Yano, H. 2007. Molecular cloning and expression of bovine (*Bos taurus*) leptin receptor isoform mRNAs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 148(2): 167-173.

Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Considine, R. V., Boden, G., Nolan, J. J., Henry, R., Caro, J. F. 1996. Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 45(5): 699-701.

Kononoff, P. J., Defoor, P. J., Engler, M. J., Swingle, R. S., James, S. T., Deobald, H. M., Marquess, F. L. S. 2013. Impact of a leptin single nucleotide polymorphism and zilpaterol hydrochloride on growth and carcass characteristics in finishing steers. *Journal of Animal Science*. 91(10): 5011-5017.

- Kovarikova, L., Pavlik, A., Knoll, A., Filipcik, R. 2014. Relations of the leptin gene polymorphism and some internal environment parameters. Mendel net. 163-166. Disponible en http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2014/articles/51_kovarikova_1001.pdf
- Lefebvre, A. M., Laville, M., Vega, N., Riou, J. P., Van Gaai, L., Auwerx, J. 1998. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. Diabetes. 47: 98-103.
- Liefers, S. C., Te Pas, M. F.W. 2002. Association between Leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstien heifers. Journal Dairy Science. 85: 1633–1638.
- Liefers, S. C., Veerkamp, R. F., Te Pas, M. F. W., Delavaud, C., Chilliard, Y., Platje, M., Lende, V. D. T. 2005. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows¹. Animal Genetics. 36(2): 111-118.
- Lusk, J. L. 2007. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and back fat growth curve parameters for beef cattle. Journal of Animal Science. 85: 1865-1872.
- Martos-Moreno, G. A., Argente, J. 2011. Obesidades pediátricas: de la lactancia a la adolescencia. In Anales de Pediatría. 75 (1) 63-e1).

- Moravčíková, N., Trakovická, A., Kasarda, R. 2012. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Slovak Pinzgau cattle. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. 45(1): 211-214.
- Myers, M. G., Cowley, M. A., Münzberg, H. 2008. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annual Review Physiology*.70: 537-556.
- Nkrumah, J. D., Li, C., Basarab, J. B., Guercio, S., Meng, Y., Murdoch, B., Moore, S. S. 2004. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Canadian Journal of Animal Science*. 84(2): 211-219
- Nkrumah, J.D., Li, C., Yu, J., Hansen, C. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *Journal of Animal Science*. 83(1): 20-8.
- Noon, L. A., Clark, A. J., O'Shaughnessy, P.J., King, P. J. 2006. A CCAAT/enhancerbinding protein site at -87 is required for the activation of a novel murine melanocortin 2-receptor promoter at late stages during adipogenesis. *Endocrinology*. 147: 6019-6027.
- Otero, M., Lago, R., Gómez, R., Diéguez, C., Lago, F., Gómez-Reino, J. 2006. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology*.45: 944-950.
- Pinto, L.F.B., Ferraz, J.B.S., Pedrosa, V.B., Eler, J.P., Meirelles, F.V., Bonin, M.N., Rezende, F.M., Carvalho, M.E., Cucco, D.C., Silva, R.C.G. 2011. Single nucleotide

- polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat colour and tenderness in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*. 10: 2057–2064.
- Reicher, S., Gertler, A., Seroussi, E., Shpilman, M. and Gootwine, E. 2011. Biochemical and in vitro biological significance of natural sequence variation in the ovine leptin gene. *General and Comparative Endocrinology*. 173: 63–71.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Ye, X., Moore, S. S., Nkrumah, J. D., Li, C., Yu, J., Mandell, I.B., Wilton, J. W., Williams, J. L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*. 83: 2009-2020.
- Silva, D.B., Crispim, B.A., Silva, L.E., Oliveira, J.A., Siqueira, F., Seno, L.O., Grisolia, A.B. 2014. Genetic variations in the leptin gene associated with growth and carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*. 13: 3002–3012.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Richards, G. J. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83: 1263–1271.
- Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M. D., Burguera, B., Riggs, B. L. 1999. Leptin Acts on Human Marrow Stromal Cells to Enhance Differentiation to Osteoblasts and to Inhibit Differentiation to Adipocytes 1. *Endocrinology*. 140(4): 1630-1638.
- Wegner, J., Huff, P., Xie C. P., Schneider, F., Teuscher, F., Mir, P. S., Mir, Z., Kazala, E. C., Weselake, R. J., Ender, K. 2001.1 Relationship of plasma leptin concentration to

- intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 81(4): 451-457.
- Woronuk, G.N., Marquess, F.L., James, S.T., Palmer, J., Berryere, T., Deobald, H., Howie, S., Kononoff, P.J. 2012. Association of leptin genotypes with beef cattle characteristics. *Animal Genetics*. 43: 608–610.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425–432.
- Zhou, H., Hickford, H. and Gong, H. 2009. Identification of Allelic polymorphism in the ovine leptin gen. *Molecular Biotechnology*. 41: 22-25.