



UN-A-CH

UNIVERSITARIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CAMPUS II

**"ESTIMACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE LEPTINA EN
SEMENTALES DE LA RAZA SUIZO AMERICANO"**

TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

ÁREA TERMINAL EN GANADERÍA

MVZ. ALFONSO DE JESÚS RUIZ MORENO

ASESORES

DR. BENIGNO RUIZ SESMA

DRA. PAULA MENDOZA NAZAR

MC. ALBERTO YAMASAKI MAZA



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; Diciembre de 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CAMPUS II



COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
17 de Noviembre de 2009.

M.C. CARLOS TEJEDA CRUZ.
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO.
PRESENTE

Después de haber revisado cuidadosamente el borrador de la tesis titulada: "ESTIMACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE LEPTINA EN SEMENTALES DE LA RAZA SUIZO AMERICANO", que como prueba escrita para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Animal Sustentable en el Área de Ganadería presenta el C. ALFONSO DE JESÚS RUIZ MORENO, le informamos que el trabajo presentado reúne los requisitos académicos necesarios y damos nuestro VOTO APROBATORIO para su impresión.

DR. BENIGNO RUIZ SESMA

DRA. PAULA MENDOZA NAZAR

M.C. ALBERTO YAMASAKI MAZA

DRA. GABRIELA AGUILAR TIPACAMU

M.C. GERARDO URIEL BAUTISTA



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CAMPUS //



ESTA TESIS DENOMINADA "ESTIMACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE LEPTINA EN TOROS DE RAZA SUIZO AMERICANO", FORMA PARTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACION "EFECTO DE LA MUTACIÓN DEL GEN LEPTINA SOBRE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA DE VAQUILLAS RAZA SUIZO AMERICANO EN EL MUNICIPIO DE VILLAFLORES, CHIAPAS", REGISTRADO EN LA DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION Y POSGRADO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS Y FINANCIADO POR LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS EN EL MARCO DEL PROYECTO CONSOLIDACIÓN DEL MODELO EDUCATIVO DE LA UNACH. SUBPROYECTO REINCORPORACION DE EXBECARIOS Y FORMA PARTE DE LA LINEA DE GENERACION DEL CONOCIMIENTO DEL CUERPO ACADEMICO DE *PRODUCCION ANIMAL TROPICAL SOSTENIBLE*.

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS, MÉXICO. DICIEMBRE DE 2009

DEDICATORIAS

MC. ALBERTO YAMASAKI MAZA

DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Por ser un incansable promotor de la formación profesional

DR. BENIGNO RUIZ SESMA Y DRA. PAULA MENDOZA NAZAR

Por brindarme su amistad y los conocimientos para realizar esta investigación

DRA. GABRIELA AGUILAR TIPACAMU

Por su colaboración y apoyo

Mc. URIEL BAUTISTA TRUJILLO

Por su colaboración y su amistad que siempre me ha brindado

DR. SERGIO TORRES SOLIS

Por su dedicación y su apoyo desinteresado

DR. CARLOS TEJEDA CRUZ

Por otorgar todas las facilidades como coordinador de posgrado (FMVZ)

DRA. PATRICIA MACIAS FARRERA Y DR. GILBERTO YONG ANGEL

Por ser personas con un gran espíritu humanitario y de superación

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Gracias, **PADRE** por permitirme llegar a este momento, por la vida, por la familia, por la salud, por el trabajo, por los amigos y por todos los que me apoyaron en este logro, Bendícelos abundantemente

A MIS PADRES: Mario Alfonso Ruiz Ruiz y Cella Moreno Corzo

Todavía siguen como buenos padres al pendiente de sus hijos, y que este nuevo logro fortalezca su vida matrimonial y que sigan con las ilusiones que se forjaron como esposos hace 50 años

A MIS HERMANOS: Dra. Laura del Carmen, Ing. Mario Ernesto, L.N. María del Pilar Ruiz y el Lic. José Francisco

Por animarme a seguir preparándome

A MI ESPOSA SARA:

Por todo el apoyo que me brindó, por su comprensión, por ese tiempo que ocupe los espacios de mi familia por cursar mis estudios, Gracias

A MIS HIJOS: MARTIN DE JESUS Y CELIA KAREN

Este esfuerzo también lo realicé para indicarles el camino, para enseñarles a transitar por las áreas del conocimiento, y que sepan que la edad no limita para prepararse y nunca es tarde para salir adelante

A MIS SOBRINOS HIJOS DE MIS HERMANOS:

Teresita de Jesús, Miguel Ángel, Laura del Carmen, José Luis, Marla Fernanda, Mario Esteban(+), Luis Ernesto, Miriam Guadalupe, José Francisco y Caridad, Leonardo, Leonel, Belén y Angélica

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1.1 Objetivos.....	3
1.2 Hipotesis.....	3
II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Antecedentes del Ganado Suizo	4
2.1.1 Ganado suizo Europeo	4
2.1.2 Ganado Suizo Americano	6
2.2 La selección asistida por marcadores moleculares	7
2.3 Genes candidatos.....	15
2.4 Gen leptina.....	16
2.5 Estructura y función del ADN.....	19
2.6 Procedimiento para la extracción y purificación del ADN	20
2.6.1 Extracción	20
2.6.2 Componentes de la solución de lisis.....	21
2.6.3 Remoción de contaminantes.....	22
2.6.4 Precipitación o concentración	24
2.6.5 Lavado.....	24
2.6.6 Resuspensión	25
2.6.7 Electroforesis	25
2.6.8 Cuantificación del ADN.....	25
2.6.9 Determinación espectrofotométrica.....	26
2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
2.8 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLR)	31
2.8.1 Uso de la técnica PCR-RFLR	33
2.9 Sistema de amplificación refractario de mutaciones (ARMS).....	35
III. MATERIALES Y METODOS	38
3.1 Descripción del área de estudio	38
3.2 Metodología.....	39
3.2.1. Técnicas de campo.....	39
3.2.2. Técnicas de laboratorio.....	39
3.3. Analisis de datos	43
IV. RESULTADOS	44
V. DISCUSIÓN	46
VI. CONCLUSIONES	49
VII. LITERATURA CITADA	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- QTLs detectados para diferentes caracteres en bovinos	12
Cuadro 2. -Proporción de la varianza explicada por algunos de los QTLs detectados en bovino lechero	13
Cuadro 3. - Genes analizados de manera comercial en programas de mejora de bovinos	14
Cuadro 4. - Edad de los toros por genotipo.....	43
Cuadro 5. - Frecuencias genotípicas del gen leptina de sementales activos en el municipio de Villaflores, Chiapas	43
Cuadro 5. - Frecuencias alélicas del gen leptina de sementales activos en el municipio de Villaflores, Chiapas	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Diagrama representativo de identificación de un SNP del gen Leptina mediante la técnica ARMS-PCR.....	34
Figura 2.- Localización del Municipio de Villaflores, Chiapas	37
Figura 3.- Gel de agarosa al 2% mostrando el resultado de la ARMS-PCR para el gen leptina común (239 y 164 pb), CT Leptina heterocigoto (239, 164, y 131 pb) y TT Leptina modificada o mutada (239 y 131 pb), Marcador de 100 pb	44

RESUMEN

La mutación del gen leptina TT está asociado con la eficiencia alimenticia y calidad de la carne en bovinos. El estudio se realizó en el municipio de Villaflores, Chiapas. El objetivo de este estudio fue de determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen leptina en el exon 2 de cromosoma 4. El polimorfismo fue obtenido mediante un análisis molecular con la técnica ARMS-PCR. Se estudiaron 42 toros de raza Suizo Americano. Con respecto al polimorfismo del gen leptina el 21% de sementales presentaron el genotipo TT, 31% CC y 48% TC. La frecuencia alélica fue de 47% para T y 53% para C. Se concluye que la baja frecuencia genotípica TT es debido probablemente a que los productores en este sistema seleccionan sus reproductores basados en su tipo racial, sin considerar caracteres de producción de leche o calidad de la carne que se asocian con la mutación del gen leptina.

Palabras clave: sementales, genotipo, alelo, leptina.

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimento y su regulación es un fenómeno biológico complejo influido por múltiples factores que la controlan y/o limitan, especialmente cuando se ingieren alimentos toscos como forrajes como es el caso de los bovinos. Esto resulta de la integración neural de numerosas señales relacionadas con el alimento, el ambiente y el estado fisiológico del animal (Faverdin *et al.*, 1995; Mertens 1997; Ingvarsen y Andersen, 2000), no siendo un único factor el que la controla. En el ganado bovino, la leptina, es sintetizada principalmente en el adiposo y codificada por el gen LEP, la leptina es una hormona proteica producida en el tejido adiposo, y es muy importante en la regulación del apetito (Kline *et al.*, 1997; Houseknecht *et al.*, 1998; Henry *et al.*, 1999; Oprzadek *et al.*, 2003; Münzberg *et al.*, 2005), ganancia de peso vivo (Fiedman y Halaas, 1998), actividad ovarica (Spicier 2001; Spicer y Francisco, 1998), crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, reparto de nutrientes entre la madre y el feto durante la gestación, incremento del metabolismo energético y el anabolismo muscular (Levin *et al.*, 1996; Ramsay, 1998). Se han descrito varios polimorfismos (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) en este gen. Un SNP en el exón dos, ocasiona efectos fisiológicos al sustituirse la citosina (C) por timina (T), que a su vez conduce a la sustitución de arginina por cisteína en la proteína correspondiente. El alelo T se ha asociado con el mayor contenido de grasa en la canal (Houseknecht *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 2002; Corva *et al.*, 2004, Motter *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007). Cuando en el gen que codifica la producción de la proteína está presente la base pirimidica citosina (C) se produce la leptina común; mientras que

cuando está presente la timina (T) se produce la leptina modificada. Como el animal recibe un gen del par de cada progenitor, el genotipo puede ser: CC (ambos genes codifican la leptina común); TT (ambos genes codifican la leptina modificada) y CT (cada gen codifica un tipo de leptina). Los animales con genotipo CC son más lentos para engordar, comen menos durante el pico de lactancia y producen menos leche. Los animales con genotipo TT producen más leche de mejor calidad y canales con mayor marmoleo (Houseknecht *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 2002; Corva *et al.*, 2004; Madeja *et al.*, 2004; Rincker *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007). Finalmente, los animales con genotipo CT pueden producir ambos tipos de leptina y tienen un comportamiento intermedio. Los tres genotipos para la producción de leptinas han sido encontrados en todas las razas bovinas, pero en diferentes proporciones (Houseknecht *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 2002; Corva *et al.*, 2004; Motter *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007).

La identificación del gen leptina es una herramienta para hacer eficiente los sistemas de producción, ya que con esto, es posible predecir cómo un toro, una vaca o una vaquilla (y su progenie) utilizarán la energía y cuál será su potencial productivo. Es decir, se trata de una técnica que permite predecir el potencial productivo de un individuo desde su nacimiento. Conociendo el genotipo es posible agrupar los animales y realizar un manejo nutricional estratégico acorde con su potencial. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue estimar frecuencia genotípica y alélicas del SNP del gen Leptina, de toros de raza Suizo Americano en los sistemas de producción bovinas del Municipio de Villaflores, Chiapas, México.

1.1 OBJETIVOS

Identificación la frecuencia genotípica y alélica del SNP (Single Nucleotide Polymorphism) del gen de la Leptina, asociado con la calidad de la carne y la producción de leche, de Sementales Suizo Americano en sistemas de producción bovinas del municipio de Villaflores, Chiapas, México.

1.2 HIPÓTESIS

La selección de reproductores basadas en el fenotipo, ocasiona que la frecuencia genética TT y alélicas T del gen leptina sea baja en los sementales bovinos de la raza Suizo Americano en el área de estudio.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes del Ganado Suizo

El ganado bovino de la raza suizo conocida como Braunvieh es una palabra alemana que significa "ganado café", en Europa se tienen registros de que existe como raza pura desde el año 800 a.c lo cual la ubica como una de las razas más antiguas del mundo, esta raza completamente establecida en Europa entre los siglos XVI y XVII, fue desarrollada para la producción de carne.

2.1.1. Ganado Suizo Europeo

El ganado Braunvieh se encuentra en más de 60 países, extendiéndose desde el círculo ártico hasta los trópicos, en altitudes que varían del nivel del mar hasta los 3,800 msnm, el inventario mundial es de 7 millones de cabezas.

Los ejemplares importados a USA entre los años 1869 y 1880 fueron la base para la formación de una raza de leche. En México a este ganado se le conoce como Suizo Europeo (García, 2002).

La Coloración del ganado Braunvieh, el pelo de esta raza puede ser de varias tonalidades de café, desde el café claro pasando por gris, hasta el café oscuro, predominando el café ratón. El morro es de color negro intenso y el pelo que forma el borde alrededor de este es muy claro, formando una especie de bigote (García, 2002).

Esta raza es muy dócil, de cuerpo largo y musculoso, con excelentes patas y pezuñas debido a generaciones de selección natural en los alpes suizos, las pesuñas son de color negro y de gran dureza, estas características le confieren una gran habilidad para pastorear en zonas de difícil acceso (García, 2002).

Gran rango de adaptación a varios climas, su pelo es muy corto fino en condiciones de clima cálido, y puede crecer muy abundantemente en condiciones de frío extremo. Esta característica le confiere al ganado Braunvieh una gran capacidad de adaptación a condiciones climáticas extremas haciendo que el ganado Braunvieh sea muy popular como raza pura o en cruzas con razas cebuínas (García, 2002).

En cuanto al peso adulto de la Raza, las Hembras presentan pesos entre los 550 a 700 Kg. Y los Machos entre 950 Kgs. a 1,100 Kg., asimismo los Novillos para abasto se obtienen pesos al sacrificio de 500 Kg a una edad al sacrificio de 13 meses.

En cuanto a la calidad de la canal, los novillos Braunvieh, consistentemente producen canales de alta calidad en el sistema de clasificación de los Estados Unidos de América y se considera al ganado Braunvieh, como la raza que encabezará la industria de la carne en este nuevo milenio, las hembras son excelentes madres, musculatura y peso, excelente marmoleo y gran desempeño productivo y reproductivo y su gran habilidad para producir leche y carne a partir de pastos templados y tropicales, hacen del ganado Braunvieh el animal ideal para los sistemas de "doble propósito".

2.1.2. Ganado Suizo Americano

El ganado Suizo Americano, desarrollado en los Estados Unidos de América, a partir de 130 cabezas de ganado Braunvieh importadas de Suiza entre 1869 y 1880, en este país el ganado fue seleccionado para una mayor producción de leche que sus ancestros Braunvieh. Durante los últimos 125 años este ha sido el principal criterio de selección del ganado suizo americano, declarada raza lechera en 1890, y por consiguiente se considera diferente al ganado Braunvieh, aunque conserva muchas ventajas de adaptación presentes en el ganado que le dio origen (García, 2002).

El ganado Suizo Americano comparada con otras razas lecheras especializadas, sobresale por las siguientes características, mejores patas y pezuñas, menor incidencia de trastornos metabólicos, excelentes para pastorear, viven y producen leche por más tiempo, tienen ubres más limpias y de mejor textura, tienen un excelente temperamento, resisten temperaturas extremas, mayor producción de proteína, gran facilidad de parto, mejor comportamiento reproductivo y otra característica importante de la raza es la elevada relación proteína/grasa.

El listado histórico de la asociación Mexicana de Criadores de Ganado Suizo de Registro se utilizó para elaborar los mapas que arrojaron la información de que el ganado Suizo ha estado presente prácticamente en todos los climas y sistemas de producción popular como raza pura o en cruces con razas cebuinas en la región tropical (García 2002).

2.2 La selección asistida por marcadores moleculares

La aplicación de la genética cuantitativa en el mejoramiento de los animales domésticos, ha permitido 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 de un animal, expresada fenotípicamente, es el resultado de diferentes combinaciones genotípicas y del ambiente en que se desarrollan (Falconer, 1981). Esta información permite la estimación del valor genético de un animal utilizando procedimientos basados en modelos mixtos, los cuales incorporan actualmente información de parentescos o relaciones genéticas a la matriz de datos, dando origen a diferentes modelos (Díaz *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2003).

En los últimos 10 años, la genética molecular ha propiciado un avance importante en la evaluación de reproductores, incorporando técnicas de análisis de ADN que han ayudado a identificar, de forma eficiente, diferencias a nivel de secuencias nucleotídicas entre individuos (Davis *et al.*, 1998; Casas, 2006). Entre las técnicas básicas se incluyen la separación de los ácidos nucleicos de otros componentes celulares, caracterización de la secuencia de ADN, estudio de la expresión de los genes, manipulación genética, clonación de genes y otros como el análisis del genoma, desde la secuenciación, mapeo y determinación de polimorfismos (Casas, 2006; Fujita, 2007).

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

Para efectuar un cambio genético en una población animal, con el fin de mejorar la producción y hacerla más rentable, el productor o criador de animales cuenta con dos herramientas: la selección adecuada de los progenitores, basándose en registros individuales, así como de sus parientes, y el diseño de cruzamientos de líneas puras o híbridas que optimicen la obtención del producto destinado al consumo (Gedelman *et al.*, 1986; Montaña, 1997; Ramírez *et al.*, 1997)

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

Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ma *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1997). Sin embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de efectos epistáticos o ambientales limitaban su uso.

La revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de marcadores iso-enzimáticos, ampliando el número de marcadores genéticos disponibles, lo cual ocasionó que la aplicación de estas técnicas se expandiera prácticamente a todas las especies de animales (Barendse *et al.*, 1997). Con el conocimiento de técnicas modernas de Biología Molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismos genéticos directamente a nivel de ADN, como los marcadores moleculares, que en general, permiten maximizar los programas de mejoramiento genético (Ma *et al.*, 1996).

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 *Quantitative Trait Loci*), 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 genéticos permiten saber si determinados genes están

presentes o no en un animal, sin tener que observar directamente su expresión fenotípica (la característica visible que confiere el gen o los genes que se traten) que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia mendeliana (Ferreira *et al.*, 1998). Entre sus principales aplicaciones en ganadería se encuentran la identificación y verificación de parentesco, la construcción de mapas genéticos, el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades (Craighead *et al.*, 1995; Uffo *et al.*, 2002).

Los marcadores constituyen una herramienta fundamental en la construcción de mapas genéticos, mismos que son imprescindibles en la identificación y aislamiento de genes de interés al investigador (Rodríguez-Zas *et al.*, 2002); información de utilidad en programas de mejoramiento animal a través de la Selección Asistida por Marcadores (Marker Assisted Selection, MAS).

Grisat *et al.*, (2002) y Brunner *et al.*, (2003) han desarrollado metodologías para la identificación de QTL en bovinos. En esta última línea de aplicación utilizando marcadores ligados a genes mejoradores, se puede aumentar la eficiencia de la selección en la medida en que sean introducidos en los programas de selección, lo cual facilita el aislamiento de genes o grupos de genes para la obtención de animales transgénicos (Dietrich *et al.*, 1992; Serikawa *et al.*, 1992; Thallman, 2004).

Actualmente, con los avances existentes en la selección asistida por marcadores 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 importante influencia en caracteres productivos (Dekkers, 2004). Al mismo tiempo, los avances en el conocimiento del genoma, están proporcionando abundante información sobre variantes nucleotídicas del ADN, junto con los registros sistemáticos de fenotipos dentro de grandes grupos de familias, lo cual está permitiendo obtener un amplio conocimiento sobre las regiones del ADN (QTLs) que ejercen influencia significativa en gran cantidad de caracteres productivos (Knott *et al.*, 1992; Haley, 1995; Goddard *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2001; Misztal, 2006; Montaldo *et al.*, 1998).

En algunas ocasiones, los avances hacia la identificación del gen responsable en una región previamente identificada como QTL de interés han tenido éxito, disponiendo en la actualidad de algunos genes que ejercen una significativa influencia en caracteres de interés económico, los cuales se han denominado genes mayores (Kinghorn *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 2001; Cañón, 2006; Misztal, 2006).

Como ejemplos de QTLs se tienen al gen de la hipertrofia muscular, la miostatina, o el DGAT1 en bovinos, gen booroola en ovinos, o genes responsables de calidad de carne o rendimiento, RYR1 y PRKAG3 en porcinos. Se conocen tres tipos de *loci*: a) *loci* en los que se conoce la mutación funcional que será genotipada; b) *loci* (marcadores) de distancias genéticas entre parejas de individuos pertenecientes a varias razas bovinas en desequilibrio de ligamiento con mutación funcional; c) *loci* (marcadores) que están en equilibrio de ligamiento

con la mutación funcional (Haley, 1995; Ashwell *et al.*, 1997; Groen *et al.*, 1997; Hetzel *et al.*, 1997; Casas *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2005; Cañón, 2006).

Cuadro 1.- QTLs detectados para diferentes caracteres en bovinos.

Bovino lechero		Bovino de carne	
Carácter	Cromosoma	Carácter	Cromosoma
Cantidad de leche	6, 14, 18	Peso nacimiento	1, 6, 19
Grasa y % grasa	6, 14, 19, 26	Peso destete	12 %
Proteína y % proteína	6, 7, 14, 19, 20, 26	Peso año	6, 12
Persistencia	11	Grasa intramuscular	7
Células somáticas	15	Peso canal	6
Fertilidad	1, 7	Rendimiento canal	5
		Área <i>L. dorsi</i>	6, 14
		% grasa canal	4
		Veteado	17, 29
		Terneza	15, 29
		Tasa ovulación	5, 7, 19

La incorporación en los programas de mejora de la información que proporcionan los QTLs comienza a ser una realidad en los bovinos, y se lleva a cabo mediante herramientas de genética cuantitativa, lo que se denomina la selección asistida por marcadores (MAS: Marker Assisted Selection) (Meuwissen *et al.*, 1992; Meuwissen *et al.*, 1996; Misztal, 2006). La incorporación de la selección asistida por marcadores dentro de programas de mejora tradicionales se justificaría en los casos de baja eficiencia de los índices de selección: caracteres difíciles de medir, que manifiesten heredabilidades reducidas o que se expresen en un solo sexo o muy tarde en la vida de un animal, correlaciones genéticas negativas entre caracteres, varianza genética no aditiva e introgresión

(Meuwissen *et al.*, 1992; Haley, 1995; Janss *et al.*, 1995; Goddard, 1992; Cañón, 2006).

Cuadro 2.- Proporción de la varianza explicada por algunos de los QTLs detectados en bovino lechero.

Cromosoma	Carácter	% varianza explicada
1	Fertilidad	15
6	Contenido proteico	18
6	Velocidad de ordeño	13
7	Fertilidad	16
14	Cantidad de leche	13
14	Contenido en grasa	40
14	Contenido proteico	30
19	Proteína	17
26	Grasa	16
26	Proteína	10

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 combinando la información fenotípica disponible con la información que proporcionan los marcadores, lograr un incremento en la intensidad de selección, al seleccionar individuos sin información fenotípica y reducir el intervalo generacional al disponer de información de selección incluso antes de que el animal haya nacido (Knott *et al.*, 1992; Meuwissen *et al.*, 1992; Meuwissen *et al.*, 1996). La explotación de la selección asistida por marcadores seguramente necesitará de esquemas alternativos de mejora en los que se pueda

explotar masivamente las técnicas de reproducción asistida (Janss *et al.*, 1995; Goddard, 1992; Kinghorn, 1998).

Cuadro 3 Genes analizados de manera comercial en programas de mejora de bovinos.

Locus/gen	Nombre	Cromosoma	Carácter o caracteres afectados
DGAT1	AcylCoA:diacilglicerolaciltransferasa	14	Cantidad y composición lechera
CAPNI	μ -calpaina	29	Terneza
CAST	Calpastatina	7	Terneza
LOX	Lysil oxidasa	7	Textura de la carne
LEP	Leptina	4	Engrasamiento canal y eficiencia alimenticia
TG	Tiroglobulina	14	Grasa intramuscular
MSTN	Miostatina	2	Desarrollo muscular, calidad de carne y eficiencia alimenticia

Un ejemplo, planteado hace más de 10 años bajo el nombre de velogenética (combinación de la MAS 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 bovinos lecheros (Georges *et al.*, 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 *et al.*, 1991; Ruane *et al.*, 1997; Wakayama *et al.*, 1998; Cañón, 2006; Misztal, 2006; Guillaume *et al.*, 2008).

Actualmente, en Francia, las tres principales razas de bovino lechero, Holstein, Normande y Montbéliard, están sometidas a un programa de selección asistida por marcadores en el que se consideran 12 QTLs identificados cada uno por 2 ó 4 marcadores moleculares. Nueva Zelanda es otro de los países que han puesto en funcionamiento un esquema de este tipo y en el que se utilizan 25 marcadores situados en 6 QTLs identificados (Boichard *et al.*, 2003; Guillaume *et al.*, 2008).

2.3. Genes candidatos

Una de las mayores complicaciones para identificar los genes responsables de la variabilidad de atributos de importancia económica en producción animal es que sus fenotipos son de herencia compleja y no es simple establecer una relación inequívoca entre un gen y un fenotipo (Soria *et al.*, 2004). De hecho, la mayoría de tales atributos muestra variabilidad de tipo cuantitativa; no es posible definir clases discretas al ordenar fenotipos y se asume que éstos están condicionados por la segregación de un número elevado de genes. Aún así, en ciertos casos ha sido posible identificar genes cuyas variantes naturales que coexisten en la población permiten explicar parcialmente la variabilidad de un fenotipo. En estos casos, se habla de un gen candidato (Rothschild *et al.*, 1997). Si se confirma una asociación significativa entre el fenotipo y los alelos de un gen

candidato, se pueden diseñar análisis de laboratorio específicos para identificar los animales portadores de las variantes más favorables en la población comercial, aún sin la información fenotípica correspondiente (Soria *et al.*, 2004). El gen candidato puede haberse identificado porque se tenía un conocimiento previo de la proteína respectiva (Soria *et al.*, 2004).

Para reforzar la condición de gen candidato, también puede disponerse de información posicional. Un gen puede tener una función asociada con un fenotipo en particular y que a su vez su posición en el genoma coincide con regiones cromosómicas que cosegregan con dicho fenotipo y que se suponga tienen una función en la regulación del mismo; ambas pistas lo hacen un candidato posicional. Se sugiere no basarse simplemente en la función para la identificación de un gen candidato, si no apoyarse también en información posicional (Haley, 1999).

2.4. Gen Leptina

La leptina es una hormona producida por el adiposito y está involucrada en el control del balance energético, el consumo de alimento y la composición corporal (Houseknecht *et al.*, 1998; Cerón *et al.*, 2008). Esta hormona genéticamente está relacionada con la obesidad en los animales, actuando a nivel central y periférico en el apetito y en el adiposito. Lo cual ha convertido a la leptina en uno de los mejores marcadores fisiológicos en el control del peso corporal, el consumo de alimento, el gasto energético (Woods *et al.*, 1998), la reproducción (García *et al.*, 2002), el engrasamiento (Buchanan *et al.*, 2002; Nkrumah *et al.*,

2005), la producción lechera (Buchanan *et al.*, 2003) y de ciertas funciones del sistema inmune (Lord *et al.*, 1998). La administración de leptina en roedores, aves, cerdos y ovejas reduce la ingesta de alimento, y esta hormona tendría un efecto de retroalimentación en la insulina, en los glucocorticoides y en el sistema nervioso autónomo simpático. Estudios *In Vitro* sugieren que la leptina modula el metabolismo energético en el tejido periférico y puede antagonizar con la actividad de la insulina en el adiposito y en el músculo (Buchanan *et al.*, 2002).

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 se asocia con canales de animales gordos y el alelo C con animales flacos. (Stone *et al.*, 1997; Wilkins *et al.*, 1997; Buchanan *et al.*, 2002; Geary *et al.*, 2003; Corva *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que vacas con mayor tejido graso presentan un alto nivel de leptina en la sangre. El conocimiento respecto a este péptido indica que cuando aumenta su concentración, envía una señal al cerebro para suprimir el apetito y redireccionar las reservas grasas a energía. Sin embargo, existe un tipo alternativo de leptina que cuando predomina no afecta al apetito y el metabolismo energético no cambia mayormente (Marcantonio, 2004; Cerón *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2008). La diferencia en el genotipo 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 (Marcantonio, 2004; Cerón *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2008). 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). Bauck (2004), en una investigación realizada en Canadá encontró que el genotipo L-TT produjo 2.44 Kg de leche d⁻¹ en los primeros 100 días de lactancia y 1.5 Kg de leche d⁻¹ en la lactancia completa más que el genotipo L-CC en estos periodos. El genotipo L-CT produjo 0.9 Kg de leche d⁻¹ más que L-CC en la lactancia completa. Con relación a la proteína láctea, L-TT produjo 73 gr d⁻¹ más en los primeros 100 días de lactancia y 43 gramos en toda la lactancia que L-CC en esos periodos. El genotipo L-CT produjo 50 gr d⁻¹ más que L-CC en los primeros 100 días.

Al genotipo L-TT se le ha relacionado con el reinicio temprano de la actividad cíclica ovárica, favoreciendo la secreción de GnRH por bloqueo de la acción inhibitoria del "Neuropeptido Y" sobre la síntesis de este factor liberador de gonadotropinas, influyendo también en el inicio de la pubertad (Brewer, 2004)

2.5. Estructura y función del ADN

Los ácidos nucleicos son polímeros de cuatro nucleótidos, y están constituidos por un grupo fosfato y un nucleósido; este último formado por una molécula de azúcar pentosa y una base nitrogenada (bases púricas: adenina y guanina o pirimidicas: citosina, timina y uracilo). Los nucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster 3' - 5' entre el grupo hidroxilo 3' del azúcar con el grupo 5' del grupo fosfato para formar una cadena. Se conocen dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y el ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena doble; este último contiene la información genética de la célula. Las diferencias entre ADN y ARN son básicamente: 1) la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 2 del azúcar en el ARN (ribosa) y su ausencia en el ADN (desoxirribosa); 2) presencia de la base nitrogenada uracilo en lugar de timina en el ARN. El ADN puede considerarse como un libro de cocina con todas las recetas para hacer proteínas y ARNt y ARNr en la célula, mientras el ARNm copia las recetas y con la ayuda de los ribosomas traduce la información del ADN a proteínas (Nelson *et al.*, 2001).

Debido a que el ADN es la molécula que almacena la información precisa para que un ser vivo pueda llevar a cabo todas las funciones necesarias, para poder estudiar y manipular los ácidos nucleicos *in vitro*, su aislamiento de células y tejidos es el primer paso en todas las investigaciones, para lo cual existen diferentes metodologías (Nelson *et al.*, 2001) de extracción de ácidos nucleicos las que varían de acuerdo a la composición celular de donde se extraen. El método específico de extracción depende del origen (células procariontas o

eucariotas, o bien animales o vegetales), el tamaño y la estructura de los ácidos nucleicos, así como, el uso que se pretende dar a las moléculas purificadas (Nelson *et al.*, 2001).

2.6. Procedimiento para extracción y purificación del ADN

2.6.1. Extracción

Lisis celular. La ruptura de la célula se consigue mediante métodos físicos o químicos. Los métodos físicos involucran el uso de calor, maceración u homogenización con perlas de vidrio. Ejemplos de ello son: la extracción de ADN plasmídico por ebullición, el ADN cromosómico se mantiene unido a la membrana celular, mientras que el ADN plasmídico se mantiene en suspensión, y la separación de cada fracción se realiza mediante centrifugación diferencial (Maniatis *et al.*, 1982). En los métodos químicos se tiene el uso de diferentes sales como: NaCl y NaOH; detergentes: deodecil sulfato de sodio (SDS) y laurel sarcosina (sarcosil); y solventes orgánicos: fenol-cloroformo (Ausubel *et al.*, 2002; Farrell, 1998).

2.6.2. Componentes de la solución de lisis

1) Un detergente (generalmente SDS), cuya función es romper las bicapas lipídicas de las membranas y unirse a las cargas positivas de las proteínas cromosómicas liberando el ADN a la solución acuosa. La concentración final en la solución de lisis es del 1%. Es posible utilizar un detergente comercial para lavar los platos como sustituto del SDS en la misma concentración final.

2) Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que se encarga de secuestrar los cationes Mg^{2+} de las enzimas que degradan el ADN y lo utilizan para llevar a cabo su actividad. La concentración final es de 0.3%.

3) Cloruro sódico, mantiene la doble hélice del ADN y actúa sobre las histonas liberándolas del ADN. La concentración final en la solución es de 0.9%.

La lisis con sales como NaCl y NaOH, denominada lisis alcalina, se ha empleado en la extracción de ADN plasmídico, en donde el NaOH junto con el detergente SDS rompen las células. Con la adición posterior de acetato de potasio se logra mantener unido el ADN plasmídico, mientras que el ADN cromosómico y las proteínas son atrapadas en un complejo formado entre el potasio y el SDS. Este método se utiliza para pequeños plásmidos (20 kb, aproximadamente) como *E. coli* (bacteria gram negativa) (Davis *et al.*, 1986; Ausubel *et al.*, 2002).

Los solventes orgánicos como el fenol y el cloroformo dañan la membrana celular y la de los organelos, remueven proteínas y lípidos y simultáneamente inactivan enzimas nucleasas tales como la ADNasa y ARNasa y otras macromoléculas aisladas en el proceso de extracción (Ausubel *et al.*, 2002; Farrell, 1998).

Por otro lado, la extracción de ARN de células con un alto contenido de ribonucleasas (ARNasas), resulta complicado por la actividad de dichas enzimas, por lo que es necesaria una rápida recuperación de ARN de los organelos y vacuolas. La mayoría de las metodologías hacen uso de potentes agentes caetrópicos, tales como: sales de guanidina (isotiocinato y clorhidrato de

guanidina), además de los detergentes y solventes orgánicos ya señalados (Maniatis *et al.*, 1982; Slater, 1984; Begger, 1987; Farrell, 1998).

La integridad de los ácidos nucleicos se conserva manteniendo el sustrato (células o tejidos) sobre hielo o congelándolo antes de comenzar el proceso de extracción.

2.6.3. Remoción de contaminantes

Una vez que se han lisado las células para la extracción del ADN o ARN, y se ha hecho disponible, es necesario separarlo del resto de la célula, ya que la calidad y cantidad de la molécula puede ser modificada por la actividad enzimática de nucleasas como la ADNasa o ARNasa y de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de purificación.

El problema de las nucleasas es la remoción de cationes como el magnesio, que es necesario para la actividad de las mismas. Agentes como EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y fenantrolina quelan cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} , previniendo de esta forma la actividad de la ADNasa y ARNasa (Farrell, 1998).

Es común remover la mayoría de las proteínas por digestión con enzimas proteolíticas como la proteinasa K, antes de la utilización de solventes orgánicos como el fenol y cloroformo, los cuales son frecuentemente utilizados, también para la desproteinización; si se usan en forma simultánea son más eficientes, además al final de la remoción de contaminantes se emplea solo cloroformo para

eliminar residuos de fenol en los ácidos nucleicos (Maniatis *et al.*, 1982; McGookin, 1987; Farrell, 1998).

La mayoría de proteínas son más solubles en fenol durante la fase orgánica (es la fase inferior, puede ser más densa o menos densa que la fase acuosa) que en la fase acuosa (es la fase superior o el sobrenadante); mientras que los ácidos nucleicos son más solubles en la fase acuosa, tales fases son separadas por centrifugación. La fase orgánica se queda en la parte inferior y contiene a las proteínas; la fase acuosa se queda en la parte superior y tiene al ADN o ARN. En la extracción de ADN es importante considerar el pH, ya que valores menores o iguales a 5 o 6, el ADN puede ser retenido en la fase orgánica y en la interfase, dejando el ARN en la fase acuosa, así que para la extracción de ADN se requieren un pH de 7.5 a 8, con el cual tanto ADN como ARN son retenidos en la fase acuosa, por lo que se debe cuidar el pH antes de llegar a la utilización de fenol (Maniatis *et al.*, 1982; Farrell, 1998).

Un reactivo utilizado en varios procedimientos para la extracción de ADN es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), el cual se pega fuertemente al ADN, desplaza a las proteínas y previene la degradación. El CTAB se remueve mediante extracciones con cloroformo y el ADN permanece en la fase acuosa (Valadez y Günter, 2000).

2.6.4. Precipitación o concentración

Se logra precipitar los ácidos nucleicos con el uso de diferentes alcoholes o la combinación de sales de cationes monovalentes en concentraciones moderadas y alcohol a bajas temperaturas (-20°C) y recuperarlos por

centrifugación. El método más ampliamente utilizado en la extracción de ADN es precipitado con etanol en presencia de concentraciones moderadas de cationes monovalentes. El isopropanol en una relación de un volumen al 100% puede ser usado en lugar del etanol al 70% (dos volúmenes) para precipitar el ADN, con la ventaja de manejar un volumen menor, pero el isopropanol es más volátil que el etanol y es más difícil de remover.

Sin embargo, con solutos como sucrosa o cloruro de sodio se coprecipitan con el ADN más fácilmente cuando se utilizan isopropanol, especialmente a -70°C (Maniatis *et al.*, 1982).

El método más utilizado en la extracción de ARN es precipitar con etanol en presencia de concentraciones moderadas de acetato de sodio. La precipitación del ARN es mucho más refinada que la del ADN, y requiere períodos más largos a -20°C (Farrell, 1998).

2.6.5. Lavado

Para remover cualquier soluto que se haya quedado en el precipitado, la pastilla con los ácidos nucleicos puede ser lavada con etanol a diferentes concentraciones, regularmente se emplea etanol al 70%, se agita con un agitador vortex y se centrifuga.

2.6.6. Resuspensión

Los ácidos nucleicos se resuspenden en algún amortiguador de baja astringencia iónica como es el TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), agua destilada estéril o agua libre de RNAsas.

2.6.7. Electroforesis

Una vez que se ha hecho la extracción de los ácidos nucleicos, la forma más común de verificar su estado físico, es mediante electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se depositan dentro de los pozos que forman los peines en el gel de agarosa y migran a través de él. Este proceso separa las moléculas de los ácidos nucleicos por tamaño, las cuales se hacen visibles mediante tinción con bromuro de etidio.

2.6.8. Cuantificación del ADN

Una vez extraído y purificado el ADN de una muestra biológica, la mayoría de las técnicas que se emplean para su posterior caracterización, clonaje o secuenciación, requieren conocer la concentración de la solución de partida. Por eso se han desarrollado diversos métodos de medida siendo el más utilizado la obtención de la absorbancia en un espectrofotómetro con luz ultravioleta. Dado que se conoce que una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 mg/ml de ADN, se puede calcular la concentración del ADN de una muestra problema midiendo la absorbancia a 260 nm.

2.6.9. Determinación espectrofotométrica

Los ácidos nucleicos tienen la habilidad de absorber la luz ultravioleta, con un máximo, a una longitud de onda de 260 nm. Su absorción se debe a las bases púricas y pirimidicas. La lectura en esta longitud de onda permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de A_{260}

corresponde, aproximadamente, a 50 µg/mL de ADN de doble cadena, 40 µg/mL de ADN de cadena sencilla y de ARN y 20 µg/mL de oligonucleótidos de cadena sencilla. La cuantificación basada en la absorbancia a 260 nm provee poca información acerca de la calidad y pureza de los ácidos nucleicos, en relación a la contaminación con proteínas, fenol o sales. La relación de A_{260} a A_{280} (A_{260} / A_{280}) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Una muestra pura de ADN tiene una relación A_{260} / A_{280} de 1.8 ± 0.15 , y una muestra pura de ARN tiene una relación A_{260} / A_{280} de 2.0 ± 0.15 (Farell, 1998; Valadez *et al.*, 2000).

2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de la biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades mínimas de un cierto de ADN específico, posibilitando su fácil identificación, de esta forma la reacción en cadena de la polimerasa es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de ADN 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; Giovambattista, 2000, Rojas, 2004).

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 μ l) y finalmente, la enzima ADN polimerasa termoestable (White *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2000; Giovambattista, 2001; Rojas, 2004).

Magnesio.

Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila entre 0.5 y 2.5 mM. La concentración de $MgCl_2$ debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de Mg^{+2} dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

Desoxirribonucleósidos Trifosfatados (dNTPs).

Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN. La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. 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.

También afecta la fidelidad de la reacción, el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales entre 0.2 a 1 mM.

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 *et al.*, 2000).

Cebadores o iniciadores.

Son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G + C de 40-75%. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR esta en el intervalo de 0.1 – 0.5 μ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN. Los cebadores ideales deben carecer, lo más posible, de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre si. El extremo 3' induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores entre si, 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 de la amplificación 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 estables 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 Mg²⁺ y de los dNTPs, así como de que exista o no balance en la concentración de estos últimos (Maniatis, 1982; Valadez *et al.*, 2000).

Agua.

Se usa como solvente del resto de los ingredientes y de preferencia debe ser destilada (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.

El hecho de que existan contaminantes en la reacción de amplificación, tales como esporas o ADN proveniente de otros organismos en los tubos o puntas que se utilizarán para preparar la reacción, tiene importantes implicaciones tanto para su aplicación en investigación como para el diagnóstico.

Debido a que el ADN original puede permitir la síntesis de millones de copias mediante PCR; la contaminación en la muestra de reacción con productos de una reacción previa, o con material proveniente de una fuente exógena, es un problema de contaminación potencial. En general, el procedimiento cuidadoso de laboratorio en este sentido, consiste principalmente en separar físicamente a los reactantes y utilizar material nuevo y estéril (hacer alícuotas), éstas son algunas de las precauciones que evitarán una posible contaminación (Valadez *et al.*, 2000; Vaughan, 2000; Fraga, 2004).

Adyuvantes de la PCR. Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. El adyuvante más extendido y utilizado es el BSA, a concentraciones mayores de 0.8 µg/µl; el 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.

2.8. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Su principio es basado en la utilización de enzimas de restricción (endonucleasas) para fragmentar la molécula de ADN, detectando polimorfismos a través del número y tamaño de los fragmentos. El ADN digerido se verifica en geles de agarosa o poliacrilamida, visualizados mediante tinción con bromuro de etidio teniendo como resultado una separación continua de diferentes fragmentos de ADN de acuerdo con su tamaño, los cuales dan origen a polimorfismos (Drinkwater *et al.*, 1991; Sambrook *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 2000; Valadez *et al.*, 2000).

Posteriormente, se realiza la transferencia de ADN del gel a una membrana (Southern blotting), normalmente de nylon o nitrocelulosa, donde el siguiente paso es la hibridación con una sonda, es decir, un fragmento de secuencia conocida, marcado mediante radiactividad, luminografía o quimioluminiscencia (dependiendo del tipo de marcaje), hará visible un fragmento de ADN específico, que puede ser comparado con el fragmento resultante de otros genomas tratados de la misma forma; la sonda se une a los fragmentos de ADN fijados en la membrana que posea una secuencia complementaria, y estos se revelan a través de una autorradiografía (Sambrook, *et al.*, 1994; Mondragón, *et al.*, 2000; Valadez *et al.*, 2000; Rojas, 2004).

Al separar los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa, puede deducirse que el "mapa" de los sitios de restricción, es específico de cada molécula de ADN. Las sondas de ADN para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque la RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica.

Generalmente los RFLP sirven como marcadores moleculares, proporcionando marcadores codominantes que se han utilizado para construir mapas genéticos (de ligamiento) con selección asistida por marcadores, para la clonación de genes basados en mapas para la identificación de genotipos, identificación de cultivares en el caso de plantas, para ayudar a resolver problemas de índole taxonómico o filogenético, estudios de segregación, recombinación, paternidad, entre otros. La técnica molecular RFLP, es altamente confiable y de fácil estandarización en laboratorios universitarios o comerciales con baja inversión, por lo que se facilita su uso en el diagnóstico de mutaciones identificadas (Mondragón *et al.*, 2000; Baldeviano *et al.*, 2003).

Sin embargo, para otros laboratorios se trata de una técnica costosa y muy laboriosa, que precisa de una gran cantidad de ADN y una información previa sobre la secuencia, por lo que está siendo desplazada por otros marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Los marcadores RFLP cubren todo el genoma de un organismo, su uso aporta la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre marcadores y

genes. Los marcadores RFLP, poseen una expresión co-dominante, que torna positiva al identificar en cada locus estudiado genotipos heterocigotos y homocigotos, generando más información a nivel genético, permitiendo, con ello, un análisis detallado de la interacción génica e interacción entre alelos en estudios de mapeo y características cualitativas (Rojas, 2004).

Los marcadores RFLP han mostrado variación génica en la secuencia de nucleótidos en regiones que codifican productos génicos. El número de marcadores RFLP es prácticamente ilimitado, ya que marcadores basados en ADN tienen una alta estabilidad, pudiendo ser extraído, conservado y reutilizado por largos periodos de tiempo (Rojas, 2004).

2.8.1. Uso de la técnica PCR-RFLP

La Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo del Tamaño de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) es una técnica que combina la amplificación mediante PCR y la digestión posterior con enzimas de restricción, en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos. El material de partida es el ADN que se amplifica mediante el empleo de primers específicos antes de proceder a la digestión de los mismos mediante distintas enzimas de restricción (Mondragón *et al.*, 2000).

Para la técnica PCR-RFLP primero se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que sirve para amplificar fragmentos pequeños de ADN (<2kb empleando métodos estándares) (Mondragón *et al.*, 2000; Giovambattista *et al.*, 2001).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) es uno de los métodos más específicos y rápidos, pero también, el más caro.

2.9. Sistema de Amplificación Refractario de Mutaciones (ARMS)

Un método de genotipificación 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 de la tetra-primer PCR (Newton *et al.*, 1989) y del sistema refractario de la mutación de la amplificación (ARMS) (Ye *et al.*, 1992). Esta técnica no requiere digestión con enzimas de restricción y solo utiliza oligonucleótido específicos para alelos normal y mutado (Figura 1).

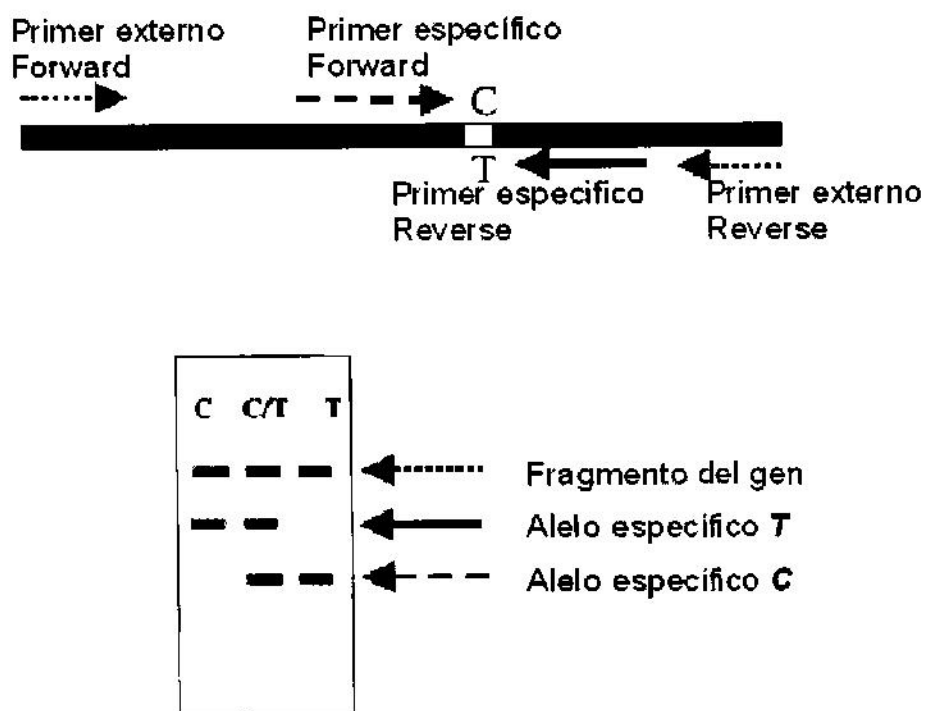


Figura 1. Diagrama representativo de identificación de un SNP del gen leptina mediante la técnica ARMS-PCR.

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. Sin embargo, la PCR puede realizarse con "primer" aleloespecíficos que amplifiquen 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 amplificará con este "primer". El "primer" aleloespecífico 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. A 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 (Newton *et al.*, 1989; Ye *et al.*, 1992; Hudson, 1997; Little, 1997; Lui *et al.*, 1997; Bathelier *et al.*, 1998).

El principio de la 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

(Newton *et al.*, 1989; Ye *et al.*, 1992; Hudson, 1997; Little, 1997; Lui *et al.*, 1997; Bathelier *et al.*, 1998).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área de estudio

El estudio comprendió el municipio de Villaflores, Chiapas, localizado en los límites de la Depresión Central y de la Sierra Madre del Sur. 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. Limita al norte con los municipios de Suchiapa, Jiquipilas y Ocozocoautla, al este con Chiapa de Corzo y Villa Corzo, al sur con Villa Corzo y Tonalá, al oeste con Jiquipilas y Arriaga. Su extensión territorial es de 1,232.1 km² 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. (Figura 2).

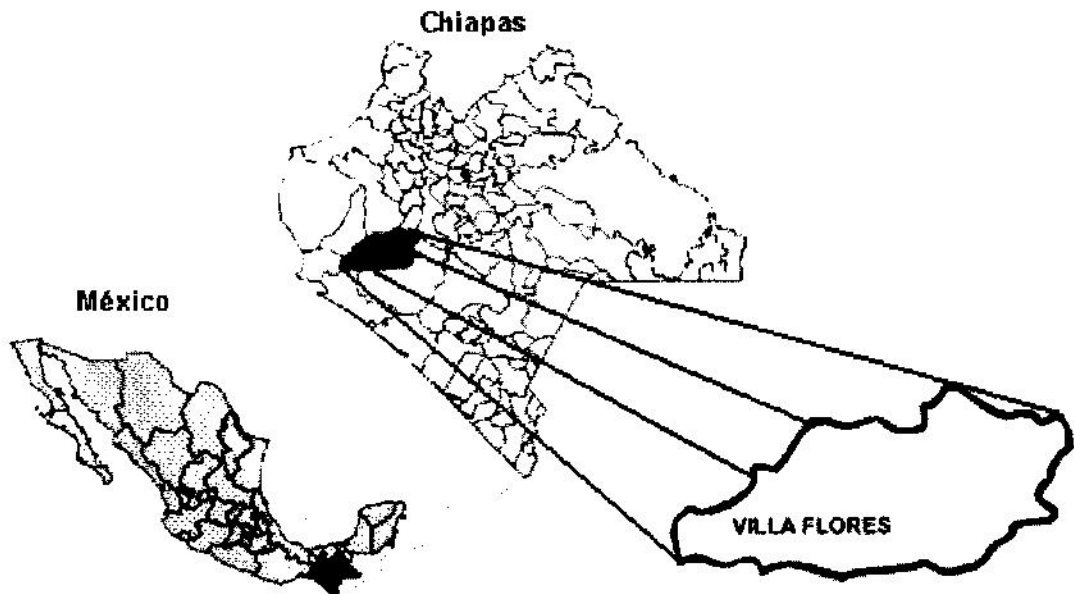


Figura 2. Localización del municipio de Villaflores, Chiapas.

3.2.- Metodología

Se evaluaron 42 sementales de la raza suizo americano, para la identificación del polimorfismo del gen leptina, se evaluaron las frecuencias genotípicas CC, CT y TT y alélicas C y T del (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) en el exón dos (Buchanan *et al.*, 2002; Corva *et al.*, 2004; Motter *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007, Ruiz, 2008).

3.2.1. Técnicas de campo

A cada semental se extrajeron 7 ml de sangre de la arteria coccigea media y se colocaron en tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA), a razón de 5 mg de EDTA por cada 2.5 ml de sangre, se giro el tubo 180° mediante un movimiento suave para que hacer la mezcla sin deteriorar los glóbulos rojos; posteriormente los tubos fueron almacenados a 4 °C hasta su procesamiento

3.2.2. Técnicas de laboratorio

La extracción de ADN se efectuó mediante la metodología descrita por Miller *et al.* (1988) con las siguientes modificaciones Ruiz, (2008): se colocaron 300 µl de sangre con anticoagulante EDTA en tubos Eppendorf de 1.5 ml; a cada tubo se le añadió 1000 µl de agua destilada fría, se mezcló en vortex (Modelo MS1 Minishaker, Marca IKA®) durante 5 minutos, se centrifugo a 12000 rpm por 5 minutos.

Se decantó quedando únicamente el sedimento, al que se le agregó 1000 µl de agua destilada fría (4 °C), se mezcló con vortex hasta deshacer la pastilla, se

centrifugó (Modelo Spectrafuge 16M, Marca Labnet®) a 12000 rpm por 5 min, nuevamente se decantó, dejando únicamente la parte sólida (este paso se repitió en un máximo de 3 veces, hasta quedar limpia). Se agregaron 1000 µl de solución Lisis (Tris HCl pH 8, NaCl 5 M, EDTA .5 M pH 8, SDS, H₂O), posteriormente se agito con un vortex hasta obtener una completa disolución de la pastilla. A los tubos se les adicionó 3 µl de proteinasa K (50 mg/ml) y se incubaron 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 centrifugando a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo de 1.5 ml, se precipitó con isopropanol frío (-20 °C) y se dejó reposar durante una hora a -20 °C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y se decantó el sobrenadante. Con el propósito de obtener la pastilla más limpia, ésta se lavó resuspendiéndola en 300 µl de etanol al 70 % frío (-20 °C), se agitó hasta disolverla, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar en la incubadora (Boekel Scientific; BOEKEL®) a 37 °C por 12 h. Finalmente, se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNasas y se guardaron a - 20 °C para su uso posterior.

Para la cuantificación del ADN se utilizó el método de absorción de luz ultravioleta, se efectuó a partir de diluciones 1/200 a 1/500 en agua destilada, para determinar la absorción de luz UV a las longitudes de onda 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (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 doble cadena. Las frecuencias genotípicas y alélicas se

obtuvieron mediante un análisis molecular utilizando la técnica de ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction) descrita por Ye *et al.*, (2001). 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 discriminar por la diferencia de tamaño de los productos amplificados.

Se utilizaron dos cebadores 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 (Corva *et al.*, 2004; Motter *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007).

Los cebadores utilizados fueron los siguientes; Cebador interno forward para el alelo T: 5'- TGT CTT ACG TGG AGG CTG TGC CCA GCT -3' cebador interno reverse para el alelo C: 5'- AGG GTT TTG GTG TCA TCC TGG ACC TTT CG -3' cebador externo forward: 5'- GAC GAT GTG CCA CGT GTG GTT TCT TCT GT -3' cebador externo reverse: 5'- CGG TTC TAC CTC GTC TCC CAG TCC CTC C -3' (Corva *et al.*, 2004, Motter *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007).

Para la amplificación genotípica y alélica se utilizaron 25 µl de reacción preparado con MgCl₂ (30 mM): 1.25 µl, Buffer (Biogenica 10 X. "100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 µg/ml gelatina, 1.5 mg/ml BSA; 1% Tritón X100"): 2.5 µl, dNTPs (Biogenica): 1 µl (200 mM de cada uno), Cebador interno Forward para el alelo T: 5 µl (10 pmol/µl), Cebador interno Reverse para el alelo C: 5 µl (10 pmol/µl), Cebador externo Forward: 1 µl (10 pmol/µl), Cebador externo Reverse: 1

μl (10 pmol/ μl), Taq ADN polimerasa (Biogenica 5 unidades/ μl) 0.2 μl , ADN 4 μl y agua 4.05 μl .

Las condiciones del ciclo térmico fueron las siguientes; desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido de 6 ciclos de 94 °C por 15 seg, 76 °C por 45 seg y 72 °C por 1 min (en el paso dos de este ciclo se baja un grado centigrado en cada ciclo hasta llegar a los 70 °C) seguido por 27 ciclos de 94 °C por 15 seg, 76 °C por 45 seg y 72 °C por 1 min y terminando con una extensión de 72 °C por 5 min (Corva *et al.*, 2004, Motter *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007).

Los productos de digestión de la PCR fueron CC 239 y 164 pb, CT 239, 164 y 131 pb y TT 239 y 131 pb (Corva *et al.*, 2004, Motter *et al.*, 2006; Corva *et al.*, 2007, Ruiz, 2008). Por otro lado, se procedió a verificar el producto de la PCR de las muestras, en gel de agarosa al 2 % (0.60 g de agarosa y 30 ml de buffer TBE 1X (Tris Borato-EDTA), por medio de una electroforesis, utilizando una cámara modelo horizon 58 (Life Technologies®). En cada pozo se depositó un volumen final de 10 μl (3 μl de colorante Naranja G y 7 μl de producto de PRC), usando como buffer de corrida TBE 1 X. Las condiciones de la electroforesis fueron de 60 minutos a 86 voltios. Transcurrido dicho tiempo los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos. Los resultados fueron evaluados en el fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, Marca Bio Rad) de luz ultravioleta (UV) y se capturaron las imágenes por computadora en el programa Quantityone, para la evaluación de frecuencias genotípicas y alélicas.

3.3. Análisis de datos

Para la caracterización genotípica y alélicas del gen leptina, se determinaron las frecuencias alélicas CC, CT y TT y genotípicas C y T. Cada muestra fue verificada visualmente con el fin de eliminar falsos positivos. Después de asignar el genotipo de cada uno de los animales, se estimó el equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas y las frecuencias alélicas se compararon mediante la prueba de Chi Cuadrada.

IV RESULTADOS

La edad promedio de los toros evaluados fue 36.7 meses. Para el genotipo CC se encontró una edad promedio de 48 meses, 32.6 y 36.7 para los genotipos CT y TT respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Edad de los toros por genotipo

Genotipo	Estimador	Meses
CC	Media	48.0
	D.E.	29.3
CT	Media	32.6
	D.E.	14.9
TT	Media	29.3
	D.E.	7.0
Total	Media	36.7
	D.E.	20.6

Las frecuencias genotípicas generales registraron un 21% de sementales con el genotipo TT, 31% genotipo CC y un 48% de individuos heterocigotos TC (Figura 3). El genotipo CT presento el mayor porcentaje (Cuadro 5).

Cuadro 5. Frecuencias genotípicas del gen leptina de sementales activos en el municipio de Villaflores, Chiapas.

Raza	Frecuencia Genotípica		
	CC	CT	TT
Suizo Americano	10	17	8
	0.31	0.48	0.21

* Equilibrio Hardy-Weinberg. (χ^2 , $P < 0.05$)

Las frecuencias del alelo T (Cuadro 3), fueron similares. Para la frecuencia genotípica y alélicas esperada y observada no se encontró diferencia significativa a un nivel de confianza de 0.05 para χ^2 .

Cuadro 6. Frecuencias alélicas del gen leptina de sementales activos en el municipio de Villaflores, Chiapas.

Raza o Cruzas	Frecuencia Alélicas (%)	
	C	T
Suizo Americano	0.53	0.47

Equilibrio Hardy-Weinberg. ($\chi^2 P < 0.05$)

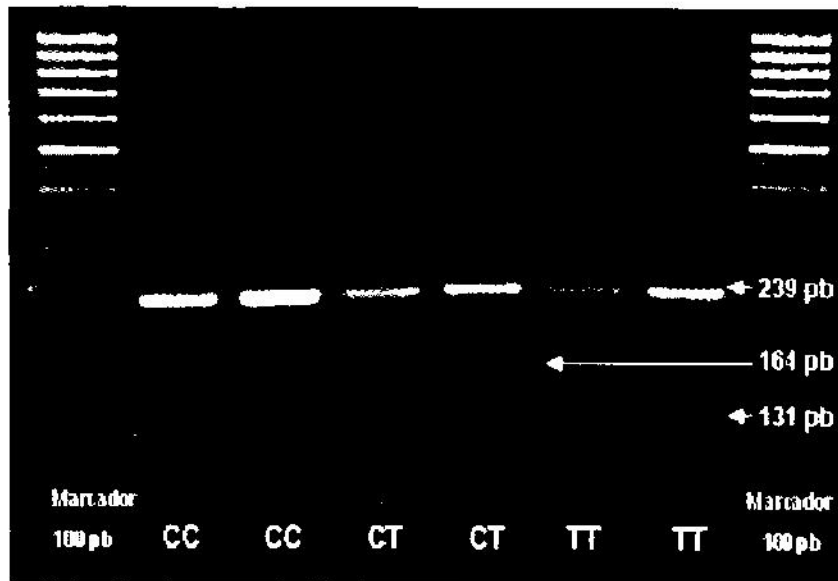


Figura 3. Gel de agarosa al 2 % mostrando el resultado de la ARMS-PCR para gen leptina. CC Leptina común (239 y 164 pb), CT Leptina heterocigoto (239, 164 y 131 pb) y TT Leptina modificada o mutada (239 y 131 pb), Marcador de 100 pb.

V DISCUSIÓN

La raza de origen europeo Suizo Americano es una de las de mayor antigüedad, se explota en México desde fines del siglo XIX y su mayor frecuencia en el área de estudio se debe a que es la raza más utilizada en los sistemas doble propósito del país (Ruiz, 2008). En el sureste mexicano son muy populares sus cruzas con el ganado Cebú en distintas proporciones genotípicas. Los ganaderos la prefieren debido a su resistencia y adaptabilidad al sistema de producción, aunado a su calidad de carne y rendimiento lechero (Ruiz, 2008). Por su parte García (2002) y Cerón (2005) menciona que la raza Suizo Americano es de las más puras del mundo, considerada de doble propósito, con amplia adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas, con buena producción de leche y carne y resistente a las enfermedades. Por su habilidad materna y fertilidad, es de las más eficientes entre todas las razas, así como por su rusticidad y capacidad de empadre de los sementales (Cerutti, 2008)

Los toros del genotipo CC presentaron mayor edad, esto debido a la falta de selección por parte de los productores, ya que generalmente los productores seleccionan a sus reproductores por fenotipo. Esto coincide con lo mencionado por Ruiz, (2008). Por otro lado, se observa que para el genotipo TT los toros son de menor edad, esto como respuesta a los programas de mejoramiento genético que se ha implementado por parte del gobierno.

La baja frecuencia del alelo T encontrada en el presente estudio 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. Considerando que la leptina es una hormona sintetizada principalmente en el adiposito y codificada por el gen LEP, y que está involucrada en el control del apetito, balance energético y composición corporal, y tomando en cuenta que uno de los polimorfismos (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) en este gen en el exón 2 (alelos C y T) provoca la sustitución de arginina por cisteína en la proteína, asociando al alelo T con mayor contenido de grasa corporal, se considera que los sementales que poseen el genotipo TT son los deseables para mejorar los sistemas de producción (Ruiz, 2008). En las razas europeas de producción 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 una frecuencia del alelo T de 0.58 y 0.55 para la raza Angus y Hereford, respectivamente; por su parte Corva *et al.*, (2004) reportan frecuencias para el alelo T de 0.61 y 0.66 en las razas Angus y Hereford, respectivamente y Schenkel *et al.* (2005) encontraron resultados similares con 51.2, 51.7, 54.6 y 65.4 para las razas Angus, Limousin, Charolais y Simmental. Sin embargo, los resultados encontrados para la frecuencia del alelo T en el área de estudio, coincide con lo registrado por Buchanan *et al.*, (2003), quienes reportan frecuencias alélicas T de 0.46, 0.45, 0.11, 0.06 y 0.53 para las razas Holstein, Suizo americano, canadiense, Guemesey y Jersey, respectivamente.

La alta frecuencia del genotipo CT y CC en sementales del área de estudio, produce la diseminación de genes no deseables en los sistemas de producción, ocasionando que sean menos eficientes. El genotipo TT presenta superioridad

con respecto a los genotipos CC y CT, en el apetito, composición de la carne en canal, espesor de grasa de cobertura, marmoleo y porcentaje de grasa en costilla (Hale *et al.*, 1998; Hossner, 1998; Delavaud *et al.*, 2000; Wegner *et al.*, 2001; Blevins *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2002; Margetic *et al.*, 2002; Geary *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2005; Chilliard *et al.*, 2005, Ruiz, 2008), por lo tanto, la baja frecuencia de este genotipo en sementales en el área de estudio afecta al mejoramiento genético de las unidades de producción. Las frecuencias genotípicas TT encontradas en este estudio, son inferiores a los reportados por Corva *et al.*, (2004) con frecuencias para el genotipo TT de 0.37 y 0.41 para la raza Angus y Hereford, respectivamente y son iguales o superiores a lo reportado por Ruiz, (2008) con 0.22 y 0.17 para toros suizos y cruza raciales respectivamente.

VI CONCLUSIONES

La baja frecuencia del alelo T se debe al criterio del productor para la selección de los sementales, ya que se basan en el tipo racial del animal sin considerar la información de los registros genealógicos y productivos relacionados con la producción de leche y calidad de carne. La alta frecuencia del genotipo CT y CC de los sementales, ocasiona que las unidades de producción sean menos eficientes. Es necesario la identificación de los reproductores con genotipo TT, para incrementar la frecuencia alélica y genotípica y lograr con esto mejorar la eficiencia productiva de los sistemas de producción

VII LITERATURA CITADA

- Abd-Elsalam KA. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR "primer" design. *Afr. J. of Biotechnol.* 2 (5):91-95.
- Álvarez JDC, Muñoz MFC, Burgos W, Montoya A, Arboleda E, Moreno MA, Vergara O. (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, Mesa MS, Bandrés F, Arroyo E. (2001). C282Y and H63D mutation frequencies in a population from central Spain. *Disease Markers.* 17:111–114.
- Ashwell MS, Rexroad Jr CE, Miller RH, Van Raden PM, Da Y. (1997). Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. *Animal Genetics* 28:216-222.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology*. 5 Edit. Vol. 2. Wiley-InterScience, New York. 692 pp
- Baldeviano VC, Quispe TN, Bonilla AC, Gastiaburu D, Pro CJ, Llanos LZ. (2003). Perfiles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas en aislamientos de *M. Tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del Callao, Perú. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* 20 (2):321-332.
- Barendse W, Vaiman D, Kemp SJ, Sugimoto Y, Armitage SM, Williams JL, Sun HS, Eggen A, Agaba M, Aleysin SA, Band M, Bishop MD, Buitkamp J, Byrne K, Collins F, Cooper L, Coppettiers W, Denys B, Drinkwater RD, Easterday K, Elduque C, Ennis S, Erhardt G, Ferreti L, Flavin N, Gao Q, Georges M, Gurung R, Harlizius B, Hawkins G, Hetzel DJS, Hirano T, Hulme D, Jorgensen C, Kessler M, Kirkpatrick BW, Konfortov B, Kostia S, Kuhn C, Lenstra JA, Leveziel H, Lewin HA, Leyhe B, Lil L, Martin Burriel I, McGraw RA, Miller JR, Moody DE, Moore SS, Nakane S, Nijman IJ, Olsaker I, Pomp D, Rando A, Ron M, Shalom A, Teale AJ, Thieven U, Urquhart BGD, Vage DI, Van der Weghe A, Varvio S, Velmala R, Vilkki J, Weikard R, Woodside C, Womack JE, Zannotti M, Zaragoza P. (1997). A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm. Genome.* 8:21-28.
- Bathelier C, Champenois T, Lucotte G. (1998). ARMS test for diagnosis of factor V Leiden mutation and allele frequencies in France. *Mol. Cell Probes,* 12, 121–123.
- Bauck S. (2004). Novel test reveals high producing dairy cows. *International Dairy topics.* Vol 3, N. 4: 21-22.

- Beger SL. (1987). Preparation and Characterization of RNA. Overview. *In*: L. S. Berger and R. A. Kimmel, (eds). Guide to Molecular Cloning Techniques. Academic Press. pp: 215-219.
- Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. (2002). Peptide signals regulating food intake and energy homeostasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (5) pp: 396-406.
- Blum JW, Zbinden Y, Hammon HM, Chilliard Y. (2005). Plasma leptin status in young calves: effects of pre-term birth, age, glucocorticoid status, suckling, and feeding with and automatic feeder or by bucket. *Dom Anim Endocrinol* 28: 119-133.
- Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher MY, Leveziel H. (2003). Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet. Sci. Evol.* 35: 77-101
- Bourdon RM. (1998). Shortcomings of current genetic evaluation systems. *J. Anim. Sci.* 76:2308-2323.
- Brewer K. (2004). Milking for profit – survive or thrive. *International Dairy Topics*. Vol 3, N. 3:17-19.
- Brunner RM, Sanftleben H, Goldammer T, Kuhn C, Weikard R, Weikard R, Kata, SR, Womack JE, Schwein M. (2003). The telomeric region of BTA18 containing a potential QTL region for health in cattle exhibits high similarity to the HSA19q region in humans small star, filled. *Genomics*, 81(3):270-8.
- Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel, AG, Thue TD, Windkelman-Sim DC, Schmutz SM. (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 FC, Van Kessel AG, Waldner C, Christense DA, Laarveld B, Schmutz, SM. (2003). Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *J. Dairy Sci.* 86:3164-3166.
- Bünger L, Hill WG. (1997). Effects of leptin administration on long-term selected fat mice. *Genetics Research.* 69. pp 215-225
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. (1995). Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 269: 546-549.
- Cañón J. (2006). Utilización de información molecular en programas de mejoramiento animal. *Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7(1): 5-15

- Cartwright CP. (1994). Techniques and diagnostic applications of in vivo nucleic acid amplification. *J. Clin. Microbiol.* 16:33-40.
- Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM, Koohmaraie M. (2000). Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78: 560-569.
- Casas E, White SN, Riley DG, Smith TPL, Breneman RA, Olson TA, Johnson DD, Coleman SW, Bennett GL, Chase CC. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosome 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 83: 13-19.
- 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 MM, Trujillo BE, Corrales JD. (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 RA, Corvisón MA, Guevara YE. (2005). Comportamiento reproductivo de la raza Brown Swiss. *Producción animal*. Vol 17 (1) Pp 1-8
- Cerutti F. (2008). Un programa de mejoramiento genético para la producción de leche en ambiente tropical: Resultados de los primeros cuatro años. En: Utilización de Razas y Tipos Bovinos Creados y Desarrollados en Latinoamérica y el Caribe. ALPA. Pp: 37-53
- Corva PM, Fernández Macedo G, Motter M, Soria L, Villarreal EL, Schor A, Mezzadra C, Melucci LM, Miquel MC. (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. pp: 243-244
- Corva PM, Melucci LM, Ganovelli MB, Massa G, Norero N, Mezzadra C, Grave M. (2004). Efectos de un polimorfismo en el gen de leptina en toros de razas carniceras en condiciones de pastoreo. XXVII Congreso Argentino de Producción Animal Tandil. *Revista Argentina de Producción Animal*. Vol.24. pp: 253 – 257. GM6. pp:1-6
- Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. (2005). Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Dom Anim Endocrinol* 29: 3-22.

- Craighead L, Pasetkan D, Reynolds HV, Vyse ER, Strobeck C. (1995). Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Artic Grizzly Bears. *The Journal of Heredity*, 86: 255-261.
- Davis GP, DeNise SK. (1998). The impact of genetic markers on selection. *J. Anim. Sci.* 76 (3):2331-2339.
- Davis GP, Dibner DM, Battey FJ. (1986). Basic methods in molecular biology. *J. Anim. Sci.* 70 (6):1405-1420.
- Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A. (2000). Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol.* 165: 519-526.
- Dekkers JCM. (2004). Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 (Suppl): E313-E328.
- Díaz MC, Moreno A, Carabaño MJ. (2000). Primeros pasos del programa de mejora genética de Limusín en España. FEAGAS, Julio-Diciembre, 18:54-59.
- Díaz MC. (1994). Evaluación genética en la raza Avileña Negra-Iberica. *Bovis.* 59:47-58.
- Dietrich W, Katz H, Lincoln SE, Shin HS, Friedman J, Dracapolí NC, Lander ES. (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics.* 131:423-447.
- Ding C, Maier E, Roscher A, Braun A, Cantor CR. (2004). Simultaneous quantitative and allele-specific expression analysis with real competitive PCR. *BMC Genetics.* (<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/5/8>).
- Drinkwater RD, Hetzel JSD. (1991). Application of molecular biology to understanding symposium on nuclear techniques in animal production and health. IAEA, FAO. Viena, 15-19 April. 437-452.
- Edel V. (1998). Polymerase Chain Reaction in Mycology in Overview. CAB International. Applications of PCR in Micology. 357 pp.
- Falconer DS. (1981). Introduction to quantitative genetics. 2a. Ed. Longman Ltd. Londres.
- Falconer, D. S. y T. C. F. McKay. (1996). Introduction to genetics. 4ª ed. Edit. Harlow Longman.

- Farrell RE. (1998). RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Academic Press. 531 p.
- Faverdin P, Baumont R, Ingvarsten KL. (1995). Control and prediction of feed intake in ruminants. In: Recent developments in the nutrition of herbivores (ed. M. Journet, E. Grenet, M. H. Farce, M. Theriez y C. Demarquilly), INRA, Paris, France. pp. 95-120.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. *EMBRAPA*. p: 220.
- Fraga NJ, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández CA. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Rev. Cubana Med. Trop.* 56(3):208-13.
- Friedman JM, Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. (395). Pp: 763–770.
- Fujita R. (2007). Genómica y su aplicación en producción animal. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Vol. 15 (Supl. 1) pp: 67-68.
- Garcia MR, Amstalden M, Williams SW, Stanko RL, Morrison CD, Keisler DH, Nizielski SE, Williams GL. (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.
- García Muñoz Jose G (2002). Segundo Taller "Importancia, interpretación y usos de las Evaluaciones Genéticas en Ganado Suizo". Chiapas, México. 1-11
- Geary TW, McFadin EL, MacNeil MD, Grings EE, Short RE, Funston RN, and Keisler DH. (2003). Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 1-8.
- Gedelman H, Pieper U, Weber WE. (1986). Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. *J. Anim. Sci.*, 63: 1759-1768.
- Georges M, Massey JM. (1991). Velogenetics or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenol.* 25:151-159.
- Giovambattista G, Ripoli MV, Lirón JP, Kienast ME, Villegas CEE, Dulout FN, Peral GP. (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.

- Goddard ME, Barwick SA, Kinghorn BP. (1998). Breeding objectives for meat animals: development of a profit function. *Animal Production in Australia* 22: 90-94.
- Goddard ME. (1992). A mixed model for analyses of data on multiple genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 878-886.
- Grisat B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R. (2002). Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res*, 12(2):222-231.
- Groen AF, Steine T, Colleau JJ, Pedersen J, Prybyl J, Reinsch N. (1997). Economic values in dairy cattle breeding, with special reference to functional traits. Report of an EAAP-working group. *Livestock Production Science* 49:1-21.
- Guillaume F, Fritz S, Boichard D, Druet T. (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
- Hale CS, Herring WO, Johnson GS, Shibuya H, Lubahn DB, Keisler DH. (1998). Evaluation of the leptin gene as a possible marker of carcass traits in Angus cattle. UMC Animal Sciences Departmental Report, 25-27.
- Haley CS. (1995). Livestock QTLs ? bringing home the bacon?. *Trends Genet.* 11(12):488-492.
- Henry BA, Goding JW, Alexander WS, Tilbrook AJ, Canny BJ, Dunshea F, Rao A, Mansell A, Clarke IJ. (1999). Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology.* 140. pp:1175-1182.
- Herrera HJG, Lemus FC, Barreras SA. (2003). Mejoramiento Genético Animal. Un enfoque aplicado. 1ª edición. Ganadería IREGEP. Texcoco, Edo de México. Pp:151.
- Hetzel DJS, Davis GP, Corbet NJ, Shorthose WR, Stark J, Kuypers R, Scacheri S, Mayne C, Stevenson R, Moore SS, Byrne K. (1997). Detection of gene markers linked to carcass and meat quality traits in a tropical beef herd. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 12: 442-446.
- Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. (1998). The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76:1405-1420.

- Hossner KL. (1998). Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production. *Can. J. Anim. Sci.* 78:463-472.
- Hudson T. (1997). Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. Washington: John Wiley & Sons, Inc; 185 pp
- Ingvartsen KL, Andersen JB. (2000). Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83:1573-1597.
- Janss LLG, Thompson R, Van Arendonk JAM. (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, Collada C. (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.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard ST, Smith TPL, Lopez-Corrales N, Beattie CW. (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research.* (7): 235-249.
- Kennedy GC. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in rats. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, 140-578.
- Kinghorn BP, Van Arendonk JAM, Hetzel J. (1994). Detection and use of major genes in animal breeding. *AgBiotech News and Information.* 6(12): 297-302
- Kinghorn BP. (1998). Managing genetic change under operational and cost constraints. 36th National Congress of the South African Association of Animal Science. University of Stellenbosch. pp 9-16.
- Kline AD, Becker GW, Churgay LM, Landen BE, Marin DK, Muth WL, Rathnachalam T, Richardson JM, Schoner B, Ulmer M, Hale JE. (1997). Leptin is a four-helix bundle: Secondary structure by NMR. *FEBS Lett.* (407) pp:239-242.
- Knott SA, Haley CS. (1992). Aspects of maximum likelihood methods for the mapping quantitative trait loci in line crosses. *Genet. Res.* 60: 139-151.
- Le Magnen J. (1983). Body energy balance and food intake: a neuroendocrine regulatory mechanism. *Physiol Rev.* 63 (1) : 314-386.
- Levin N, Nelson C, Gurney A, Vadlen R, de Sauvage FJ. (1996). Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (93) pp:1726-1730.

- Little S. (1997). ARMS analysis of point mutations. In Taylor, G.R. (ed.) *Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 45–51.
- Liu Q, Thorland EC, Heit JA, Sommer SS. (1997). Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res.*, 7, 389–398.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 27: 897-901.
- Ma RZ, Beaver JE, Da Y, Green CA, Russ I, Park C, Heyen WD, Evarts RE, Fisher SR, Overton KM, Teale JA, Kemp SJ, Hines HC, Guerin G, Lewin HA. (1996). A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J. Hered.* 87:261 -271.
- Madeja Z, Adamowicz T, Chmurzynska A, Jankowski T, Melonek J, Switonski M, Strabel T. (2004). Short Communication: Effect of Leptin Gene Polymorphisms on Breeding Value for Milk Production Traits. *J. Dairy Sci.* 87:3925–3927
- Maniatis T, Fritsch FE, Sambrook J. (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.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Inter. J. Obes.* 26: 1407-1433.
- Martínez GJC, Parra BGM. (2008). Mejoramiento genético del ganado Brahman en México. *Tu Revista Digital*. UAT. Vol. 2 Núm. 4. pp:1-16.
- Martínez SR, Barrera CGP. (2005). Aplicación de selección asistida por marcadores para características de calidad de la canal en bovinos de carne. *Innovación G. Cambio tecnológico*. Centro de Investigación Turipaná, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, *CORPOIC. Colombia*. 25-28.
- McGookin R. (1987). RNA Extraction by the Proteinase K Method. *In: Walker, J.M. Methods in Molecular Biology* vol. 2, Nucleic Acids. The Humana Press Inc. USA. pp: 109-112.
- Mertens DR. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1463-1481.

- Meuwissen THE, Goddard ME. (1996). The use of marker-haplotypes in animal breeding schemes. *Genet. Sel. Evol.* 28:161-176.
- Meuwissen THE, Van Arendonk JAM. (1992). Potential improvements in rate of genetic gain from marker assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *J. Dairy Sci.* 75: 1651-1659.
- Miller SA, Dykes DD, Poletsky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16: 1215.
- 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
- Mondragón BM, Vázquez ACC, Barrón CR, Acosta PB, Jost CK, Balandrazo S, Olivera HD. (2000). Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública Méx.* 42(6):58-68
- Montaldo VHH, Barria PN. (1998). Mejoramiento genético de animales. *Ciencia al Día.* 2(i):1-19.
- Montaño B. M. (1997). Importancia de las asociaciones de criadores en la efectividad de los sistemas de cruzamiento en ganado bovino. En *Memorias: primer Foro de Análisis de los Recursos Genéticos de la Ganadería Bovina*. Cd. de México D.F. Pp. 12-17.
- Motter M, Corva PM, Soria L, Villarreal EL, Schor A, Cervini ML, Mezzadra C, Melucci LM, Paván E, Depetris G, Santini FJ, Grigera Naón JJ. (2006). Efecto de un SNP del gen de la leptina sobre aptitudes carniceras de novillos. 29 Congreso Argentino de Producción Animal. Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal*. GM5.
- Morris CA, Cullen NG, Hickey SM, Crawford AM, Hyndman DL, Bottema CDK, Pitchford WS. (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.
- Münzberg H, Björnholm M, Bates SH, Myers MG. (2005). Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 62, p.642-652
- Nelson DL, Cox MM. (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica*", 3ª ed. Omega.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, 17, 2503–2516.

- Nkrumah JD, Li C, Yu J, Hansen C, Keislet DH, Moore SS. (2004). Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *J. Anim. Sci.* 83:20-28.
- Olive MD, Bean P. (1999). Minireview. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *American Soc. Microbiol.* 37(6):1661-1669.
- Oprzadek J, Flisikowski K, Zwierzchowski L, Dymnicki E. (2003). Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. *Animal Science Papers and Reports.* v.21, p.135-145
- Pomp D, Allan MF, Wesolowski SR. (2004). Quantitative genomics: Exploring the genetic architecture of complex trait predisposition. *J. Anim. Sci.* 82:300-312
- Pomp D. (1997). Genetic dissection of obesity in polygenic animal models. *Behav. Genet.* 27:285-306
- Ramírez GJA, Rios RJG. (1997). Tecnologías de vanguardia aplicadas a la ganadería bovina. En: Memorias: "primer" Foro de Análisis de los Recursos Genéticos de la Ganadería Bovina. Cd. de México D.F. Pp. 21-30.
- Ramsay TG, Yan X, Morrison C. (1998). The Obesity Gene in Swine: Sequence and Expression of Porcine Leptin. *J. Anim. Sci.* (76) pp:484-90.
- Rincker CB, Pyatt NA, Berger LL, Faulkner DB. (2006). Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J. Anim. Sci.* 84:686-693
- Rodríguez-Zas SL, Southey BR, Heyen DW, Lewin HA. (2002). Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data. *J Dairy Sci.*, 85(10):2681-91.
- Rojas MRI. (2004). Introducción a la Biología Molecular. Manual de Curso FIT-624. Introducción a la Biología Molecular. Colegio de Postgraduados. México. 80 pp.
- Rothschild MF, Soller M. (1997). Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe.* 8:13.
- Ruane J, Klemesdal G, Sehested E. (1997). Views on the potential impact of cloning on animal breeding and production. *Acta Agric. S-cand.* 47: 209-212.

- Ruiz SB. 2008. Evaluación genética-reproductiva y frecuencia del gen leptina de sementales en el sistema doble propósito. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. México. 110 pp.
- Ruiz SB, Herrera JG, Ruiz H, Lemus C, Hernández A, Gómez H, Barcena JR, Rojas RI. (2007). Capacidad reproductiva de sementales activos en un sistema de monta abierta de los GGAVATT en el municipio de Villaflores, Chiapas. II Congreso Internacional de Producción Animal. I Simposio Internacional de Producción de Rumiantes. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. PR 50: Pp 1-6.
- Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T. (1994). Molecular Cloning. A laboratory manual. Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. E. U. A.
- San Primitivo TF. (2001). La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo XX. *Arch. Zootec.* 50:517-546.
- Schenkel FS, Miller SP, Ye X, Moore SS, Nkrumah JD, Li C, Yu J, Mandell IB, Wilton JW, Williams JL. (2005). Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci.* 83:2009-2020.
- Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, Mori M, Yamada J, Dubay CJ, Lindpainter K, Ganten D, Guenet JL, Lathrop GM, Beckman JS. (1992). Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, 131: 701-721.
- Slater RJ. (1984). The extraction of total RNA by detergent and phenol method. In: Walker, J.M. *Methods in Molecular Biology vol. 2, Nucleic Acids.* The Humana Press Inc. U.S.A. Pp: 101-112.
- Soria LA, Corva PM. (2004). Factores genéticos y ambientales que determinan la ternera de la carne bovina. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 12(2): 73-88.
- Spicer LJ. (2001). Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic Animal Endocrinology.* Vol. 21 (4). Pp: 251-270
- Spicer LJ, Francisco CC. (1998). Adipose Obese Gene Product, Leptin, Inhibits Bovine Ovarian Thecal Cell Steroidogenesis, *Biology of Reproduction* (58): 207-212
- Stone RT, Kappes SM, Beattie C. (1997). Two polymorphic microsatellites within an 18 kb genomic clone containing the bovine ob gene. *Animal Genetics.* 27 (2):64.
- Thallman RM. (2004). DNA testing and marker assisted selection. *Proc. Beef Improv. Fed. 36th Ann. Res. Symp. Ann. Meet. USA.* Pp. 20-25.

- Uffo O, Sanz A, Sosa A, Martínez S. (2002). Identificación del polimorfismo del gen que codifica para la hormona del crecimiento bovina mediante PCR y detección por RFLP. *Rev. Salud Anim.* (2002): 24 (1) 27-31.
- Valadez ME, Günter K. (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.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-373.
- Wegner J, Huff P, Xie CP, Schneider F, Teuscher F, Mire PS, Mir Z, Kazala, EC, Weselake RJ, Ender K. (2001). Relationship of plasma leptin concentration to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 81:451-457.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1998). PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. CAB International. 357 pp.
- Wilkins RJ, Davey H. (1997). A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. *Animal Genetics* 38: 370-383.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*. 280:1378-1383.
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins, AR, Day IN. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29:88. pp 1-8.
- Ye S, Humphries S, Green F. (1992). Allele specific amplification by tetra-"primer" PCR. *Nucleic Acids Res.* 20:1152.