

## Polimorfismos del gen de leptina en sementales bovinos pardo suizo

### *Leptin gene polymorphisms on sires cattle brown swiss*

**Benigno Ruiz Sesma<sup>1</sup>, Alfonso de Jesús Ruiz Moreno, Paula Mendoza Nazar, Horacio Ruiz Hernández, María Ángela Oliva Llaven, René Pinto Ruiz<sup>2</sup>, Francisco Guevara Hernández<sup>2</sup> y Federico Antonio Gutiérrez Miceli<sup>3</sup>**

#### RESUMEN

La determinación del polimorfismo del gen leptina incorporado a los programas de selección asistida por marcadores puede hacer más eficientes los sistemas de producción animal. La mutación del gen leptina TT está asociada a la eficiencia alimenticia y calidad de la carne en bovinos. El objetivo de este estudio fue el de determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen leptina en el exón 2. El estudio se realizó en el municipio de Villaflores, Chiapas. Se estudiaron 35 sementales Suizo Americano en servicio activo en los sistemas de producción bovina de doble propósito. El polimorfismo fue obtenido mediante un análisis molecular con la técnica ARMS-PCR. Los resultados mostraron que 21% de los sementales presentaron el genotipo TT, 31% CC y 48% TC para el gen leptina. Se concluye que la baja frecuencia genotípica TT probablemente se deba 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 a la mutación del gen leptina.

**Palabras clave:** sementales, genotipo, alelo, leptina.

#### ABSTRACT

The determination of Leptin gene polymorphisms incorporated in marker assisted selection programs can make animal production systems more efficient. Mutation of the leptin TT gene is associated to feeding efficiency and meat quality in cattle. The objective of this study was to determine genotypic and allelic frequencies of the leptin gene in exon 2. The study was carried out in the municipality of Villaflores, Chiapas. Thirty-five Brown Swiss sires in active service within the dual purpose bovine production systems were included in this study. Polymorphism was observed by ARMS-PCR. The frequencies of sire genotypes for leptin gen were 21% for TT, 31% for CC, and 48% for TC. It was concluded that a low frequency of TT genotype could be associated to a selection criterion of breeding animals by producers based on racial type, instead of milk production or meat quality traits.

**Key words:** sire, genotype, allele, leptin.

#### INTRODUCCIÓN

La leptina es una hormona sintetizada principalmente en el adiposito y codificada por el gen LEP, que está involucrada en el control del apetito, balance energético y composición corporal. Se han descrito varios polimorfismos (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) del gen de la leptina. Un SNP en el exón 2, ocasiona efectos fisiológicos diferentes (ganancia de peso, grasa en la canal, etc.) 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 (Buchanan et al., 2002; Motter et al., 2006; Corva et al., 2007). Cuando en el gen que codifica la producción de la proteína está presente la base pirimídica 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; Corva et al., 2004; Madeja et al., 2004; Rincker et al., 2006). 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 (Buchanan et al., 2002; Motter et al., 2006; Corva et al., 2007). La identificación del gen leptina es una herramienta para mejorar la eficiencia de 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

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Tuxtla Gutiérrez-Ejido Emiliano Zapata km 8.5, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. CP 29000. Tel. (961) 6716075. Correo-e: brsesma@prodigy.net.mx

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Ocozacoautla-Villaflores. Tel. y Fax 01 (965) 65-2-14-77. Correo-e: pinto\_ruiz@yahoo.com.mx

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana Km. 1080, Tuxtla Gutiérrez. Tel: (961) 5 03 80 y 5 04 61. Correo-e: biotecveg@hotmail.com

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 frecuencias genotípicas y alélicas del SNP del gen Leptina, de toros de raza Suizo Americano en los sistemas de producción bovina del municipio de Villaflores, Chiapas, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el municipio de Villaflores, Chiapas, ubicado entre los paralelos 15° 35' y 16° 33' de latitud norte y entre los meridianos 92° 12' y 93° 45' de longitud oeste, se inició en agosto de 2009 y finalizó en agosto de 2010. Se evaluaron 35 sementales de la raza Suizo Americano y para la identificación del polimorfismo del gen leptina, se analizaron las frecuencias genotípicas de CC, CT y TT y alélicas de C y T del SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) en el exón 2 (Buchanan et al., 2002; Corva et al., 2004; Ruiz, 2008). A cada semental se le extrajeron 7 ml de sangre de la arteria coccígea 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; los tubos se giraron 180° mediante un movimiento suave para mezclar sin deteriorar los glóbulos rojos; posteriormente los tubos fueron almacenados a 4 °C hasta su procesamiento. 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 1 000 µl de agua destilada fría, se mezcló en vortex (Modelo MS1 Minishaker, Marca IKA®) durante 5 minutos, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, y se procedió a la extracción del ADN. 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. Lambda Bio10 Perkin-Elmer ®.) Se calculó el contenido de ADN asumiendo que una unidad de absorbencia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN doble cadena. 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 del 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 preparada con MgCl<sub>2</sub> (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 centígrado 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, 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; 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 µg/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. En la caracterización genotípica y alélica del gen leptina, se determinaron las frecuencias genotípicas de CC, CT y TT y alélicas de 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.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La edad promedio de los toros evaluados fue 36.7 meses. Las frecuencias genotípicas registraron un 0.21 de sementales con el genotipo TT, 0.31 con CC y 0.48 con TC. Las frecuencias de los alelos C y T fueron similares (C: 0.55 y T: 0.45). No se observaron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas y alélicas esperadas y observadas, a un nivel de confianza de 0.05 para X<sup>2</sup>.

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 (Ruiz et al., 2009). Las frecuencias genotípicas TT encontradas en este estudio son inferiores a las reportadas por Corva et al. (2004), con frecuencias para el genotipo TT de 0.37 y 0.41 para las razas Angus y Hereford, respectivamente, y son similares a lo reportado por Ruiz (2008) con 0.22 y 0.17 para toros suizos y cruza raciales, respectivamente. La baja frecuencia de este genotipo en sementales en el área de estudio podría estar afectando el mejoramiento genético de las unidades de producción, ya que 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 (Geary et al., 2003; Blum et al., 2005; Chilliard et al., 2005).

La baja frecuencia del alelo T encontrada, podría ser el resultado del criterio de los ganaderos al adquirir sus reproductores con base en el fenotipo del animal, sin considerar información de los registros genealógicos y productivos. En este contexto, existen reportes de que en las razas europeas de bovinos para carne se ha realizado mayor selección para eficiencia alimenticia y ga-

nancia de peso, por lo que la frecuencia del alelo T es mayor que la encontrada. Al respecto, Buchanan et al. (2002) encontraron una frecuencia del alelo T de 0.58 y 0.55 para las razas Angus y Hereford, respectivamente; por su parte, Corva et al. (2004) reportaron frecuencias para el alelo T de 0.61 y 0.66 en las razas Angus y Hereford, respectivamente; y a su vez, Schenkel et al. (2005) obtuvieron frecuencias similares con 0.51, 0.52, 0.55 y 0.65 para las razas Angus, Limousin, Charolais y Simmental. Sin embargo, la frecuencia del alelo T encontrada, coincide con la estimada por Buchanan et al. (2003) para las razas Holstein, Suizo Americano, Canadiense, Guernesey y Jersey (0.46, 0.45, 0.11, 0.06 y 0.53, respectivamente).

## CONCLUSIONES

La alta frecuencia del genotipo CT y CC de los sementales, podría ocasionar que las unidades de producción sean menos eficientes.

La baja frecuencia del alelo T podría deberse 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 identificación de genotipos para los alelos T y C, permitiría diseñar apareamientos para incrementar la frecuencia del alelo T y coadyuvar al mejoramiento de la eficiencia productiva en hatos de bovinos Suizo Americano.

## AGRADECIMIENTOS

Esta publicación es producto del proyecto de investigación "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 Dirección General de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Chiapas y financiado en el marco del proyecto: Consolidación del modelo educativo de la UNACH; subproyecto: Reincorporación de ex becarios, y forma parte de la línea de generación del conocimiento del cuerpo académico de producción animal tropical sostenible y de la red de cuerpos académicos Producción Animal Tropical Sostenible, Agroforestería Pecuaria y Biotecnología y Mejoramiento Genético Animal, de la Universidad Autónoma de Chiapas.

## REFERENCIAS

- Blevins, J.E., Schwartz, M.W., & Baskin, D.G. (2002). Peptide signals regulating food intake and energy homeostasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 80 (5); 396-406.
- Blum, J.W., Zbinden, Y., Hammon, H.M., & 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.
- Buchanan, F.C., Fitzsimmons, C.J., Van Kessel, A.G., Thue, T.D., Windkelman-Sim, D.C., & Schmutz, S.M. (2002). Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sci. Evol.* 34, 105-116.
- Buchanan, F.C., Van Kessel, A.G., Waldner, C., Christense, D.A., Laarveld, B., & Schmutz, S.M. (2003). Hot topic; an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *J. Dairy Sci.* 86:3164-3166.
- 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.
- Corva, P.M., Fernández, M.G., Motter, M., Soria, L., Villarreal, E.L., Schor, A., Mezzadra, C., Melucci, L.M., y Miquel, M.C. (2007b). 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, 243-244.
- Corva, P.M., Melucci, L.M., Ganovelli, M.B., Massa, G., Norero, N., Mezzadra, C., y Grave, M. (2004a). 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.* 24, 253-257.
- Delavaud, C., Bocquier, F., Chilliard, Y., Keisler, D.H., & 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.
- Geary, T.W., McFadin, E.L., MacNeil, M.D., Grings, E.E., Short, R.E., Funston, R.N., & Keisler, D.H. (2003). Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 81, 1-8.
- Hale, C.S., Herring, W.O., Johnson, G.S., Shibuya, H., Lubahn, D.B., & Keisler, D.H. (1998). Evaluation of the leptin gene as a possible marker of carcass traits in Angus cattle. *UMC Animal Sciences Departmental Report*, 25-27.
- Hossner, K.L. (1998). Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production. *Can. J. Anim. Sci.* 78,463-472.
- Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L., & Spurlock, M.E. (1998). The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1405-1420.
- 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.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., & Hill, R.A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Inter. J. Obes.* 26, 1407-1433.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., & Poletsky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16, 1215.
- Motter, M., Corva, P.M., Soria, L., Villarreal, E.L., Schor, A., Cervini, M.L., Mezzadra, C., Melucci, L.M., Paván, E., Depetris, G., Santini, F.J. y Grigera Naón, J.J. (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.
- Rincker, C.B., Pyatt, N.A., Berger, L.L., & Faulkner, D.B. (2006). Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J. Anim. Sci.* 84:686-693.
- Ruiz, S.B. (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, S.B., Herrera, H.J.G., Rojas M.R.I., Ruiz H.H., Mendoza N.P., Oliva LL.A., Gutiérrez M.F.A., Aguilar T.G., Bautista T.G.U. e Ibarra M.C.E. (2009). Estimación de polimorfismos del gen de leptina de sementales en el sistema doble propósito bovino, en Villaflores, Chiapas, México. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, vol. 10, no. 12. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121209/120901.pdf>
- Schenkel, F.S., Miller, S.P., Ye, X., Moore, S.S., Nkrumah, J.D., Li, C., Yu, J., Mandell, I.B., Wilton, J.W., & Williams, J.L. (2005). Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 2009-2020.
- Wegner, J., Huff, P., Xie, C.P., Schneider, F., Teuscher, F., Mire, P.S., Mir, Z., Kazala, E.C., Weselake, R.J., & 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.