

**DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN LEPTINA  
(MICROSATÉLITE ST) EN LA RAZA BOVINA HARTÓN DEL VALLE**

**LUIS ALFONSO CARTAGENA MANJARRES**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2007**

**DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN LEPTINA  
(MICROSATÉLITE ST) EN LA RAZA BOVINA HARTÓN DEL VALLE**

**LUIS ALFONSO CARTAGENA MANJARRES**

**Trabajo de Grado como requisito parcial para optar el título de Biólogo**

**Director**

**Magíster. SILVIO MARINO CARVAJAL  
Profesor Titular FACNED  
Grupo Toxicología Genética y Citogenética  
Universidad del Cauca**

**Asesora**

**Magíster. ESPERANZA TRUJILLO B.  
Grupo Genética y Mejoramiento Animal  
Universidad de Antioquia**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2007**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

**Director**  
**Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL V.**

---

**Jurado**  
**PhD. NOHELIA CAJAS**

---

**Jurado**  
**Mg. EDNA LOURDES OROZCO**

**Fecha de Sustentación: Popayán, 13 de Marzo de 2007**

Este trabajo de grado esta dedicado a ***DIOS*** quien con su infinito AMOR y MISERICORDIA a guiado mi camino en el transcurso de mi vida; a mis PADRES, que con su apoyo incondicional me han dado ánimos para seguir y no desfallecer; a mis HERMANOS por haberme acompañado desde el día de su nacimiento.

## **AGRADECIMIENTO**

Doy gracias a DIOS por ser mi guía espiritual.

A mis PADRES y HERMANOS, que con su apoyo incondicional y compañía me han dado ánimos para seguir y no desfallecer;

A mi novia Lina Marcela por haber aparecido en mi vida cuando más lo necesitaba.

A mis grandes amigos Cesar, Ivan y Javier, por estar en las buenas y en las malas con migo.

Al Magíster Silvio Marino Carvajal por ser mi DIRECTOR DE TESIS, por su ejemplo y dedicación.

A la Doctora Nohelia Cajas, por ser la EVALUADORA y JURADO del trabajo, ella con su experiencia profesional y buen ejemplo me hizo mejorar a nivel académico y personal.

A la Magíster Edna Lourdes Orozco, EVALUADORA y JURADO del trabajo, quién con sus importantes observaciones permitió mejorar considerablemente el trabajo.

A todos mis COMPAÑEROS y AMIGOS de universidad, por compartir con migo buenos y malos ratos.

Al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por regalarme el espacio en la formación profesional.

A todos mis maestros, por su paciencia y sabiduría a la hora de transmitir sus conocimientos.

A la Magíster Esperanza Trujillo, por su asesoramiento para el desarrollo de esta investigación y por enseñarme la metodología en el laboratorio de biología molecular de la Universidad de Antioquia. Gracias por brindarme su tiempo y compartir su sabiduría.

A mis compañeros de pasantía Maria Teresa Guerra, Juan David Corrales, Julián Jurado, Angela Rodas por regalarme ese tiempo y espacio en la Universidad de Antioquia

Al laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal de la Universidad de Antioquia por permitirme el uso de sus equipos.

A la Universidad del Cauca por abrirme las puertas en el comienzo de este camino.

Y a todos los que me acompañaron a lo largo del camino y contribuyeron para que este sueño fuera realidad.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. ANTECEDENTES	16
4. OBJETIVOS	18
4.1 OBJETIVOS GENERALES	18
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5 MARCO TEÓRICO	19
5.1 RAZA HARTÓN DEL VALLE	23
5.2 MICROSATÉLITES	24
5.3 BENEFICIOS DEL GEN EN GANADERÍA	25
6 MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 MUESTRA POBLACIONAL	26
6.2 EXTRACCIÓN DE ADN	26
6.3 GENOTIPIFICACIÓN	26
6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
8 CONCLUSIONES	33
9 SUGERENCIAS	34
10 BIBLIOGRAFÍA	35



## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Investigaciones realizadas en el gen de la Leptina con sus respectivos aportes.	17
Tabla 2. Reactivos y Concentraciones usadas en PCR	26
Tabla 3. Frecuencias alélicas para el marcador ST en la raza bovina Hartón del Valle.	29
Tabla 4. Genotipos y Sexo de los animales para el marcador ST en la raza bovina Hartón del Valle (n=159). (Prueba de asociación Chi-cuadrado = 4.1630; p>0.05)	29
Tabla 5. Razas bovinas estudiadas y alelos encontrados para el marcador ST.	31



## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Músculo <i>longissimus dorsi</i> con Marmoreo	20
Figura 2. Estructura tridimensional de la molécula de la Leptina	22
Figura 3. Organización molecular del gen de la Leptina (tomado de Liefers, 2004)	22
Figura 4. Perfil Térmico usado en la PCR.	27
Figura 5. Gel de agarosa donde se confirma la amplificación del microsatélite ST en la raza Hartón del Valle.	27
Figura 6. a) Esquema del gel de poliacrilamida donde se muestran los genotipos presentes en la raza Hartón del Valle. b) Gel de poliacrilamida.	30

## RESUMEN

La Leptina es una proteína de 16 kD secretada por el tejido adiposo, esta involucrada en la regulación del apetito, balance energético, fertilidad, función inmune y es responsable de las proporciones de grasa intramuscular (marmoreo) en bovinos; es transcrita por el gen de la obesidad (gen Leptina) en donde se han identificado algunas regiones altamente polimórficas, una de ellas, ubicada en el extremo 3` del gen, es el microsatélite ST (No. de acceso en GenBank: G18586); previas investigaciones, han demostrado que algunos alelos de este microsatélite están asociadas con los niveles de marmoreo en el músculo *longissimus dorsi* determinando en parte el grado de calidad de la carne bovina.

En este trabajo se determino el polimorfismo para la región que flanquea el extremo 3` del gen Leptina utilizando el microsatélite ST (G18586) en 159 animales de la raza bovina criolla colombiana Hartón del Valle (88 Hembras y 71 machos). Se encontraron tres alelos diferentes para dicho marcador (135, 144 y 147) siendo el alelo 144 el de mayor frecuencia (0.472); se detectaron 5 genotipos dos homocigotos y tres heterocigotos; la población analizada se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg, el sexo de los animales no se asoció significativamente ( $p > 0.05$ ) con los genotipos encontrados.

Este polimorfismo en el gen, puede traer muchas ventajas en la selección asistida por marcadores moleculares a la hora de seleccionar animales con buenas proporciones de marmoreo en la carne.

Palabras claves: Marmoreo, gen Leptina, microsatélite ST, polimorfismo, Hartón del Valle.

## INTRODUCCIÓN

El ganado bovino se cría en el mundo tanto por razones religiosas como económicas; esta última cobra importancia por la creciente población mundial que requiere de los productos derivados de su cría, tales como los lácticos y cárnicos para los cuales existen más de 1000 razas puras e híbridas (Fries R. and Ruvinsky, 1999), clasificadas como: ganado lechero, ganado cárnico y ganado de doble propósito; estas razas están distribuidas a lo largo y ancho de los continentes y separadas biológicamente de acuerdo a su adaptabilidad y sus sistemas de explotación.

Existen varias maneras de seleccionar características en bovinos tales como producción de leche y calidad de carne. La más usada y a la vez la más antigua, es la selección de los sementales basándose principalmente en los datos de producción suministrados por sus hijos y parentales. Este método de selección tiene la desventaja de requerir largos periodos de tiempo para la colecta de los datos y baja heredabilidad relativa de sus características (Liefers, 2004). El otro método de selección, más moderno y eficaz que el anterior en cuanto a modo de empleo y tiempo, utiliza la biología molecular como herramienta. Su utilidad radica en la definición de estrategias de mejoramiento genético, identificación de híbridos, el establecimiento de relaciones filogenéticas, entre otros (Dunner y Cañón, 2002). El principio de este método de selección se basa en los polimorfismos de genes específicos o segmentos de cromosomas. Muchos autores (Liefers, 2004) han demostrado que la selección dada por información genética puede ser integrada con la información fenotípica.

En el desarrollo de los mamíferos, las hormonas juegan un papel importante para cumplir procesos tales como fertilidad, desarrollo muscular, apetito, entre otros; una de estas hormonas es la Leptina, proteína de 16 kD secretada en el tejido adiposo que está involucrada en la regulación del apetito, balance energético, fertilidad, función inmune (Fruhberk *et al.*, 1998) y es responsable de las proporciones de grasa intramuscular (marmoreo) en bovinos que determina en parte el grado de calidad de su carne.

En Colombia existen grupos dedicados a la investigación y desarrollo del sector pecuario, que llevan a cabo trabajos en pro de la conservación y mejoramiento de algunas especies y razas de importancia económica como lo es el ganado bovino.

El objeto de estudio de esta investigación es la raza bovina criolla Hartón del Valle usada por los ganaderos como raza de doble propósito, por lo tanto, el objetivo de este trabajo, es identificar el polimorfismo presente en la región flanqueante al extremo 3' del gen de la Leptina bovina en la raza bovina criolla Hartón del Valle usando el microsatélite ST como marcador molecular. Este proyecto se desarrolló en el laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal de la Universidad de Antioquia (Colombia).

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la comercialización y consumo de carne bovina en Colombia presenta una disminución notoria en cuanto a la productividad y competitividad, debido en gran parte a la calidad y costos de la carne. Se ha estimado que en el último año los colombianos dejaron de consumir alrededor de 8 Kg de carne por habitante al año (consumo per cápita) dato que resulta preocupante al saber que el país es netamente agropecuario. Una de las posibles causas, aparte de las económicas, es que la mayor cantidad de carne que se produce presenta bajo marmoreo y alto contenido de grasa de cobertura por lo que tiende a ser seca y desabrida, lo que conlleva a una reducida comercialización.

Los atributos que el consumidor frecuentemente busca al comprar carne son la ternura y jugosidad, características que están determinadas por el marmoreo; el bajo porcentaje de marmoreo y alto contenido de grasa de cobertura de la carne se debe principalmente a que las razas comerciales del país, genéticamente presentan una baja frecuencia de genes que tienen que ver con la mejor expresión de ésta característica, en parte por una limitada utilización del mejoramiento genético.

Debido a la reciente aparición de este tipo de estudios con ADN en especies de interés comercial, el país cuenta con poca investigación al respecto, siendo una limitante para la selección de animales con potenciales productivos en cuanto a la calidad de la carne se refiere.

Los métodos de selección bovina vigentes en Colombia para tomar decisiones sobre calidad de carne, mezclan muchos rasgos de producción y se basa en la toma de datos que están expresados en el fenotipo, esto disminuye la posibilidad de predicción acerca de lo que pueda ocurrir con el conjunto de genes en las diferentes poblaciones y en los descendientes. Existe la necesidad de seleccionar las características de interés, principalmente de orden cuantitativo a través de marcadores o regiones genómicas específicas y la implementación y desarrollo de métodos moleculares para optimizar esa selección. Esto va a la par con las necesidades del mercado, y el deseo de los criadores de tomar decisiones con base en un conjunto de características mas estrechamente relacionadas con el valor económico.

Según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), para el año 2001, Colombia ocupó el puesto 13 en cuanto a producción de carne de bovinos en el mundo, con una participación del 1,31% sobre el total mundial y ascendiendo a un total de 745.780 toneladas año. Es el primer productor entre los países de la CAN (Comunidad Andina<sup>1</sup>), participando con el 47% de la sub-región y en el contexto americano es el sexto productor contribuyendo con el 2,76%. Sin embargo, sus exportaciones no corresponden a ésta alta producción manteniendo unos niveles bajos de comercio con 1.555 toneladas

---

<sup>1</sup> Países pertenecientes a la Comunidad Andina (CAN): Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Bolivia.

exportadas para el año 2000, en parte porque la carne que produce no presenta la calidad estándar para los mercados internacionales (Martínez, 2002).

El consumo de carne por persona (consumo per cápita) en Colombia, ha disminuido de 21 Kg/Hab en el año 1990 a 16,3 Kg/Hab en el 2003. Es imperativo incrementar la productividad y poder extraer un porcentaje mayor del hato y aumentar el ritmo de crecimiento de la población ganadera, principalmente mejorando las prácticas de manejo para obtener un producto de mejor calidad.

El sistema de clasificación de carnes en canal “5 estrellas”, utilizado en el país, está dando las pautas para mercadeo, lo que necesariamente se refleja en los precios. Si la carne en canal presenta mucha grasa de cobertura (cebo), coincide con un bajo marmoreo, y no es comercializable o alcanza precios muy bajos en detrimento de pequeñas o grandes economías.

El rendimiento de la carne en canal se mide en porcentaje de carne magra o cantidad de carne comercial (alto marmoreo). La carne en canal empieza a ser comercializable y a sumar puntos fundamentales para el valor de compra, en la medida que supera el 50% de rendimiento en canal. Esto indica que el costo por el mantenimiento de un gran número de animales con baja calidad en sus productos, producen un impacto negativo en la economía individual y general del país.

Es claro que las nuevas exigencias en sanidad, presentación y calidad de productos como la carne en canal, presionan a niveles más exigentes de competitividad. Para alcanzarlo hace falta la vinculación del sector científico como capitalizador del recurso biológico.

El efecto competitivo generado por la globalización y el comercio de productos con altos estándares de calidad en los mercados nacionales e internacionales, ha determinado que, entre las características que serán relevantes para la exportación de producción, sea imperativo el mejoramiento de la calidad de la carne, lo que incidirá en un incremento del consumo a nivel interno, como también sobre niveles de competitividad en el exterior.

Por lo anterior se ve la necesidad de buscar algunos de los polimorfismos del gen Leptina asociado al marmoreo; para, de esta forma, contar con herramientas moleculares que permitan conocer el estado genético de los animales con respecto a la calidad de carne, ahorrando tiempo y agilizando los procesos de cría, dándole un valor agregado al animal mediante la selección asistida por marcadores.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La utilización de técnicas moleculares en la producción animal es sin lugar a dudas una herramienta reciente muy valiosa utilizada con varios propósitos, entre los cuales están la implementación de estrategias de mejoramiento genético, la identificación de híbridos, al establecimiento de relaciones filogenéticas, la identificación de especies, entre otros (Dunner y Cañon, 2002). La búsqueda de regiones conservadas en los genomas como los son los microsatélites, han sido difundidas en estudios de genética molecular en genes de interés comercial en bovinos. Esta herramienta permite la caracterización de tales recursos identificando la variación genética y descartando la influencia del ambiente, lo cual permite la obtención de “huellas” genómicas de individuos, poblaciones y especies; pero, debido a su reciente aparición, este tipo de estudios en especies de interés comercial son hasta el momento muy escasos en Colombia.

En el año 2000, la actividad ganadera en Colombia (carne y leche) representó el 30% del valor de la producción agropecuaria nacional y el 67% del sector pecuario. En términos de valor, es el principal producto de la actividad pecuaria nacional y es 2,61 veces el valor de la avicultura (carne y huevos) (Martínez, 2002).

Algunos factores que afectan la composición de la carne en cuanto a sus características son la raza, el sexo y la edad de los animales, lo que termina por afectar el mercado. Reportes recientes han mostrado que la rigidez del tejido conectivo decrece con el aumento y disposición de la grasa intramuscular, en mayor grado dependiendo del aumento del tejido adiposo o marmoreo, incrementando el sabor, la jugosidad y la terneza (Nishimura, 1999). El gen de la Leptina, tiene una gran influencia en éstas características, de tal manera que su utilización en la selección de animales, contribuirá a un incremento en la calidad de la carne, basada en las preferencias del consumidor, lo que permitiría igualar en exportación a muchos países.

En otro aspecto, los animales que depositan mejores niveles de marmoreo en la carne magra, utilizan mejor el alimento, necesitando una menor cantidad de materia seca para formar cada unidad de gramo de peso, influyendo positivamente en la economía del alimento. Acevedo (2004) en su tesis magistral, reportó que las hembras poseen mayor grasa intramuscular que los machos, ésta, es indispensable para compensar el gasto energético extra que se requiere a la hora de gestar y amamantar a las crías.

Se contribuirá al mejoramiento de la calidad en la producción de ganado de carne y derivados, acorde con el énfasis que en Australia, Estados Unidos y otros países están dando a los programas genéticos de selección para terneza, sabor y jugosidad, basados en los altos precios que alcanza en el mercado la carne con alto porcentaje de marmoreo.

El incentivo económico para incremento de marmoreo podría ser importante en el futuro. La selección genética en éste sentido, podría contribuir a una alta calidad de carne en canal.

De la extracción de ganado, que en el año 2001 ascendió a 3`543.000 cabezas, se obtuvieron 745.780 toneladas (Tm) de carne en canal que significan un consumo per cápita de 17,7 Kg/Hab. De esta actividad se desprende una serie de actividades industriales directamente relacionadas, tales como la matanza de ganado, la preparación y conservación de carnes, la producción y el desarrollo de industrias relacionadas con el cuero, la fabricación de calzado y prendas de vestir. Estas actividades industriales representan el 2,23% de la producción bruta de la industria manufacturera del país y el 2,16% del valor agregado creado por la industria nacional y generan en forma directa casi 21.000 empleos. En esta perspectiva, el incremento potencial de la venta de ganado, debido al ofrecimiento en el mercado de una carne de mejor calidad, permite afirmar que la ganadería vacuna y los productos industriales que se derivan de él aumentarán su peso en forma importante en la producción agrícola y agroindustrial de Colombia.

El conocimiento de los factores genéticos, relacionados con el mejoramiento de la calidad de la carne, permitirá la modificación de la conducta de manejo de los hatos por parte de los campesinos y ganaderos de la región, que redundará en un mayor consumo tanto interno como de exportación, lo que a su vez permitirá el desarrollo de actividades relacionadas.

Este trabajo tiene como interés contribuir a la estandarización de una metodología que permita determinar regiones polimórficas en el gen de Leptina en la raza Hartón del Valle mediante la técnica molecular de microsatélites.

La determinación de polimorfismos del gen Leptina al estar relacionada con el marmoreo, representará una nueva herramienta para hacer más eficiente la producción de carne. Con ella será posible identificar con exactitud la frecuencia del polimorfismo en el microsatélite ST en la raza analizada.

Los resultados de este trabajo a largo plazo, además de servir como punto de partida en la búsqueda de polimorfismos de genes de interés comercial en razas bovinas criollas colombianas, servirá como referencia para otras investigaciones en el campo de la genética de bovinos; además de complementar los hallazgos citados en este trabajo y de expandir el conocimiento sobre el genoma del ganado bovino en el país.

### 3. ANTECEDENTES

Las investigaciones en genética molecular en ganado bovino han tenido un gran auge desde el año 2000 cuando se puso en marcha el Proyecto Genoma Bovino, esto trajo con sígo la aparición de nuevas técnicas y herramientas para la identificación de regiones génicas que están relacionadas con muchas características siendo las mas importantes las de interés comercial como lo son calidad de carnes, calidad de leche, resistencia a enfermedades, adaptación a ecosistemas, entre otras. Muchos países están trabajando arduamente para identificar y descifrar el genoma bovino por lo que no se han escatimado esfuerzos y recursos para dicho proyecto.

El gen de la Leptina fue descubierto en ratones por Zhang *et al.*, en el año de 1994, quien observó una mutación que daba como resultado ratones obesos, desde entonces gran variedad de investigadores han puesto su interés en este gen. La proteína producto de este gen ha sido investigada fisiológicamente y esta implicada en humanos y animales en el apetito, composición del cuerpo, balance energético (Geary *et al.*, 2003), fertilidad y función inmune (Fruhberk *et al.*, 1998). Tiene un efecto directo sobre otros tejidos como músculo esquelético (Hossner, 1998). Es considerada como modificadora del metabolismo (Houseknecht *et al.*, 1998). En la regulación de la reproducción puede actuar como señal para concepción y preñez (Hossner, 1998), en calidad de leches esta relacionada con el porcentaje de grasa (Buchanan *et al.*, 2003; Liefers, 2004).

Ha sido identificada además en otros organismos conservando secuencias idénticas en un 67% en humanos, gorilas, chimpancés, orangutanes, perros, vaca, ratones, cerdos, ovejas, y pollos. (Hossner, 1998; Zhang, *et al.*, 1997). En bovinos se ha mapeado física y genéticamente en el cromosoma 4q23 (Stone *et al.*, 1996) y algunas regiones del gen han sido relacionadas con algunas características como lo es el grado de marmoreo, el área del ojo del lomo y el porcentaje de grasa subcutánea (Tabla 1).



Tabla 1. Investigaciones realizadas en el gen de la Leptina con sus respectivos aportes.

REFERENCIA	REGIÓN DEL GEN
Zhang <i>et al.</i> , 1994	Descubrimiento del gen de la Leptina (gen de la obesidad).
Stone <i>et al.</i> , 1996	Un microsatélite (microsatélite ST) detectado en la región flanqueante al extremo 3' que esta asociado con el grado de marmoreo y grasa subcutánea.
Fitzsimmons <i>et al.</i> , 1998	El microsatélite ST fue caracterizado en las razas Angus, Charolais, Hereford y Simmental, se describieron 4 alelos de 138, 140, 147 y 149 pb y se hace una asociación del alelo 138-pb con alto porcentaje de marmoreo y el alelo 147-pb con efecto contrario.
Tessane <i>et al.</i> , 1999	El microsatélite ST se caracterizó nuevamente en la raza Angus con la presencia de los alelos 135 y 144 pb, siendo el alelo 144 el más frecuente. Estos dos alelos mostraron asociación significativa con el grado de marmoreo.
Wilkins y Davey 1997	Un microsatélite polimórfico (microsatélite WD) en la región 5'UTR del gen asociado con el área del ojo del lomo.
Liefers <i>et al.</i> , 2002	Un punto de mutación detectado por PCR-RFLP en el intrón 2 del gen, el cual produce 2 alelos asociados con alto marmoreo y bajo marmoreo.
Buchanan <i>et al.</i> , 2002	Una mutación puntual detectada por PCR-RFLP, que produce 2 alelos (C y T) asociados con bajo y alto marmoreo respectivamente.

Los estudios de genética molecular en bovinos son hasta el momento escasos en Colombia, sin embargo algunos grupos han desarrollado investigaciones relacionadas con:

1. La caracterización molecular de algunas razas criollas,
2. Relaciones filogenéticas de poblaciones emparentadas,
3. Asociación de genes con resistencia a enfermedades como Mastitis,
4. Genes asociados con calidad de leche,
5. Pruebas de paternidad.

En relación con el gen de la Leptina, el grupo de Genética y Mejoramiento Animal de la Universidad de Antioquia ha venido desarrollando en los últimos dos años investigaciones en varias razas criollas colombianas (Hartón del Valle, Blanco Orejinegro, Velásquez, Sanmartinero, Romosinuano) y la raza cebuina Brahmán buscando los polimorfismos descritos por Stone *et al.* (1996), Wilkins y Davey (1997) y Buchanan *et al.*, 2002 y estableciendo un paralelo con el fenotipo para determinar la asociación del gen con marmoreo, área del ojo del lomo y grasa subcutánea mediante la técnica de ultrasonido.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el polimorfismo presente en la región flanqueante al extremo 3' del gen de la Leptina bovina en la raza bovina criolla Hartón del Valle usando el microsatélite ST como marcador molecular.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo en la región que flanquea el extremo 3' del gen de la Leptina (microsatélite ST).

Establecer si existe alguna asociación entre algunas de las variaciones encontradas y el sexo de los animales.

## 5. MARCO TEÓRICO

La carne es el tejido animal más apto para ser usado como alimento, este corresponde a uno de los más nutritivos para el consumo humano debido a su gran aporte de proteínas, grasas, vitaminas y minerales. Provee calorías procedentes fundamentalmente de su contenido lipídico, pero su contribución vital a la dieta son las proteínas, vitaminas del complejo B, ciertos minerales como hierro, zinc y fósforo y ácidos grasos esenciales (Hedrick *et al.*, 1994). También aporta colesterol que se ha asociado con problemas cardiovasculares en humanos razón por la cual es de gran importancia una buena selección. La carne se subdivide en varias categorías generales: carnes rojas y blancas basándose en los niveles del pigmento mioglobina; dentro de las rojas encontramos la de bovinos, cerdos y corderos y la blanca generalmente asociada con aves de corral y de especies ícticas.

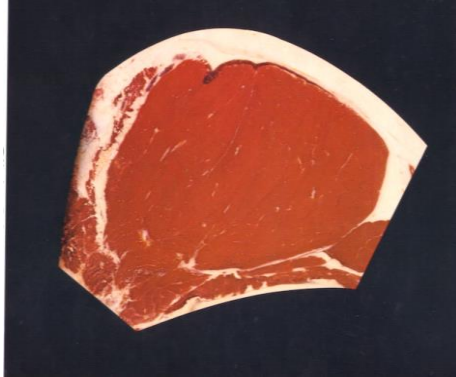
Cuando se habla de calidad de carnes frescas, algunos de los atributos que el consumidor frecuentemente busca son la terneza, jugosidad y color. Estas propiedades están influenciadas por varios factores tales como genéticos (raza del animal), factores ambientales, el manejo *antemortem* del mismo, los procesos de matanza, el manejo de las canales durante el almacenamiento *postmortem*, las características intrínsecas del músculo y tejido conectivo, intensidad de proteólisis *postmortem* en las células musculares y temperatura de cocción de la carne (Pearson y Dutson, 1994). En el caso de la jugosidad y terneza, la cantidad de grasa intramuscular o marmoreo es un factor significativo en la medida en que ambas variables se asocian positivamente (León, 1995).

La industria de la carne tanto a nivel mundial como local atenta contra estas costumbres dadas por el consumidor, promoviendo cantidad y no calidad, por esta razón los países desarrollados han implementado estrategias de manejo para aumentar los altos niveles de marmoreo y disminuir el porcentaje de grasa subcutánea en el ganado. Dentro de las estrategias se pueden mencionar el uso de alimentos que estimulen la síntesis de proteínas musculares, cruces dirigidos con herramientas genéticas y buena manipulación de los animales *ante y post-mortem* que son claves en la obtención de cortes buenos de carne.

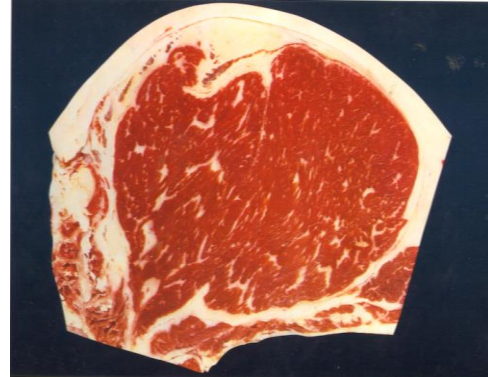
El marmoreo en bovinos corresponde al tejido adiposo intramuscular o comúnmente conocido en los hogares como carne entreverada o beteada ya que se puede observar fácilmente como finas rayas o betas en medio del tejido muscular, es directamente proporcional a la palatabilidad de la carne siendo esta la suma de la terneza (8%) mas la jugosidad (16%) mas el gusto o sabor. La acumulación de esta grasa (buena) no es uniforme en todo el cuerpo del animal acumulándose en forma decreciente desde la cabeza hasta la cola, el músculo que mas porcentaje de marmoreo presenta es el ojo del lomo (*longissimus dorsi*) razón por la cual es utilizado en la cuantificación de esta característica. En cuanto a utilización de energía por parte del animal, esta grasa es el primer reservorio calórico que encuentra el animal (Smith *et al.*, 2000) por lo tanto esta en constante renovación. Por otro lado la grasa subcutánea o de cobertura corresponde a aquella que se

acumula por encima del músculo, esta grasa (mala) es inversamente proporcional al marmoreo y es la última alternativa energética del animal.

Figura 1. Músculo *longissimus dorsi* con Marmoreo



**Carne no selecta (3.43%)**



**Carne de Primera Calidad (8.56%)**

Para mencionar un poco acerca la utilidad directa del marmoreo en los hogares, parece que este desorganiza la estructura del tejido muscular (colágeno + elastina) y contribuye a su ternieza; el aumento de ternieza produce un tejido conectivo mas susceptible al calor dado por producto de cambios estructurales que causan mas eficiente solubilización y gelatinización del colágeno (Nishimura *et al.*, 1999).

La raza, el sexo y la edad del animal son factores que afectan la composición de la carne en cuanto a ternieza (Acebedo 2004). Se ha reportado por ejemplo que los animales de la raza Brahman y sus cruces presentan carne menos tierna que otras razas, Ramsey (1963) demostró que la raza Holstein presenta mas marmoreo que Brahman, lo que según Moran (1970), puede deberse a las diferencias en la genética de los animales. Pagán (1997) trabajó con toros de las razas Holstein, Charbray y Brahman criados a pastoreo y encontró que pueden producir carne de calidad similar y con un contenido de grasa intramuscular de 1% o menos. Whipple y colaboradores (1990) encontraron que diferencias en ternieza entre *Bos indicus* y *Bos taurus* son mayores para ciertos músculos. Sherbeck (1995) mostró que la carne en canal de novillos Hereford, tienen un alto grado de marmoreo en relación con descendientes de Brahman, que presentan entre 25 y 50%. En relación al sexo de los animales, Acevedo en su tesis magistral, reportó que las hembras poseen mayor grasa intramuscular que los machos, ésta, es indispensable para compensar el gasto energético extra requerido a la hora de gestar y amamantar a sus crías evitando trastornos metabólicos.

Varios grupos han determinado en bovinos asociaciones que van desde las concentraciones de leptina en sangre con apetito y composición de la carne en canal (Cameron *et al.*, 2000; Geary *et al.*, 2003; Wegner *et al.*, 2001), hasta las asociaciones genéticas de las regiones polimórficas en el gen de Leptina con promedio de grasa total, marmoreo y porcentaje de grasa en costilla (Buchanan *et al.*, 2002; Fitzsimmons, 1999; Halle *et al.*, 1999).

En éste sentido, se han identificado algunas regiones entre y adyacentes al gen de la Leptina, que facilitan su estudio genético en asociación con diferentes niveles de grasa en la carne, grasa de cobertura y marmoreo cuyas frecuencias varían de una raza a otra y de una población a otra.

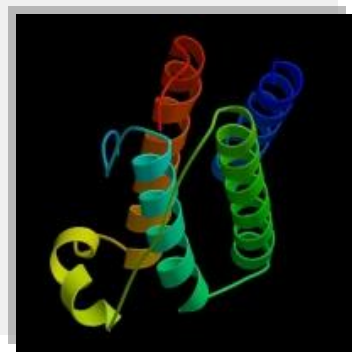
Los siguientes polimorfismos se han usado para evaluar el gen de la Leptina como posibles marcadores de características asociadas a la carne en canal.

Las regiones analizadas son:

1. Un microsatélite detectado en la región que flanquea el extremo 3' (Stone *et al.*, 1996 [No. acceso GenBank G18586]), este microsatélite ha sido asociado con el porcentaje de marmoreo en el músculo *longissimus dorsi*. Es llamado ST y esta conformado por la repetición 5' GATA(CA)<sub>n</sub>CTAG 3', se han encontrado 6 alelos con secuencias en tandem cortas con las repeticiones (CA)<sub>14</sub>, (CA)<sub>16</sub>, (CA)<sub>17</sub>, (CA)<sub>18</sub>, (CA)<sub>19</sub>, (CA)<sub>20</sub>, y (CA)<sub>22</sub> que corresponden a los alelos 135, 138, 140, 144, 147 y 149 pb respectivamente, siendo los alelos 135, 138 y 144 pb los que tuvieron asociación significativa con la grasa intramuscular (Fitzsimmons *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1996; Tessane *et al.*, 1999).
2. Un microsatélite polimórfico en la región 5'UTR del gen que fue asociado con el área del ojo del lomo. (Wilkins and Davey 1997).
3. Una mutación puntual detectada por PCR-RFLP en el intrón 2 del gen de Leptina, (Liefers *et al.*, 2002), el cual produce 2 alelos R y C asociados con alto marmoreo y bajo marmoreo respectivamente.
4. Una mutación puntual detectada por PCR-RFLP en el exón 2 del gen de la Leptina (Buchanan *et al.*, 2002) el cual produce 2 alelos C y T, donde los animales con genotipo TT y CC corresponden a un fenotipo que presenta carne con alto y bajo porcentaje de grasa intramuscular respectivamente, esta mutación produce un cambio en la proteína del aminoácido cisteína por tiamina creando una diferencia funcional que bloquea su capacidad para identificar los receptores en el hipotálamo siendo crítico en la función biológica del gen que esta asociado al apetito del animal.

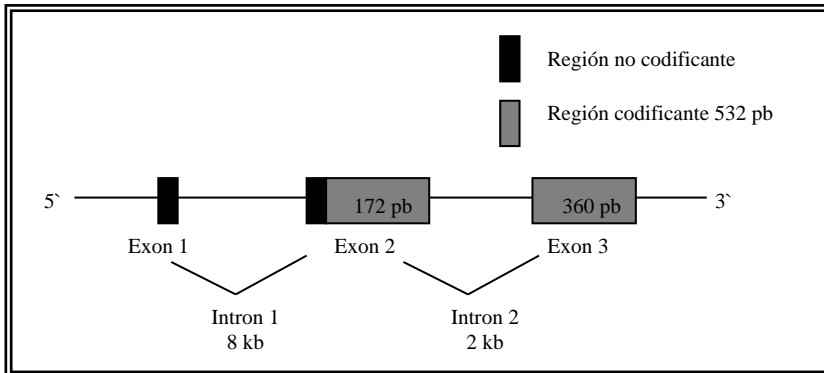
La Leptina es una hormona de tipo proteico que es producida en el tejido adiposo, posee 167 aminoácidos que son procesados a un polipéptido de 146 residuos con un peso molecular de 16 kD antes de integrarse a la circulación sanguínea. La Leptina pertenece a la familia de las citoquinas, su estructura incluye un paquete de 4 hélices alfa antiparalelas unidas entre si por 3 hélices, tiene 4 giros beta y un enlace disulfuro entre los aminoácidos 117 y 167 (Figura 2) (Zhang *et al.*, 1997). Esta proteína esta implicada en el apetito, composición del cuerpo, balance energético, fertilidad y función inmune (Geary *et al.*, 2003).

Figura 2. Estructura tridimensional de la molécula de la Leptina



La hormona Leptina es codificada por el gen de la obesidad *ob* comúnmente conocido como gen Leptina en mamíferos (Zhang *et al.*, 1994), en bovinos se ha mapeado física y genéticamente en el cromosoma 4q23 (Stone *et al.*, 1996). El gen consta de tres exones y dos intrones de los cuales solo dos exones traducen a proteína, la región codificante (exones 2 y 3) tiene una longitud de 532 pb aproximadamente, tales exones están separados por un intrón de 2 kb. La region promotora del gen tiene aproximadamente 3 kb (Figura 3).

Figura 3. Organización molecular del gen de la Leptina (tomado de Liefers, 2004)



La Leptina es producida por las células adiposas, entre mayor sea el número de adipositos, mayor es la cantidad de RNAm de leptina presente (Auwex & Staels 1998; Masuzaki *et al.*, 1995). Luego es secretada en sangre y transportada al cerebro (hipotálamo) donde actúa sobre factores que regulan el apetito. Tiene un efecto directo sobre otros tejidos como músculo esquelético (Hossner, 1998), donde participa en la síntesis del glucógeno y transporte de glucosa (Margetic *et al.*, 2002), además incrementa la energía y la actividad física. Su secreción está altamente correlacionada con masa grasa del cuerpo y tamaño del adiposito. (Houseknecht *et al.*, 1998). Pequeñas cantidades de leptina también son secretadas por células en el epitelio del estómago y de la placenta (Margetic *et al.*, 2002; Hossner, 1998).

Ha sido asociada como un factor potencial que contribuye a la variación entre animales en relación con el apetito, balance de energía y composición del cuerpo. Es considerada como modificadora del metabolismo (Houseknecht *et al.*, 1998). En la regulación de la reproducción puede actuar como señal para concepción y preñez (Hossner, 1998), debido en parte a su capacidad para potenciar la secreción de las hormonas gonadotropina y estimulante del folículo.

En ganado, la estimulación antagónica del efecto de leptina es la insulina, sobre la granulosa y células tecales esteroidogénicas. La leptina es un producto del peso corporal del animal, de la circunferencia escrotal y de la concentración sérica de testosterona, la cual provee el gran información para investigar la interacción ente el crecimiento y el eje reproductivo en ganado (Almeida *et al.*, 2003).

El gen mutado *ob* en forma homocigótica (*ob/ob*) produce obesidad genética en ratones, que resulta en un adulto estéril siendo el 50% del peso del cuerpo solo grasa. El defecto específico del gen *ob* en ratón fue reportado por (Zhang *et al.*, 1994). El ratón *ob/ob* no produce Leptina biológicamente activa. La falta de Leptina en ratones afecta la reproducción en machos, aunque su administración restaura la fertilidad (Hossner, 1998). La deficiencia se caracteriza además por hiperfagia y reducción del gasto de energía (Tartaglia *et al.*, 1995).

El descubrimiento del gen de la Leptina en ratón y sus efectos sobre la grasa del cuerpo, la convierten en un candidato ideal para evaluación de metabolismo en muchas especies.

## **5.1. RAZA HARTÓN DEL VALLE**

La industria cárnica en Colombia ha desarrollado una serie de cruces con dos componentes genéticos (razas criollas e introducidas) para aumentar su producción; teniendo en cuenta los datos fenotípicos y productivos de estos cruces, es posible entender la evolución que han sufrido las producciones en las explotaciones de bovinos de carne de nuestro país en los últimos años. El cambio sufrido en la base racial se ha acompañado de un importante aumento en la producción de carne por cabeza (número de kilogramos obtenidos por cada animal sacrificado), pasando de 170 en 1961 a 196,1 en el 2001 (Martínez H, 2002); este aumento va de la mano con las importantes mejoras en las infraestructuras que sustentan estos sistemas.

Todos estos cambios, implican la necesidad de mejorar las metodologías utilizadas para selección animal de cara a satisfacer las demandas crecientes de un ritmo reproductivo más intenso de las razas criollas.

Una de las razas criollas colombianas es Hartón del Valle, la cual se localiza básicamente en las regiones planas cálidas del suroccidente Colombiano especialmente en las fértiles tierras del Valle del río Cauca. El nombre Hartón es debido a sus cuernos que tienen la forma de plátano hartón. Es una raza de doble propósito (carne y leche) lo cual hace que tenga gran importancia en nuestro sistema de producción. La conformación general

angulosa indica aptitud para producción moderada de leche y su gran porte le confiere aptitudes cárnicas. Presenta similitud fenotípica con las razas Costeño con Cuernos y Chino Santandereano. La población de la raza Hartón del Valle es de 1.540 bovinos puros de propiedad de 51 criadores.

El Hartón del Valle al igual que todas las razas criollas de ganado bovino, desde poco menos de 100 años, ha sido sometido constantemente a cruzamientos graduales de absorción hacia ganado cebuino o taurino, ocasionando una disminución en la población pura. El origen del Hartón del Valle se deriva de la raza criolla Costeño con Cuernos con una combinación de diferentes razas ibéricas: la Rubia Gallega y sus modalidades Palmeña y Canaria, la Australiana de los valles y la minorquía o Mahonesa, las cuales se mezclaron en diferentes proporciones (CEGA, 1987; citado por Pinzón, 1996).

## **5.2. MICROSATÉLITES**

Los microsatélites son pequeñas regiones de ADN que contienen múltiples copias de secuencias repetitivas cortas (de 1 a 6 pares de bases) los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos y que se emplean como marcadores genéticos para rastrear características fenotípicas de interés tales como herencia, enfermedades genéticas, caracteres comerciales, entre otras (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Si se toma el ADN y se separa según su densidad en lo que se llama un gradiente de densidad de cloruro de cesio, lo que se encuentra es que la distribución de densidad no es pareja o continua, sino que de hecho hay bandas específicas que migran a un sitio específico en este gradiente. Tales bandas fueron llamadas satélites porque no parecen estar donde está la masa principal de ADN. Como se dijo anteriormente estas son repeticiones de secuencias cortas, ya sea mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos. El tipo más frecuente son los dinucleótidos con las repeticiones de la secuencia CACACACA (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Se encuentra un microsatélite cada cien mil pares de bases, y si es suficientemente larga, esa secuencia en particular tiende a ser polimórfica. De tal forma que constituyen excelentes marcadores genéticos para rastrear el genoma. Este marcador genético es muy frecuente y fácil de detectar por medio de PCR, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, y son cien por cien fiables, repetitivos y automatizables, El elevado polimorfismo que presentan los microsatélites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos. También es posible estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas (Ferreira y Grattapaglia 1998).



### **5.3. BENEFICIOS DEL GEN EN GANADERÍA**

Uno de los factores asociados positivamente con el potencial productivo de los bovinos es su capacidad para consumir alimentos. En forma simplificada, los animales con mayor "apetito" producen más. Los novillos con mayor capacidad de consumo engordan más rápido, se terminan antes y producen reses con mayor marmoreo. Si bien la cantidad de alimento consumido por el animal depende de una gran cantidad de factores propios (raza, edad, estado sanitario, condición fisiológica, etc.) y del ambiente (tipo de alimento, disponibilidad, época del año, etc.), también está determinada por la genética. En otras palabras, hay animales que genéticamente están condicionados a tener más apetito. Esta variación genética del consumo abre la posibilidad de realizar selección por esta característica y el desafío de identificar aquellos animales cuyo "genotipo" determina un mayor nivel de consumo. La consecuencia es que los animales que tienen ciertos polimorfismos en el gen de la Leptina tienden a permanecer con más hambre incrementando el almacenamiento de grasa intramuscular.

Con el conocimiento del gen de la Leptina y sus polimorfismos, se puede establecer un nuevo método de selección basado en herramientas moleculares para predecir el potencial productivo de los bovinos criados con fines cárnicos. Con tan solo una muestra de sangre, semen o pelo se puede identificar a los animales de mayor calidad y agruparlos para realizar un manejo nutricional estratégico acorde con su potencial, asimismo es una herramienta que ayuda a seleccionar a reproductores (machos y hembras) brindándoles un valor agregado.

A partir de este conocimiento surge el desafío de desarrollar técnicas moleculares que permitan identificar el genotipo de cada animal que finalmente se verá reflejado en el potencial productivo del bovino antes que sea sacrificado.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MUESTRA POBLACIONAL

Se analizaron 159 animales (Hembras = 88, Machos = 71) de la raza Hartón del Valle, tomados de la Hacienda Zanjón Hondo, esta se encuentra localizada en el municipio de Buga la Grande (Valle del Cauca) con latitud 4° 12` N y longitud 76° 10` O, esta a 491 msnm, tiene una temperatura media anual de 23°C y un promedio anual de precipitación de 1166 mm, su clasificación según Holdridge corresponde a bosque seco tropical (bs-T).

En dicho lugar se recopiló la información relacionada con el fenotipo de cada uno de los animales tales como peso, sexo y edad (Anexo A), por ultimo se procedió a tomar las muestras de sangre (7 ml de sangre total periférica en tubos al vacío con anticoagulante EDTA) de los animales para la extracción de ADN.

### 6.2 EXTRACCIÓN DEL ADN:

Fueron extraídos por cada animal 7 ml de sangre total periférica en tubos estériles al vacío *Vacutainer* con anticoagulante EDTA. Este material se transporto refrigerado al laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal de la Universidad de Antioquia y se mantuvo a temperatura de -4°C.

La extracción de ADN se realizó con el método convencional de extracción de ADN que se basa en la precipitación de sales *SALTING-OUT* (Anexo B). El ADN obtenido fue almacenado a -20°C y resuspendido en Low TE.

### 6.3 GENOTIPIFICACIÓN

Para la estandarización de las condiciones de PCR adecuadas de acuerdo a las temperaturas medias Tm de los *Primers* seleccionados se usaron los siguientes parámetros:

Tabla 2. Reactivos y Concentraciones usadas en PCR

REACTIVOS	[ ]
ADN genómico	50 ng
Taq Polimerasa	0.1 unidades
Primer	25 pM de c/u
dNTP's	10 mM de c/u
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
Buffer 10X	10 mM
H <sub>2</sub> O <sub>m</sub> Q	Hasta completar 25 µl

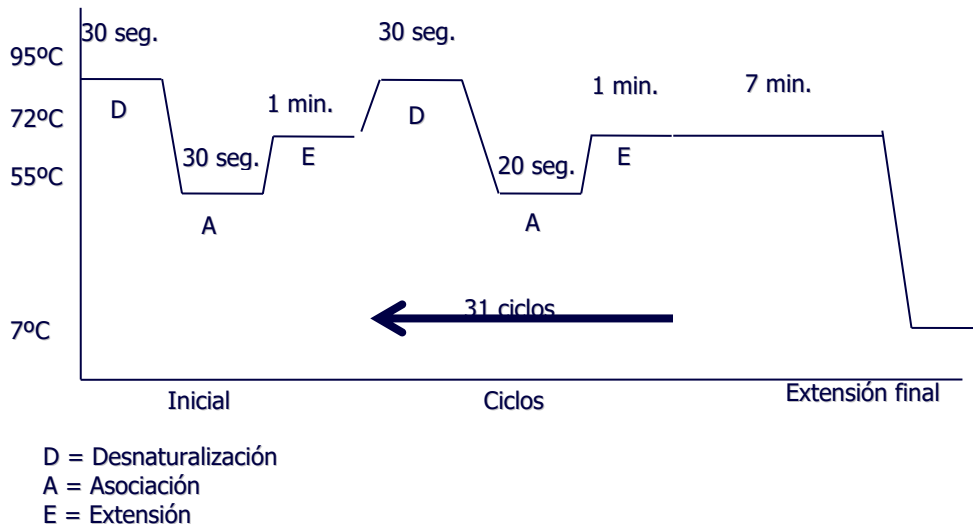
La reacción PCR del microsatélite ST (Stone, 1996) (Anexo C) usa los siguientes Primers para generar fragmentos que van desde 136 a 149 pb.

A (5' -GAT GCA GCA GAC CAA GTG G- 3') Forward

B (5' -CCC ATT GCT AGA ACC CAG G- 3') consensus reverse

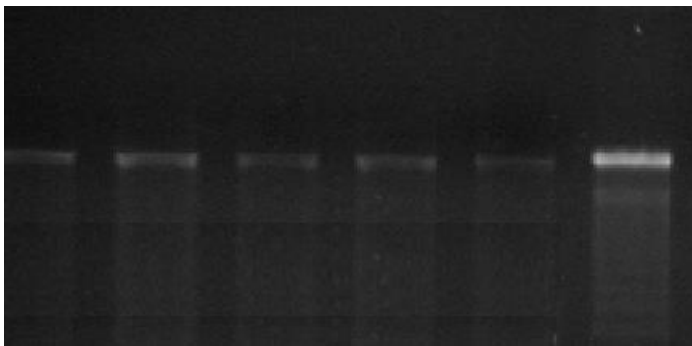
La reacción de amplificación fue sometida al siguiente perfil térmico (Figura 4) y se llevo al Termociclador marca *Biometra T personal*.

Figura 4. Perfil Térmico usado en la PCR.



Para verificar si la PCR tuvo éxito, se tomaron 0.5 µl de cada muestra amplificada y se separó por electroforesis en geles de agarosa al 2% con buffer TBE 1X (8.9 mM Tris-HCl, 8.9 mM ácido Bórico, 0.25 mM EDTA, pH 8.3), luego fueron corridos a 60V por 20 minutos. Los fragmentos de ADN fueron visualizados por medio de un Transiluminador de luz ultravioleta (Upland, CA 91786, USA) (Figura 5).

Figura 5. Gel de agarosa donde se confirma la amplificación del microsatélite ST en la raza Hartón del Valle.



El producto de amplificación fue sometido a un gel de secuenciación al 6% de poliacrilamida (19:1 Acrilamida:Bisacrilamida). Se hace la electroforesis a 500 mA durante 90 minutos usando la cámara de electroforesis y fuente de poder marca *GIBCO BRL PS9009 TC*. Luego se pasa a la tinción con nitrato de plata usando el protocolo Silver Sequence (DNA staining Reagents) de *Promega*.

#### **6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa GENEPOP 3.4 (Raymond M. and Rousset F, 1995) el cual es usado en genética de poblaciones para determinar las frecuencias fenotípicas, genotípicas, alélicas, y el equilibrio Hardy-Weynberg que asocia las frecuencias genotípicas con las alélicas mediante el desarrollo del binomio.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La genotipificación del marcador ST (Stone *et al.*, 1997), en la población seleccionada de la raza criolla Hartón del Valle, dio como resultado la caracterización de 3 alelos con 135, 144 y 147 pb para este microsatélite (Tabla 3), siendo los mas frecuentes 135 y 144 pb con una frecuencia de 0.408 y 0.472 respectivamente.

Tabla 3. Frecuencias alélicas para el marcador ST en la raza bovina Hartón del Valle.

Alelo	Frecuencias alélicas
	n=159
135	<b>0.408</b>
144	<b>0.472</b>
147	<b>0.120</b>

Investigaciones desarrolladas por Fitzimmons *et al* (1998) y Tessanne *et al* (1999) en las razas Angus, Charolais, Hereford y Simmental, demostraron la presencia de 6 alelos diferentes para este microsatélite, los cuales fueron 135, 138, 140, 144, 147 y 149 pb.

Para los animales analizados (machos y hembras) se detectaron 5 combinaciones genotípicas para el marcador ST en Hartón del Valle, dos homocigóticas (35.2%) y tres heterocigóticas (64.8%). El genotipo más frecuente fue 135/144 pb (0.409), ente los homocigóticos el genotipo 144/144 pb (0.195) presentó la frecuencia más alta en la población, la combinación genotípica que se presento en menos proporción fue 135/147 pb (0.094), el alelo 147-pb estuvo en baja proporción y no se identifico ningún homocigótico (Tabla 4).

Tabla 4. Genotipos y Sexo de los animales para el marcador ST en la raza bovina Hartón del Valle (n=159) (Prueba de asociación Chi-cuadrado = 4.160; p>0.05).

GENOTIPO n=159		SEXO		Total	Frecuencias alélicas
		Hembras	Machos		
<b>Hom</b>	135/135	7.5%	8.2%	15.7%	<b>0.157</b>
	144/144	8.8%	10.7%	19.5%	<b>0.195</b>
<b>Het</b>	135/144	23.3%	17.6%	40.9%	<b>0.409</b>
	135/147	6.9%	2.5%	9.4%	<b>0.094</b>
	144/147	8.8%	5.7%	14.5%	<b>0.145</b>
<b>Total</b>		55.3%	44.7%	100%	

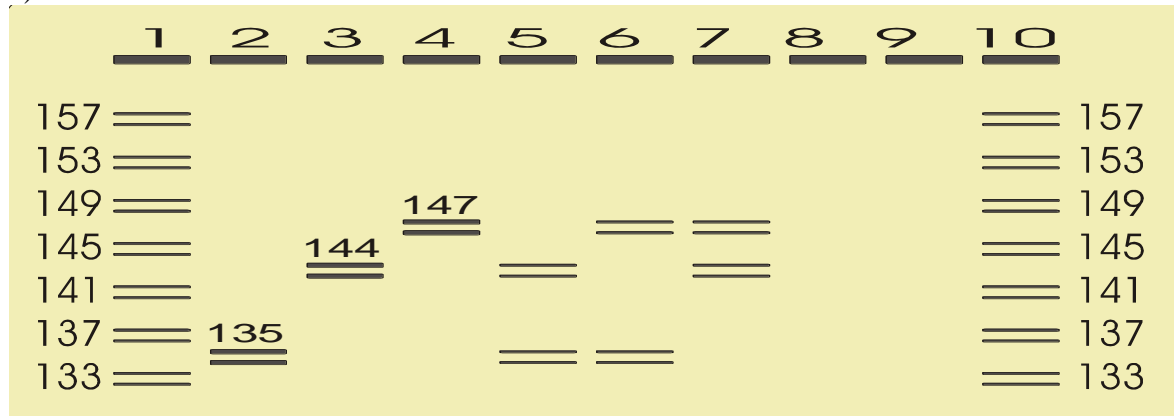
Hom = Homocigóticos

Het = Heterocigóticos

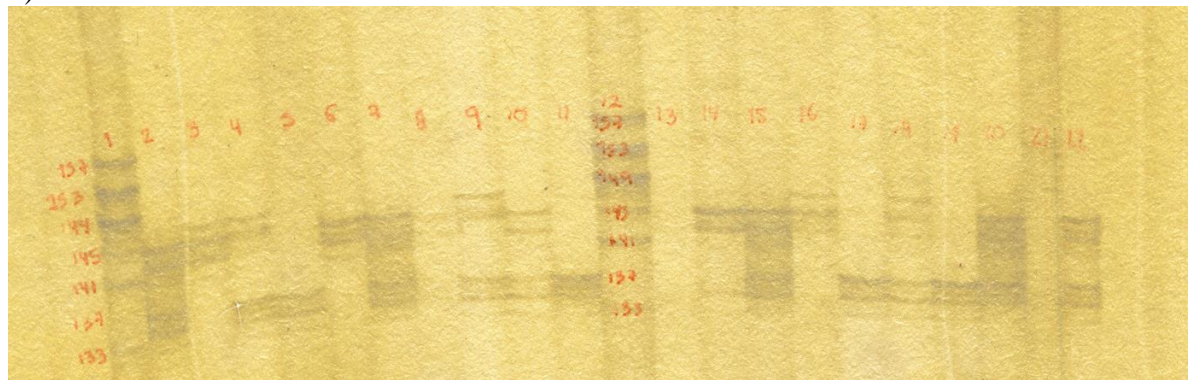
En la figura 6 se muestra un esquema y una fotografía del gel de poliacrilamida donde se representan los genotipos encontrados en la presente investigación. En el esquema (Figura 6a) los carriles 1 y 10 representan un marcador de peso molecular conocido (escalera), en los carriles 2, 3 y 4 se muestra los genotipos homocigóticos 135/135, 144/144 y 147/147 pb respectivamente y los carriles 5, 6 y 7 muestra los genotipos heterocigóticos 135/144, 135/147 y 144/147 pb respectivamente.

Figura 6. a) Esquema del gel de poliacrilamida donde se muestran los genotipos presentes en la raza Hartón del Valle. b) Gel de poliacrilamida.

a)



b)



Nota: Carriles 1 y 12 escaleras,

El microsatélite ST ubicado en el extremo 3' del gen de la Leptina, ha sido caracterizado previamente en otras razas originarias de otros países como Angus, Charolais, y Simmental, para estas razas se describen 4 alelos de 138, 140, 147 y 149 pb, se determinó una asociación altamente significativa del alelo 138-pb con un alto porcentaje de grasa intramuscular en las razas Hereford y Angus (Hereford = 0.57, Angus = 0.59) y un efecto contrario para el alelo 147-pb (Fitzsimmons *et al.*, 1998); en la presente investigación se arrojan resultados con una frecuencia muy baja para el alelo 147-pb (0.120) en la raza Hartón del Valle mientras que el alelo 138-pb no se encontró.

Por otra parte, resultados publicados por Tessane *et al.*, (1999), demuestran la presencia de los alelos 135 y 144 pb en dos variedades productivas de la raza Angus (raza bovina con mejores estándares en cuanto a calidad de carne), siendo el alelo 144-pb el más frecuente en la población analizada, con una frecuencia de 0.56. Análisis de varianza mostraron que estos dos alelos del microsatélite ST tuvieron efecto significativo ( $P = 0.15$ ) sobre el grado de marmoreo. En este trabajo el alelo 144 fue el más frecuente (0.472), dándole importancia a la raza Hartón del Valle en cuanto a la calidad de carnes se refiere.

En el trabajo publicado por Guerra *et al.*, (2005) para las razas criollas Colombianas Hartón del Valle, Blanco Orejinegro y la raza cebuina Brahman, se reportó la presencia de 7 alelos para el microsatélite ST (132, 135, 138, 141, 144, 147, 150 pb), entre los cuales, tres alelos no están reportados en investigaciones previas; los alelos nuevos (132, 141 y 150 pb) aparece con una muy baja frecuencia (0.010, 0.000 y 0.005) para la raza Hartón del Valle.

Comparando el grado de polimorfismos de la raza Hartón del Valle con otras razas analizadas, se puede decir que esta raza en la presente investigación, posee bajo polimorfismo ya que presentó solo 3 alelos de los 7 determinados en otras razas, esto se debe en parte, a que genéticamente esta raza ha tenido un proceso de mezcla muy escaso impidiendo un intercambio genético que permita una variabilidad mas elevada (Tabla 5).

Tabla 5. Razas bovinas estudiadas y alelos encontrados para el marcador ST.

<b>Alelo</b> <b>Raza</b>	<b>132</b>	<b>135</b>	<b>138</b>	<b>140</b>	<b>141</b>	<b>144</b>	<b>147</b>	<b>149</b>	<b>150</b>	<b>Total alelos</b>
Hartón del Valle	+	+				+	+		+	5
Brahman		+	+		+	+	+		+	6
Blanco Orejinegro		+			+	+	+			4
Angus		+	+	+		+	+	+		6
Charolais			+	+			+	+		4
Simmental			+	+			+	+		4
Hereford			+	+			+	+		4

+ = Presencia del alelo en la raza

Otras razas criollas Colombianas como Romosinuano, Velásquez, Sanmartinero también están siendo analizadas.

Acevedo (2004), indica en su Tesis Magistral, que el sexo de los animales es otra variable que puede afectar la calidad de la carne en cuanto a la terneza; en esta investigación, el sexo de los animales no se asoció significativamente ( $p > 0.05$ ) con los genotipos encontrados en el microsatélite ST aplicando la prueba de Chi-cuadrado en la raza bovina Hartón del Valle.

A partir de los análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) se determinó que la población analizada se encuentra en equilibrio para el microsatélite ST ( $p > 0.05$ ) por que las frecuencias genotípicas observadas se acomodan a las esperadas.

El equilibrio H-W del microsatélite ST mostrado en los resultados para la raza criolla Hartón del Valle era de esperarse, dado en parte a que esta población no ha sufrido grandes procesos de manipulación impidiendo que los tres factores que determinan el desequilibrio actúen por si mismos (mutación, deriva genética y selección natural).

En este tipo de explotación es frecuente la utilización de pocos parentales machos en los hatos, lo que conlleva a un alto nivel de endogamia detectada en los registros históricos que se llevan en estas explotaciones, aumentando posiblemente el grado de consanguinidad, lo que no permite un flujo genético.

El principal objetivo que se persigue en un programa de conservación de animales vivos “*in situ*”, es el *mantenimiento de la máxima cantidad de diversidad genética con el mínimo incremento posible de consanguinidad por generación*, razón por la cual es muy importante seguir analizando la raza Hartón del Valle en otros núcleos conformados y aumentando el número de genes en el análisis.

Uno de los principales problemas que afectan a las poblaciones minoritarias, como lo muestra la raza Hartón del Valle, son los inevitables apareamientos entre individuos emparentados, que se traduce genéticamente en un incremento de la consanguinidad (homocigosis) con la consiguiente depresión consanguínea, una reducción de los valores medios fenotípicos de los caracteres productivos y reproductivos, y por último, y como consecuencia de esos problemas reproductivos, la inevitable disminución y/o extinción de la población.



## 8. CONCLUSIONES

Basado en los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

La raza bovina Hartón del Valle presentó tres alelos para el microsatélite ST (135, 144 y 147 pb) siendo los más frecuentes los alelos 135 y 144 pb con frecuencias de 0.408 y 0.472 respectivamente; la presencia de estos alelos en dichas proporciones nos sirven como buen indicador de que esta raza, si lo confrontamos con la bibliografía, es portadora de buen marmoreo y por ende buena calidad de carne.

Se encontraron cinco genotipos diferentes del marcador ST en la raza bovina Hartón del Valle, dos homocigóticas (135/135 y 144/144 pb) y tres heterocigóticas (135/144, 135/147, 144/147 pb), el más frecuente fue 135/144 pb con frecuencia de 0.409.

El sexo de los animales no se asocio significativamente ( $p > 0.05$ ) con los genotipos encontrados en el microsatélite ST en la raza bovina Hartón del Valle.

La raza bovina Hartón del Valle es menos polimórfica para microsatélite ST que otras razas analizadas.

La población analizada se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para el microsatélite ST.

En general, el ganado criollo Hartón del Valle es una buena raza para ser criada con propósitos productivos de carne, ya que su genotipo con relación al gen de la Leptina y el microsatélite ST lo hace promisorio.

## 9. SUGERENCIAS

En Colombia no existe un sistema de clasificación de la carne vacuna que se ofrece a la venta en los diferentes expendios, por tanto, se debe comenzar con implementar un sistema de clasificación para de esta forma aumentar las posibilidades de competir frente al mercado internacional.

Es importante que la industria de carne bovina, tanto a nivel local como importada, aumente o estandarice el grado de marmoreo para estimular su consumo y competir favorablemente con otros sectores como lo son los de la carne de ave y porcina.

Es conveniente llevar a cabo estudios a nivel nacional que incluyan otras características organolépticas como lo son terneza, pH, color, análisis de las fibras musculares, humedad, grasa cruda y establecer paralelos con sus respectivos genotipos.

También se podría realizar análisis de ácidos grasos y colesterol para los diferentes cortes de carne en las razas criollas y estudiar variables como manejo *antemortem* y *postmortem* del animal ya que estas afectan las características organolépticas de la carne de res, para obtener una idea más completa de la importancia relativa de las mismas y poder tomar medidas para mejorarlas.

Sería conveniente realizar futuros estudios similares a este usando como muestra poblacional otras haciendas aisladas que tengan ganado Hartón del Valle, para identificar si existe la presencia de otros alelos poco frecuentes reportados en bovinos y poder establecer con mas exactitud los polimorfismos de el microsatélite ST en la raza analizada.

Teniendo en cuenta que, toda investigación debe tener siempre un factor social ligado en su desarrollo, es importante continuar con la identificación de genes de importancia económica en esta raza.

La experiencia del trabajo con la raza bovina Hartón del Valle, permitió reconocer que realmente se está frente a un recurso con potencial pecuario y económico, el cual merece seguir siendo investigado para que, en un futuro, pueda ser validada su importancia y crear así, estrategias de recuperación del ganado criollo Colombiano.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ALMEIDA, SEM *et al.*. Molecular marker in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. En: J. Anim. Breed. Genet. Vol. 120 (2003); p. 106-113.
- ACEVEDO M. Evaluación de los atributos principales de calidad de la carne de res de origen local e importada, según se ofrece al consumidor. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Puerto Rico (2004).
- AUWERX, J and STAEELS, B. Leptin. En: Lancet. Vol. 7 (1998); p. 737-42.
- BUCHANAN, FC *et al.* Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. En: Genet Sel Evol. Vol. 34 (2002); p. 105-116.
- \_\_\_\_\_. Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. En: J Dairy Sci. Vol. 86 No 10 (2003); p. 3164-3166.
- CAMERON, ND. PENMAN, JC. and McCULLOUGH, E. Serum leptin concentration in pigs selected for high and low daily food intake. En: Genetical Research. Vol. 75 (2000); p. 209-213.
- DUNNER, S. y CAÑÓN, J. Aplicaciones de Genómica en Laboratorios de Producción Animal Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria de la UCM. (on line). (2002). <http://www.ucm.es/info/genetvet>. Ultima consulta agosto 2004.
- FERREIRA, M. E. y GRATTAPAGLIA, D. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. EMBRAPA – Cenargen. Brasilia, D. F. (1998).
- FITZSIMMONS, CJ *et al.* A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. En: Mamm Genome. Vol. 6 (1998); p. 432-4.
- \_\_\_\_\_. An investigation into leptin's role as a candidate gene for carcass fat levels in beef cattle. M.Sc. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK. (1999)
- FRIES, R. and RUVINSKY. The Genetics of Cattle. CABI International. New York (1999).
- FRUHBERK, G. JEBB, SA. and PRINCET, AM. Leptin: Physiology and pathophysiology. En: Clin Phusiol. Vol. 18 (1998); p. 399-419
- GEARY, TW *et al.* Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. En: J. Anim. Sci. Vol. 81 (2003.); p. 1-8

GUERRA, MT. TRUJILLO, E. y CERON, M. Estimación de los polimorfismos del gen leptina bovino en poblaciones de las razas criollas Hartón del Valle, Blanco Orejinegro (BON) y en la raza Brahman. En: Rev Col Cienc Pec. Vol. 18 No 3 (2005); p. 215-221

HALLE, M *et al.* Concurrent reductions of serum leptin and lipids during weight loss in obese men with type II diabetes. En: Am J Physiol. Vol. 277 (1999); p. 277-282.

HEDRICK, HB *et al.* Principles of Meat Science. 3rd. ed., Kendall Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa. (1994); p. 1, 3, 274, 289, 317.

HOSSNER, KL. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production. En: Canadian Journal of Animal Science. Vol. 78 (1998); p. 463-472.

HOUSEKNECHT, KL *et al.* The Biology of Leptin: A Review. En: J. Anim. Sci. Vol. 76 (1998); p. 1405-1420

LEÓN, OS. Manual de Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Carnes Frescas. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez P. R. (1995); p. 1-6.

LIEN, S *et al.* Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). En: Anim. Genet. Vol. 28 (1997); p. 245.

LIEFERS SC. Physiology and genetics of leptin in periparturiant dairy cows. Ph.D. Thesis, Wageningen University. Wageningen, UR (2004).

MARGETIC, S *et al.* Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. En: Int J Obes Relat Metab Disord. Vol. 26 No11 (2002); p. 1407-33.

MARTÍNEZ, H. Tendencias de la producción y consumo de carnes en el mundo y en Colombia (1961-200). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Bogotá. Col. (online). (2002). <http://www.agrocadenas.gov.co>

MASUZAKI, H *et al.* Augmented expression of the obese gene in the adipose tissue from rats fed high-fat diet. En: Biochem Biophys Res Commun. Vol. 2 No 216 (1995); p. 355-358.

MORAN, JB. Brahman cattle in temperate environment. Liveweight gains and carcass characteristics. En: Journal of Agriculture Science. Vol. 69 (1970); p. 4469.

NISHIMURA, T. HATTORI, A. and TAKAHASHI, K. Structural Changes in Intramuscular Connective Tissue During the Fattening of Japanese Black Cattle: Effect of Marbling on Beef Tenderization. En: J. Anim. Sci. Vol. 77 (1999); p. 93-104

PAGÁN, M. Características químicas y organolépticas de músculos del cuarto trasero de toretes Holstein, Charbray y Brahman. Tesis M. S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P. R. (1997).

PEARSON, AM. and DUTSON, TR. Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products, 1st edition. Blackie Academic & Professional, New Cork (1994); p. 9, 18-19, 48-50, 79, 289-331, 480, 486, 489.

PINZÓN, ME. Historia de la ganadería en Colombia. En: Revista Costa Ganadera. Vol. 8 No. 28 (1996); p. 6-8. 43.

RAMSEY, CB *et al.* Effects of type and breed of British, Zebu and dairy cattle on production, palatability differences and cooking losses as determined by laboratory and family panels. En: J Anim Sci. 22(1963); p. 1001.

RAYMOND, M. and ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exotic tests and ecumenicist. En: J. Heredity. Vol. 86 (1995); p. 248-249

SHERBECK, JA *et al.* Feedlot performance, carcass traits, and palatability traits of Hereford and Hereford x Brahman steers. En: J Anim Sci. Vol. 73 No. 12 (1995); p. 3613-3620.

SMITH, SB *et al.* Intramuscular fat deposition: The physiological process and the potential for its manipulation. Proc. 2000 Plains Nutrition Council Spring Conference. 1-11 (2000).

STONE, RT *et al.* The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. En: Mamm Genome. Vol. 7 (1996); p. 399.

\_\_\_\_\_. Cow marker, locus G18586, STS BM 1500. National Center for Biotechnology Information NCBI, United State. (online). (1996). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

\_\_\_\_\_. Two polymorphic microsatellites within an 18kb genomic clone containing the bovine ob gene. En: Anim. Genet. Vol. 27 (1997); p. 64.

TARTAGLIA, LA *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. En: Cell. Vol. 83 No. 7 (1995); p. 1263-1271

TESSANE, K. HINES, HC. and DAVIS, ME. Relationships of polymorphisms in the bovine leptin gene with differences in beef carcass traits. Research and Reviews: Beef and Sheep, Special Circular 170-99. (online) (1999) <http://ohioline.osu.edu/sc170/sc170>.

WEGNER, J *et al.* Relationship of plasma leptin concentration to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle. En: Can. J. Anim. Sci. 81(2001); p. 451-457.

WILKINS, RJ and DAVEY, HW. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. En: Anim Genet. Vol. 28 No. 5 (1997); p. 376.

WHIPPLE, G *et al.* Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos indicus cattle. En: J Anim Sci. Vol. 68 (1990); p. 2721-2722.

ZHANG, Y *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. En: Nature Vol. 372 (1994); p. 425-432.

ZHANG, F *et al.* Crystal structure of the obese protein leptin-E100. En: Nature. Vol. 387 (1997); p. 206-209.



## ANEXO B: EXTRACCIÓN DE ADN MÉTODO “SALTING – OUT”

Este método de extracción se basa en la precipitación de sales para descubrir el ADN, se usan 2 ml de sangre total periférica colectada en tubos al vacío (*Vacutainer*) con anticoagulante EDTA.

1. 2 ml de sangre en tubos Falcom de 50 ml, ajustar a 35 ml con buffer de lisis I
2. Centrifugar a 3200 rpm por 5 min.
3. Secar tubos invertidos y adicionar:
  - 1300  $\mu$ l de Buffer de lisis II
  - 500  $\mu$ l de Perclorato de Sodio
  - 40  $\mu$ l de Dodesil sulfato de sodio (SDS)
4. Dar Vortex vigorosamente hasta deshacer el botón.
5. Adicionar 500  $\mu$ l de NaCl (6 M).
6. Dar Vortex vigorosamente por 15 seg.
7. centrifugar a 2800 rpm por 7 min
8. Transferir sobrenadante a tubos Falcom de 15 ml.
9. Adicional un volumen de Isopropanol (Conservado a -20°C)
10. Reposar y retomar con cuidado las proteínas que quedan en la interfase.
11. Mezclar por inversión hasta que aparezca la malla (ADN)
12. Pescar la malla y lavar con Etanol al 70% (4°C)
13. Resuspender en TE (50  $\mu$ l) y poner a 65 °C por 30 min.

### PREPARACIÓN DE BUFFER DE LISIS I (1 litro)

Sucrosa		102.69 g
Tris – HCl	Stock 1M	10 ml
MgCl <sub>2</sub> 1 M		5 ml
Triton 100X		10 ml

Ajustar el volumen final con H<sub>2</sub>Odi y almacenar a 4°C



## PREPARACIÓN DE BUFFER DE LISIS II (50 ml)

NaCl 6 M	625 $\mu$ l
EDTA 0.5 M	2.4 ml a pH 8.0

Ajustar volumen final de 50 ml con H<sub>2</sub>Odi y almacenar a temperatura ambiente.

### ANEXO C: MICROSATÉLITE ST DESCRITO POR STONE (1996)

El microsatélite ST descrito por Stone (1996) esta registrado en la base de datos del Centro Nacional de Investigaciones Biotecnológicas de los estados Unidos (NCBI) con numero de acceso G18586 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

En la secuencia de abajo, los mostrados en negrilla, se adhieren al genoma con sus bases complementarias amplificando solamente una región que comprende repeticiones de las bases citosina y adenina en negrilla y subrayadas:

Primers:        A (5' -GAT GCA GCA GAC CAA GTG G- 3') Forward  
                  B (5' -CCC ATT GCT AGA ACC CAG G- 3') consensus reverse

CCCACTTGGCAGTTCCTTGCAGCGTCCCCTTCTCCACAGACAAGCTTGCCTCTT  
GGTTCCCAAGAAGCTGGTGGCCTCCAGACATAANCTCCCTCACCTTCCCTCTT  
GTCCTGGGG**GATGCAGCAGACCAAGTGG**GAGCCTCCATGTTAAGG  
TAGGAGGTGTTTCTCTAGATACACACACACACACACACACACA  
CACACTAGAAGTTTAGCTGGGCCAGGGAGGCCTAC**CCTGGGTTCTA**  
**GCAATGGG**G.