

## **Polimorfismos del gen *ob* en bovinos de raza holstein en la Comarca Lagunera, México**

### ***Ob* Gene Polymorphisms in Holstein Cattle at Comarca Lagunera, Mexico**

Sarai S. Mendoza-Retana<sup>1</sup>, Miguel A. Gallegos-Robles<sup>2</sup>, Uriel González-Salas<sup>2</sup>, José L. García-Hernández<sup>2</sup>, Manuel Fortis-Hernández<sup>3</sup>, Cirilo Vázquez-Vázquez<sup>2</sup> y Héctor I. Trejo-Escareño<sup>2</sup>

**Palabras Clave:** leptina; genotipos; calidad; producción de leche

Recepción: 20-06-17 / Aceptación: 13-09-17

---

### **Resumen**

La Comarca Lagunera es la cuenca lechera más importante de México. En la actualidad se están utilizando diversas técnicas que permiten evaluar genéticamente el animal a una edad temprana, permitiendo seleccionar futuros reproductores con características deseables. Entre los genes relacionados con la producción de leche, se encuentran el gen *Ob* también llamado gen Leptina el cual actúa sobre el sistema nervioso central y tejidos periféricos jugando un papel muy importante en la modulación regulación del apetito, ganancia de peso vivo, incremento del metabolismo energético y el anabolismo muscular. Este trabajo se realizó para determinar el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción *ACI* I de gen leptina en el exón 2 y correlacionarlo con los parámetros de producción y calidad de leche. Se recolectaron 100 muestra de sangre de vacas en producción del establo “Lácteos Florida” de Francisco I. Madero municipio de Coahuila, México con tres estatus de producción: altas, medias y bajas La extracción de ADN se realizó por el método modificado de Salting-Out. Se realizó PCR del gen leptina originando un fragmento de 272 bp de longitud y se realizó PCR-RFLP con la enzima de restricción *ACI* I y secuenciación, correlacionando los genotipos TT, CT Y CC con tres estatus de producción de leche: altas, medias, bajas. El análisis estadístico indicó que las vacas portadoras del genotipo homocigoto (TT) tienen un efecto significativo ( $P < 0.01$ ) con respecto a las características de producción y calidad de leche ya que tuvieron un mayor consumo de alimento, ganancia de peso, además de una elevada producción de leche en comparación a los genotipos heterocigoto (CT) y homocigoto (CC). Los resultados obtenidos muestran que la identificación molecular de polimorfismos del gen *Ob* puede usarse como herramienta de selección genética en bovinos de raza Holstein.

<sup>1</sup>Doctorado DICAF, Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango. E-mail: garoma64@hotmail.com

<sup>2</sup>Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango

<sup>3</sup>Instituto Tecnológico de Torreón, Torreón, Coahuila

## **Abstract**

The Laguna Region is the most important dairy region of Mexico. Currently are using various techniques to genetically evaluate the animal at an early age, allowing to select future breeding with desirable characteristics. Among related genes to milk production, are the *Ob* gene also called Leptin gene which acts on the central nervous system and peripheral tissues playing an important role in regulating modulation of appetite, body weight gain, increased metabolism energy and muscle anabolism. This study was performed to determine polymorphism restriction fragment length *ACI* I of Leptin gene in exon 2 and correlate it with the production parameters and milk quality. Blood sample of one hundred cows were collected on the dairy farm "Lacteos Florida" Francisco I. Madero municipality of Coahuila, Mexico with three status of milk production: high, medium and low. DNA extraction was performed by the modified method of Salting-Out. PCR of leptin gene was performed resulting in a fragment of 272 bp in length and was subjected to PCR-RFLP with the *ACI* I restriction enzyme and sequencing, correlating TT, CT and CC genotypes with groups of cows sampled high, medium, low producers respectively. Statistical analysis indicated that cows carrier the homozygous genotype (TT) have a significant effect ( $P < 0.01$ ) with respect to the characteristics of production and quality of milk since they had a higher feed intake, weight gain, and a high milk production compared to heterozygote (CT) and homozygote (CC) genotypes. The results show that molecular identification of *Ob* gene polymorphisms can be used as a tool for genetic selection in Holstein cattle.

**Keywords:** leptin; genotypes; quality; milk production.

---

## Introducción

La Comarca Lagunera, ubicada en los estados de Coahuila y Durango es la cuenca lechera más importante de México, concentra la mayor parte del inventario bovino lechero del país, con un promedio de 464,086 cabezas de ganado que representan alrededor de 20% del hato nacional (SAGARPA, 2015). Dada la importancia que los bovinos de leche representan para la región, la selección temprana de vaquillas con alto potencial lechero representaría un ahorro por conceptos de alimentación y cuidados sanitarios.

En la producción de leche influyen factores como la raza, edad, estado sanitario, condición fisiológica y del ambiente, y en todos los casos están influenciadas por los genes, que en un alto porcentaje determinan el comportamiento productivo y reproductivo del animal (Vallone *et al.*, 2014,41; Vásquez *et al.*, 2007, 60; Thomas *et al.*, 2002,757). La producción de leche es una variable continua y está determinada en parte por las enzimas que participan en la ruta metabólica. Cada una de estas enzimas es codificada por un gen específico cuya expresión y variante (alelo) es determinante en la producción y calidad de la leche. En los programas de mejoramiento genético tradicional se busca identificar aquellos animales que portan genes (alelos) que mejoran esta característica, aunque no necesariamente se conozca cuál es ese gen o su forma (alelo).

Los estudios realizados en ganado bovino a nivel molecular han permitido estudiar características productivas de gran importancia para el mejoramiento animal, y han llevado a la búsqueda de marcadores genéticos para la identificación de genes asociados a caracteres de interés (Martínez *et al.*, 2012, 294; Piñeira *et al.*, 2012, 45; White *et al.*, 2005, 2001). Entre los genes relacionados con la producción y calidad de leche, se encuentra el gen *Ob* también llamado gen leptina. El producto de este gen es la hormona proteica leptina de 16-KDa, compuesta por 146 aminoácidos, secretada por los adipocitos a la sangre y desempeña funciones importantes en el control del peso corporal, la deposición de grasa, consumo de alimento, la función inmune, y la reproducción en ganado. (Javanmard *et al.*, 2010, 10; Quintero y Ruíz, 2008, 98; Nkrumah *et al.*, 2005, 26; Huang *et al.*, 2014, 11997).

Se han descrito varios polimorfismos (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) en el exón dos del gen *Ob* (Yoo *et al.*, 2005, 1551). Uno de estos polimorfismos es la sustitución de citosina(C) por timina (T), que a su vez conduce al remplazo del aminoácido arginina por cisteína en la proteína leptina, originando una modificación en la estructura de la proteína que bloquea la capacidad para ser identificada por los receptores en el hipotálamo, suprimiendo la sensación de saciedad del

animal, por lo que consumen más alimento, reflejándose en un aumento de producción de leche entre otras características (Cerón-Muñoz *et al.*, 2009, 372).

Este polimorfismo genera dos alelos, el T y el C, siendo el alelo T el mutado y el C el alelo normal, asociados respectivamente a la leptina modificada y leptina común. El alelo T también se ha asociado con el mayor contenido de grasa en la canal (Dias *et al.*, 2007, 4; Souza *et al.*, 2010, 440; Cerón-Muñoz *et al.*, 2009, 379).

Como el animal recibe sólo un alelo por par de genes de cada progenitor, en relación con el gen *Ob* el genotipo de las vacas puede ser: CC (ambos alelos codifican la leptina común); TT (ambos alelos codifican la leptina modificada) y CT (cada alelo codifica un tipo de leptina). En su comportamiento, 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 (Montoya *et al.*, 2009, 43). Los tres genotipos para la producción de leptina han sido encontrados en todas las razas bovinas, pero en diferentes proporciones (Corva *et al.*, 2007, 243).

Debido a que el gen de *Ob* y sus polimorfismos representan una función muy importante en los sistemas de producción y calidad de leche, el uso de este gen como marcador genético podría ser una opción eficiente para selección de becerras en edad temprana, y se asume que conociendo la condición genética del animal, se puede conocer el tipo de leptina que produce y por lo tanto ser un indicador de cuál será su potencial productivo y de calidad de la leche desde su nacimiento.

En este contexto, el objetivo de esta investigación fue determinar la relación existente entre los genotipos generados (CC, CT, TT) por el polimorfismo del exón 2 del gene *Ob* y las características de producción y calidad de la leche en vacas Holstein en lactancia.

## **Método**

### **Selección de animales**

Para el estudio se seleccionaron 100 vacas de raza Holstein en servicio activo con 2 a 7 lactancias y con 60 a 70 días posparto, de tres grupos de producción de leche: 34 altas productoras ( $\mu = 43.42$  litros/día  $\pm 4.3$  L), 31 medias productoras ( $\mu = 33.47$  litros/día  $\pm 1.4$  L), 35 bajas productoras ( $\mu = 24.68$  litros/día  $\pm 2.8$  L). Todas las vacas pertenecían al establo “Lácteos Florida” ubicado en el municipio Francisco I. Madero Coahuila, México.

## Obtención de muestras de sangre

De las vacas seleccionadas se recolectaron muestras de sangre de la arteria coccígea en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA y las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio en un congelador y almacenadas a -20 °C para la posterior extracción de ADN en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agricultura y Zootecnia, ubicada en el ejido Venecia municipio de Gómez Palacio, México.

## Extracción de DNA

La extracción de ADN a partir de la sangre de las vacas se realizó mediante la metodología Saltin-Out (Rivera *et al.*, 2010, 5), con algunas modificaciones. Se tomaron 300 µL de sangre y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml; enseguida se agregaron 540 µL de solución lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM pH 8, TritonX-100 1% y Sacarosa 11%), luego se centrifugó a 1200 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante, este paso se realizó 3 veces hasta que se lavó perfectamente de las células anucleadas. Posteriormente se añadieron 180 µL de la solución lisis de glóbulos blancos (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 400 mM; EDTA 2 mM), más 30 µL de la solución de proteinasa K (Proteinasa K 20 mg/ml, SDS 1%, EDTA 2mM), más 6 µL SDS 20%, y la mezcla se agitó durante 5 minutos con vórtex hasta obtener la disolución completa de la pastilla. Enseguida se incubó a 65°C por 1 h agitándolo cada 10 min. Posteriormente se añadieron 30 µL de acetato de potasio 3M, se centrifugó a 1200 rpm por 10 min, y se recuperó el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Para conseguir la precipitación del ADN se agregaron 200 µL de isopropanol frío (-20°C) y se dejó reposar durante 30 min, transcurrido el tiempo se centrifugó a 1200 rpm por 10 min, y se descartó el sobrenadante para obtener el pellet; con el objetivo de conseguir mayor pureza de ADN se añadió 200 µL de etanol 70% frío (-20°C) y se centrifugó a 200 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante, y el pellet se dejó secar a 37°C por 12 h en incubadora (Boekel Scientific; BOEKEL). Finalmente el pellet se resuspendió en 30 µL de agua libre ARNasas y se almacenó a -20°C para su uso posterior. El ADN obtenido se visualizó en gel de agarosa al 0.8%, y se evaluó la concentración y pureza del ADN por el método de espectrofotometría (NANODRP 1000, Thermo Scientific).

## PCR y Digestión enzimática

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador TC-512 (Tecchne). Los primers utilizados fueron: P2F: 5'-TAACGGAGCACGTGGGTG-3' y P2R: 5'-GCCACGGTTCTACCTCGTCT-3' (accesion GenBank: HE605298). Las reacciones de amplificación fueron las siguientes: se utilizó un volumen de 20 µL que contenía aproximadamente 50 ng de ADN, buffer de reacción 1X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02 mM dNTPs, 0.125 µM de cada uno de los primer, 1U de Taq DNA Polimerasa (BIOLINE®) y agua Milli-Q para completar el volumen final de 20 µL. El perfil térmico de amplificación de los productos de PCR consistió en lo siguiente: 95°C durante 1 minuto para desnaturalización inicial. Enseguida 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos para pegado de los primers, 72°C por 30 segundos para la generación del producto de PCR, y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa 1.0 % durante 60 minutos a 86 voltios y se tiñeron con bromuro de etidio. Asimismo, los productos de PCR se sometieron a digestión con la enzima *Aci I* (*Arthrobacter citreus*) que reconoce el sitio de corte CCGC, a 37 °C durante 3 horas con la siguiente mezcla reactiva: 10 µl del producto de PCR, 2 µl del amortiguador de digestión, 1 µl enzima de restricción y 18 µl de agua desionizada. Los productos de digestión se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio. Los genotipos se determinaron basados en la diferencia de tamaño de los fragmentos en el gel. Adicionalmente, se realizó una digestión “*In Silico*” con el software GENTle (V 2.0) para corroborar el número y tamaño de los fragmentos esperados y que éstos coincidieran con los productos esperados a partir de la digestión “*In Vitro*” del producto de PCR.

## Identificación del polimorfismo

El producto de PCR obtenido a partir del gen *Ob* de las vacas de cada grupo de producción de leche se secuenció en el IPICYT (Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica), San Luis Potosí, S.L.P, México, con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se sometieron al análisis BLAST servidor NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para detectar homología de las secuencias de interés con secuencias reportadas del gen *Ob* en el GenBank.

## **Muestras de leche**

Se colectaron 50 ml en tubos falcon (Falcon®) de plástico de muestra de leche individual de cada una de las 100 vacas ya identificadas durante las ordeñas de la mañana y de la tarde. Esta actividad se realizó durante ocho semanas. Los tubos conteniendo las muestras de leche se identificaron con el número de la vaca, fecha de colecta y ordeña, e inmediatamente después de obtenidas, etiquetadas y selladas, las muestras se transportaron en hielo al laboratorio para su análisis dentro de las siguientes cuatro horas.

## **Análisis físico-químico de muestras de leche**

Las muestras de leche se analizaron en el Laboratorio de lácteos de la Facultad de Agricultura y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Las muestras se calentaron a baño María hasta alcanzar 35°C y mezcladas suavemente antes de ser analizadas en el equipo LactiCheck LC-02 (PAGE & PEDERSEN) el cual determina de forma automática los porcentajes de grasa, proteína y sólidos totales de la muestra.

## **Variables de producción y calidad evaluadas**

En el estudio se realizaron registros diarios de producción de leche (PL) en litros, consumo de materia seca (CMS) en kilogramos, peso vivo del animal (PVA) en kilogramos. Las variables de calidad de leche porcentaje de grasa (PG), porcentaje de proteína (PP), contenido de sólidos totales (ST), fueron determinadas a partir del análisis físicoquímico realizados con el equipo LactiCheck LC-02 (PAGE & PEDERSEN).

## **Análisis estadístico**

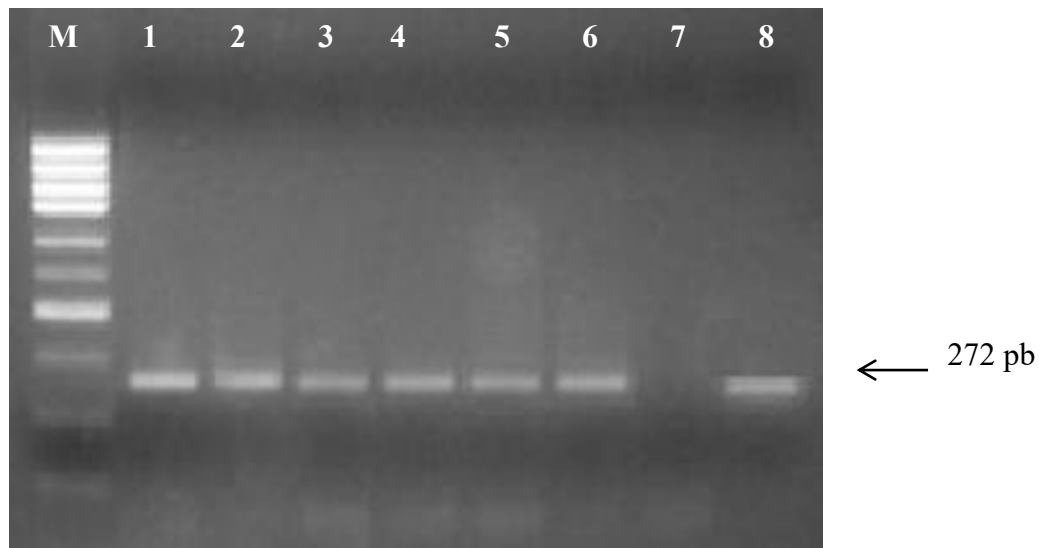
Se realizó un análisis de correlación de Spearman para determinar asociaciones entre las variables de producción y calidad de leche, además se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para probar la dependencia de los componentes de producción y calidad de la leche con los genotipos de leptina. Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = b_0 + b_{1i}NL + b_{2j}DL + b_{3k}G_k + e_{ijk}$$

Dónde:  $Y_{ijk}$  valor observado para la variable de interés: producción de leche (PL), consumo de materia seca (CMS), peso vivo del animal (PVA), porcentaje de grasa (PG), porcentaje de proteína (PP), sólidos totales (ST);  $b_0$  es la media general de la población para las diferentes características;  $b_{1iNL}$  es el coeficiente de regresión lineal de las variables dependientes sobre el número de lactancias;  $b_{2jDL}$  es el coeficiente de regresión lineal de las variables dependientes sobre los días lactando;  $b_{3Gk}$  es el efecto medio que se espera ocurra sobre  $b_0$  en función del genotipo leptina ( $k = TT, CT, CC$ ), el cual se analizó como una variable Dummy;  $e_{ijk}$  es el efecto residual aleatorio. Los datos se analizaron en SAS (V 9.0), utilizando las opciones GLM, correlación de Spearman y comparación de medias con la prueba diferencia mínima significativa (DMS).

## Resultados

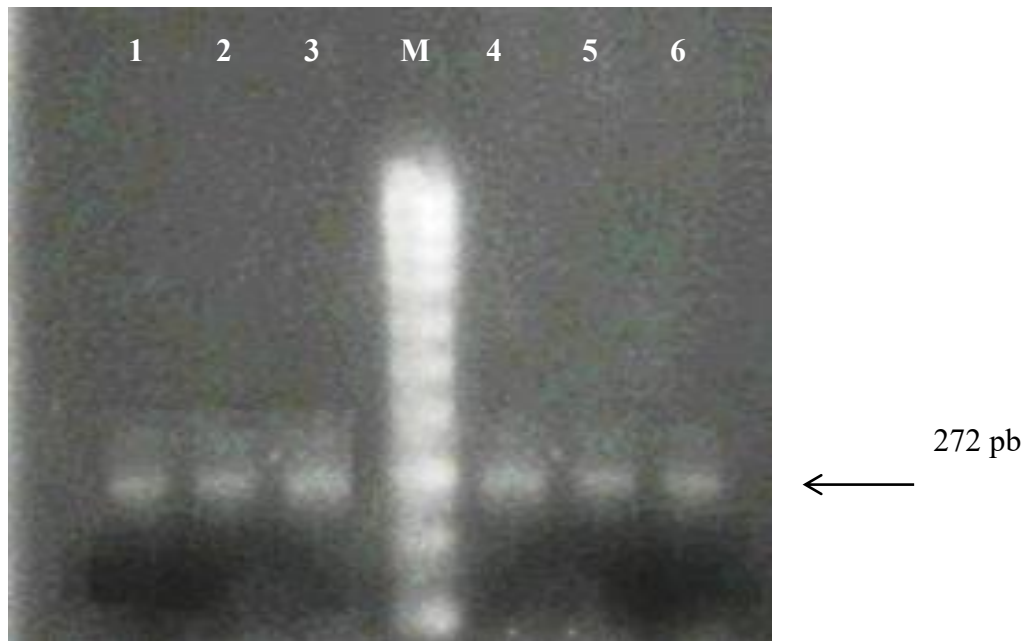
La extracción de ADN de las muestras de sangre se obtuvo en cantidad y calidad adecuada para poder realizar PCR. Los productos de PCR fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % mostrando que los primers diseñados fueron eficientes para generar a partir del gen *Ob* el producto de PCR esperado de 272 pb (Figura1).



**Figura 1.** Productos de PCR a partir gen *Ob* con un fragmento de 272 pb de longitud. M: Marcador molecular de 1000 pb. Carriles 1-6 y 8 productos de PCR, carril 7: control negativo.

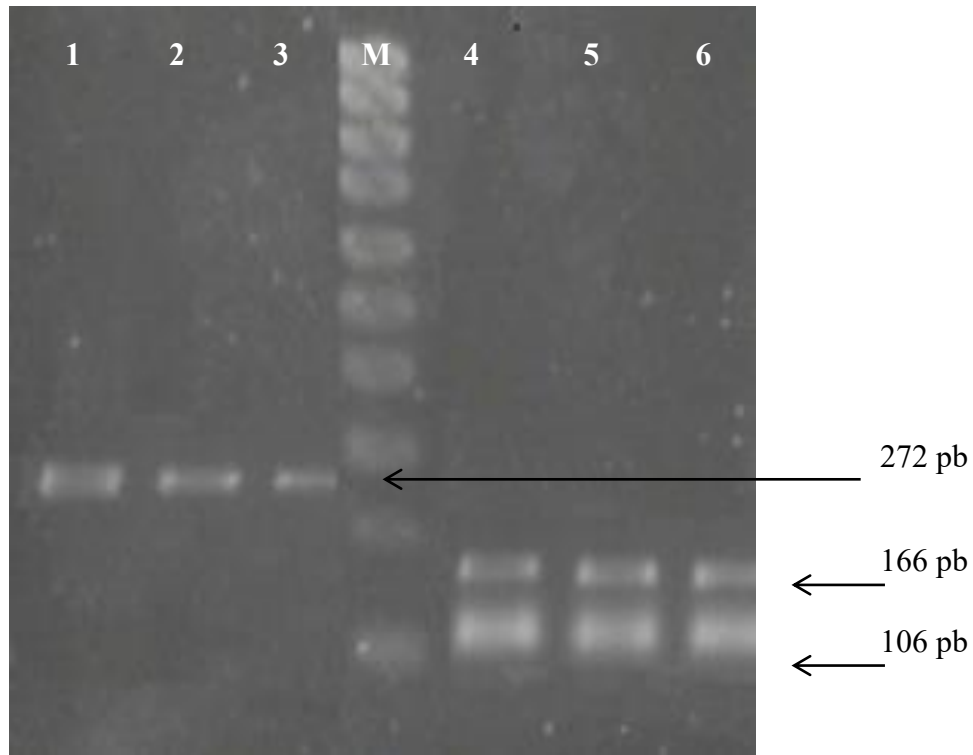


La digestión de los productos de PCR de 272 bp de longitud con la enzima de restricción *Aci* I generó tres patrones de restricción. El primer patrón de restricción consistió en el fragmento intacto de PCR de 272 bp, el cual no fue cortado por la enzima debido a que no presenta el sitio de corte ya que posee el polimorfismo o sustitución de citosina por timina C/T, y el cual está asociado con el genotipo homocigoto TT (Figura 2).



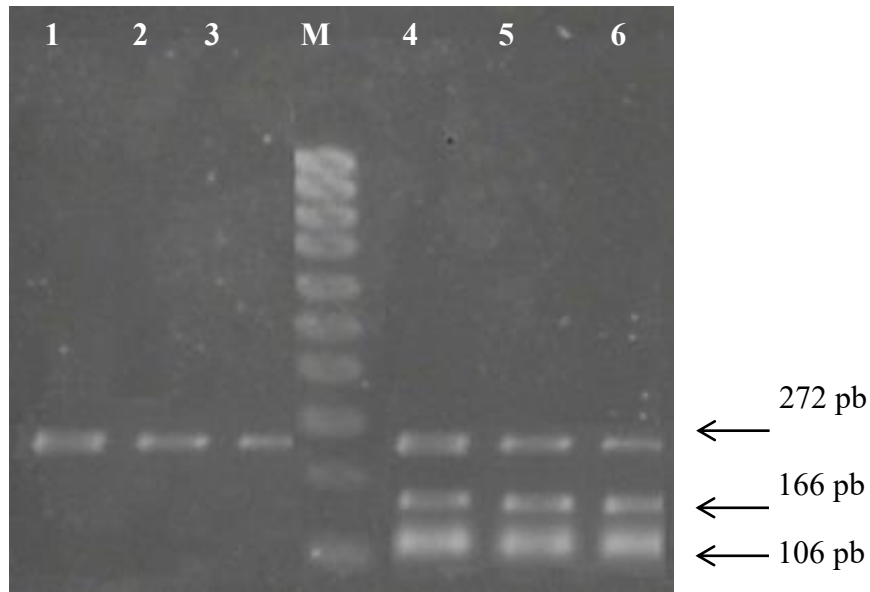
**Figura 2.** Patrón de restricción para el genotipo TT. Carriles 1-3, productos de PCR de 272 pb sin digerir. Carriles 4-6, mismos productos de PCR después de la digestión enzimática (enzima *Aci* I) mostrando un único fragmento de 272 pb., sin sitio de corte, asociado con el genotipo TT. M: marcador molecular de 1000 pb.

El segundo de los patrones de restricción presentó dos fragmentos, uno de 106 y otro de 166 pb de longitud asociados con el genotipo homocigoto CC. El alelo C codifica para la leptina normal y no presenta la mutación, y al no estar modificado el sitio de corte CCGC la enzima lo reconoce y genera estos dos fragmentos de diferente longitud (Figura 3).



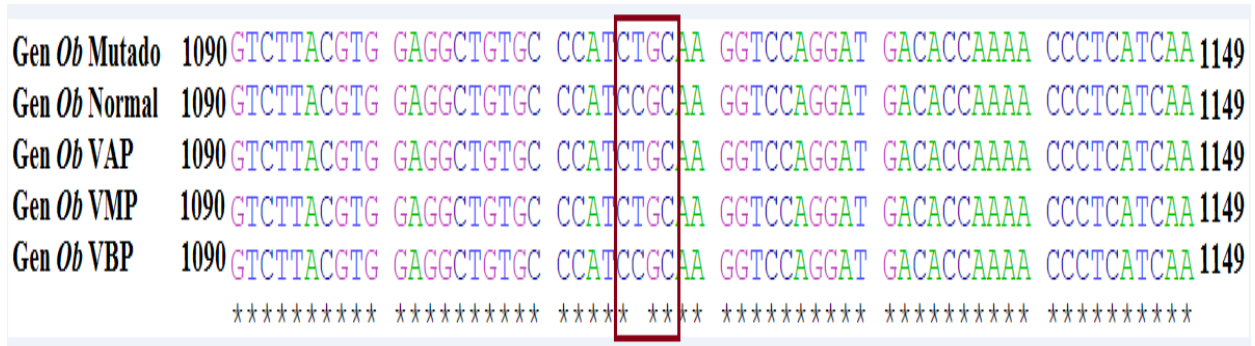
**Figura 3.** Patrón de restricción para el genotipo CC. Carriles 1-3, productos de PCR con un tamaño de 272 pb de longitud. M: marcador molecular de 1000 pb. Carriles 4-6, productos de la digestión enzimática (enzima *Aci I*) mostrando dos fragmentos, uno de 106 pb y otro de 166 pb asociados con el genotipo CC.

El tercero de los patrones de restricción y asociado con el genotipo heterocigoto CT, el cual genera los dos tipos de leptina modificada y común, origina tres fragmentos de diferente peso molecular, un fragmento de 106 y otro de 166 pb originados por el alelo de la leptina normal, y un fragmento de 272 pb correspondiente al alelo de la leptina modificada (Figura 4).



**Figura 4.** Patrón de restricción para el genotipo CT. Carriles 1-3, productos de PCR con un tamaño específico de 272 pb de longitud, M: Marcador molecular de 1000 pb. Carriles 4-6, productos de la digestión enzimática (enzima *Aci I*) mostrando tres fragmentos de 272, 106 y 166 pb.

En la Figura 5 se presentan las secuencias del gen leptina mutada y normal obtenidas del Gen Bank (accesion HE605298), en donde se puede observar la transición de citosina (C) por timina (T) ubicada en el cromosoma 4 del exón 2 posición 1115, también se muestran las secuencias genéticas de los productos de PCR del gen leptina de vacas de los tres grupos según su estatus de producción: altas, medias y bajas productoras. La secuencia del gen *Ob* para la leptina de las vacas de alta producción fue similar a la secuencia del gen *Ob* de la leptina mutada del GeneBank, ya que en el sitio específico de la mutación se encontró el nucleótido timina, contrario a la secuencia del gen *Ob* para la leptina de las vacas de baja producción el cual fue igual al alelo normal con la presencia del nucleótido citosina.



**Figura 5.** Secuencia del gen *Ob* para leptina mutada y normal obtenidas del GenBank (*Gen Ob* Mutado y *Gen Ob* Normal), y secuencia de los productos de PCR del gen *Ob* de vacas altas productoras (VAP) medias productoras (VMP) y bajas productoras (VBP). \*= nucleótidos comunes en las secuencias.

El análisis de varianza (Tabla 1) muestra que hubo significancia ( $p < 0.01$ ) en la fuente de variación para el modelo en las variables PL, CMS y PV. Asimismo se observó significancia ( $p < 0.01$ ) para los genotipos TT y CT en las mismas variables.

**Tabla 1.** Análisis de varianza.

FV	GL	PL	CMS	PV	PG	PP	ST
Modelo	4	1533.6**	141.1**	137839.4**	14.72	2.63	2.39
Error	95	9.5	1.3	1273.9	2.09	0.507	0.41
NL	1	0.08	3.3	3228.3	13.698	0.023	0.13
DL	1	49.3	4.8	4719.6	10.041	0.076	0.05
TT	1	4709.2**	422.1**	412384.2**	14.404	7.633	4.27
CT	1	664.1**	79.0**	77211.1**	1.160	0.080	0.35
R <sup>2</sup>		0.87	0.81	0.82	0.22	0.17	0.19
CV		9.0	4.9	4.9	18.17	20.5	6.7

CMS=Consumo de Materia Seca, PV=Peso Vivo, PL= Producción de leche, PG= Porcentaje de grasa, PP= Porcentaje de proteína, ST= Sólidos totales. \*\* = ( $P < 0.01$ ). Nota: Los valores que se muestran corresponden a los cuadros medios de las variables estudiadas.

En la comparación de medias entre genotipos (Tabla 2) se observa que las diferencias entre los valores medios del genotipo TT y los de los genotipos CT y CC, son significativamente diferentes en todas las variables estudiadas, y entre los genotipos CT y CC sólo hubo diferencias significativas en las variables PL, CMS y PV.

**Tabla 2.** Comparación entre genotipos y diferencia entre medias.

Genotipos	PL	CMS	PV	PG	PP	ST
TT vs CT	10.11**	2.64**	82.55**	1.08**	0.65**	0.55**
TT vs CC	18.77**	5.67**	177.43**	1.41**	0.70**	0.71**
CT vs CC	8.65**	3.03**	94.88**	0.33	0.05	-0.15

CMS=Consumo de Materia Seca, PV=Peso Vivo, PL= Producción de leche, PG= Porcentaje de grasa, PP= Porcentaje de proteína, ST= Sólidos totales; TT, CT y CC son los genotipos posibles asociados a las vacas según el SNP del gen *Ob* determinado en cada vaca. \*\*= (P<0.01).

En la Tabla 3 se muestran los modelos de predicción para la producción de leche (PL), consumo de materia seca (CMS) y peso vivo del animal (PV) en función del número de lactancias, días lactando y genotipo del animal. El modelo para producción de leche tuvo un coeficiente de determinación del 0.87. Al hacer la comparación respectiva del modelo para producción de leche (PL) de cada genotipo se obtuvo que cuando las vacas son de genotipo TT, tienen un aumento en la producción de leche diaria de 18.06 L más que el genotipo CC y 10.47 L más que el genotipo CT (ES 0.8122,  $p<0.0001$ ); mientras que las vacas con el genotipo CT tienen una producción mayor de 7.59 L sobre el genotipo CC (ES 0.9095,  $p<0.0001$ ). Para el caso del consumo de materia seca (CMS), las vacas con el genotipo TT consumieron 5.40 kg más de materia seca que las vacas con genotipo CC, y 2.78 kg más que las vacas con genotipo CT (ES 0.3138,  $p<0.0001$ ), asimismo, éstas últimas tuvieron un consumo mayor de 2.62 kg de materia seca que las vacas con genotipo CC (ES 0.3424,  $p<0.0001$ ). Respecto al peso vivo del animal (PV), las vacas con genotipo TT tuvieron en promedio 169.02 kg más peso que las vacas con genotipo CC y 88.02 kg más que las vacas con genotipo CT (ES 9.8066,  $p<0.0001$ ). Por su parte, las vacas con el genotipo CT fueron 81 kg más pesadas que las vacas con genotipo CC (ES 10.7012,  $p<0.0001$ ). En general, las vacas con el genotipo TT tuvieron valores más altos en las tres variables dependientes que las vacas con

cualquiera de los genotipos CT y CC. Los parámetros estimados no fueron significativos para las variables porcentaje de grasa (PG), porcentaje de proteína (PP), y contenido de sólidos totales (ST).

**Tabla 3.** Modelos de predicción por genotipo para las variables producción de leche, consumo de materia seca y peso vivo.

Variable	Modelo	R <sup>2</sup>
<b>PL</b>	PL = 23.91 + 0.023NL + 0.006DL + 18.06TT	0.87
	PL = 23.91 + 0.023NL + 0.006DL + 7.59CT	0.87
	PL = 23.91 + 0.023NL + 0.006DL + 0.0CC	0.87
<b>CMS</b>	CMS = 19.46 + 0.14NL + 0.002DL + 5.40TT	0.82
	CMS = 19.46 + 0.14NL + 0.002DL + 2.62CT	0.82
	CMS = 19.46 + 0.14NL + 0.002DL + 0.0CC	0.82
<b>PV</b>	PV = 608.24 + 4.63NL + 0.06DL + 169.02TT	0.82
	PV = 608.24 + 4.63NL + 0.06DL + 81CT	0.82
	PV = 608.24 + 4.63NL + 0.06DL + 0.0CC	0.82

PL= Producción de leche, CMS=Consumo de Materia Seca, PV=Peso Vivo, NL= No. De lactancias; DL = Días lactando; TT, CT y CC son los genotipos posibles asociados a las vacas según el SNP del gen *Ob* determinado en cada vaca.

Se observaron correlaciones (Tabla 4) positivas y altamente significativas ( $P < 0.01$ ) de la producción de leche (PL) con días de lactancia (DL), consumo de materia seca (CMS), peso vivo de la vaca (PV), porcentaje de grasa (PG), porcentaje de proteína (PP) y con el genotipo TT, y correlación significativa ( $P < 0.05$ ) con sólidos totales (ST). También se observó correlación negativa y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el genotipo CC. La correlación entre producción de leche y el genotipo heterocigoto (CT) no fue significativa.

El consumo de materia seca (CMS) mostró correlación positiva y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con peso vivo de la vaca (PV), porcentaje de grasa (PG), porcentaje de proteína (PP) y con el genotipo TT, y correlación significativa ( $P < 0.05$ ) con sólidos totales (ST). Presentó correlación negativa y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el genotipo CC, y no hubo correlación con el genotipo CT.

El peso vivo de la vaca (PV) mostró correlación en el mismo sentido y magnitud que el CMS con las de más variables.

El porcentaje de grasa (PG) tuvo correlación positiva y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el porcentaje de proteína (PP) y con el genotipo TT, y correlación negativa y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el genotipo CC. La correlación con el genotipo heterocigoto (CT) no fue significativa.

La correlación del porcentaje de proteína (PP) con los sólidos totales y el genotipo TT fue positiva y altamente significativa ( $P < 0.01$ ), pero con los genotipos CT y CC fueron negativas y significativas ( $P < 0.05$ ).

Los sólidos totales (ST) también mostraron correlación positiva y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con los genotipos TT y CT, y correlación no significativa con el genotipo CC.

El genotipo TT mostró correlación positiva y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el CMS, PV, PL, PG, PP y ST; el genotipo CT tuvo correlación positiva y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con ST y correlación negativa y significativa ( $P < 0.05$ ) con PP; el genotipo CC presentó correlación negativa y altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con DL, CMS, PV, PL, PG, y correlación negativa y significativa ( $P < 0.05$ ) con PP y correlación no significativa con ST.

Las correlaciones entre el número de lactancias con las demás variables no fueron significativas ( $P > 0.05$ ).

**Tabla 4.** Matriz de coeficientes de correlación de Spearman.

	NL	DL	CMS	PV	PL	PG	PP	ST
DL	0.011							
CMS	0.175	0.407**						
PV	0.165	0.397**	1.000**					
PL	0.091	0.384**	0.945**	0.935**				
PG	0.230	0.235*	0.369**	0.364**	0.349**			
PP	0.037	0.031	1.000**	0.337**	0.935**	0.369**		
ST	-0.063	0.038	0.248*	0.249*	0.253*	0.051	0.260**	
TT	0.020	0.120	0.830**	0.767**	0.830**	0.371**	0.420**	0.427**
CT	0.158	0.389	-0.032	0.042	-0.032	-0.104	-0.179*	0.285**
CC	0.174	-	-	-	-	-	-0.243*	-0.147
		0.497**	0.792**	0.803**	0.792**	0.267**		

NL= Número de Lactancias, DL= Días de lactancia, CMS= Consumo de Materia seca, PV= Peso Vivo, PL= Producción de Leche, PG= Porcentaje de grasa, PP= Porcentaje de proteína, ST= Sólidos totales, TT, CT, y CC= Son los genotipos posibles para el SNP del gen *Ob*. \*=P<0.05, \*\*=P<0.01.

## Discusión

Existe una relación entre los genotipos estudiados y las características de producción y calidad de la leche, éstos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Ngu *et al.*, 2015, 305; Schenkle *et al.*, 2005, 2018). El presente estudio demostró que la digestión del producto de PCR del gen *Ob* para la leptina con la enzima *Aci* I así como el número y tamaño de los fragmentos observados, se puede usar como herramienta para determinar el genotipo del ganado Holstein respecto al gen *Ob*. Estos genotipos generados se presentan en la mayoría de razas bovinas, pero en diferentes proporciones (Ayres *et al.*, 2010, 2056) y concuerdan con los del ganado *Bos taurus* según estudios realizados por Choudhary *et al.*, (2005, 741).

Los resultados de secuenciación mostraron la sustitución de citosina por timina en el alelo mutado proveniente de las vacas altas productoras (VAP), el cual coincide con la mutación de la secuencia del gen *Ob* mutado obtenida del GenBank. Mientras que en la secuencia del alelo de las vacas bajas productoras (VBP) se observó la presencia de citosina al igual que en la secuencia del alelo normal obtenida del GenBank. Lo anterior coincide con Raoof *et al.*, (2008, 348).

En relación con el genotipo y su potencial productivo, las vacas que se identificaron con el genotipo TT mostraron ser superiores a las vacas con cualquiera de los otros dos genotipos (CT y CC) en todas las variables estudiadas, ya que las vacas con dicho genotipo tuvieron una capacidad de mayor consumo de materia seca lo que a su vez conllevó a un aumento de peso vivo, esto también lo menciona Vallone *et al.*, (2014,43), al igual que Liefers *et al.*, (2002, 1637), quienes señalan que la correlación entre el tamaño de la vaca y el consumo de alimento es alta y positiva, de manera tal que las vacas de mayor tamaño tienen mayor consumo, además se asocia el incremento del consumo de alimento con una mayor producción de leche (Banos *et al.*, 2007, 3196,) ya que las vacas con el genotipo TT alcanzaron mayor producción en el pico de lactancia. Mojtaba *et al.*, (2015, 21) informa de los efectos positivos del genotipo TT con mayor producción diaria de leche. Así mismo para las vacas con genotipo TT se observó un mayor contenido en el porcentaje de grasa y proteína en comparación a las vacas con cualquiera de los otros dos genotipos, esto mismo lo menciona Liefers *et al.*, (2002, 1636). En el caso de homocigoto CC se caracterizaron



por tener un menor consumo y por consiguiente tuvieron un menor peso (Woronuk 2011, 2), además de tener un decremento importante en la producción de leche coincidiendo con lo reportado por Casas *et al.*, (2007, 2810). Por otro lado el genotipo heterocigoto CT tuvo un comportamiento intermedio definido por su estructura en la cual tiene la característica de generar los tipos de leptina común y mutada (Corva *et al.*, 2007, 244).

El principal sitio de acción de la leptina es en el núcleo arcuato del hipotálamo, el cual comprende dos poblaciones de neuronas: la primera libera el neuroléptico y representa la vía orexigénica (inductora del apetito); la segunda comprende neuronas que secretan proopiomelancortina y representa la vía anorexigénica (inductora de saciedad), la leptina inhibe la vía orexigénica y estimula la anorexigénica. La función más importante de la leptina es de reguladora del peso corporal (Dias *et al.*, 2007, 3; Frühbeck 2006, 7). Al producirse la sustitución de citosina por timina en el alelo normal, se altera la estructura de la proteína y bloquea la capacidad para ser identificada por los receptores en el hipotálamo (Buchanan *et al.*, 2002, 113), originando características relacionadas con ganancia de peso.

La correlación entre los días de lactancia, consumo de materia seca, peso vivo y producción de leche fue positiva y significativa ( $P < 0.01$ ) lo cual significa que entre más días de lactancia haya transcurrido, el animal tiende a consumir más y por consiguiente su producción es mayor, es importante mencionar que los muestreos de leche se realizaron durante el pico de lactancia de 60 a 70 días posparto, ya que el objetivo era conocer si el polimorfismo del gen *Ob* afectaba de forma directa el consumo de materia seca y la producción de leche, en donde se pudo observar la existencia de correlaciones significativas entre peso vivo de la vaca y la producción de leche lo cual coincide con Vallone *et al.*, (2014, 43).

Por otro lado se puede observar los efectos positivos del genotipo TT versus el genotipo CC con respecto al aumento de los componentes de la leche como en el caso del porcentaje de grasa y proteína. Además de tener un impacto significativo ( $P < 0.01$ ) sobre la producción de leche, las vacas con genotipo TT tienen un mayor consumo de materia seca lo que a su vez conduce a una ganancia de peso. El genotipo CT no estuvo correlacionado con la ganancia de peso y con las variables de calidad de la leche, tuvo una producción media, asumiendo que su comportamiento intermedio se debe a que generan dos tipo de leptina; normal y mutada; por el contrario el genotipo CC tuvo una alta correlación negativa con la producción y con los componentes de la leche de

manera específica el porcentaje de grasa y proteína, así como un menor consumo de materia seca y menor peso vivo.

Estos resultados demuestran la importancia de sustitución C/T la cual trae consigo un cambio en uno de los aminoácidos alterando de forma radical la estructura la proteína leptina generando que el polimorfismo se relacione con los parámetros como producción y los componentes de calidad de la leche (Liefers *et al.*, 2002,1636)

Se puede concluir que los resultados sugieren que el genotipo TT del gen leptina tiene un efecto positivo sobre el consumo de materia seca, el volumen de producción de leche, y está asociado con el incremento en el contenido porcentual de los distintos componentes de la leche, representando así este polimorfismo un indicador para evaluaciones futuras, y su aplicación práctica en el mejoramiento genético asistido teniendo ventajas económicas para los productores lecheros. Es necesario seguir analizando información sobre otros polimorfismos en el gen leptina y la interacción que pueda existir con polimorfismos en otros genes para poder hacer una mejor selección de animales con características sobresalientes.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se llevó acabo gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al Doctorado En Ciencias Agropecuarias y Forestales, a la Facultad de Agricultura y Zootecnia y a la empresa de Lacteos Florida por haber otorgados los permisos para trabajar en su estable.

## **Referencias**

- Ayres, D. R., Souza, F. R. P., Mercadante, M. E. Z, Fonseca, L. F. S., Tonhati, H., Cyrillo, J. N. S. G., Bonilha, S. F. M., Albuquerque, L. G. (2010). Evaluation of TFAM and FABP4 gene polymorphisms in three lines of Nellore cattle selected for growth. *Journal of Genetics and Molecular Research*. 9(4): 2050-2059.
- Banos, G., Woolliams, J. A., Woodward, B. W., Forbes, A. B., Coffey, M. P. (2007). Impact of Single Nucleotide Polymorphisms in Leptin, Leptin Receptor, Growth Hormone Receptor, and Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT1) Gene Loci on Milk Production, Feed, and Body Energy Traits of UK Dairy Cows. *American Dairy Science Association*. 91: 3190–3200.

- 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
- Casas, E., White, S. N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Bennett, G. L., Smith, T. P. L. (2007). Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *American Society of Animal Science.* 85: 2807-2814.
- Cerón-Muñoz. M. F., Montoya, A. A. E., Trujillo, B. E. R., Ramírez, T. E. J., Monsalve, F. Z. I. (2009). Marcadores del Gen Leptina en Bovinos Cruzados con Angus, Cebú, Romosinuano y Blanco Orejinegro. *Revista Científica. FCV-LUZ.* 19(4): 371-381.
- Choudhary, V., Kumar, P., Bhattacharya, T. K., Bhushan, B., Sharma, A. (2005). DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Genetics and Molecular Biology.* 28(4): 740-742.
- Corva, P. M., Fernández, M. G., Motter, M., Soria, L., Villarreal, E. L., Schor, A., Mezzadra, C., Melucci, L. M., Miquel, M. C. (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.* 27(1): 239-248.
- Dias, S. A. K., Bernal, C. R., Giachetto, P. F. (2007). Gene da Leptina em Ruminantes. *Revista electrónica de Veterinaria.* 8(12):1-13.
- Frühbeck, Gema. (2006). Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem Journal.* 393: 7-20.
- Huang, H., Wei, Y., Meng, Z., Zhang, Y., Liu, X., Guo, L., Lou, J., Chen, G., Lin, H. (2014). Polymorphisms of leptin-b gene associated with growth traits in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *International Journal of Molecular Sciences.* 15: 11996-12006.
- Javanmard, A., Khaledi, K., Asadzadeh, N., Solimanifarjam, A. R. (2010). Detection of polymorphisms in the bovine leptin (LEP) Gene: Association of single nucleotide polymorphism with breeding value of milk traits in Iranian Holstein cattle. *Journal of Molecular Genetics* 2:10-14.
- Liefers, S. C., Pas, M. F., Veerkamp, R. F., Van der, L. T. (2002). Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science.* 85(6): 1633–1638.

- Martínez, N. C. A., Manrique, P. C., Elzo, M. A. (2012). Cattle genetic evaluation: a historical perception. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*. 25: 293-311.
- Mojtaba, R., Ziaeddin, M. S., Hossein, Z. N. G. (2015). Análisis de PCR-RFLP del gen de leptina y su asociación con características de la leche en ganado nativo (*Bos indicus*) de Irán. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*; 6(1): 15-24.
- Montoya, A. A. E., Cerón, M. M. F., Trujillo, B. E., Ramirez, T. E. J., Angel, M. P. A. (2009). Frecuencia de los marcadores del gen leptina en razas bovinas criollas y colombianas: I. Romosinuano, Chino Santandereano, Sanmartinero y Velásquez. *Revista Científica FCV-LUZ*. 19(1): 38 – 48.
- Ngu, N. T., Quynh, L. T., Hon, N. V., Nhan, N. V., Khoa, D. V., Hung, L. T., Xuan, N. H. (2015). Influence of Leptin genotypes on milk fat and protein content of crossbred Holstein Friesian x lai sind cows. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 25: 304-308
- Nkrumah, J.D., LI, C., YU, J., Hansen, C., Keisler, D. H., Moore, S. S. (2005). Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *Journal of Animal. Science*. 83(1): 20-28.
- Piñeira, J., Ríó, J., Floody, H., Felmer, R. (2012). Distribución de polimorfismos asociados al grado de infiltración de grasa intramuscular en siete razas bovinas de carne utilizadas en la Región de La Araucanía, Chile. *Revista de Medicina Veterinaria* 44: 43-52.
- Quintero, V. J. C., Ruíz, C. Z. T. (2008). Efectos de la leptina en el inicio de la pubertad en animales machos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21: 97-108.
- Raooof, A. A., Eftekhari, S. F., Reza N. M., Heravi, M. A., Heydarpour, M., Sadeghi, B. (2008). Association of SNP in the exon II of leptin gene with and reproduction traits in holstein iranian Cows. *Biotechnology*. 7(2): 347-350.
- Rivera, A. M., Rojas, E. M., Zapata, D. P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*. 14:4-7.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Anuario estadístico de la producción agropecuaria. Delegación Comarca Lagunera <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera>. (11 Julio, 2015).
- Schenkle, 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 polymorphism in the

- leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*. 83: 2009-2020.
- Souza, F. R. P., Mercadante, M. E. Z., Fonseca, L. F. S., Ferreira, L. M. S. Regatieri, I. C., Ayres, D. R., Tonhati, H., Silva, S. L., Razook, A. G., Albuquerque, L. G. (2010). Assessment of DGAT1 and LEP gene polymorphisms in three Nelore (*Bos indicus*) lines selected for growth and their relationship with growth and carcass traits. *American Society of Animal Science*. 88: 435-441.
- Thomas, M. G., Enns, R. M., Hallford, D. M., Keisler, D. H., Obeidat, B. S., Morrison, C. D., Hernandez, J. A., Bryant, W. D., Flores, R., Lopez, R., Narro, L. (2002). Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. *Journal of Animal Science*. 80(3): 757-767.
- Vallone, R., Camiletti, E., Exner, M., Mancuso, W., Marini, P. (2014). Análisis productivo y reproductivo de vacas lecheras Holstein, Pardo Suizo y sus cruzas en un sistema a pastoreo. *Revista Veterinaria*. 25(1): 40-44.
- Vásquez, R. E., Ballesteros, H. H., Muñoz, C. A. (2007). Factores asociados con la calidad de la carne. I parte: la terniza de la carne bovina en 40 empresas ganaderas de la región Caribe y el Magdalena Medio. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(2): 60-65.
- White, S. N., Casas, E., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, C. C., Johnson, D. D., Keele, J. W., Smith, T. P. L. (2005). A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*. 83(9): 2001-2008.
- Woronuk, G. N., Marquess, F. L., James, S. T., Palmer, J., Berryere, T., Deobald, H., Howie, S., Kononoff, P. J. (2011). Association of leptin genotypes with beef cattle characteristics. *Journal of Animal Genetics*. 68:1-3.
- Yoon, D. H., Cho, B. H., Park, B. L., Choi, Y. H., Cheong, H. S., Lee, H. K., Chung, E. R., Cheong, I. C., Shin, H. D. (2005). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 18(11): 1548-1551.