

FRECUENCIA DE LOS MARCADORES DEL GEN LEPTINA EN RAZAS BOVINAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS: I. ROMOSINUANO, CHINO SANTANDEREANO, SANMARTINERO Y VELÁSQUEZ¹

Frequency of Leptin Gene Markers in Creole and Colombian Cattle: I. Romosinuano, Chino Santandereano, Sanmartinero and Velásquez breeds

Alba Eunery Montoya A^{2,3*}, Mario Fernando Cerón-Muñoz^{3,4}, Esperanza Trujillo B³, Edison Julian Ramirez T.³ y Paula Andrea Angel M.³

¹ Proyecto financiado por Colciencias y el CODI, Universidad de Antioquia, ² Estudiante de Maestría en Biología, Universidad de Antioquia, ³ Grupo de Genética y Mejoramiento Animal, Universidad de Antioquia, ⁴GRICA, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. *E-mail: aemontoya@matematicas.udea.edu.co

RESUMEN

La leptina es una hormona de 146 aminoácidos, secretada al torrente sanguíneo por los adipocitos blancos. Está asociada a diferentes características productivas y reproductivas en animales de granja. Los objetivos de este trabajo fueron determinar los polimorfismos de tres marcadores moleculares del gen leptina: Un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) y los microsatélites BM1500 (ST) en la región 3' y un marcador de la región 5'UTR (WD), los cuales fueron amplificados por la técnica de PCR y visualizados en geles de agarosa después de ser sometidos a restricción para el SNP y en geles de poliacrilamida para los microsatélites y establecer la asociación, mediante análisis de varianza, de estos marcadores con peso corporal, área de ojo de lomo (AOL), Espesor de Grasa Dorsal (EGD), características medidas a partir de imágenes de ultrasonido tomadas. Se muestrearon 252 animales de 3 razas criollas y una colombiana de diferentes núcleos de Colombia. Para el SNP, la mayor frecuencia del alelo T se presentó en la raza Sanmartinero (0,66) y la menor en la raza Chino Santandereano (0,23). Para el microsatélite BM 1500 (ST) se encontraron cinco alelos diferentes (136; 138; 144; 146 y 148), siendo los más frecuentes para todas las razas 136 (entre 0,31 y 0,76) y 144 (entre 0,15 y 0,65) y para WD se identificaron 13 alelos, siendo los más frecuentes 183 (entre 0,038 y 0,63) y 177 (entre 0,14 y 0,46). Sólo se encontró asociación en la raza Velásquez, del alelo 146 del microsatélite ST con mayor peso corporal entre los 18 y 24 meses de edad ($P \leq 0,05$).

Palabras clave: Calidad de carne, marcadores moleculares, leptina, ultrasonido.

ABSTRACT

Leptin is a 146 amino acids hormone that it is secreted predominantly by white adipocytes. It has been associated to different productive and reproductive traits of farm's animals. The aims of this study were to determine polymorphisms of three molecular markers of the leptin gene: A Single Nucleotide Polymorphism (SNP), the microsatellites ST (or BM1500) at the 3'UTR region, and WD at the 5'UTR. The amplification was made for PCR technique and was run in agarosa gel after the restriction for SNP and polyacrylamide gel for microsatellites. In order to establish the association of these markers with body weight, rib eyes area, and backfat thickness, Analysis of Variance (ANOVA) was used and data was obtained using ultrasound images. Samples were taken from 252 animals of three creole and one Colombian breed cattle out of different nuclei from Colombia. For the SNP, T allele frequency was larger in Sanmartinero breed and lower in Chino Santandereano breed. For the microsatellite BM 1500 five different alleles were found (136, 138, 144, 146 and 148). Among these, alleles 136 (between 0.31 y 0.76) and 144 (between 0.15 and 0.65) appeared more often. Also, in WD 13 alleles were identified, being allele 183 (between 0.038 and 0.630) and allele 177 (between 0.14 and 0.46) the most common. Finally, for the Velasquez breed the only association found occurred between the microsatellite ST allele 146 and larger body weight in individuals between 18 – 24 months ($P \leq 0.05$).

Key words: Meat quality, molecular markers, animal breeding, leptin, ultrasound.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están utilizando diversas técnicas que permiten evaluar genéticamente el animal vivo a una edad temprana, permitiendo seleccionar futuros reproductores con características deseables, de tal manera que pueda darse la diseminación de genotipos de animales con mejores desempeños [17]. Si bien, muchas características de la carne dependen de factores como la raza, edad, estado sanitario, condición fisiológica y del ambiente, en todos los casos están influenciadas por la genética [37].

Entre los genes relacionados con la calidad de la carne, se encuentran 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 [10], luego transportada al cerebro donde actúa para estimular factores que intervienen en el consumo de alimento, la condición corporal, el gasto energético, el aumento de la actividad física y la regulación del peso corporal entre otras funciones [26, 34]. Fue originalmente identificada siguiendo el mapeo físico del gen presente en ratones *ob/ob* [30, 42] y en bovinos *Bos taurus - indicus* ha sido mapeado en el cromosoma 4 región q32. Consta de 3 exones y 2 intrones, con las regiones codificantes ubicadas en los exones 2 y 3 el cual presenta varias regiones altamente polimórficas dentro y adyacentes a éste [18, 34], y que han sido asociadas con características de calidad de la carne y de la leche [11, 15, 22, 27].

Al ser la leptina una hormona secretada por el tejido adiposo, la concentración de ésta en sangre es mayor cuanto mayor sea la proporción de grasa corporal. Thomas y col. [37] sugirieron que la leptina es un predictor de peso corporal, circunferencia escrotal y concentración de testosterona en suero, el cual provee las bases para investigar la interacción entre el crecimiento y reproducción en ganado.

Investigaciones como las de Kononoff y col. [19], Lagoni-gro y col. [20], Liefers y col. [22] y Tessanne y col. [36] han sugerido el importante papel que juega la leptina en la regulación del apetito y el control del peso [20, 22], en el grado de producción, composición y peso de la canal [19, 36]. También la identificación de regiones variables en el gen han sido asociadas con promedio de grasa, espesor de grasa de cobertura, marmoreo y área del ojo del lomo [8, 9, 34, 36]. Algunas de estas regiones se han propuesto como marcadores moleculares, es el caso del Polimorfismo de un Único Nucleótido (SNP) ubicado en el exón 2 [3, 9, 19, 20] y dos microsátélites, uno en la región que flanquea el extremo 3' llamado BM 1500 ó ST [35] y otro en la región 5'UTR, llamado WD [40] con variaciones entre raza y poblaciones [8, 23, 34, 39].

Para el SNP del exón 2 ha sido reportado la sustitución de una base, citosina (C) por timina (T), resultando en el cambio del aminoácido arginina, que normalmente se produce por cisteína, un cambio no conservativo que altera la estructura de la proteína y bloquea la capacidad para ser identificada por los

receptores en el hipotálamo [3, 9]. Fitzsimons y col [9] y Buchanan y col [3] encontraron que animales con genotipo CC presentan menor proporción de grasa que aquellos que presentaron genotipo TT y los animales heterocigóticos CT presentaron un valor intermedio de engrasamiento.

El microsátélite ST [34] está compuesto por el patrón de repetición 5'GATA (CA)_{nCTAG3'} (GenBank acceso No. G18586) ha sido asociado con marmoreo o grasa en canal [8, 36]. El microsátélite WD compuesto por la secuencia 5'AAAAAAAAAAAAAAAA-ATATATATATATATATATATA-3', ubicado entre los nucleótidos 247 al 282 del gen GeneBank acceso N° U50365 [16, 39] ha sido asociado, con mayor área del ojo del lomo, especialmente los genotipos que contienen el alelo 209 [36].

La asociación de los marcadores se ha analizado con características de rendimiento y calidad de carne, principalmente con el uso de ultrasonido en el animal vivo y que tiene una alta correlación entre las características de canal y las mediciones por ultrasonido [6, 7, 12, 40, 41]. La combinación de las técnicas moleculares y las de ultrasonido posibilitarán clasificar y seleccionar el ganado por sus méritos lo que permitirá establecer programas de selección y mejoramiento de la calidad de la carne en canal.

Este tipo de estudios (molecular y ultrasonido) podrían ser aplicados a razas bovinas criollas para valorar, conservar y seleccionar eficientemente en menor tiempo este tipo de animales y de esta forma, fortalecer y mejorar las explotaciones ganaderas en Colombia.

Colombia cuenta con siete razas criollas, las cuales según el censo de 1999 [32] presentan un inventario pobre (probablemente mucho más reducida en la actualidad), y en el cual algunas se encuentran al borde de la extinción, por eliminación o por absorción de la raza Cebú y otras foráneas. Las razas criollas colombianas se caracterizan por poseer una excelente adaptación, éstas llevan un proceso de selección natural largo que las hace superiores a otras razas en ambientes tropicales, con alta tolerancia a parásitos internos y externos, resistencia a infecciones reproductivas, condiciones extremas de temperatura, humedad y radiación solar y capaces de hacer un buen aprovechamiento de forrajes muy fibrosos [14]. Por su origen taurino, los animales criollos producen una carne de mejores características, en comparación con animales de origen indico [17].

De las siete razas criollas colombianas, tres son incluidas en este estudio como razas puras: Romosinuano (R), Santmartinero (SM) y Chino Santandereano (CH), la sintética o raza colombiana: Velásquez (VL) y una subpoblación de Rubio Gallego cruzado con Chino Santandereano (RGC). Cada una con características propias como:

Romosinuano: desciende del primer ganado venido al nuevo mundo en el segundo viaje de Colón, llegado primero a la isla de Santo Domingo y luego al territorio continental, finalmente formado en el Valle del Sinú, departamento de Córdoba.

Es la raza criolla más ampliamente distribuida en Colombia. La ausencia de cuernos aún no es clara, ha sido atribuida a un cruce del ganado Criollo Costeño con Cuernos (CCC) con Angus o dada por una mutación genética, por lo tanto se le considera criollo auténtico colombiano [29]. Se caracteriza por su fertilidad, tolerancia al calor y excelente producción de carne.

Sanmartinero: Se formó en el Piedemonte Llanero del Departamento del Meta, Orinoquía colombiana. Animales para doble propósito, producción de carne y leche. La disminución de la población fue por cruzamiento absorbente e indiscriminado que se hizo con la raza cebú Brahman [24].

Chino Santandereano: Desciende de los ganados de origen ibérico, con el cual guarda una relación estrecha en sus características externas. Se formó en el centro-norte de la Cordillera Oriental de Colombia, correspondiente a los departamentos del Norte de Santander, Santander y parte de Boyacá. Es ganado para doble propósito, muestra buena tolerancia a las variaciones climáticas, capacidad de pastoreo, sobresaliente fertilidad y habilidad para la crianza [2].

Velásquez: La raza fue creada hace 60 años por el cruce de novillas Romosinuano con un torete Brahman Rojo, las hembras obtenidas se cruzaron con un torete Red Poll. Posteriormente y hasta la fecha, se han cruzado las mejores hembras de esa segunda generación con los mejores machos de la misma. Teóricamente, la raza es 25% Romosinuano, 25% Brahman y 50% Red Poll, el Romosinuano caracterizada por la fertilidad y adaptación al medio tropical cálido Colombiano, el Brahman por su rusticidad y resistencia a parásitos y al calor y la Red poll por precocidad, producción y calidad de carne. Se consideran productores de carne y leche y presenta alta resistente al calor [2, 38].

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP (Single Nucleotide Polymorphism) del exón 2 y de los microsatélite de la región 5'UTR y el extremo 3' del gen Leptina en razas criollas R, CH, SM, la raza colombiana VL y animales RGC. Adicionalmente evaluar la asociación de estos marcadores con características como peso, área de ojo de lomo, espesor de grasa dorsal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon 252 animales procedentes de diferentes núcleos del oriente, suroccidente, occidente y centro de Colombia de las razas R, CH, SM, VL y RGC (TABLA I).

Para la genotipificación de cada animal fueron colectados aproximadamente 4 mL de sangre de la vena yugular o arteria coccígea media, en tubos con anticoagulante EDTA y almacenada a 4°C hasta su procesamiento. Posteriormente el ADN fue extraído por el método de Salting out [25] y almacenadas a -20°C.

Para el SNP (Single Nucleotide Polymorphism), la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µL que con-

tenía aproximadamente 50ng de ADN, Buffer de reacción 1X, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 0,02 mM, primer 0,125 µM y 1U de Taq DNA Polimerasa (Fermentas®), con un perfil térmico de 94°C durante 2 min para desnaturalización, seguido de 35 ciclos así: 94°C durante 45 seg, 61°C 45 seg para annealing, 72°C por 55 seg y extensión final a 72°C por 3 min por un ciclo.

Para el microsatélite MB1500 ó ST el volumen de reacción fue de 20 µl en las siguientes condiciones, 0,25 µM de primers, 0,5U de Taq DNA pol (Fermentas®), para WD las condiciones fueron 15 µL de reacción con 2,0mM MgCl₂, 0,26 µM de primers y 0,5U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), los demás componentes de la reacción fueron iguales que para el SNP, el perfil térmico para ambos microsatélites fue 95°C por 2 min, 94°C por 30 seg, 61°C por 20 seg, 72°C por 1 min, por 30 ciclos y con una extensión final de 72°C por 10 min. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador T-Personal 48 (Biometra®).

Las secuencias de primers utilizados para cada marcador fueron:

Para el SNP del exón 2: PB-1: 5'ÁTGCGCTGTGGA CCCCTGTATC-3' y PB-2: 5'TGGTGCATCCTGGA CCTTCC-3' [4], acceso GenBank: AF120500.1. Para la amplificación del microsatélite ST se utilizaron los primers ST-1 5'GATGCAGCAGACCAAGTGG-3' y ST-2 5'CCCAATGCTAGAACCCAGG-3' [32], acceso GenBank: G18586. Para la amplificación del microsatélite WD, fueron utilizados los primers: WD-1: 5'TTCTAATCCTGCAATATCTTGTCC-3' y WD-2:

5'-AAACAGGCCGTAGCAGTACAG-3' [36], acceso GenBank: U50365.

Todos los productos de amplificación fueron verificados en geles de agarosa al 2%, posteriormente los microsatélites BM1500 y WD se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% seguidos de tinción con nitrato de plata [4], FIGS. 1 y 2.

Para el SNP del exón 2 se realizó una digestión simple en un total de 20 µL. La reacción consistió en 15 µL del amplificado y 2U de la enzima de restricción *Kpn2I* (fermentas®). La reacción fue incubada a 55°C durante 4 horas. Los fragmentos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 5%, FIG. 3. La verificación de los resultados para los tres marcadores fueron realizadas por secuenciación en los laboratorios de Macrogen EUA, Corp.

Los animales de 18 a 24 meses fueron pesados (P18-24) y se realizaron mediciones de ultrasonido para área de ojo de lomo (AOL) y espesor de grasa dorsal (EGD) con un equipo Aloka SSD-500, un transductor lineal de 3,5 MHz de 12,0 cm (Aloka Inc., Wallingford, CT, EUA). Las imágenes fueron capturadas usando la tarjeta digitalizadora PXC-200AL (CyberOptics Semiconductor Corporation Beaverton, OR) e interpretadas con el analizador de imágenes IA90 del componente CPEC (Cattle Performance Enhancement Company, Oakley, KS).

TABLA I
NÚMERO DE ANIMALES MUESTREADOS PARA LOS MARCADORES DEL GEN LEPTINA DE LAS RAZAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS / NUMBER OF SAMPLED ANIMALS FOR THE LEPTIN GENE MARKERS OF CREOLE AND COLOMBIAN BREEDS

Raza	Hembras	Machos	Total	Finca	Procedencia
Velásquez	40	15	55	Africa	La Dorada (Caldas)
Chino Santandereano	12	1	13	La granja	Cimitarra (Santander)
Rubio Gallego cruzado con Chino Santandereano	11	0	11	La granja	Cimitarra (Santander)
Romosinuano	10	5	15	El Espejo	Urabá (Antioquia)
Romosinuano	18	10	28	Hacienda Cardosa	Restrepo (Valle)
Romosinuano	23	5	28	Manoa	Villavicencio (Meta)
Romosinuano	0	22	22	H. San Luis	Pachiaquiario (Meta)
Sanmartinero	44	9	53	Granja Iracá (Secr Agricultura)	San Martín (Meta)
Sanmartinero	15	12	27	Corpoica	Villavicencio (Meta)
TOTAL	173	79	252		

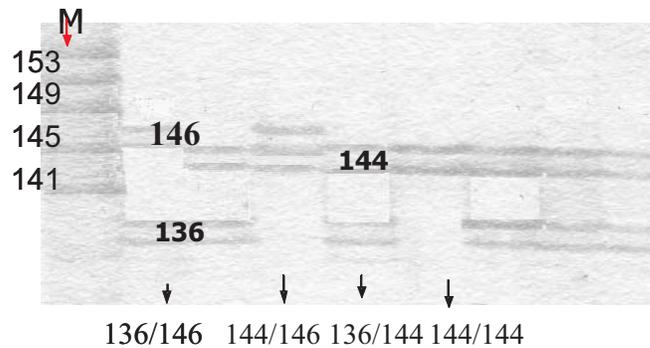


FIGURA 1. GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%. LÍNEA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR, LÍNEA 2-8 ALELOS PARA EL MICROSATÉLITE ST/ A 6% POLYACRYLAMIDE GEL. LINE 1: MOLECULAR WEIGHT MARKER, LINE 2 TO 8: ALLELES FOR ST.

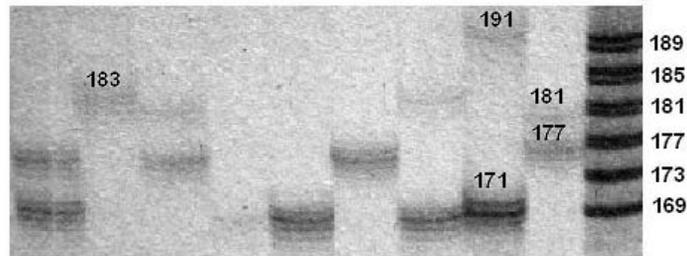


FIGURA 2. GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%. LÍNEA 10, MARCADOR DE PESO MOLECULAR, LÍNEA 1-9 ALELOS PARA EL MICROSATÉLITE WD/ A 6% POLYACRYLAMIDE GEL. LINE 10: MOLECULAR WEIGHT MARKER. LINE 1 TO 9: WD MICROSATELLITE ALLELES.

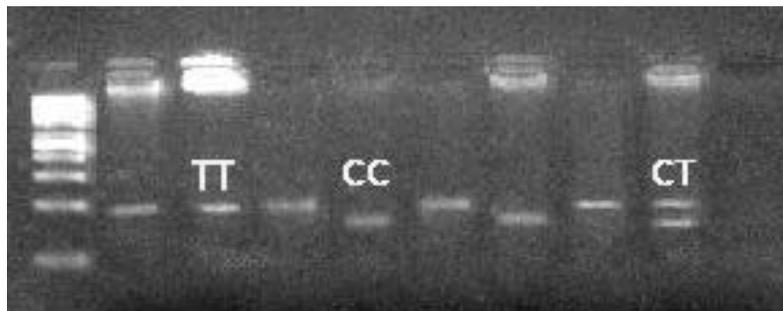


FIGURA 3. GEL DE AGAROSA AL 5% PARA EL SNP DEL GEN LEPTINA. LÍNEA 1: ESCALERA DE 50 PB (FERMENTAS®). LÍNEAS 2, 4, 6 Y 8: MUESTRAS NO SOMETIDAS A RESTRICCIÓN. LÍNEAS 3, 5, 7 Y 9: MUESTRAS SOMETIDAS A RESTRICCIÓN, CORRESPONDIENTES RESPECTIVAMENTE A LAS MUESTRAS 2, 4, 6 Y 8. LÍNEA 10: CONTROL NEGATIVO/ A 5% AGAROSA GEL FOR SNP LEPTIN GENE. LINE 1: 50 PB LADDER (FERMENTAS®). LINES 2, 4, 6 AND 8: NO RESTRICTION SAMPLES. LINES 3, 5, 7 AND 9: RESTRICTED SAMPLES CORRESPONDENT TO 2, 4, 6 AND 8 LINES, RESPECTIVELY. LINES 10: NEGATIVE CONTROL.

Se calcularon las frecuencias génicas y genotípicas para cada marcador y raza, se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg por el método de las cadenas de Markov y el coeficiente de endogamia (Fis). Se utilizó el programa estadístico GENEPop versión 3,3 [31]. Con los resultados de frecuencias alélicas de todos los marcadores analizados se construyó el árbol de distancias genéticas utilizando el algoritmo de neighbour-joining de Nei, con el programa GDA [21].

Las asociaciones entre los marcadores y las características incluidas en este estudio fueron realizadas mediante análisis de varianza para cada raza y marcador incluyendo los efectos fijos de grupo contemporáneo, las variantes alélicas y la covariable edad del animal en el momento de la medición.

En los análisis para el SNP se consideraron los genotipos CC, TT y CT. Para los análisis del marcador ST se consideraron regresiones parciales de 0; 1 y 2 alelos dependiendo del número de éstos presentes en el genotipo. Para la raza R se consideraron las regresiones parciales del alelo 136 y 144, en la raza SM se consideró la regresión parcial del alelo 144 y en la raza VL las regresiones parciales de los alelos 136; 146 y 148.

En los análisis para el marcador WD, se consideraron las regresiones parciales dependiendo del número de alelos presentes en el genotipo. En la raza R se consideraron las regresiones para los alelos 175; 177 y 191, en SM los alelos 183 y 177 y en VL los alelos 171; 177 y 183.

Los grupos contemporáneos fueron formados teniendo en cuenta el sexo, y la finca donde se realizó la medición. Para la raza R los grupos contemporáneos fueron hacienda El Espejo-hembras, hacienda El Espejo-machos, hacienda Manoa-hembras, hacienda San Luis-machos. En la raza SM, fueron formados los grupos contemporáneos: Granja Iracá-machos, Granja Iracá-hembras y Corpoica La libertad-machos. Para VL se consideraron los grupos contemporáneos de machos y hembras procedentes de la hacienda África.

La raza CH y el RGC no fueron considerados para la asociación ya que por el tamaño de la muestra no había suficiente información para realizar los análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permitieron observar que existe una gran variabilidad dentro y entre las razas estudiadas, para los marcadores SNP, ST y WD (FIG. 4). En esta investigación, el alelo T presentó la frecuencia más alta para las razas SM y R (0,66 y 0,53, respectivamente), en CH, RGC y VL la frecuencia de este alelo fue menor. Los genotipos con mayor frecuencia fueron el CT con 0,56, 0,51 y 0,49 para SM, VL y R, respectivamente. En CH y RGC predominó el genotipo CC (0,62 y 0,55, respectivamente), el genotipo TT se presentó en bajas frecuencias en todas las razas.

El Fis, que mide el exceso o déficit de heterocigotos (Weir and Cockerham) [31], varió para el SNP, entre -0,23 y +0,17

(cercano a cero con $P > 0,05$), lo que sugiere que los procesos endogámicos no moldean genéticamente estas poblaciones, resultados congruentes con el Equilibrio de HW. La raza SM presentó la mayor frecuencia de heterocigóticos (0,56) y CH la menor con 0,31, no obstante este último puede ser considerado un valor alto de heterocigosis. Para RGC en la cual a pesar del tamaño pequeño de la muestra presenta EHW, con un valor de heterocigotos intermedio lo cual puede explicarse por el cruce entre el Rubio Gallego y el Chino Santandereano, cruce que habría permitido el intercambio de genes aumentando la diversidad génica entre ellas para este locus.

Para el microsatélite ST (BM 1500) se identificaron de 3 a 4 alelos (FIG. 4), siendo las razas CH y RGC las que presentaron menor número de alelos (136; 144 y 148), las demás razas presentaron cuatro alelos. La mayor frecuencia fue 0,78 y 0,34 para el alelo 136 en SM y VL, respectivamente. En CH y RGC el alelo más frecuente fue el 144 (0,65 y 0,5, respectivamente). En R se encontraron las mayores frecuencias en los alelos 136 y 148 de 0,48. El alelo 138 sólo se encontró en la raza SM con una frecuencia de 0,04. Se detectaron 11 combinaciones genotípicas diferentes, 9 en la raza VL, 5 para CH y SM, 6 para R y 4 para la subpoblación RGC. Los genotipos con más alta frecuencia en general encontradas en las razas evaluadas en este estudio, fueron 136/144, 136/136 y 136/146. Sin embargo, los genotipos más frecuentes difirieron entre razas así: 136/146 en VL (0,204), 136/144 en R (0,527) y en CH (0,462) y el 136/136 en SM (0,632) y el 144/144 en RGC (0,364).

De las cinco razas criollas (incluyendo la subpoblación RGC) de este estudio, cuatro presentaron equilibrio de H-W, excepto RGC con Fis +0,56 ($P \leq 0,01$), indicando déficit de heterocigóticos. El componente Chino de esta subpoblación proviene del mismo núcleo de conservación de la Raza CH de este estudio, la cual se observa como la menos polimórfica, lo que permitiría deducir que el cruce con Rubio Gallego no aumentó la diversidad para este locus, concordante con el cálculo de la heterocigosis promedio, CH= 0,265 y RGC = 0,181.

Los diferentes alelos encontrados para el microsatélite WD, teniendo en cuenta las poblaciones genotipificadas, indican un alto polimorfismo, con 16 alelos (FIG. 4). De las razas criollas, la población que presentó más polimorfismo fue la raza R con 14 alelos y la menos polimórfica es VL con siete alelos. La mayor frecuencia fue para el 183 en SM y VL con 0,630 y 0,321, respectivamente; 177 para R con 0,456 y 171 para CH con 0,308. Se detectaron 66 combinaciones genotípicas, de las cuales se presentan las más frecuentes en la FIG 4, siendo los genotipos más frecuentes 183/177 en la raza VL con 0,245, 181/171 para CH con 0,231; 177/177 para R con 0,316 y para SM con 0,449. Para RGC se presentaron en igual frecuencia (0,182) los genotipos 171/175, 177/181 y 175/183.

La raza R presentó una desviación del equilibrio HW, aunque fue la más polimórfica la mayoría de los genotipos se encontraron en baja frecuencia. La frecuencia más alta fue para el alelo 177 (0,456) y el genotipo 177/177, concordante con el

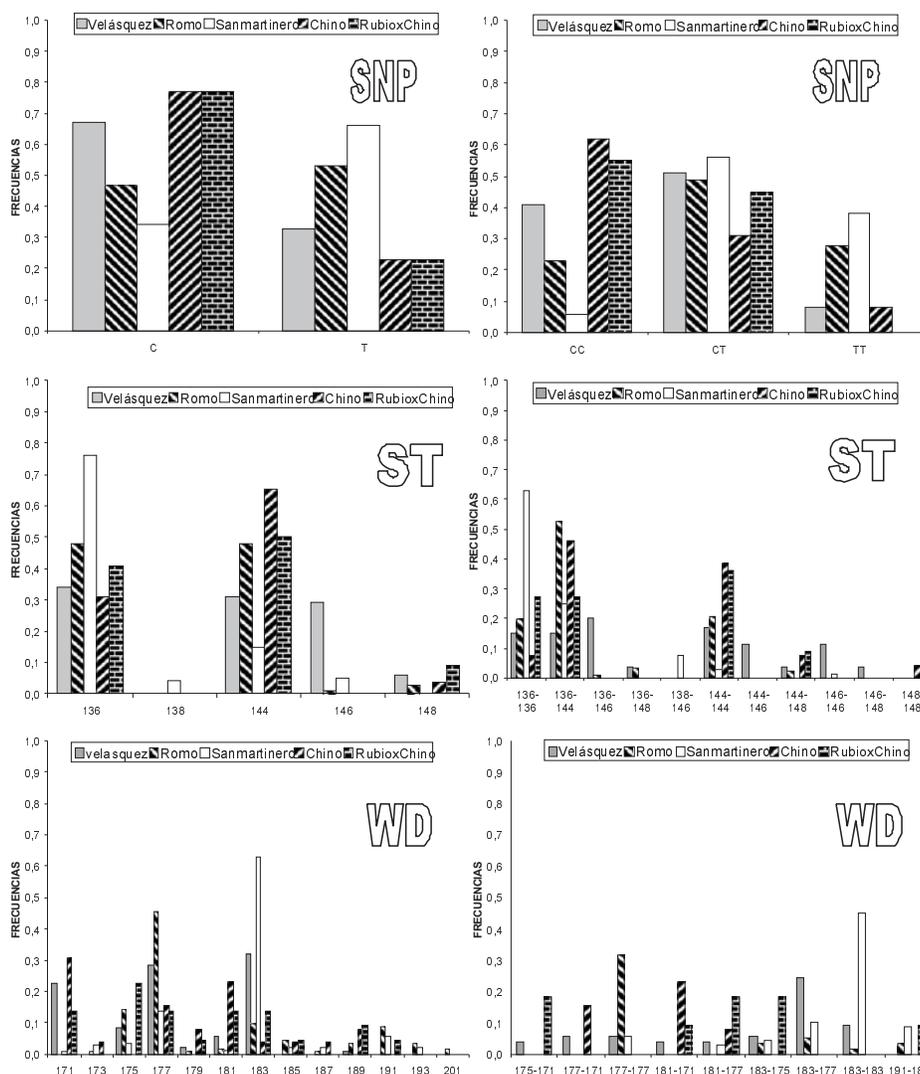


FIGURA 4. FRECUENCIAS ALÉLICAS (IZQUIERDA) Y GENOTÍPICAS (DERECHA) PARA UN POLIMORFISMO DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNP) Y LOS MICROSATÉLITES ST Y WD DEL GEN DE LEPTINA BOVINO EN ANIMALES CRIOLLOS Y COLOMBIANOS / ALLELE FREQUENCIES (LEFT) AND GENOTYPIC FREQUENCIES (RIGHT) FOR A POLYMORPHISM OF A SINGLE NUCLEOTIDE (SNP) AND ST AND WD MICROSATELLITES OF THE BOVINE LEPTIN GENE IN CREOLE AND COLOMBIAN BREEDS.

déficit de heterocigotos obtenidos por el Fis (0,26; $P \leq 0,01$), de continuarse con apareamientos endogámicos en la población, se tendría pérdida de los alelos en baja frecuencia.

Diferentes estudios han reportado la asociación de cada uno de estos marcadores con algunas características productivas. Buchanan y col. [3] encontraron el alelo T con mayor frecuencia en animales Angus y Hereford, los cuales presentaron canales más grasos que las canales de animales con genotipo CC y concluyeron que el promedio y la calidad de grasa son afectados significativamente por el genotipo, además, individuos con genotipo TT producen más mRNA que los CC. Valores altos para el alelo T se encontraron en las razas Angus y Hereford, y para el alelo C en Charolais y Simmental [19].

Para el microsatélite ST (MB1500), Fitzsimmons y col. [8] encontraron los alelos 138; 140; 147 y 149 en una pobla-

ción de 158 toros para carne de las razas Angus, Charolais, Hereford y Simmental, estudio en el cual se asociaron los alelos 138 y 147 con altos y bajos niveles de grasa en la canal, respectivamente. Liefers y col. [22] reportaron los alelos 136; 144, 146 para este microsatélite en animales de la raza Holstein y para las razas criollas colombianas Hartón del valle y Blanco Orejinegro (BON), Guerra y col. [13] también reportaron estos alelos.

Para el microsatélite WD de la región 5'UTR del gen leptina en estudios previos se encontraron 18 alelos en investigaciones con animales de la raza Angus [39]. Tessanne y col. [36] reportaron la asociación del alelo 209 con mayor AOL a partir de un estudio realizado en 139 animales de esta misma raza. En evaluaciones realizadas en razas criollas, Guerra y col. [13] encontraron 15 alelos en la raza Hartón del Valle, 6 alelos en BON y 8 en la raza Brahman.

TABLA II
ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS CARACTERÍSTICAS PESO A LOS 18 A 24 MESES (P18-24), ÁREA DE OJO DE LOMO (AOL) Y ESPESOR DE GRASA DORSAL (EGD) TENIENDO EN CUENTA EL GENOTIPO DE SNP DEL GEN DE LEPTINA EN ANIMALES ROMOSINUANO, SANMARTINERO Y VELÁSQUEZ/ ANALYSIS OF VARIANCE FOR WEIGHT TO THE 18 TO 24 MONTHS (P18-24), RIB EYE AREA (AOL) AND BACKFAT THICKNESS (EGD) TRAITS, CONSIDERING A SNP LEPTIN GENE IN ROMOSINUANO, SANMARTINERO AND VELÁSQUEZ CATTLE.

F.V	P18-24		AOL		EGD	
	GL	C.M	GL	C.M	GL	C.M
Romosinuano						
Edad	1	10891,22**	1	56,49 ^{n.s}	1	0,0027 ^{n.s}
GC	2	8644,75**	3	236,33**	3	0,0088 ^{n.s}
SNP	2	1380,43 ^{n.s}	2	56,73 ^{n.s}	2	0,0025 ^{n.s}
Error	17	1120,8	17	17,65	20	0,0052
R ²		0,76		0,81		0,29
C.V		9,71		11,19		12,62
Promedio		345,00kg		37,53cm ²		0,57cm
Sanmartinero						
Edad	1	8401,18**	1	19,86 ^{n.s}	1	0,008 ^{n.s}
GC	2	6435,19**	3	204,33**	3	0,025 ^{n.s}
SNP	3	310,25 ^{n.s}	2	4,02 ^{n.s}	2	0,0002 ^{n.s}
Error	26	960,7	16	22,42	24	0,004
R ²		0,48		0,66		0,48
C.V		14,36		17,43		12,23
Promedio		215,79kg		27,17cm ²		0,54cm
Velásquez						
Edad	1	7518,82**	1	85,5*		1
GC	1	36401,00**	1	267,8**		1
SNP	2	566,04 ^{n.s}	2	12,11 ^{n.s}		2
Error	31	888,02	24	13,2		31
R ²		0,66		0,58		0,098
C.V		10,81		11,03		12,41
Promedio		275,64kg		32,94cm ²		0,5cm

F.V.= fuente de variación; gl= grados de libertad; C.M.= cuadrado medio; GC=grupo contemporáneo; R²= coeficiente de determinación; C.V.= coeficiente de variación; CC, CT y TT son los genotipos posibles para SNP; n.s.= no significativo; **= P ≤ 0,001 y *= P ≤ 0,05.

Aunque en las razas criollas se encuentra el alelo T, no se encontró asociación con ninguna de las características estudiadas (TABLA II), a diferencia de lo encontrado por Buchanan y col. [3]. El alelo 146 del microsatélite ST fue asociado con la característica peso en la raza Velásquez (TABLA III), aumentando en ~28 kg en individuos que posean ambos alelos 146. Este alelo se encontró en las razas criollas Romosinuano y Sanmartinero, en baja frecuencia. Para los demás marcadores no se encontraron resultados de asociación estadísticamente significativos para ninguna de las características evaluadas (TABLAS II a IV). Las razas CH y RGC no se tuvieron en cuenta para los análisis de asociación debido al tamaño de la muestra.

El nivel bajo de asociación de los marcadores con las características estudiadas para las razas criollas pueden deberse al efecto del ambiente en la expresión de los genes. El

factor nutricional es decisivo en el grado de precocidad, en la conformación o buena apariencia de los animales para un excelente desarrollo. Las razas criollas han sido sometidas a suelos pobres con malos pastos y deficiencia en el suministro de concentrados y microelementos, dejando su desarrollo sólo al aporte y capacidad de conversión de pastos fibrosos en carne y leche [14]. Diferentes estudios han demostrado que el tipo de alimentación también influencia el estado de engrasamiento que se alcanza [1, 5, 28, 33, 35]. Allen y col. [1] sostienen que el área de ojo de lomo, el espesor de grasa, el grado de producción de grasa, el nivel de marmóreo y la calidad de las canales se modifica dependiendo del tipo de pastoreo al que son sometidos los animales. Patterson y col. [28], demostraron que un nivel bajo de nutrición produce disminuciones significativas en los depósitos de grasa subcutánea y de la cavidad corporal.

TABLA III

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS CARACTERÍSTICAS PESO A LOS 18 A 24 MESES (P18-24), ÁREA DE OJO DE LOMO (AOL) Y ESPESOR DE GRASA DORSAL (EGD), TENIENDO EN CUENTA LA PRESENCIA O AUSENCIA DE LOS ALELOS 136, 144 Y 148 DEL MICROSATÉLITE ST DEL GEN DE LEPTINA EN ANIMALES ROMOSINUANO, SANMARTINERO Y VELÁSQUEZ/ ANALYSIS OF VARIANCE FOR WEIGHT TO THE 18 TO 24 MONTHS (P18-24), RIB EYE AREA (AOL) AND BACKFAT THICKNESS (EGD) TRAITS, CONSIDERING THE PRESENCE OR ABSENCE OF 136, 144 AND 148 ALLELES OF ST MICROSATELLITE OF LEPTIN GENE IN ANIMALS ROMOSINUANO, SANMARTINERO AND VELÁSQUEZ.

FV	P18-24		AOL		EGD	
	GL	C.M	GL	C.M	GL	C.M
Romosinuano						
Edad	1	8038,55*	1	15,57 ^{n.s}	1	0,003 ^{n.s}
GC	2	7562,9**	3	272,02**	3	0,006 ^{n.s}
st144	1	3424,75 ^{n.s}	1	26,28 ^{n.s}	1	0,006 ^{n.s}
st136	1	2869,31 ^{n.s}	1	14,42 ^{n.s}	1	0,008 ^{n.s}
Error	16	1080,49	17	22,25	20	0,005
R ²		0,77		0,77		0,33
C.V		9,53		12,57		12,34
Promedio		345,00kg		37,53cm ²		0,57cm
Sanmartinero						
Edad	1	5638,8**	1	0,015 ^{n.s}	1	0,008 ^{n.s}
GC	3	4402,9**	3	160,15**	3	0,03**
st144	1	23,96 ^{n.s}	1	54,04 ^{n.s}	1	0,001 ^{n.s}
Error	27	875,61	17	24,8	25	0,005
R ²		0,42		0,64		0,48
C.V		13,77		18,44		12,63
Promedio		214,9kg		27,00cm ²		0,55cm
Velásquez						
Edad	1	9195,1**	1	57,33*	1	0,00004 ^{n.s}
GC	1	49450,9**	1	329,19**	1	0,0004 ^{n.s}
st136	1	1,13 ^{n.s}	1	0,003 ^{n.s}	1	0,001 ^{n.s}
st146	1	3442,7*	1	19,77 ^{n.s}	1	0,001 ^{n.s}
st148	1	1150,3 ^{n.s}	1	7,15 ^{n.s}	1	0,0002 ^{n.s}
Error	33	874,5	26	14,99	33	0,004
R ²	0,69			0,56		0,038
C.V	10,92			11,92		13,00
Promedio	270,8kg			32,48cm ²		0,49cm
Coefficiente de regresión del alelo 146	14,14kg					

F.V.= fuente de variación; gl= grados de libertad; C.M= cuadrado medio; GC=grupo contemporáneo; R²= coeficiente de determinación; C.V= coeficiente de variación; n.s= no significativo, **= P ≤ 0,001 y *= P ≤ 0,05.

El árbol de distancias genéticas (FIG. 5) realizado con base en el algoritmo de neighbour-joining de Nei, con el programa GDA [21], muestra el agrupamiento de las razas criollas estudiadas en el cual se observó la cercanía entre las razas CH y SM con distancia de 0,55. Este agrupamiento se podría explicar por el origen histórico [29], por poseer información genética en común y por distribución geográfica [2], ya que el Chino Santandereano también ha sido ubicado en la región del

Meta, principal asentamiento de la raza Sanmartinero. Se esperaría un agrupamiento entre CH y RGC por el cruce. Sin embargo, los resultados (distancia 0,95) indican que son grupos distantes lo que revelaría distanciamiento genético entre estos dos grupos raciales. Era de esperarse la separación de VL de las demás razas debido a su origen cruzado y su alto nivel endogámico lo que la ha llevado a permanecer como un grupo aislado genética y geográficamente de los demás.

TABLA IV

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS CARACTERÍSTICAS PESO A LOS 18 A 24 MESES (P18-24), ÁREA DE OJO DE LOMO (AOL) Y ESPESOR DE GRASA DORSAL (EGD), TENIENDO EN CUENTA LA PRESENCIA O AUSENCIA DE LOS ALELOS 171, 175, 177, 183 Y 191 DEL MICROSATÉLITE WD DEL GEN DE LEPTINA EN ANIMALES ROMOSINUANO, SANMARTINERO Y VELÁSQUEZ/ ANALYSIS OF VARIANCE FOR WEIGHT TO THE 18 TO 24 MONTHS (P18-24), AREA OF BACK EYE (AOL) AND BACKFAT THICKNESS (EGD) TRAITS, CONSIDERING THE PRESENCE OR ABSENCE OF 171, 175, 177, 183 AND 191 ALLELES OF WD MICROSATELLITE OF THE LEPTIN GENE IN ANIMALS ROMOSINUANO, SANMARTINERO AND VELÁSQUEZ CATTLE.

FV	P18-24		AOL		EGD	
	gl	C.M	gl	C.M	gl	C.M
Romosinuano						
Edad	1	7,77 ^{n.s}	1	13,5 ^{n.s}	1	0,00002 ^{n.s}
GC	2	3966,66*	3	75,2**	3	0,00250 ^{n.s}
175	1	1480,07 ^{n.s}	1	36,99 ^{n.s}	1	0,00003 ^{n.s}
177	1	3510,26 ^{n.s}	1	46,75 ^{n.s}	1	0,00417 ^{n.s}
191	1	325,73 ^{n.s}	1	10,38 ^{n.s}	1	0,00245 ^{n.s}
Error	6	1144,2	7	23,68	8	0,004
R ²		0,74		0,83		0,55
C.V		9,62		13,42		10,66
Promedio		351,46kg		36,25cm ²		0,57cm
Sanmartinero						
Edad	1	6678,58**	1	8,2 ^{n.s}	1	0,0087*
GC	3	3395,43**	3	109,73**	3	0,03**
177	1	914,08 ^{n.s}	1	0,52 ^{n.s}	1	0,0021 ^{n.s}
183	1	868,46 ^{n.s}	1	0,0017 ^{n.s}	1	0,0055 ^{n.s}
Error	24	726,15	15	30,99	23	0,004
R ²		0,6		0,56		0,58
C.V		12,32		20,5		12,15
Promedio		218,74kg		27,16cm ²		0,55cm
Velásquez						
Edad	1	7953,7**	1	78,86**	1	0,000001 ^{n.s}
GC	1	46318,4**	1	302,84**	1	0,00026 ^{n.s}
171	1	738,1 ^{n.s}	1	1,02 ^{n.s}	1	0,0011 ^{n.s}
177	1	34,3 ^{n.s}	1	1,38 ^{n.s}	1	0,000002 ^{n.s}
183	1	768,9 ^{n.s}	1	0,001 ^{n.s}	1	0,002 ^{n.s}
Error	32	990,6	25	16,64	32	0,004
R ²		0,65		0,52		0,04
C.V		11,6		12,53		13,1
Promedio		270,3kg		32,55cm ²		0,49cm

F.V.= fuente de variación; gl= grados de libertad; C.M= cuadrado medio; GC=grupo contemporáneo; R²= coeficiente de determinación; C.V.= coeficiente de variación; n.s= no significativo; **= P ≤ 0,001 y *= P ≤ 0,05.

CONCLUSIÓN

Las razas bovinas criollas y colombianas presentan variantes alélicas que en otras razas han sido asociadas a calidad de carne. Sin embargo, en este trabajo no se encontró una asociación manifiesta de los marcadores del gen leptina con cantidad y calidad de carne. La razón fundamental puede ser los ambientes adversos y los problemas de manejo a los

que los animales son sometidos, lo que no permite que ellos expresen su potencial para producción.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue posible gracias a la Financiación de Colciencias, Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Antioquia, a la colaboración de las haciendas África, El Espejo, La Granja, Granja Iracá, La Libertad (Corpoica), Manoa y San Luís.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLEN, V.G.; FONTENOT, J.P.; NOTTER, D.R.; HAMMES, R.C. JR. Forage systems for beef production from conception to slaughter: I. Cow-calf production. **J. of Anim. Sci.** 70 (2): 576-587. 1992.
- [2] BANCO GANADERO. Folleto: Razas Bovinas Criollas y Colombianas. 4ta. Ed. 22 pp 1996.
- [3] BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G.; THUE, T.D. WINDKELMAN-SIM, C.D; SCHMUTZ, S.M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genet. Sel. Evol.** 34:105-116. 2002.
- [4] BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A.M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR Locus DIS80 by the PCR Followed by High-Resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.** 48: 137-144. 1991.
- [5] DUCKETT, S.K.; WAGNER, D.G.; YATES, L.D.; DOLEZAL, H.G; MAY, S.G. Effects of Time on Feed on Beef Nutrient Composition. **J. Anim. Sci.** 71:2079-2088. 1993.
- [6] FAULKNER, D.B.; PARRETT, D.F.; MCKEITH, F.K.; BERGER, L.L. Prediction of fat cover and carcass composition from live and carcass measurements. **J. Anim. Sci.** 68:604-610. 1990.
- [7] FIGUEIREDO, L.G.G. Estimativas de parâmetros genéticos de características de carcaças feitas por ultra-sonografia em bovinos da raça Nelore. Pirassununga. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de Sao Paulo. Tese Mestrado. 52pp 2001.
- [8] FITZSIMMONS, C.J.; SCHMUTZ, S.M.; BERGEN, R.D.; MCKINNON, J.J. A potential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **J. Anim. Sci.** 81: 1-8. 1998.
- [9] FITZSIMMONS, C. J.; SCHMUTZ, S.C. A SNP in the leptin gene leads to a change in the amino acid sequence of the mature protein in cattle. 1999. Plant & Animal Genome VII Conference, On Line: <http://www.intl-pag.org/pag/7/abstracts/pag7152.html>. 05.12.2004.
- [10] FREDERICH, R.C.; LOLLMANN, B.; HAMANN, A.; NAPOLITANO-ROSEN, A.; KAHN, B.B.; LOWELL, B.B.; FLIER, J.F. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. **J. Clin. Invest.** 96:1658-1663. 1995.
- [11] GEARY, T.W.; MCFADIN, E.L.; MACNEIL, M.D.; GRINGS, E.E.; SHORT, R.E.; FUNSTON, R.N.; KEISLER, D.H. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **J. Anim Sci.** 81:1-8. 2003.
- [12] GREINER, S.P.; ROUSE, G.H.; WILSON, D.E.; CUNDIFF, L.V.; WHEELER T.L. The relationship between ultrasound measurements and carcass fat thickness and longissimus muscle area in beef cattle. **J. Anim. Sci.** 81:676-682. 2003.
- [13] GUERRA, M.T.; TRUJILLO, B.E.; CERÓN, M.M. Estimación de polimorfismos del gen de leptina bovino en poblaciones de las razas criollas Hartón del Valle, Blanco Orejinegro (BON) y en la raza Brahman, **Rev Col Cienc Pec.** 18 (3): 215-221. 2005.
- [14] GUTIERREZ, I. Razas criollas y colombianas puras. Ganado Criollo Blanco Orejinegro (BON). **Memorias: Convento** 135. 01. Bogotá. Produmedios. 57-73pp. 2003.
- [15] HAEGEMAN, A.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Anim. Genet.** 31: 79. 2000.
- [16] HALE, C.S.; HERRING, W.O.; JOHNSON, G.S.; SHIBUYA, H.; LUBAHN, D.B.; KEISLER, D.H. Evaluation of the leptin gene as a possible marker of carcass traits un angus Cattle. University of Missouri Beef and Dairy Research Report. 25-27pp. 1999.
- [17] HOCQUETTE, J.F.; RENAND. G.; LEVÉZIEL, H.; PICARD, B.; CASSAR-MALEK, I. Genetic effects on beef meat quality. In: WOOD J. (Ed). The Science of Beef Meat. British Society of Animal Science, Bristol, United Kingdom. 13-19 pp. 2005.
- [18] JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R.; SPURLOCK, M.E. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. **Anim. Biotechnol.** 9: 1-14. 1998
- [19] KONONOFF, P.J.; DEOBALD, H.M.; STEWART, E.L.; LAYCOCK, A.D.; MARQUESS, F.L.S. The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. **J. Anim. Sci.** 83:927-932. 2005.
- [20] LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J. A.; WILLIAMS, J. L. A new mutation in the coding region of the bovine leptine gene associated with feed intake. **Anim Genet.** 34. 371-373. 2003.
- [21] LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Department of Ecology and Evolutionary Biology. University of Connecticut. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. 2001.
- [22] LIEFERS, S.C.; TE PAS, M.F.W.; VEERKAMP, R.F.; VAN DER LENDE, T. Associations Between Leptin Gene Polimorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake and Fertility in Holstein Heifers. **J. of Dairy Sci.** 85: 1633-1638. 2002.

- [23] LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H.; VAGE, D.I. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Anim Genet.** 28: 245. 1997.
- [24] MARTINEZ, G. Razas criollas y colombianas puras. Ganado Criollo Sanmartinero. **Memorias:** Convenio 135. 01. Bogotá. Produmedios. 145–154pp. 2003.
- [25] MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLETSKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucl Acids Res** 16: 1215. 1988.
- [26] NKRUMAH, J.D.; LI, C.; BASARAB, J.B.; GUERCIO, S.; MENG, Y.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S.S. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. **Can. J. Anim. Sci.** 84: 211-219. 2004.
- [27] NKRUMAH, J.D.; LI, C.; YU, J.; HANSEN, C.; KEISLER, D.H.; MOORE, S.S. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behaviour, and measures of carcass merit. **J. Anim. Sci.** 83:20-28. 2005.
- [28] PATTERSON, D.C.; MOORE, C.A.; STEEN, R.W. The effects of plane of nutrition and slaughter weight on the performance and carcass composition of continental beef bulls given high forage diets. **Anim Prod.** 58: 1 41-47. 1994.
- [29] PINZÓN, M.E. Origen de las razas bovinas criollas colombianas. En: **Historia de la ganadería en Colombia.** Suplemento Ganadero, Carta Ganadera, Italgraf, Bogotá, Colombia. 55-103 pp. 1984.
- [30] POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A.C.; BARENDSE, W. Rapid communication: Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. **J. Anim. Sci.** 75:1427. 1997.
- [31] RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Versión 3.3): Population genetics software for exact test and ecumenicism. **J. Hered** 86:248-249. 1995.
- [32] RESTREPO, A. Razas criollas y colombianas puras. **Memorias:** Convenio 135. 01. Bogotá. Produmedios. 9–13 pp. 2003.
- [33] ROBELIN, J.; DAENICKE, R. Variations of net requirements for cattle growth with liveweight, liveweight gain, breed and sex. **Ann. Zoot.** 29. 15-30. 1980.
- [34] STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; BEATTIE, C.W. The bovine homologue of the obese gene maps to chromosome 4. **Mammal Gen.** 7:399-400. 1996.
- [35] SUGIMOTO, M.; KUZUOKA, S.; YAYOTA, C.; SATO, Y. The effects of grazing and supplemental protein concentrations during the grazing period on subsequent finishing performance and carcass quality in Japanese Black cattle steers. **Anim Sci J.** 75: (1): 29-35. 2004.
- [36] TESSANNE, K.; HINES, H.C.; DAVIS, M.E. Relationships of Polymorphisms in the Bovine Leptin Gene with Differences in Beef Carcass Traits. **Research and Reviews: Beef and Sheep.** Special Circular.170pp. 1999.
- [37] THOMAS, M.G.; ENNS, R.M.; HALLFORD, D.M.; KEISLER, D.H.; OSEIDAT, B.S.; MORRISON, C.D.; HERNANDEZ, J.A.; BRYANT, W.D.; FLORES, R.; LOPEZ, R.; NARRO, L. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. **J. Anim. Sci.** 80: 757–767. 2002.
- [38] VELASQUEZ, J. Razas Criollas y Colombianas Puras. Historia de la Raza Velásquez. **Memorias:** Convenio 135. 01. Bogotá. Produmedios. 155–167pp. 2003.
- [39] WILKINS, R.J; DAVEY, H.W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Anim. Genet.** 28: 370. 1997.
- [40] WILLIAMS, A.R. Ultrasound applications in beef cattle carcass research and management. **J. Anim. Sci.** 80: E183–E188. 2002.
- [41] WILSON, D.E. Application of ultrasound for genetic improvement. **J. Anim. Sci.** 70:973-983. 1992.
- [42] ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEL, M.; BARONE, M.; LEOPOLDO, L. Positional Cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** 372: 425-432. 1994.