

# CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN LEPTINA EN SEMENTALES DE LA RAZA CARORA

## Characterization of Leptin gene polymorphisms in Carora sires

Saúl Salazar-Sequea<sup>1</sup>, Oscar De La Rosa<sup>2\*</sup>, Alexis Marques-Urdaneta<sup>2</sup>, Lourdes Vilanova F<sup>3</sup> y Belkys Vasquez-Marin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Producción Animal. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Laboratorio de Biotecnología Agrícola. <sup>3</sup>Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Cátedra de Reproducción Animal.

Correspondencia: delarosa100@gmail.com.

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) *LepClal* (rs29004487), *LepKpn2l* (rs29004488), *LepHphl* (rs29004508) y *LepSau3Al* (rs29004501) del gen Leptina, en toros reproductores de la raza Carora. Se colectaron muestras de sangre y semen de 43 toros nacidos entre 2002 y 2013 para la extracción de ADN; éste se obtuvo a partir de metodologías de precipitación salina. Las genotipificaciones se realizaron a través del análisis de la longitud de los fragmentos de restricción de un producto amplificado (PCR-RFLP) y mediante un sistema de amplificación con cuatro cebadores, refractario a mutaciones (TETRA PRIMER PCR). Los productos de amplificación y digestión fueron verificados en electroforesis horizontal en geles de agarosa. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, la heterocigosidad observada (Ho), y se probó el equilibrio de Hardy – Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron respectivamente 0,98(A), 0,02(T) y 0,95(AA), 0,05(AT) para el polimorfismo rs29004487; 0,59(C), 0,41(T) y 0,14(CC), 0,53(CT), 0,33(TT) para rs29004488; 0,8(C), 0,2(T) y 0,67(CC), 0,26(CT), 0,07(TT) para rs29004501; 0,94(C), 0,06(T) y 0,88(CC), 0,12(CT) para rs29004508. No se observaron desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y se evidencia la existencia de desequilibrio de ligamiento entre la mayoría de los SNP estudiados. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos evaluados en la población de toros de raza Carora, son similares a las obtenidas en otras razas. Esta primera aproximación en la caracterización del gen Leptina en ganado Carora, permitirá considerar el potencial genético de la raza para la producción de leche o de carne.

**Palabras clave:** Alelo; bovino; genotipo; leptina; polimorfismo

### ABSTRACT

The objective of this work was to characterize the *LepClal* (rs29004487), *LepKpn2l* (rs29004488), *LepHphl* (rs29004508) and *LepSau3Al* (rs29004501) single nucleotide polymorphisms (SNP) of the Leptin gene in Carora sires. Blood and semen samples were collected from 43 bulls born between 2002 and 2013 for DNA extraction; this was obtained from salting out methodologies. Genotyping was carried out through the PCR-RFLP analysis and by an amplification system with four primers, refractory to mutations (TETRA PRIMER PCR). The amplification and digestion products were verified in horizontal electrophoresis in agarose gels. Allelic and genotypic frequencies, observed heterozygosity (Ho) were calculated, and Hardy-Weinberg equilibrium was tested. Allelic and genotypic frequencies were respectively 0.98(A), 0.02(T) and 0.95(AA), 0.05(AT) for rs29004487 polymorphism; 0.59(C), 0.41(T) and 0.14(CC), 0.53(CT), 0.33(TT) for rs29004488; 0.8(C), 0.2(T) and 0.67(CC), 0.26(CT), 0.07(TT) for rs29004501; 0.94(C), 0.06(T) and 0.88(CC), 0.12 (CT) for rs29004508. No deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were observed and the existence of linkage disequilibrium was evident among the majority of SNPs studied. The allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms evaluated in the Carora bull population were similar to those obtained in other breeds. This first approach in the characterization of the Leptin gene in Carora cattle will allow to consider the genetic potential of the breed for the production of milk or meat.

**Key words:** Allele; bovine; genotype; leptin; polymorphism

## INTRODUCCIÓN

La Leptina es una proteína constituida por 146 aminoácidos y 16 Kilodaltons (Kda) de peso molecular, altamente conservada, con una homología entre 84 – 97 % en las especies bovina (*Bos taurus*), ratón (*Mus musculus*), humana, cerdos (*Sus scrofa*) y ovejas (*Ovis aries*) [9, 17, 25]. Es secretada principalmente por el tejido adiposo, una vez en circulación es transportada al cerebro donde estimula factores que intervienen en funciones biológicas tales como: saciedad, regulación del sistema neuroendocrino, gasto energético, hematopoyesis, angiogénesis, pubertad y reproducción; igualmente interviene en la adaptabilidad y función inmune [1, 19, 21]. Esta hormona regula su propia expresión mediante mecanismos de retroalimentación y mientras mayor sea el número de adipocitos, mayor será la concentración de Leptina en suero [5, 22].

Esta hormona es codificada por el gen Leptina (LEP), identificado por mapeo físico del gen en ratones deficientes en Leptina (ob/ob) [62]. Posteriormente fue localizado en el cromosoma 4 región q32 en bovinos (*Bos taurus-Bos indicus*) [53]. Contiene más de 15.000 pares de base (pb), y consta de 2 intrones y 3 exones [12]. Las regiones codificantes se encuentran ubicadas en los exones 2 y 3, y las mismas presentan varios polimorfismos que han sido asociados con características de interés económico en el ganado bovino, como contenido de grasa en la canal, consumo de alimentos, peso vivo, balance energético, fertilidad, producción de leche y rendimiento proteico en leche [10, 20, 32, 34, 35]. Entre los polimorfismos nucleotídicos (SNP) identificados en este gen y evaluados en análisis de asociación genética se encuentran rs29004487 y rs29004488, ubicados en el exón 2, rs29004508 ubicado en el exón 3 y rs29004501 identificado en el intrón 2 [10, 28, 32, 40, 42].

Los estudios mencionados resaltan la importancia del gen LEP en el metabolismo lipídico y crecimiento de los animales domésticos, así como en la regulación del desempeño productivo de los rebaños; esto último ha generado gran interés para la evaluación de LEP como un gen candidato para estudios de asociación genética que permitan predecir el comportamiento productivo y reproductivo del ganado bovino. En Venezuela, se han realizado algunos reportes en ganado Carora y Criollo Limonero [51, 56]; no obstante, se desconoce la distribución de los polimorfismos de LEP arriba mencionados, en los rebaños Carora.

La raza Carora constituye un recurso zoogenético valioso para el país. Es una raza sintética, nativa de Carora, estado Lara, Venezuela. Fue conformada a partir del ganado criollo Amarillo de Quebrada Arriba y la raza Pardo Suizo, lo que la convirtió en una raza adaptada al clima tropical y con buena producción de leche [3]. Su proceso de formación se inició en los años 30, con semen de toros Pardo Suizo proveniente de Europa y Norteamérica y luego continuó con el uso de toros mestizos con la finalidad de mantener su adaptación al ambiente tropical [11]. Para el año 2007, la producción promedio de esta raza para 305 días (d), era cercano a los 3500 kilogramos (kg) [11, 49]. Posee rasgos favorables en cuanto a mansedumbre, fortaleza, vigor y buena reproducción, además, la selección natural favoreció genes específicos del criollo [11], lo que le aporta rusticidad, capacidad de adaptación al clima y de aprovechamiento de los forrajes

tropicales. Se ha consolidado como una raza lechera tropical, producto del programa de mejoramiento genético implementado por la Asociación de Criadores de ganado Carora (ASOCRICA) y el Centro de Inseminación Artificial Carora (CIAC) [11].

El ganado Carora es utilizado en ambientes tropicales con un amplio rango de temperaturas (22 a 38 °C), humedad por encima del 90 %, y bajo diferentes sistemas de producción, desde extensivos con pastoreo y ordeño manual en presencia del becerro, hasta sistemas intensivos caracterizados por la suplementación con alimentos concentrados, ordeño mecánico y alto rendimiento lechero [11].

Además de su potencial lechero, la raza Carora es utilizada en el cruzamiento con razas *Bos indicus* para la obtención de animales “doble propósito”, por lo que la caracterización de los polimorfismos del gen Leptina que han sido asociados con rasgos de producción lechera y cárnica en estudios previos, puede contribuir al conocimiento de la arquitectura genética de estos rasgos complejos, además permitiría optimizar el proceso de selección de rasgos de importancia económica en esta raza.

Fundamentado en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue caracterizar los polimorfismos rs29004487, rs29004488, rs29004508 y rs29004501 del gen LEP, en un plantel seleccionado de sementales de la raza Carora.

## MATERIALES Y METODOS

### Muestra poblacional y manejo general de los animales

Las muestras analizadas se colectaron a partir de 43 toros raza Carora pertenecientes al plantel de reproductores del CIAC, ubicado en Carora, municipio Pedro León Torres, estado Lara, Venezuela, nacidos entre los años 2002 y 2013.

Los reproductores del CIAC son seleccionados por la ASOCRICA, con base en los valores genéticos de sus progenitores mediante la optimización del índice de pedigrí y de los coeficientes de relaciones [11]. Por lo general, estos animales ingresan al CIAC a partir del tercer d de nacido. No obstante, esto puede variar de acuerdo a la ubicación de la finca de procedencia. El manejo alimenticio consiste en el suministro de pasto ad libitum, complementado con silo de naranja (*Citrus x sinensis*) y minerales; adicionalmente se les suministra alimento concentrado, cuya ración aumenta en la medida en que los animales crecen, hasta alcanzar una cantidad entre 3 a 4 kg.d<sup>-1</sup>.

La extracción de semen se inicia cuando los animales alcanzan el año de edad; esta se realiza cada 7 d, dos veces.d<sup>-1</sup>. La rutina previa de trabajo consiste en baños, recortes de pelos del prepucio y lavados prepuciales con 20 mililitros (mL) de citrato de sodio al 2,9 %; al momento de la extracción se utiliza un toro de aproximadamente la misma altura como maniquí y se realiza un par de montas falsas antes de extraer el semen con vagina artificial.

### Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN genómico se aisló mediante metodologías de precipitación salina [16, 50], a partir de 18 pajuelas de semen

**TABLA I**  
**POLIMORFISMOS NUCLEOTÍDICOS SIMPLES DEL GEN *LEP* REVISADOS**  
**Y SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS**

Identificación	Ubicación	Oligonucleótidos	Fabricante
rs29004487	Exón 2	5'-GATTCCGCCGACCTCTC-3' 5'-CCTGTGCAAGGCTGCACAGCC-3' 5'-TGTCTTACGTGGAGGCTGTGCCAGCT-3'	Eurogentec
rs29004488	Exón 2	5'-AGGGTTTTGGTGTTCATCCTGGACCTTTCG-3' 5'-GACGATGTGCCACGTGTGGTTTCTTCTGT-3'	Macrogen
rs29004501	Intrón 2	5'-CGGTTCTACCTCGTCTCCAGTCCCTCC-3' 5'-CAAGCCCTCTTCAGATACAACC-3' 5'-ATTCAGGGAGGGTCACTTGC-3' 5'-TTTGTCCAAGATGGACCAGACATTTGT-3'	Eurogentec
rs29004508	Exón 3	5'-ACTGGTGAGGATCTGTTGGTAGAGCG-3'; 5'-CTCTCTCCCACTGAGCTCTTGCTCTC-3' 5'-GGAGTA GAGGGAAGCTTCCAGGACAA-3'	Macrogen

congelado y 25 muestras sanguíneas, estas últimas fueron obtenidas por medio de punción de la vena coccígea, mientras que las pajuelas de semen fueron obtenidas durante las colectas rutinarias de semen que se realizaron en el Centro de Inseminación.

Para el aislamiento del ADN a partir de sangre, se dispensaron 400 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de cada muestra y se solubilizaron con 1000  $\mu\text{L}$  de un tampón contentivo de TrisCl 20 milimolar (mM), pH 7,6, luego se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos (min). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 20.800 g (fuerza centrifuga relativa) por 20 segundos (seg) y el sobrenadante fue descartado. Las pastillas resultantes fueron incubadas en una solución de lisis contentiva de ácido etileno diaminotetraacético (EDTA 1 mM), Tris-Cl (10 mM), 0,1% de dodecil sulfato sódico (SDS), pH 8 a temperatura ambiente durante 20 min. El ácido ribonucleico (ARN) fue lisado agregando 2,5  $\mu\text{L}$  de ribonucleasa (Invitrogen®) y se incubó por 30 min a 37 °C. Los residuos proteicos fueron digeridos con 2,5  $\mu\text{L}$  de proteínasa K a una concentración de 20 miligramos por mililitro ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 4 horas (h) a 55 °C. Luego se utilizó acetato de potasio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ ), 5 molar (M) para precipitar los residuos peptídicos mediante centrifugación a 20.800 g. El sobrenadante fue mezclado con una solución de etanol absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) y acetato de sodio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) 0,12 M, con la finalidad de provocar la precipitación del ADN. El ADN aislado fue lavado dos veces con etanol al 70 % y solubilizado en un tampón de conservación contentivo de Tris (10 mM), EDTA (1 mM), pH 8.

Para el aislamiento de ADN a partir de semen, se dispensaron 30  $\mu\text{L}$  de cada muestra y fueron incubadas en una solución de

lisis (Tris 10 mM; cloruro de potasio (KCl) 50 mM; polisorbato 20 (Tween 20) 4,4 mM; Ditioneitol (DTT) 25 mM), y los residuos proteicos fueron digeridos con proteínasa k (2,5  $\mu\text{L}$ ; 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 6 h a 55 °C y 300 rpm (revoluciones por min). Posteriormente se utilizó 150  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 5 M, para precipitar los residuos peptídicos mediante centrifugación a 20.800 g. El sobrenadante fue mezclado con 700  $\mu\text{L}$  de una solución de Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) / Isopentanol ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$ ) (24:1), se centrifugó a 20.800 rcf. El sobrenadante fue mezclado con una solución de etanol absoluto y acetato de sodio 0,12 M con la finalidad de provocar la precipitación del ADN. El ADN aislado fue lavado dos veces con etanol al 70% y solubilizado en un tampón de conservación (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8).

Luego de finalizados los procesos de extracción de ADN, la concentración del mismo se midió por espectrofotometría a 260 nanómetros (nm).

#### **Polimorfismos evaluados y amplificación de ADN**

El número de referencia del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI), ubicación genómica de los SNP estudiados y las secuencias de los cebadores utilizados se presenta en la TABLA I.

Para evaluar los SNP rs29004487 y rs29004501, se realizaron amplificaciones en tiempo final, con el uso de cebadores descritos en la bibliografía [29]. En cuanto a los SNP rs29004488 y rs29004508, se utilizó un sistema de amplificación con cuatro cebadores (dos internos y dos externos), refractario a mutaciones, denominado TETRA PRIMER PCR [60], en la cual se obtienen

TABLA II

COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *LEP* EN TOROS CARORA

Componente	rs29004487	rs29004501	rs29004488	rs29004508
Agua	6,69 µL	7,73 µL	4,78 µL	4,94 µL
Buffer (5X)	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,1 mM	1,6 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM
CF (10 µM)	0,2 µM	0,2 µM	-	-
CR (10 µM)	0,2 µM	0,2 µM	-	-
CFRI (10 µM)	-	-	1 µM	1 µM
CFRE (10 µM)	-	-	0,2 µM	0,15 µM
Taq Polimerasa (5 U/µL)	0,75 U	0,7U	0,7 U	0,6 U
ADN	60 ng	50 ng	50 ng	50 ng

**Buffer:** tampón de amplificación; **MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio; **dNTPs:** desoxiribonucleótidos fosfatados; **CF:** cebador forward; **CR:** cebador reverse; **CFRI:** cebador forward y reverse internos; **CFRE:** cebador forward y reverse externos; **Taq polimerasa:** enzima polimerasa

TABLA III

PERFILES DE TEMPERATURA PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *LEP* EN TOROS CARORA

Fase		rs29004501	rs29004488	rs29004508
Desnaturalización inicial		95°C (5 min)	95°C (3 min)	95°C (3 min)
Ciclos	Desnaturalización	95°C (30 seg)	95°C (1 min)	95°C (1 min)
	Alineamiento	57,5°C (30 seg)	69,8°C (35 seg)	66°C (35 seg)
	Extensión	72°C (40 seg)	72°C (1 min)	72°C (1 min)
Extensión final		72°C (10 min)	72°C (5 min)	72°C (5 min)

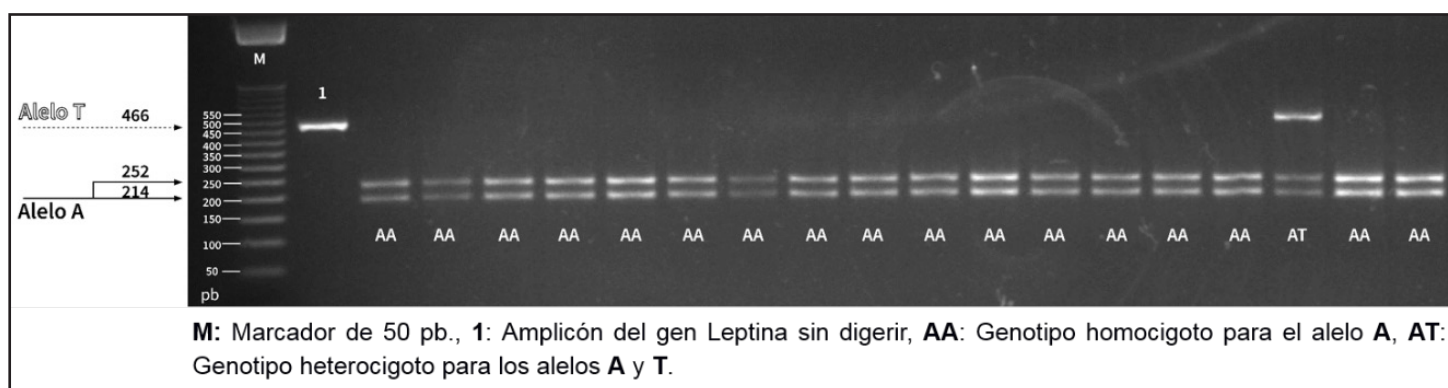


FIGURA 1. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE *LEP*ClaI (rs29004487) EN EL EXÓN 2 DEL GEN LEPTINA DIGERIDOS CON LA ENZIMA ClaI

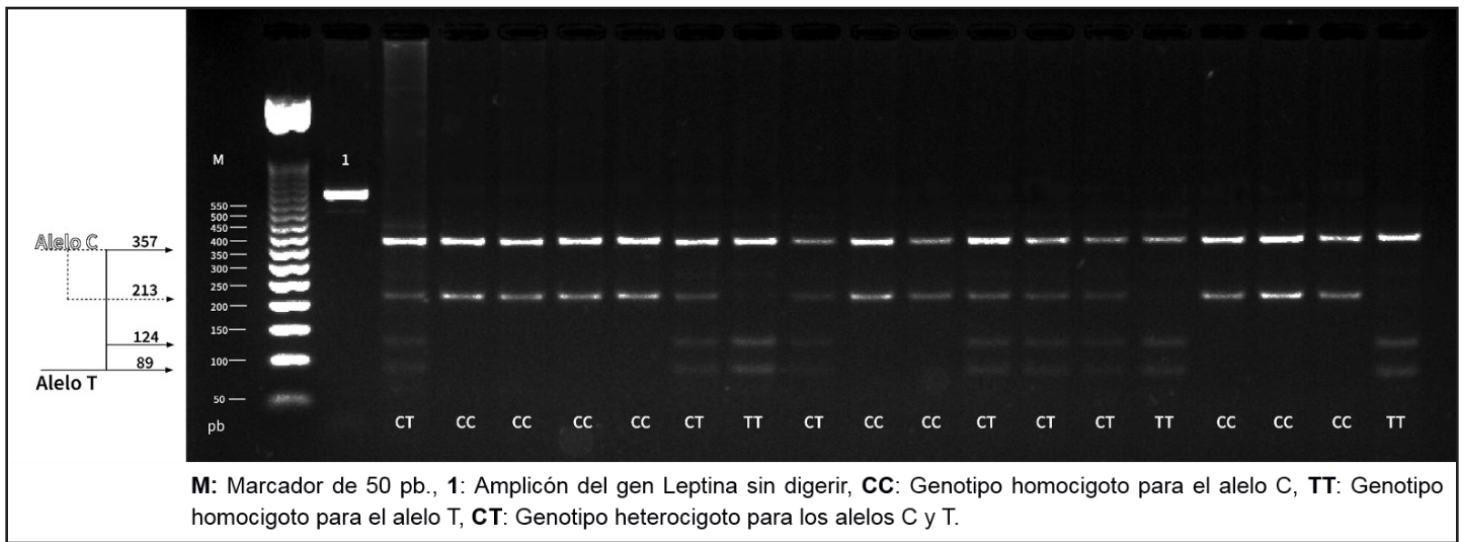


FIGURA 2. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LEPSau3AI (rs29004501) EN EL INTRÓN 2 DEL GEN LEPTINA DIGERIDOS CON LA ENZIMA Sau3A1

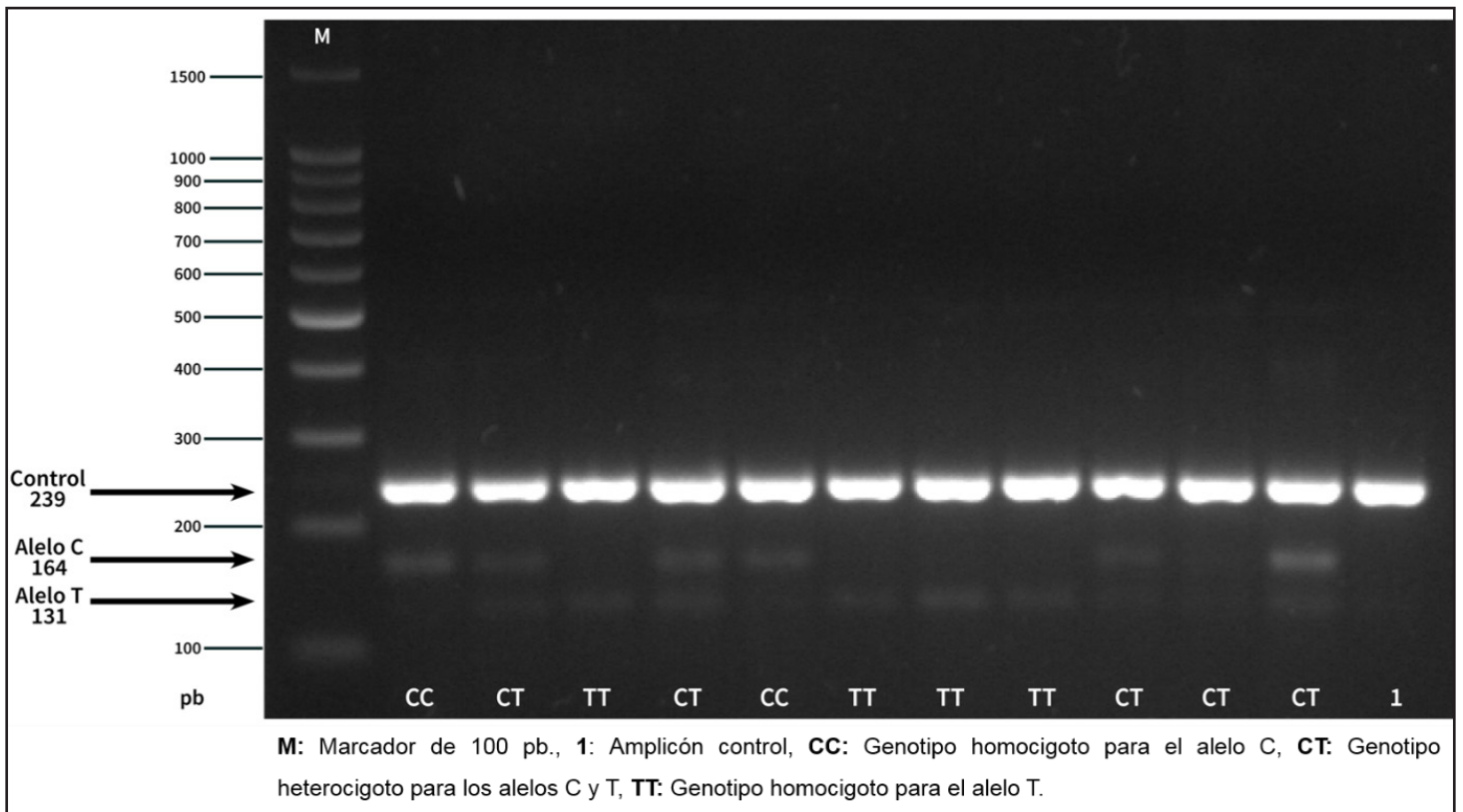


FIGURA 3) AMPLICONES DE LEPKpn2I (rs29004488) EN EL EXÓN 2 DEL GEN LEPTINA

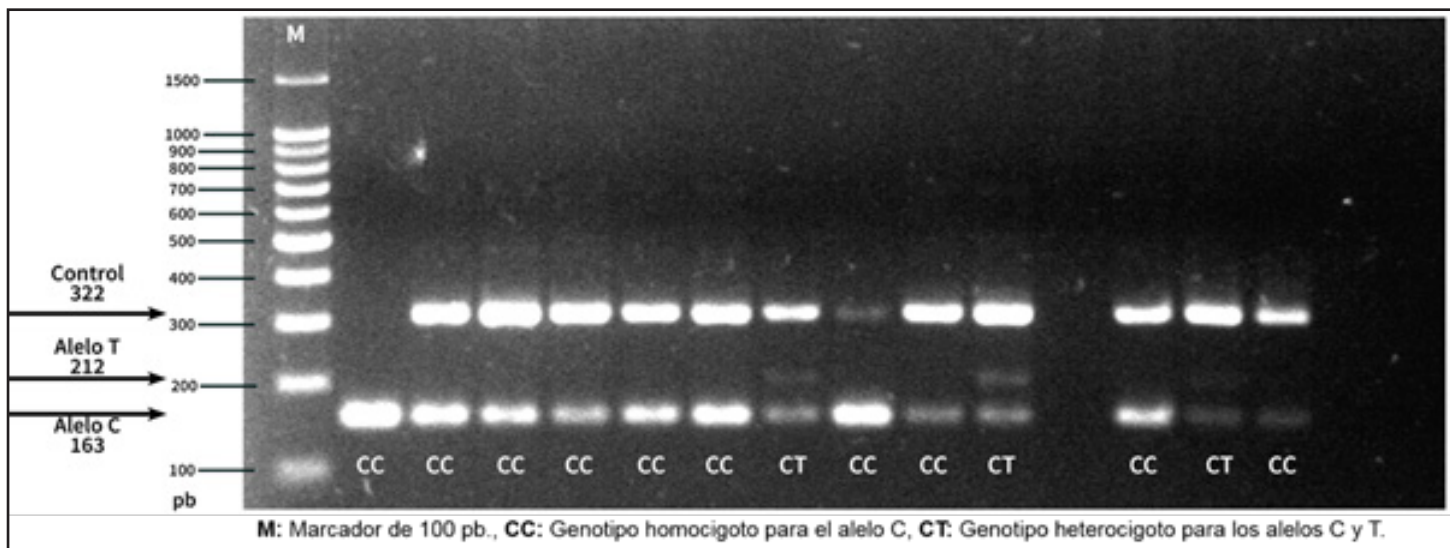


FIGURA 4) AMPLICONES DE LEPHphi (rs29004508) UBICADO EN EL EXÓN 3 DEL GEN LEPTINA

tres fragmentos de ADN. Para rs29004488 se utilizó un conjunto de cebadores descritos en trabajos previos [14]. En referencia al SNP rs29004508, se diseñó un conjunto de cebadores mediante el programa Primer 1 [13].

Las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para los cuatro polimorfismos evaluados se realizaron en un volumen de mezcla total de 15 µL; los componentes del tampón para la reacción de amplificación se describen en la TABLA II.

Los perfiles térmicos para rs29004501, rs29004488 y rs29004508, se detallan en la TABLA III. El SNP rs29004487, se amplificó mediante un perfil térmico que incluyó una metodología Touch Down [30], que se describe brevemente: desnaturalización inicial de 95 °C min, 12 ciclos de: 95 °C (30 seg), 65,4 °C (30 seg), 72 °C (45 seg), con disminución de la temperatura de alineamiento en 1 °C en cada ciclo hasta ubicarse en 53,4 °C, seguido de 18 ciclos de: 95 °C (30 seg), 53,4 °C (30 seg), 72 °C (45 seg) y una extensión final de 72 °C (10 min).

### Genotipificación

La genotipificación de rs29004487 y rs29004501 se realizó a través del análisis de la longitud de los fragmentos de restricción de un producto amplificado (PCR-RFLP); para el caso de rs29004488 y rs29004508, el sistema de amplificación TETRA PRIMER PCR utilizado [60], requiere de un único paso de amplificación por PCR, a partir del cual se realiza la genotipificación. El primer fragmento amplificado rs29004487, que tiene una longitud de 466 pares de bases (pb), fue sometido a una digestión simple con la enzima de restricción Clal, en un volumen total de 20 µL que contenía: 6,8 µL de agua ultra pura, 2 µL de Buffer C 10X Promega®; 0,2 µL de BSA (Bovine Serum Albumine) 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>; 1 µL de Clal 10 U.µL<sup>-1</sup>; 10 µL de ADN amplificado.

Buffer: tampón de ampificación; MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio;

dNTPs: desoxiribonucleótidos fosfatados; CF: cebador forward; CR: cebador reverse; CFRI: cebador forward y reverse internos; CFRE: cebador forward y reverse externos; Taq polimerasa: enzima polimerasa

El segundo fragmento amplificado rs29004501 (570 pb) se sometió a una digestión simple con la enzima de restricción Sau3AI en un volumen total de 20 µL que contenía: 8,8 µL de agua ultra pura; 2 µL de buffer C 10X (Promega®); 0,2 µL de BSA 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>; 1 µL de Sau3AI 10 U.µL<sup>-1</sup>; 8 µL de ADN amplificado. Ambas reacciones se incubaron a 37 °C durante 4 h.

Los productos de amplificación y digestión enzimática obtenidos, fueron verificados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 y 2,5 %, respectivamente.

### Análisis de la estructura genética poblacional

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) e índice de diversidad genética de Nei [43]. Así mismo, se probó el equilibrio de Hardy – Weinberg (HW) mediante el algoritmo de Levene [33], con estimaciones de  $\chi^2$  y de razón de verosimilitud ( $G^2$ ). Se calculó el índice de fijación  $F_{is}$  [58] y se estimó el desequilibrio de ligamiento (DL), a través de la medida compuesta de Burrows y pruebas de significancia  $\chi^2$  [57]. Para realizar estos análisis se utilizó el programa POPGENE 1.32 [61].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Productos de amplificación y genotipificación obtenidos

En el estudio del polimorfismo rs29004487 se obtuvo un producto de amplificación con el tamaño esperado (466 pb). El alelo T no presenta sitio de reconocimiento para la enzima Clal, por lo que permanece sin digerir; mientras que el alelo A posee el sitio de reconocimiento y el resultado de la digestión enzimática

se corresponde con dos fragmentos de 252 pb y 214 pb (FIG. 1).

Para rs29004501, se obtuvo un producto de amplificación con el tamaño esperado (570 pb). El alelo C presenta un sitio de reconocimiento para la enzima Sau3AI, por lo que se observaron dos fragmentos de 357 pb y 213 pb como productos de digestión (FIG. 2); mientras que el alelo T presentó dos sitios de reconocimiento por lo que se evidenció la presencia de tres fragmentos (357, 124 y 89 pb).

Para rs29004488 se obtuvieron tres fragmentos correspondientes a un segmento control de 239 pb, el alelo T de 131 pb y el alelo C de 164 pb (FIG. 3).

Finalmente, en el estudio de rs29004508, se observó la presencia de un fragmento control de 322 pb, así como de un fragmento de 212 pb que corresponde al alelo T y un fragmento de 163 pb que identifica al alelo C (FIG. 4).

#### Alelos y genotipos presentes

Se observaron dos alelos (A y T) y dos genotipos (AA y AT) en el polimorfismo rs29004487, el genotipo TT no fue detectado. Para el SNP rs29004488, se observaron dos alelos (C y T) y tres genotipos (CC, CT, TT); mientras que en el polimorfismo rs29004501, se evidenciaron dos alelos (C y T) y tres genotipos (CC, CT, TT). Finalmente, rs29004508 presentó dos alelos (C y T) y dos genotipos (CC / CT); el genotipo TT no fue observado.

Se ha reportado que el SNP rs29004487 promueve una transversión nucleotídica de adenina a timina (A/T) en el exón 2 que resulta en una sustitución aminoacídica no conservativa de tirosina a fenilalanina, en la proteína, [32]. En el caso del polimorfismo rs29004488, causa una transición de citosina a timina (C/T) en el exón 2 que genera un reemplazo aminoacídico de arginina a cisteína, en la proteína, [29]; este último, es un cambio no conservativo que altera la estructura de la proteína e impide la identificación por parte de los receptores en el hipotálamo, lo que origina cambios importantes en la acción hormonal y altera la regulación sobre las características de importancia económica [39].

En cuanto al SNP rs29004508, se ha reportado que promueve una transición de timina a citosina (T/C) en el exón 3, la cual resulta en un cambio aminoacídico conservativo de valina a alanina, en la proteína [29]. Por último, el SNP rs29004501, promueve una transición citosina a timina C/T en la secuencia del intrón 2 [47]. Alteraciones nucleotídicas en estas regiones resultan importantes, ya que, aunque los intrones no se traducen a proteína, cambios en su estructura pueden modular la expresión del gen.

En esta investigación, el SNP rs29004487 mostró frecuencia alta para el alelo A (0,98), así como del genotipo AA (0,95) (TABLA IV). Resultados similares se han reportado en animales British Friesian, Aberdeen Angus, Hereford, Highland y Charolais, con frecuencias de 0,96; 0,96; 0,88; 1,00 y 0,85 para el alelo A, y de 0,04; 0,04; 0,12; 0,00 y 0,15 para el alelo T, respectivamente [32]. Al igual que en las razas British Friesian, Aberdeen Angus y Highland, en la raza Carora no se evidenció el genotipo TT. Situación similar fue descrita en ganado Nelore, con frecuencias

alélicas de 0,999 y 0,001 para los alelos A y T, respectivamente, y frecuencias genotípicas de 0,998 y 0,002 para los genotipos AA y AT, sin detección del genotipo TT [15].

**TABLA IV**  
**FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS**  
**POLIMORFISMOS DEL GEN LEP EN TOROS**  
**DE RAZA CARORA**

Polimorfismo	Frecuencias alélicas		Frecuencias genotípicas	
rs29004487	A (84)	0,98	AA (41)	0,95
	T (2)	0,02	TT (2)	0,05
	C (69)	0,8	CC (29)	0,67
rs29004501			CT (11)	0,26
			TT (3)	0,07
	T (17)	0,2		
rs29004488	T (51)	0,59	CC (6)	0,14
			CT (23)	0,53
			TT (14)	0,33
rs29004508	C (35)	0,41		
	C (79)	0,94	CC (37)	0,88
	T (5)	0,06	CT (5)	0,12

En cuanto al SNP rs29004501, se evidenció mayor frecuencia del alelo C (0,80) con respecto al alelo T (0,20) (TABLA IV). Este patrón de frecuencias es similar al reportado por Kasprzak-Filipek y col. en razas nativas de Europa Central, en las cuales se detectaron frecuencias de 0,69 y 0,31 para los alelos C y T [26]. Moravcikova y col. reportaron frecuencias alélicas de 0,896 y 0,103 para C y T en vacas Pinzgau [40], mientras que Öner y col. obtuvieron frecuencias de 0,76 y 0,24 para C y T, en vacas Holstein turcas [46]. En cuanto a los genotipos, los resultados de la presente investigación muestran frecuencias que se pueden definir como alta, media y baja para los genotipos CC, CT y TT, respectivamente; este esquema es similar al reportado en otros estudios donde se evidenciaron frecuencias de 0,80; 0,193 y 0,0063 [40, 46].

En la evaluación del SNP rs29004488 se identificó al alelo T como el más frecuente, mientras que el alelo C resultó el menos frecuente, con valores de 0,59 y 0,41, respectivamente (TABLA IV); estos resultados son similares a los reportados en las razas Angus y Hereford (0,58 y 0,55), y son superiores a los detectados (0,34 y 0,32) en las razas Charolais y Simmental [10]. En el caso del alelo C se observan frecuencias similares a las descritas en las razas Angus y Hereford (0,42 y 0,45) e inferiores a las reportadas en Charolais y Simmental (0,66 y 0,68). Los resultados obtenidos muestran diferencias en cuanto a las frecuencias alélicas de T y C (0,48 y 0,52, respectivamente) y de los genotipos TT, CT y CC (0,24; 0,48 y 0,28, respectivamente) en ganado Holstein, donde al alelo C fue el más frecuente [55].

Finalmente, las frecuencias alélicas y genotípicas en el SNP rs29004508 (TABLA IV), muestran que el alelo C resultó el más frecuente (0,94) comparado al alelo T (0,06). El genotipo CC

se presentó en la mayoría de los animales, en contraste con el genotipo CT, mientras que el genotipo TT no fue detectado. Este patrón es similar al encontrado en vacas Holstein iraníes, con frecuencias de 0,782 y 0,218 para los alelos C y T, respectivamente, así como de 0,588 y 0,388 para los genotipos CC y CT en el mismo orden [59], sin embargo, se destaca que estos investigadores detectaron el genotipo TT (0,024), que no fue evidenciado en el presente estudio. De igual forma, en ganado Nelore se han reportado frecuencias alélicas de 0,99 y 0,01 para los alelos C y T, respectivamente, así como frecuencias genotípicas de 0,998 y 0,02 para CC y CT en el mismo orden, sin la detección del genotipo TT [15], esto es similar a lo presentado en este estudio. Por otra parte, Ardicli y col. trabajando con toros Holstein turcos, reportaron frecuencias de 0,147; 0,202 y 0,650 para los genotipos CC, CT y TT, respectivamente, donde destaca la presencia del genotipo TT [2]. Adicionalmente, en vacas Holstein eslovacas se determinaron frecuencias de 0,69 y 0,31 para los alelos C y T, respectivamente y 0,48; 0,43 y 0,09 para los genotipos CC, CT y TT [55].

En este trabajo no se observó el genotipo TT en los SNP rs29004487 y rs29004508, esto puede explicarse por el número reducido de animales utilizado como unidades experimentales y la baja frecuencia del alelo T para ambos SNP, aunque esto último es un hallazgo similar a reportes previos en otras poblaciones bovinas [18, 32, 59].

Estudios anteriores han demostrado la asociación entre los polimorfismos del gen LEP y algunos rasgos de importancia económica en el ganado bovino, como producción láctea, producción de carne, crecimiento y rasgos reproductivos. En el caso de la producción láctea, se ha reportado que el alelo T de rs29004488, el alelo C de rs29004501 y el alelo C de rs29004508 se encuentran asociados con el incremento del rendimiento lechero en ganado Holstein y Negro-Blanco polaco [7, 31, 54], así como con el contenido de grasa, proteína, lactosa y punto de congelación de la leche en ganado Jersey y Holstein [6, 8, 38].

En cuanto a la producción de carne, se ha reportado que los SNP rs29004487 y rs29004488 se encuentran asociados con características de rendimiento magro y de la grasa en la canal bovina. El alelo T de rs29004488 ha sido asociado con disminución del rendimiento magro y aumento de los depósitos, así como del grado de la grasa de la canal bovina, explicando aproximadamente el 4 % de la variación fenotípica de este rasgo [52]. Por otra parte, en este mismo trabajo [52], se reportó que el alelo T de rs29004487 se encuentra asociado con un alto rendimiento magro y bajo contenido graso de la canal. De igual forma, se destacó la baja frecuencia de este alelo, reportando que la variación fenotípica asociada a este SNP, aumenta en la medida que se incrementa la frecuencia del mismo [52]. En cuanto a los rasgos de calidad y contenido de ácidos grasos de la canal, se ha mencionado que los mismos se encuentran asociados a los genotipos AA de rs29004487, CC de rs29004488 y CC de rs29004508, en ganado negro japonés [27].

En el aspecto reproductivo se ha reportado que algunos polimorfismos del gen LEP pueden afectar el intervalo parto – primer servicio y la edad al primer servicio en vacas Holstein [24], así como características seminales en el búfalo (*Bubalus bubalis*) y en el hombre [37, 45].

Esta investigación constituye un primer abordaje para la caracterización del gen LEP en ganado Carora y permitirá considerar el potencial genético de la raza para la producción de leche o de carne, con características de valor añadido como grasa en leche o ácidos grasos de la canal, así como algunos rasgos reproductivos. Los alelos y genotipos identificados como favorables en los estudios previos mencionados, se presentan en frecuencias muy similares a las encontradas en la muestra de toros Carora y constituye una oportunidad para el desarrollo de estudios de asociación de rasgos productivos de importancia, con polimorfismos del gen LEP. De comprobarse estas relaciones, los hallazgos pueden ser utilizados en metodologías de selección asistida por marcadores que complementen el programa de mejoramiento genético de la raza.

### Índices genéticos

Los rebaños Carora han sido sometidos a un intenso proceso de selección para el incremento de la producción lechera en términos de cantidad y calidad [11], de acuerdo a Attia y col. [4], el tamaño reducido de la población y los procesos de selección, pueden promover el desequilibrio genético en una población. No obstante, la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) mostrada en la TABLA V evidencia que el programa de mejoramiento genético de la raza no ha afectado el equilibrio de HW.

Sin embargo, los valores de heterocigosidad observada en los SNP rs29004487, rs29004501 y rs29004508, se encuentran por debajo de 0,5 (50 %). El cálculo de la heterocigosidad es una de las maneras más precisas para medir la diversidad genética de la población [44] y obtener una visión general de la variabilidad genética [36]. Así mismo, se ha sugerido que valores de heterocigosidad por debajo de 0,5 indican una variación baja del gen en la población [23]. De igual forma, el índice de diversidad genética de Nei muestra valores por debajo de 0,5. Se ha mencionado que la diversidad es máxima cuando este índice presenta valores cercanos a 1, y mínima cuando se acerca a 0 [48]. La muestra de toros Carora estudiada constituye una base genética de bajo número que ha sido sometida a un intenso proceso de selección para la producción lechera, e indirectamente para fertilidad y calidad seminal. Lo anterior puede haber ocasionado valores de heterocigosidad por debajo de 0,5 para estos alelos en la población.

En cuanto al índice de fijación o coeficiente de endogamia, se ha mencionado que constituye una medida de la desviación de las frecuencias genotípicas en términos de exceso o deficiencia de heterocigotos [58]. El valor de este índice varía entre -1 y 1; los valores negativos indican un exceso de heterocigotos respecto al equilibrio de HW. Los resultados obtenidos, permiten afirmar que no existe endogamia en la muestra de toros Carora bajo estudio (TABLA V); al mismo tiempo, los valores negativos muestran que no existe deficiencia de individuos heterocigotos para los SNP rs29004487, rs29004488 y rs29004508, mientras que para el SNP rs29004501, se observa un déficit no significativo, lo que corrobora la existencia de equilibrio de HW en la población estudiada, mencionada anteriormente.

Los resultados de la presente investigación muestran la

TABLA V  
PARÁMETROS GENÉTICOS DE LA POBLACIÓN DE TOROS CARORA ESTUDIADA

Equilibrio de Hardy–Weinberg (HW), Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) e Índice de Diversidad Genética de Nei				
Polimorfismo	HW (P- value)	$H_o$	Nei	
rs29004487	0,012 (0,913)	0,047	0,045	
rs29004488	0,4 (0,527)	0,535	0,483	
rs29004501	1,864 (0,172)	0,256	0,317	
rs29004508	0,133 (0,715)	0,119	0,112	
Índice de Fijación				
Alelos / Locus	rs29004487	rs29004488	rs29004501	rs29004508
A	-0,024			
C		-0,108	0,194	-0,063
T	-0,024	-0,108	0,194	-0,063
Total	<b>-0,024</b>	<b>-0,108</b>	<b>0,194</b>	<b>-0,063</b>
Desequilibrio de ligamiento				
Polimorfismos		rs29004488	rs29004501	rs29004508
rs29004487	<i>D</i>	0,014	-0,005	-0,001
	<i>D'</i>	0,995	0,985	0,948
	<i>r</i>	0,188	-0,078	-0,037
	<i>P</i>	0,084	0,478	0,733
rs29004488		<i>D</i>	-0,05	-0,003
		<i>D'</i>	0,606	0,115
		<i>r</i>	-0,252	-0,024
		<i>P</i>	0,021	0,827
rs29004501			<i>D</i>	-0,012
			<i>D'</i>	0,994
			<i>r</i>	-0,126
			<i>P</i>	0,248

*D*: coeficiente de desequilibrio de ligamiento; *D'*: coeficiente de desequilibrio de ligamiento estandarizado; *r*: coeficiente de correlación; *P*: valor de probabilidad ( $P < 0,05$ )

existencia de desequilibrio de ligamiento entre la mayoría de los SNP (TABLA V). El DL se define como un patrón de asociación estadística no aleatoria entre alelos de diferentes loci de un cromosoma, en una población, que ocasiona la segregación en conjunto de los mismos [41], o en bloques de haplotipos que resultan en combinaciones específicas de variantes alélicas que se transmiten en conjunto a la descendencia [4]. El coeficiente *D'* puede alcanzar valores entre 0 y 1, mientras mayor sea el valor, mayor será el grado de ligamiento entre las variantes alélicas. De igual forma, los valores del coeficiente *r*, pueden ubicarse en el rango de 0 y 1, con el mismo significado del coeficiente *D'*. En este estudio es evidente la existencia de un alto grado de asociación entre el par rs29004487 - rs29004488, con un valor de *D'* cercano a 1; la misma situación ocurre entre los pares rs29004487 - rs29004501 y rs29004487 - rs29004508. Esto sugiere que estos SNP segregaran de forma conjunta en la mayoría de los casos. Sin embargo, el coeficiente de correlación

(*r*) es bajo, lo cual indica que no se encuentran completamente ligados. Esto difiere a lo establecido en trabajos previos [7], y significa que no se puede inferir el genotipo del conjunto de polimorfismos a partir de la genotipificación de uno de los SNP de este grupo. A excepción del par rs29004488 – rs29004501, las asociaciones detectadas en la presente investigación resultaron no significativas.

### CONCLUSIONES

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs29004487, rs29004488, rs29004501 y rs29004508 en la población de toros de raza Carora estudiada, son similares a las obtenidas en otros individuos *Bos taurus*.

No se detectó el genotipo TT en los SNP rs29004487 y rs29004508, hallazgo similar a reportes previos en otras poblaciones bovinas.

La evaluación del Equilibrio H-W indicó la existencia de equilibrio en la población, así como de estabilidad génica.

La heterocigosidad observada, mostró la presencia de una moderada diversidad en los SNP rs29004488/ rs29004501, y así mismo una baja diversidad en los SNP rs29004487/ rs29004508.

El índice de fijación mostró un bajo nivel de consanguinidad en la población de toros de raza Carora estudiada.

El estudio demostró la existencia de desequilibrio de ligamiento entre la mayoría de los SNP evaluados. No obstante, no se encuentran completamente ligados.

El gran potencial de la raza Carora como recurso zoogenético tropical, fue confirmado a nivel genético molecular. Las frecuencias de los alelos y genotipos evaluados podrían confirmar que estos animales pueden ser utilizados en sistemas lecheros intensivos, así como de doble propósito. No obstante, se requiere incrementar la base muestral con el fin de realizar una estimación más exacta de las frecuencias alélicas y genotípicas de estos polimorfismos en la raza Carora.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Inseminación Artificial Carora (CIAC) y al programa de Estímulo a la Investigación e Innovación (PEII), Proyecto N° 201200674: "Caracterización de las variantes alélicas de genes candidatos implicados en el control de la actividad reproductiva de toros de raza Carora, con fines de selección y mejoramiento genético".

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] AGARWAL, R.; ROUT, P.K.; SINGH, S.K. Leptin: a biomolecule for enhancing livestock productivity. **Indian J. Biotechnol.** 8(2): 169-176. 2009
- [2] ARDICLI, S.; SAMLI, H.; DINCEL, D.; SOYUDAL, B.; BALCI, F. Individual and combined effects of CAPN1, CAST, LEP and GHR gene polymorphisms on carcass characteristics and meat quality in Holstein bulls. **Arch. Anim. Breed.** 60: 303-313. 2017
- [3] ASOCRICA. "Raza Carora", un logro tropical. **XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal**. Valera, 22 - 26 octubre 2002, Venezuela. Memorias., Pp. 1 -11. 2002.
- [4] ATTIA, J.; IOANNIDIS, J.P.; THAKKINSTIAN, A.; MCEVOY, M.; SCOTT, R.J.; MINELLI, C.; THOMPSON, J.; INFANTE-RIVARD, C.; GUYATT, G. How to use an article about genetic association (A: Background Concepts). **J. Ame. Med. Assoc.** 301(1): 74-81. 2009
- [5] AUWERX, J.; STAELS, B. Leptin. **Lancet.** 351(9104): 737-742. 1998
- [6] BALAKIREV, N.A.; SAPHINA, N.Y.; YULMETEVA, Y.R.; SHAKIROV, S.K.; ZINNATOVA, F.F. Association of Leptin Gene (LEP) Polymorphism with Growth Rates and Milk Production in Holstein First-Calf Heifers. **Russ. Agric. Sci.** 44(5): 460-464. 2018
- [7] BANOS, G.; WOOLLIAMS, J.A.; WOODWARD, B.W.; FORBES, A.B.; COFFEY, M.P. 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. **J. Dairy Sci.** 91: 3190-3200. 2008
- [8] BHAT, S.A.; AHMAD, S.M.; GANAI, N.A.; KHAN, S.M.; MALIK, A.; SHAH, R.A.; IQBAL, Z. Association of DGAT1, beta-casein and leptin gene polymorphism with milk quality and yield traits in Jersey and its cross with local Kashmiri cattle. **J. Entomol. Zool. Stud.** 5(6): 557-561. 2017
- [9] BIDWELL, C.A.; JI, S.; FRANK, G.R.; CORNELIUS, S.G.; WILLIS, G.; SPURLOCK, M.E. Cloning and expression of the porcine obese gene. **Anim. Biotechnol.** 8(2): 191-206. 1997
- [10] BUCHANAN, F.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G.; THUE, T.D.; WINKELMA-SIM, D.C.; SCHMUTZ, S.M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genet. Select. Evol.** 34(1): 105-116. 2002
- [11] CERUTTI, F.; ALVAREZ, J.C.; RIZZI, R. Development of the Carora breed. **8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**. Belo Horizonte, 13 - 18 agosto 2006, Brasil. Proceeding., CDROM. 2006.
- [12] COLEMAN, D.L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetol.** 14(3): 141-148. 1978
- [13] COLLINS, A.; KE, X. Primer1: Primer Design WEB Service for Tetra-Primer ARMS-PCR. **Bioinform. J.** 6(1): 55-58. 2012
- [14] CORVA, P.M.; FERNÁNDEZ-MACEDO, G.V.; SORIA, L.A.; PAPALEO-MAZZUCCO, J.; MOTTER, M.; VILLAREAL, E.L.; SCHOR, A.; MEZZADRA, C.A.; MELUCCI, L.M.; MIQUEL, M.C. Effect of polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. **Genet. Molec. Res** 8(1): 105-116. 2009
- [15] DA SILVA, R.C.; FERRAZ, J.B.; MEIRELLES, F.V.; ELER, J.P.; BALIEIRO, J.C.; CUCCO, D.C.; MATTOS, E.C.; REZENDE, F.M.; SILVA, S.L. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. **Genet. Molec. Res** 11(4): 3721-3728. 2012
- [16] DE LA ROSA, O.; VÁSQUEZ, B.; MARQUES, A.; DICKSON, L. Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. **II Congreso venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación**. LOC-TI-PEII. Caracas, 07 - 10 noviembre 2013, Venezuela. Libro de Resúmenes, Tomo 2. Pp. 437. 2013.
- [17] DYER, C.J.; SIMMONS, J.M.; MATTERI, R.L.; KEISLER, D.H. cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY1 receptor, and NPY2 receptor. **Dom. Anim. Endocrinol.** 14(5): 295-303. 1997

- [18] GIBLIN, L.; BUTLER, S.; KEARNEY, B.M.; WATERS, S.M.; CALLANAN, M.; BERRY, D. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. **Genet.** 11(73): 2-10. 2010
- [19] GUERRA, M.; TRUJILLO, E.; CERÓN-MUÑOZ, M. Estimación de polimorfismos del gen leptina bovino en poblaciones de las razas criollas Hartón del Valle, Blanco Orejinegro (BON) y en la raza Brahman. **Rev. Colomb. Cien. Pec.** 18(3): 3-9. 2005
- [20] HAEGEMAN, A.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Anim. Genet.** 3(1): 79-86. 2000
- [21] HATAMI-BAROOGH, L.; RAZAVI, S.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; TAVALEE, M.; TANHAEI, S.; GHAEDI, K.; DEEMEH, M.; RABIEE, F.; NASR-ESFAHANI, M. Evaluation of the leptin receptor in human spermatozoa. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 8: 17-23. 2010
- [22] HOUSEKNECHT, K.; BAILE, C.A.; MATTERI, R.L.; SPURLOCK, M.E. The Biology of Leptin: A review. **J. Anim. Sci.** 76(5): 1405-1420. 1998
- [23] JAVANMARD, A.; ASADZADEH, N.; BANABAZI, M.H.; TAVAKOLIAN, J. The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription factor and Leptin genes in iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. **Iranian J. Biotechnol.** 3: 104-108. 2005
- [24] JECMINKOVA, K.; KADLECOVA, V.; STADNIK, L. Association of DGAT1 and leptin with fertility traits in Holstein cows. **Acta Fytotechn. Zootechn.** 19 (Special Issue): 34-37. 2016
- [25] JI, S.; WILLIS, G.M.; SCOTT, R.R.; SPURLOCK, M.E. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. **Anim. Biotechnol.** 9(1): 1-14. 1998
- [26] KASPRZAK-FILIPEK, K.; SAWICKA-ZUGAJ, W.; LITWINCZUK, Z.; CHABUZ, W.; SVEISTIENÉ, R.; BULLA, J. Assessment of the genetic structure of central european cattle breeds based on functional gene polymorphism. **Global Ecol. Conserv.** e00525. 2019
- [27] KAWAGUCHI, F.; OKURA, K.; OYAMA, K.; MANNEN, H.; SASAZAKI, S. Identification of leptin gene polymorphisms associated with carcass traits and fatty acid composition in Japanese Black cattle. **Anim. Sci. J.** 88(3): 433-438. 2017
- [28] KOMISAREK, J.; ANTKOWIAK, I. The relationship between leptin gene polymorphisms and reproductive traits in Jersey cows. **Polish J. Vet. Sci.** 10(4): 193-197. 2007
- [29] KONFORTOV, B.A.; LICENCE, V.E.; MILLER, J.R. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammal. Gen.** 10(12): 1142-1145. 1999
- [30] KORBIE, D.; MATTICK, J. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols.** 3(9): 1452-1456. 2008
- [31] KULIG, H. Association between leptin combined genotypes and milk performance traits of Polish Black and white cows. **Arch. Tierz.** 48(6): 547-554. 2005
- [32] LAGONIGRO, R.; WIENER, P.; PILLA, F.; WOOLLIAMS, J.A.; WILLIAMS, J.L. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Anim. Genet.** 34(5): 371-374. 2003
- [33] LEVENE, H. On a matching problem in genetics. **Ann. Math. Statist.** 20(1): 91-94. 1949
- [34] LIEFERS, S.C.; TE PAS, M.F.; VEERKAMP, R.F.; VAN DER LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. **J. Dairy Sci.** 85(6): 1633-1638. 2002
- [35] LIEFERS, S.C.; VEERKAMP, R.F.; TE PAS, M.F.; DELAUAUD, C.; CHILLIARTL, M.; PLATJE, M.; VAN DER LENDE, T. Leptin promoter mutation affects leptin levels and performance traits in dairy cows. **Anim. Genet.** 36(2): 111-118. 2005
- [36] MARSON, E.P.; FERRAZ, J.B.; MEIRELLES, F.V.; BALIEIRO, J.C.; ELER, J.P.; FIGUEIREDO, L.G.; MOURAO, G.B. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. **Genet. Molec. Res.** 4(3): 496-505. 2005
- [37] MARTÍNEZ, R.; ROCHA, J.F.; BEJARANO, D.; GÓMEZ, Y.; ABUABARA, Y.; GALLEGO, J. Identification of SNPs in growth-related genes in colombian creole cattle. **Genet. Molec. Res.** 15(3): 1-16. 2016
- [38] METIN, J.; ARSLAN, K.; AKYUZ, B.; ALIBER, M.; GAMZE, E.; ULAS, M. Relationships between polymorphisms of growth hormone, leptin and myogenic factor 5 genes with some milk yield traits in Holstein dairy cows. **Int. J. Dairy Technol.** 72(1): 1-7. 2019
- [39] MONTOYA, A.; CERÓN-MUÑOZ, M.; TRUJILLO, E.; RAMIREZ, E.; ÁNGEL, P. Frecuencia de los marcadores del gen Leptina en razas bovinas criollas y colombianas: Romosinuano, Chino Satnadereano, Sanmartinero y Velásquez. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIX(1): 38-48. 2009
- [40] MORAVCIKOVA, N.; TRAKOVICKA, A.; KASARDA, R. Polymorphism within the Intron Region of the bovine Leptin Gene in Slovak Pinzgau Cattle. **Anim. Sci. Biotechnol.** 45(1): 211-214. 2012
- [41] MUELLER, J.C. Linkage disequilibrium for different scales and applications. **Brief. Bioinform.** 5(4): 355-64. 2004
- [42] NASSIRY, M.R.; MOUSSAVI, A.H.; ALASHAWKANY, A.R.; GHOVATI, G.S. Leptin gene polymorphism Iranian Native Golpayegani and Taleshi cows. **Pakist. J. Biol. Sci.** 10(20): 3788-3741. 2007

- [43] NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genet.** 20: 583-590. 1978
- [44] NEI, M.; KUMAR, S. Analysis of Allele Frequency Data. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press. Pp. 333. 2000.
- [45] NIKBAKHT, G.; ALÍ MEHR, M.R.; BAGHBANZADEH, A.; TAJIK, P.; TAMANINI, C.; EMAM, M. Leptin receptor mRNA in bull ejaculated spermatozoa. **Reprod. Dom. Anim.** 45: 237-242. 2010
- [46] ÖNER, Y.; YILMAZ, O.; OKUT, H.; ATA, N.; YILMAZBASMECITOGLU, G.; KESLIN, A. Associations between GH, PRL, STAT5A, OPN, PIT-1, LEP and FGF2 polymorphisms and fertility in Holstein-Friesian heifers. **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.** 23(4): 527-534. 2017
- [47] POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A.C.; BARENDSE, W. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR based polymorphism. **J. Anim. Sci.** 75(5): 1427-1430. 1997
- [48] RIVERA, P.; TICLLA, M.; BALDA, L.; GONZALEZ, D.; CÉSPEDES, M. Diversidad genética de aislamientos peruanos de *Leptospira* spp. mediante electroforesis en gel de campo pulsado. **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publ.** 29(4): 469-476. 2012
- [49] RIZZI, R.; PEDRON, O.; SAMORÉ, A.; HAHN, M.; RIERA, M.; VILA, V. Parámetros genéticos de las características morfológicas de ganado Carora. **Rev. Cientif. FVC-LUZ.** XVII(1):2007
- [50] SALAZAR, S.; MARQUES, A.; VÁSQUEZ, B.; DE LA ROSA, O. Protocolo para aislamiento de ADN genómico a partir de semen congelado bovino. V **Congreso Venezolano de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola**. Maracay, 13 – 15 junio 2012, Venezuela. Resúmenes, Pendrive. 2012.
- [51] SALAZAR, S.; VÁSQUEZ, B.; MARQUES, A.; VILANOVA, L.; REYES, S.; DE LA ROSA, O. Determinación de variantes alélicas en el intrón 2 del gen Leptina en un plantel seleccionado de toros Carora. **Rev. Fac. Agron.** 41(Supl. 1): 26. 2015
- [52] SHENKEL, F.S.; MILLER, S.P.; YE, X.; MOORE, S.S.; NK-RUMAH, J.D.; YU, C.L.; MANDELL, I.B.; WILTON, J.W.; WILLIAMS, J.L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **J. Anim. Sci.** 83: 2009-2020. 2005
- [53] STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; BEATTIE, C. Two polymorphic microsatellites within an 18 kb genomic clone containing the bovine ob gene. **Anim. Genet.** 27(3): 216. 1996
- [54] SZYDA, J.; KOMISAREK, J. Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 90: 2971-2979. 2007
- [55] TOMKA, J.; VASÍCKOVÁ, K.; ORAVCOVÁ, M.; BAUER, M.; HUBA, J.; VASÍCEK, D.; PESKOVICOVÁ, D. Effects of polymorphisms in DGAT1 and LEP genes on milk traits in Holstein primiparous cows. **Mljekarstvo.** 66(2): 122-128. 2016
- [56] VÁSQUEZ, B.; SALAZAR, S.; MARQUES, A.; DE LA ROSA, O.; ARANGUREN-MENDEZ, J.A. Polimorfismos del gen Leptina (LEP) en ganado Criollo Limonero. Evaluación Preliminar. **I Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación.** LOCTI – PEIL. Caracas, 23 – 25 septiembre 2012, Venezuela. Libro de Resúmenes, Tomo I, Pp. 217. 2012.
- [57] WEIR, B. Inferences about Linkage Disequilibrium. **Biometrics.** 35(1): 235-254. 1979.
- [58] WRIGHT, S. Genetic Variability in Natural Populations: Methods. **Variability within and among natural populations.** Chicago: The University Chicago Press. Pp. 590.1978.
- [59] YAZDANI, H.; RAHMAN, H.R.; EDRIS, M.A.; DIRANDEH, E. Association between A59V polymorphism in exon 3 of leptin gene and reproduction traits in cows of iranian Holstein. **African J. Biotechnol.** 9(36): 5997-6000. 2010
- [60] YE, S.; DHILLON, S.; KE, X.; COLLINS, A.R.; DAY, I.N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Res.** 29(17): e88. 2001
- [61] YEH, F.; YANG, R.C.; BOYLE, T.; YE, Z.; MAO, J.X. POPGENE Version 1.31: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide. 1999. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. On line: <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>. 15/05/2015.
- [62] ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEL, M.; BARONE, M.; LEOPOLDO, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional Cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature.** 372(6505): 425-432. 1994