

## Estimación de las frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3 en una población de ganado Holstein de La Pampa mediante secuenciación directa.

Baltian, L.R.<sup>1</sup>; Ripoli, M.V.<sup>2</sup>; Takeshima S.N.<sup>3</sup>; Aida, Y.<sup>3</sup>; Giovambattista, G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116 (6360), General Pico. La Pampa.

<sup>2</sup>IGEVET- CCT LA PLATA – CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118 S/N (1900), La Plata. Buenos Aires.

<sup>3</sup>Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan.

[lbaltian@speedy.com.ar](mailto:lbaltian@speedy.com.ar)

### Resumen

El objetivo del presente estudio consistió en estimar las frecuencias alélicas del exón 2 del gen de Clase II del Sistema Principal de Histocompatibilidad BoLA-DRB3 en una población de ganado Holstein de la provincia de La Pampa. Los polimorfismos presentes en el exón 2 del gen BoLA-DRB3 se identificaron mediante la técnica de secuenciación directa (PCR-SBT). Los resultados obtenidos permitieron detectar un total de 21 alelos con un rango de frecuencia de 0,014 a 0,222. Esto resultó en una heterocigosidad esperada de 0,91. Estos resultados se compararon con los reportados para ganado Holstein de Japón, evidenciando que con la excepción del alelo BoLA-DRB3\*1201, ambas poblaciones presentaron los mismos alelos mayoritarios (BoLA-DRB3\*1101, \*1501 y \*0101). Este resultado sería consecuencia del alto nivel de homogeneidad exhibido por esta raza, debido al uso de la misma genética a nivel global.

**Palabras claves:** BoLA-DRB3, polimorfismo, secuenciación directa, diversidad genética

### Abstract

**Gene frequencies of BoLA-DRB3 alleles estimated through sequence-based typing (PCR-SBT) in a Holstein population of La Pampa province.**

The objective of this study was to estimate allele frequencies of the BoLA-DRB3 exon 2 in a Holstein population from La Pampa province. The exon 2 polymorphisms were genotyped by sequence-based typing method (PCR-SBT). In the studied herd, a

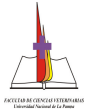
total of 21 variants were detected, ranging from 0.014 to 0.222. This resulted in an expected heterozygosity of 0.91. Obtained data were compared with those reported for Japanese Holstein population, showing that with the exception of BoLA-DRB3\*1201 allele, both populations shared the same major variants (BoLA-DRB3\*1101, \*1501 and \*0101). This result could be consequence of the high level of homogeneity present in Holstein breed, due to the use of same genetic on the whole world.

**Key words:** BoLA-DRB3, polymorphism, sequence-based typing, diversity genetics.

### Introducción

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) bovino es conocido también como BoLA (*Bovine Leukocyte Antigen*) (Amorena y Stone, 1978; Spooner et al., 1978). El BoLA ha sido mapeado en el cromosoma bovino 23 (BTA23) (Freis et al., 1993), y está constituido, al igual que en el resto de los mamíferos, por genes de Clase I, II y III.

Las proteínas codificadas por los genes de clase II son glicoproteínas que se ubican en la superficie celular y cuya función principal es la presentación de péptidos antigénicos a las células T CD4+. Estas moléculas están constituidas por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas de forma no covalente, y codificadas por genes independientes (Por ejemplo, DQA, DRA, DQB y DRB). Los genes de Clase II son los más estudiados porque presentan altos niveles de polimorfismo en el dominio  $\beta$ 1 (codificado por el segundo exón del gen), que es el sitio de unión del péptido antigénico a la proteína (Takeshima & Aida, 2006; Yoshida et al., 2009).



Los genes del BoLA desempeñan un rol central en la respuesta inmune y han sido asociados con resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas y autoinmunes, tales como mastitis, leucosis, dermatofilosis y parasitosis (endo y ectoparásitos), responsables de importantes pérdidas económicas. Además, estos polimorfismos han sido relacionados con variables de respuesta inmune y con diferentes características productivas, como por ejemplo producción de leche y crecimiento (Takeshima & Aida, 2006). Finalmente, el BoLA también ha sido asociado con resistencia/susceptibilidad a enfermedades bovinas, tales como paresia espinal posterior, quetosis y retención de placenta (Josten et al., 1991; Park et al., 1993; Mejdell et al., 1994). Por lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar las frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3 en una población de Holstein de La Pampa mediante secuenciación directa del segundo exón de este gen y comparar los resultados obtenidos con los previamente reportados para ganado Holstein de Japón.

### ***Materiales y Métodos***

Se extrajeron 5 ml de sangre entera de 36 animales de la raza Holstein pertenecientes a un tambo comercial de la provincia de La Pampa. El ADN genómico se extrajo mediante la técnica de DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

La tipificación del segundo exón del gen BoLA-DRB3 se realizó mediante la técnica de PCR-secuenciación directa (PCR-SBT) descrita por Takeshima et al. (2009). Esta metodología consiste en la amplificación del exón 2 mediante PCR utilizando los primers DRB3FRW y DRB3REV (Miltiadou et al., 2003). Los productos de amplificación se purificaron utilizando polietilenglicol 8000, y la cantidad y calidad de ADN fueron estimadas mediante un espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare, USA). Los productos de amplificación fueron secuenciados en un secuenciador capilar MegaBACE (GE Healthcare) utilizando el kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare) y los mismos primers de amplificación. Las secuencias

crudas fueron editadas con el programa Sequence Analyzer (GE Healthcare), y finalmente fueron analizadas con el software Assign 400ATF (Conexio Genomics, Fremantle, Australia) para determinar el genotipo de los animales tipificados (Takeshima et al., 2009).

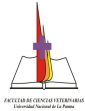
Las frecuencias génicas y genotípicas fueron estimadas por conteo directo. Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se estimaron mediante el parámetro  $F_{IS}$  (Weir y Cockerham, 1984). La significancia estadística se determinó por el método de Markov Chain (Gou y Thompson, 1992). La heterocigosidad observada ( $h_o$ ) y esperada ( $h_e$ ) se calcularon de acuerdo a Nei (1987).

### ***Resultados y Discusión***

Mediante la técnica de PCR-SBT se detectaron en la población analizada 21 alelos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 con un rango de frecuencia de 0,014 a 0,222 (Tabla 1). Como se observa en la figura 1, tres alelos presentaron una frecuencia superior al 10%, seis variantes evidenciaron valores entre 5-10%, mientras que los 12 alelos restantes presentaron frecuencias inferiores al 5%. Esto resultó en una curva de frecuencias génicas acumuladas con una alta pendiente inicial, siendo hacia el final asintótica. La  $h_o$  y  $h_e$  fueron de 0,92 y 0,91, respectivamente. La población estudiada se encontraba en desequilibrio de HWE ( $F_{IS} = -0,007$ ;  $p = 0,041$ ).

Los resultados obtenidos se compararon con los reportados para ganado Holstein de Japón, evidenciando que las dos poblaciones presentaban un alto número de alelos ( $n_a$  La Pampa = 21,  $n_a$  Japón = 16) y valores de  $h_e$  superiores al 0,9. Estos resultados coinciden con los observados en otras poblaciones de Holstein, estudiadas por PCR-RFLP, y en otras razas bovinas, evidenciando que a pesar de la alta presión de selección sufrida por la raza Holstein, esta conserva altos niveles de diversidad en la región analizada (Giovambattista et al., (1996); Yoshida et al., (2009); Takeshima et al., (2010)).

Si bien la combinación alélica de las poblaciones de Holstein de Japón y de La Pampa no fueron exactamente iguales,



ambas poblaciones presentaron los mismos alelos mayoritarios (BoLA-DRB3\*1101, \*1501 y \*0101), con la excepción del alelo BoLA-DRB3\*1201. Este resultado sería consecuencia del alto nivel de homogeneidad exhibido por esta raza debido al uso de la misma genética a nivel global.

### **Bibliografía**

**Amorena, B and Stone, W. 1978.** Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science*; 201: 159–160.

**Ballingall, KT; Ellis, SA; Machugh, ND; Archibald, D; Mckeever, DJ. 2004.** The DY genes of the cattle MHC: expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. *Immunogenetics*; 55: 748–755.

**Fries, R; Eggen, A; Womack, JE. 1993.** The bovine genome map. *Mammalian Genome*, 4: 405-428.

**Giovambattista, G; Golijow, CD; Dulout, FN; Lojo, MM. 1996.** Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics*, 27: 55-56.

**Guo, SW and Thompson, EA. 1992.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.

**Joosten, I; Sanders, ME and Hensen EJ. 1991.** Involvement of MHC Class I compatibility between dam and calf in the aetiology of the retained placenta. *Animal Genetics*, 22: 455-463.

**Mejdell, CM; Lie, O; Solbu, H; Arnet, EF; Spooner, RL. 1994.** Association of major histocompatibility complex antigens (BoLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis, ketosis and fertility in Norwegian cattle. *Animal Genetics*, 25(2): 99-104.

**Miltiadou, D; Law, AS; Russel, GC. 2003.** Establishment of a sequence based typing system for BoLA-DRB3 exon 2. *Tissue antigens*, 62(1): 55-56.

**Nei, M. 1987.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.

**Park, CA; Hines, HC; Monke, DR; Trlfall, WT. 1993.** Association between the bovine major histocompatibility complex and chronic posterior spinal

pareis- a form of ankylosing spondylitis- in Holstein bulls. *Animal Genetics*, 24: 53-58.

**Spooner RL, Leveziel H, Grosclaude F, Oliver RA; Vaiman M. 1978.** Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *Journal of Immunogenetics*, 5: 325– 346.

**Takeshima, SN; Aida, Y. 2006.** Structure function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Journal Animal Science*, 77(2): 138-50.

**Takeshima, SN; Matsumoto, Y; Aida, Y. 2009.** Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex class II DRB3. *Journal Dairy Science*, 92(6): 2965-2970.

**Takeshima, S; Matsumoto, Y; Arainga-Ramirez, M; Kim, J; Miyasaka, T; Xue, G; de la Barra Díaz, VG.; Giovambattista, G; Pofcher, EJ; Rivera-Geronimo, H; Saito, H; Acosta, TJ; Kanemaki, M; Ortiz, ML; Oltra, J; Onuma, M; Aida, Y. 2010.** Variation of cattle major histocompatibility complex (BoLA) DRB3 allele frequencies within different farm, breed and countries in South America. XXXII Conference of the International Society for Animal Genetics, Edimburgo, Reino Unido, del 26 al 30 de julio de 2010. p. 82.

**Weir, BS; Cockerham, CC. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution*, 3, 1358-1370.

**Yoshida, T; Mukoyama, H; Furuta, H; Kondo Y; Takeshima, S; Aida, Y; Kosugiyama, M. and Tomogane, H. 2009.** Association of BoLA-DRB3 alleles identified by a sequence-based typing method with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Journal Animal Science*, 80: 498-509.

### Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por la Subsecretaría de Asuntos Agrarios del Ministerio de Producción de la Provincia de La Pampa, la Universidad Nacional de La Plata, la Universidad Nacional de La Pampa y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Por otra parte, agradecemos la colaboración del personal de la Estancia El Tigre (Provincia de La Pampa).

**Tabla 1. Frecuencias génicas estimadas para el exón 2 del gen BoLA-DRB3 en la población de Holstein de la provincia de La Pampa.**

Alelo	Frecuencia
BoLA-DRB3*0101	0,125
BoLA-DRB3*0201	0,0556
BoLA-DRB3*0301	0,0139
BoLA-DRB3*0601	0,0139
BoLA-DRB3*0701	0,0417
BoLA-DRB3*0901	0,0139
BoLA-DRB3*0902	0,0556
BoLA-DRB3*1001	0,0694
BoLA-DRB3*1101	0,2222
BoLA-DRB3*1201	0,0139
BoLA-DRB3*14011	0,0278
BoLA-DRB3*1501	0,1111
BoLA-DRB3*1601	0,0139
BoLA-DRB3*1701	0,0139
BoLA-DRB3*1801	0,0417
BoLA-DRB3*2006	0,0833
BoLA-DRB3*20011	0,0139
BoLA-DRB3*2703	0,0278
BoLA-DRB3*2707	0,0139
BoLA-DRB3*4501	0,0139
BoLA-DRB3*4702	0,0139

**Figura 1. Frecuencias génicas acumuladas estimadas para el exón 2 del gen BoLA-DRB3 en la población de Holstein de la provincia de La Pampa.**

