

Genetic diversity of BoLA-DRB3 gene in Colombian creole Hartón del Valle cattle^a

Diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle

Diversidade genética do gene BoLA-DRB3 em gado crioulo colombiano Hartón del Valle

Darwin Yovanny Hernández Herrera^{1*}, Zoot, MSc, PhD; Jaime Eduardo Muñoz Flórez², IA, Esp, PhD; Luz Ángela Álvarez Franco², Zoot, MSc, PhD.

**Autor para correspondencia: Darwin Yovanny Hernández Herrera. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre.*

¹ Grupo de Investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre, Sede Puerta Verde. Granja Perico Km 7 Margen izquierdo vía Sincelejo - Sampués. darwin.hernandez@unisucra.edu.co;

² Grupo de Investigación en Recursos Zoogenéticos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Carrera 32 No 12-00 Palmira, Colombia.

(Recibido: 6 de enero, 2015; aceptado: 4 de abril, 2015)

Abstract

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of BoLA-DRB3 gene in the Colombian creole Hartón del Valle cattle. A total of 93 Hartón del Valle (HV), 30 Lucerne (LUC), and 30 Holstein (HOL) animals were evaluated for DRB3 gene polymorphism using the PCR-SBT method. The number of alleles found were 27, 17 and 14 for HV, LUC, HOL, respectively. The most frequent alleles were *DRB3*1101* (14.5%) in HV; *LUC DRB3 * 0701* in LUC; and **1107*, **1501* and **2301* in HOL (11.7%). Expected heterozygosity values were higher than observed, which resulted in a low fixing index, positive F_{IS} (significant only for HV), and no significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium for LUC. The molecular analysis of variance reflected little variation between breeds (3%) and a moderate genetic differentiation ($F_{ST} = 0.056$ $p < 0.01$). Regarding sequence, LUC was the most diverse breed, no neutral selection is occurring, and none of the breeds is in selection equilibrium. Comparison with reports on other breeds showed high genetic diversity in Colombian breeds. We conclude that HV has high genetic diversity in BoLA-DRB3 locus. The cause of this polymorphism may be due in part to the origin of HV. This high variation can be maintained by selection equilibrium.

Key words

Genetic marker, major histocompatibility complex, PCR-SBT.

^aPara citar este artículo: Hernández Herrera DY, Muñoz Flórez JE, Álvarez Franco LA. Diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle. Rev CES Med Zootec. 2015; Vol 10 (1): 18-30.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo Colombiano Hartón del Valle. En 93 animales Hartón del Valle (HV), 30 Lucerna (LUC) y 30 Holstein (HOL) se evaluó el polimorfismo del gen DRB3 usando la metodología PCR-SBT. Se encontraron 27 alelos en la raza HV, 17 en LUC y 14 en HOL. El alelo más frecuente en HV fue el *DRB3*1101* (14,5%), en la raza LUC los alelos *DRB3*0701*, **1107*, **1501* y **2301* al igual que el alelo *DRB3*0701* en la raza HOL tuvieron la frecuencia más alta (11,7%). Los valores de heterocigocidad esperada fueron más altos que la observada, lo que se tradujo en un valor bajo del índice de fijación, valores de F_{IS} positivos solo significativo en el HV y desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg no significativos en LUC. El análisis de varianza molecular reflejó poca variación entre razas (3%) y una diferenciación genética moderada ($F_{ST} = 0,056$ $p < 0,01$). A nivel de secuencia se resalta que, la raza más diversa es LUC, que no se está presentando selección neutral y que ninguna de las razas se encuentra en equilibrio de selección balanceadora. La comparación con otras razas reportadas, mostró alta diversidad genética en las razas colombianas. Se concluye que la raza HV tiene alta diversidad genética en el *locus* BoLA-DRB3, que el origen del polimorfismo puede deberse en parte al origen de la raza y que esta alta variación puede ser mantenida mediante equilibrio de selección.

Palabras clave

Complejo mayor de histocompatibilidad, marcador genético, PCR-SBT.

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a diversidade genética do gene BoLA-DRB3 no gado crioulo colombiano Hartón del Valle. O estudo se fez com 93 animais Hartón del Valle (HV), 30 Lucerna (LUC) e 30 Holandês (HOL). Avaliou-se o polimorfismo do gene DRB3 utilizando a metodologia PCR-SBT. Encontraram-se 27 alelos na raça HV, 17 em LUC e 14 em HOL. O alelo com maior frequência em HV foi o *DRB3*1101* (14,5%), na raça LUC os alelos *DRB3*0701*, **1107*, **1501* e **2301* ao igual que o alelo *DRB3*0701* na raça HOL tiveram a maior frequência (11,7%). Os valores de heterocigocidade esperada foram maiores que a observada, o que se traduz em um valor baixo do índice de fixação, valores de F_{IS} positivos só foram significativos no HV e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram não significativos em LUC. O Analise de variância molecular reflexou pouca variação entre raças (3%) e uma diferenciação genética moderada ($F_{ST} = 0,056$ $p < 0,01$). No nível de sequência destacou-se que, a raça mais diversa é LUC, que não está apresentando seleção neutral e que nenhuma das raças encontra-se em equilíbrio de seleção balanceadora. Se comparar com outras raças reportadas, as raças colombianas exibiram uma alta diversidade genética. Conclui-se que a raça HV tem alta diversidade genética no *locus* BoLA DRB3, que a origem do polimorfismo pode se dever em parte à origem da raça e que essa alta variação pode ser mantida mediante o equilíbrio de seleção.

Palavras chave

Complexo maior de histocompatibilidade, marcador genético, PCR-SBT.

Introducción

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de los bovinos es conocido como Antígenos de los Leucocitos Bovinos (BoLA) y se localiza en el cromosoma 23. El sistema BoLa es un conjunto de glicoproteínas que se ubican en la superficie celular y su función principal es la presentación de péptidos⁴⁶.

En general la estructura del BoLA está conservada en los mamíferos y se divide en tres regiones, llamadas *clase I*, *clase II* y *clase III*, cada una con función diferente¹³. El

producto de los genes *clase I* son dos cadenas polipeptídicas, una de ellas atraviesa la membrana celular y tiene un peso molecular aproximado de 45.000 daltons; la cadena más corta llamada microglobulina $\beta 2$ tiene un peso aproximado de 12.000 daltons. Estas proteínas están implicadas en el reconocimiento de las células hospederas que han sido infectadas, mediante la presentación de péptidos a las células citotóxicas T CD8⁺⁴⁶. Los genes *clase II* están localizados en dos sitios diferentes del cromosoma 23, poseen dos regiones llamadas *clase IIa* y *clase IIb* separadas por una distancia de 15 cM. Estos genes producen proteínas implicadas en la comunicación intercelular entre las células

B y T, presentación de antígenos extracelulares con células T CD4⁺ y otras funciones inmunes. Los genes clase III codifican proteínas de complemento, implicadas en la destrucción de células extrañas ⁴⁶.

Los genes y productos de la *clase II* han sido más estudiados, entre ellos, la *clase IIa* contiene los genes *DR* y *DQ* y la *clase IIb* los genes *DYA*, *DYB*, *DMA*, *DMB*, *DOB*, *DOA*, *TAP1*, *TAP2*, *LAPM2* y *LMP7*. La *clase IIa* es la más polimórfica y contiene los genes: *DRA*, *DRB* (*DRB1*, *DRB2*, *DRB3*), *DQA* (*DQA1*, *DQA2*, *DQA3*, *DQA4*, *DQA5*) y *DQB* (*DQB1*, *DQB2*, *DQB3*, *DQB4*, *DQB5*) ², mientras que, la *clase IIb* solo se encuentra en rumiantes ⁴⁶.

El gen *BoLA-DRB3* tiene una longitud de 11,4 Kbp desde el codón de inicio hasta la señal de poliadenilación, con cinco intrones y seis exones ³⁹ y codifica elementos funcionales de restricción, proceso mediante el cual un linfocito puede reconocer un antígeno como propio o extraño ⁶. De estos exones el más polimórfico es el 2 (*BoLA-DRB3.2*) que tiene un tamaño aproximado de 270 bp; este codifica justo para el sitio de unión al péptido que se quiere presentar, y conociendo que la unión entre antígeno-anticuerpo es específica se requiere una alta diversidad en este gen. Al momento se han reportado 137 alelos *BoLA-DRB3.2*, que están enlistados en la base de datos del EMBL-EBI IPD-MHC ⁸.

El método de genotipación más utilizado para el estudio de este gen es la PCR-RFLP, con ella se han estudiado diferentes razas autóctonas, criollas y foráneas, en las cuales el número de alelos varió entre 11 y 37 alelos y la heterocigocidad esperada entre 0,88 y 0,91 ^{10, 11, 38, 40, 53}. Esta técnica es un método simple que permite un análisis rápido del polimorfismo de este gen, sin embargo, su utilidad es limitada en el caso de los alelos (tipos) que tienen alelos adicionales (subtipos), por lo que un mismo patrón de corte, codifica para varios alelos determinados por la secuencia del ADN. Por tanto, métodos de genotipaje basado en secuenciamiento del ADN como la PCR-SBT (sequence based typing) han sido desarrollados, pero menos utilizados, por la complejidad en la interpretación de las secuencias. Con PCR-SBT el número de alelos determinados es ligeramente mayor (11 a 39) así como el valor de heterocigocidad esperada (0,89 a 0,95) ^{32, 43, 44}.

Los genes del *BoLA* son muy interesantes para los criadores de animales y genetistas. Algunos alelos del gen *DRB3* han sido asociados con resistencia y/o susceptibilidad a una gran variedad de enfermedades como la mastitis y la leucosis viral bovina, a enfermedades transmitidas por

garrapatas y con otras características como producción de leche, crecimiento y respuesta inmune ^{21, 23, 32, 33, 34, 37}.

El ganado criollo Colombiano Hartón del Valle ha sido caracterizado usando marcadores moleculares tipo STRs, cromosoma Y, D-Loop mitocondrial y para el gen *DRB3* en menor medida por PCR-RFLP y PCR-SBT. Por tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética del gen *DRB3* en el ganado criollo Colombiano Hartón del Valle mediante la técnica PCR-SBT y compararlo con otras razas previamente reportadas.

Materiales y métodos

Población y muestras

Se tomaron 93 muestras de animales puros Hartón del Valle (HV) de cuatro fincas localizadas en el departamento del Valle del Cauca, 30 muestras de animales de la raza Lucerna (LUC) y 30 animales de la raza Holstein (HOL); el menor grado de parentesco posible fue el criterio para la elección de los animales. Se recolectaron muestras de sangre en tubos de 5 ml, mediante punción de la vena coccígea con el sistema Vacutainer® con anticoagulante (K₂EDTA 7,2 mg) y refrigerados hasta su transporte al laboratorio.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo mediante el método de microextracción de Salting-Out ⁴¹. Rápidamente, 500 µl de sangre se mezclaron con 1 ml de solución de lisis I (0,32 M de Sacarosa, 10 mM de Tris HCl pH 7,5, 5 mM de MgCl₂ y 1% de Triton X100) y se mezclaron por inversión a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a 14000 rpm durante un 1 minuto y se descartó el sobrenadante, se realizaron sucesivos lavados con la solución de lisis I hasta obtener una pastilla de glóbulos blancos bien limpia. Se agregaron 400 µl de solución de lisis II (10 mM de Tris HCl pH 7,5, 10 mM de EDTA pH 8,0, 50 mM de NaCl, 0,2% de SDS) y 20 µl de proteinasa K (10 mg/µl) se incubó a 56 °C durante 1 hora. Se añadió 400 µl de NaCl 5 M, se hizo vórtex durante 1 minuto, y se centrifugó a 14000 rpm durante 14 minutos. 350 µl del sobrenadante fueron pasados a un tubo nuevo con 900 µl de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó a 14000 rpm durante 12 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de etanol al 70%, se mezcló por inversión durante 2 minutos, y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se dejó secar el pellet de ADN durante 20 minutos a 37 °C y luego se resuspendió en TE 1X (1 mM de Tris HCl pH 7,5, 0,1 mM de EDTA pH 8,0).

La calidad y concentración del ADN se evaluó usando geles de agarosa al 0,8% en una cámara SUB-CELL® GT, (BIO-RAD, USA) teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta, la concentración se determinó mediante la comparación de las muestras con concentraciones conocidas del bacteriófago lambda.

Amplificación y secuenciación (PCR-SBT) del gen DRB3

La genotipificación de los alelos BoLA-DRB3.2 se realizó utilizando la metodología PCR-SBT, en un protocolo de un paso con los cebadores:

DRB3FEW (5'-CGCTCCTGTGACCAGATC-TATCC-3') y DRB3REV (5'-GGTGAGCGCGGGGGT-G-3')^{3, 48} en una concentración de 10 mM, 25 ng de ADN, 0,2 mM de cada dNTP, 1X de tampón de PCR, 2,5 mM de MgCl₂ y 1U de Taq DNA Polymerase.

El perfil térmico de la reacción incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos 62 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, para terminar con una extensión final de 72 °C durante 5 minutos. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC-100® Teltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA).

Los amplificadores se observaron en geles de agarosa al 1,2% teñidos con bromuro de etidio en una cámara SUB-CELL® GT, (BIO-RAD, USA) y visualizados con luz ultravioleta. El producto de la PCR fue un fragmento de aproximadamente 281 pb, y la concentración mínima de los amplificadores fue 20 ng/μl. El secuenciamiento de las muestras se realizó en la empresa MACROGEN, USA.

Análisis estadístico

Las secuencias y sus electroferogramas fueron editados usando el programa GENEIOUS 6.1 (Biomatters development team, USA) y alineadas usando el programa MEGA 6⁴⁹. Los genotipos fueron determinados usando el programa ASSIGN 400ATF ver. 1.0.2.41 (Conexio Genomics, Fremantle, Australia).

El número de Alelos (Na), sus frecuencias, los alelos únicos, la heterocigocidad observada (Ho) y esperada (He), el índice de fijación (F) y las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) fueron estimadas con el programa ARLEQUIN versión 3.5⁹. Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el fin de estimar la estructura y la diferenciación genética entre las poblaciones además de los estadísticos F de Wright's usando los programas ARLEQUIN versión 3.5 y GENALEX versión 6.5³⁵.

La distancia genética estándar de Nei entre las razas (HV, LUC y HOL y reportadas) fueron estimadas usando el programa GENALEX versión 6.5 a partir de las frecuencias alélicas e interpretadas mediante un análisis de clúster usando el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) mediante el programa MEGA 6⁴⁹. La significancia de las ramas se determinó con un bootstrap de 1000 réplicas.

La diversidad genética a nivel de secuencia se estimó a partir de la diversidad nucleotídica (π), se realizó el test de neutralidad de Tajima (D-Tajima) y el test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin (EWS) mediante el programa ARLEQUIN versión 3.5. La distancia genética entre pares de secuencias fue estimada con el modelo de Kimura 2-parámetros y el árbol construido usando el algoritmo neighbor-joining (NJ) con el programa MEGA 6⁴⁹. La significancia de las ramas se determinó con un bootstrap de 1000 réplicas, y se compararon con los 137 alelos del gen DRB3 reportados en la base de datos del EMBL-EBI IPD-MHC⁸.

Resultados

El número de alelos y sus frecuencias para cada raza se pueden apreciar en la tabla 1. Los alelos con las frecuencias más altas están resaltados en negrilla. Se encontraron 27 alelos en la raza HV, 17 en LUC y 14 en HOL. En el HV la mayoría de los alelos (74%) presentaron frecuencias menores del 5% y solo un alelo (*DRB3*1101*) tuvo frecuencia mayor al 10%, los dos alelos que le siguen en frecuencia fueron el *BoLA-DRB3*0902* y **2703*. El 23,5% de los alelos en la raza LUC mostraron frecuencias mayores al 10% entre ellos el *DRB3*0701*, **1107*, **1501* y **2301*, de otro lado, el 41% de los alelos presentaron frecuencias menores al 5%. En la raza HOL no se encontraron alelos con frecuencias menores al 5%, mientras que, el 85,8% de los mismos presentaron frecuencias entre el 5 y el 10%, los alelos más frecuentes fueron *DRB3*0701* y **2701*.

De los 39 alelos totales, 4 solo estuvieron en HOL todos con frecuencias entre el 5 y el 10%. La raza LUC presento 6 alelos únicos dos de los cuales mostraron altas frecuencias alélicas (*DRB3*2301* y **2901*). En la raza HV se encontraron 16 alelos únicos, 14 de ellos con frecuencias bajas y solo los alelos *DRB3*0902* y **2703* con frecuencias mayores al 5% (Tabla 1).

La Ho en la raza HV fue ligeramente menor que en las demás razas (Tabla 2). Sin embargo, se observó que en todos los grupos genéticos la He fue mayor que la Ho, es

Tabla 1. Número de alelos y frecuencias halladas en las razas HV, LUC y HOL.

<i>Alelo DRB3</i>	<i>HV</i>	<i>LUC</i>	<i>HOL</i>
DRB3*0101	0,032	---	---
DRB3*0201	---	---	0,050
DRB3*0501	0,043	---	---
DRB3*0601	---	---	0,083
DRB3*0701	0,011	0,117	0,117
DRB3*0902	0,070	---	---
DRB3*1001	0,027	---	0,067
DRB3*1002	0,043	0,067	0,050
DRB3*1101	0,145	0,117	0,083
DRB3*1104	0,048	---	---
DRB3*1201	---	---	0,083
DRB3*1301	---	0,050	0,050
DRB3*14011	0,016	---	---
DRB3*1501	0,059	0,117	0,083
DRB3*1601	0,022	0,050	0,050
DRB3*1701	0,059	---	---
DRB3*20011	---	0,017	---
DRB3*20012	0,065	0,050	---
DRB3*2006	0,038	---	---
DRB3*2201	0,016	0,017	---
DRB3*2202	---	0,033	---
DRB3*2301	---	0,100	---
DRB3*25011	0,032	0,067	0,050
DRB3*25012	0,011	---	0,067
DRB3*2701	---	0,033	0,100
DRB3*2702	---	0,033	---
DRB3*2703	0,070	---	---
DRB3*2704	---	---	0,067
DRB3*2801	0,011	---	---
DRB3*2802	0,027	0,017	---
DRB3*2901	---	0,083	---
DRB3*2902	0,022	---	---
DRB3*3001	0,032	---	---
DRB3*3501	0,005	---	---
DRB3*3601	0,048	---	---
DRB3*3801	---	0,033	---
DRB3*3901	0,022	---	---
DRB3*4401	0,011	---	---
DRB3*4802	0,016	---	---
N*	93	30	30
Na**	27	17	14

esta diferencia se vio reflejada en los valores de positivos de F_{IS} indicando un déficit de heterocigotos que solo fue significativo en el HV.

La diversidad genética (H_e) fue alta en todas las razas, mayor en HV y con valor similar en LUC y HOL, de aquí que el índice de fijación fue igualmente bajo en todas las razas. Solo en las razas HV y HOL se observaron desviaciones significativas de las proporciones teóricas del equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que, la raza LUC si se encontró en EHW (Tabla 2).

El AMOVA indicó que del total de la variación solo el 3% es debido a diferencias entre las razas y el 5% a las

diferencias de los individuos dentro de las razas, como es común la mayor variación se presentó dentro de los individuos (Tabla 3). La diferencia genética (F_{ST}) entre las razas fue moderada y altamente significativa, en general se observó un déficit significativo de heterocigotos en cada raza (F_{IS}) y toda la población de bovinos estudiada (F_{IT}).

El análisis a nivel de secuencia de ADN mostró que la diversidad nucleotídica fue más alta en la raza LUC seguido por HV y HOL (Tabla 4). El test de neutralidad de Tajima indicó que no se está presentando selección neutral en las razas estudiadas. El test EWS mostró que ninguna de las razas se encuentra en equilibrio de selección balanceadora.

Tabla 2. Número de alelos (N_a), heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), índice de fijación (F), déficit y/o exceso de heterocigotos (F_{IS}) y equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en cada raza.

Raza	N	N_a	H_o	H_e	F	F_{IS}	HWE
HV	93	27	0,892	0,941	0,052	0,056*	0,026*
LUC	30	17	0,900	0,921	0,022	0,039 ^{ns}	0,399 ^{ns}
HOL	30	14	0,900	0,923	0,025	0,041 ^{ns}	0,045*
Promedio	51	19,33	0,897	0,928	0,033	---	---

ns: no significativo, * $p < 0,05$

Tabla 3. Análisis de varianza molecular y estadísticos de Wright entre las razas.

Fuente de variación	Grados de libertad	Variación (%)	F 's de Wright
Entre razas	2	3	$F_{ST}=0,056^{**}$
Entre individuos dentro de razas	150	5	$F_{IS}=0,051^*$
Dentro de individuos	153	92	$F_{IT}=0,076^{**}$
Total	305	100%	

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Tabla 4. Análisis a nivel de secuencia en cada raza. Diversidad nucleotídica (π), test de Neutralidad de Tajima (D) y test de selección neutral de Ewens-Watterson-Slatkin (EWS).

Raza	π	D	EWS
HV	0,0794	2,5188 ^{ns}	0**
LUC	0,0825	2,1999 ^{ns}	0,008**
HOL	0,0725	1,8291 ^{ns}	0**

ns: no significativo, ** $p < 0,01$

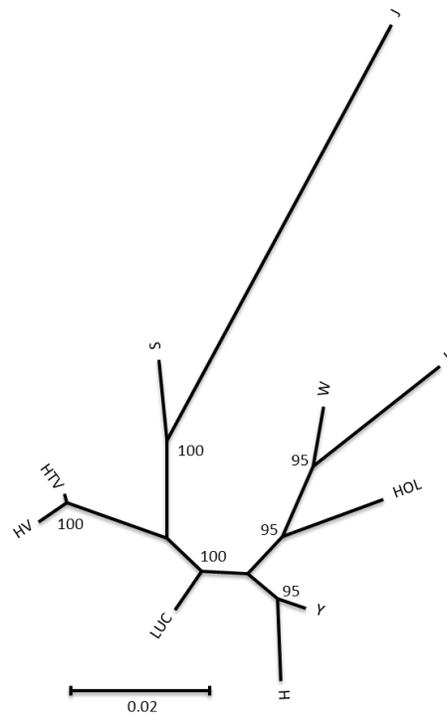


Figura 2. Árbol reconstruido con el método de Neighbor-Joining a partir de las distancias genéticas. Los porcentajes de bootstrap se presentan en los nudos. Razas del presente estudio: Hartón del Valle (HV), Lucerna (LUC) y Holstein (HOL). Datos de razas tomadas de la literatura: Yacumeño (Y)¹², Hartón del Valle (HTV)¹², Holstein (H)⁴⁴, Shorthorn Japonés (S)⁴⁴, Negro Japonés (W)⁴⁴, Jersey (J)⁴⁴ y Hanwoo (K)²⁵.

Discusión

Para el ganado criollo Colombiano, solo existen reportes de la utilización de la técnica PCR-SBT para evaluar el polimorfismo del gen DRB3 en la raza Hartón del Valle, sin embargo, utilizando la técnica PCR-RFLP se han reportado en las razas Blanco Orejinegro entre 15 y 31 alelos^{18,30}, en la Casanareño 17 alelos, 12 alelos en la Costeño con Cuernos, 10 en la raza Chino Santandereano, en la raza Caqueteño 25, 12 alelos en la San Martinero, 16 en el Romosinuano y 14 en el Hartón del Valle. Por su parte, en las razas sintéticas Colombianas se reportan 13 y 12 alelos en Lucerna y Velásquez respectivamente¹⁸. La PCR-SBT permite detectar más y con mejor precisión los alelos DRB3 que la PCR-RFLP, ya que un mismo patrón de corte con RFLP puede estar determinado por varias secuencias; esto explica porque el número de alelos aquí presentado es mayor para HV y LUC que lo reportado por Hernández *et al.*, (2013)¹⁸. El mismo autor también reporta valores de heterocigocidad esperada más bajos y valores de F_{IS} más altos en todas las razas de ganado criollo Colombiano excepto en el HV (0,021ns) donde el valor fue similar.

En el HV si ha sido empleada la técnica PCR-SBT para

estudiar el polimorfismo del gen DRB con reportes de 37 alelos¹⁷, diez más de los aquí presentados, los más frecuentes fueron: *BoLA-DRB3*1101* (0,204), **20012* (0,122), **2006* y **2801* (0,071); de estos solo el *BoLA-DRB3*1101* presentó también alta frecuencia. El mismo autor también presenta una H_e mucho más baja (0,734), un déficit alto de heterocigotos $F_{IS}=0,213$, ($p<0,01$) y contrario a lo aquí indicado, reporta que la raza no mostraba desviaciones del EHW. Otro estudio¹² reporta 24 alelos, tres menos que el presente estudio, y coincide en que el alelo más frecuente es el *BoLA-DRB3*1101* (0,121); por otro lado, muestra un exceso leve de heterocigotos, reportando un valor mayor de H_o que de H_e (0,94) y un F_{IS} de -0,036, ($p<0,01$) lo que se tradujo en desviaciones significativas de EHW. Estas diferencias pueden atribuirse a la utilización de un menor número de animales y al origen de los mismos, pues las muestras empleadas para este estudio fueron recolectadas en cuatro hatos, mientras que, los reportes^{12,24} solo son de una finca.

La comparación detallada de nuestros resultados con otras razas alrededor del mundo se presentan en la tabla 5. En general se observa que el número de alelos estuvo de acuerdo con el tamaño de muestra. Las razas con

más alelos fueron la Yacumeño y el Hanwoo. El alelo *DRB3*1101* es común en varias razas, aunque cada raza tiene un alelo en particular, diez alelos estuvieron solo presentes en ganados criollos (Hartón del Valle y Yacumeño). Estas diferencias en las frecuencias y distribución de los alelos en las razas puede deberse a varios factores, entre ellos: el origen de la raza, selección artificial o natural, endogamia o efecto fundador^{12, 45}.

Pese al bajo número de animales utilizado en este estudio, los resultados revelan que el HV tiene una alta

diversidad genética en el *locus* BoLA-DRB3. Estos valores obtenidos fueron similares a lo reportado en otras razas. Los valores *He* estuvieron por encima de 0,9 excepto en un reporte de Hartón del Valle¹⁷ y en la Jersey⁴⁵ con leve déficit de heterocigotos. A nivel de secuencia la raza más diversa fue la Shorthorn Japonés (Tabla 5).

Estos valores de diversidad no son inesperados para genes clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) conociendo su importante función biológica en el organismo.

Tabla 5. Diversidad genética del gen DRB3 en razas del mundo. Número de individuos (N), número de alelos (Na), Heterocigocidad esperada (He), déficit o exceso de heterocigotos (F_{IS}) y diversidad nucleotídica (π).

Raza	N	Na	Alelos frecuentes	He	F _{IS}	π	Referencia
Hartón del Valle	93	27	*1101, *0902, *2703, *20012	0,94	0,056**	0,079	Presente estudio
Lucerna	30	17	*0701, *1501, *1101, *2301	0,92	0,039 ^{ns}	0,083	
Holstein	30	14	*0701, *2701, *1201, *1101	0,92	0,041 ^{ns}	0,073	
Hartón del Valle	66	37	*1101, *20012, *2006, *2801	0,73	0,213**	---	Hernández et al., 2011 ¹⁶
Hartón del Valle	99	24	*1101, *2703, *2006, *2801	0,94	-0,036	0,076	Giovambattista et al., 2013 ¹²
Yacumeño	113	36	*0701, *0902, *1801, *0201	0,95	0,034 ^{ns}	0,079	
Shorthorn Japonés	100	20	*1201, *0301, *0801, *1101	0,91	-0,009	0,146	Takeshima et al., 2003 ⁴⁵
Negro Japonés	200	23	*1001, *1601, *1101, 1201	0,91	0,009 ^{ns}	0,071	
Jersey	69	14	*4501, *0201, *2502, *3701	0,89	-0,03	0,086	
Holstein	102	18	*1101, *1201, *1501, *0101	0,90	-0,021	0,082	
Hanwoo	359	39	*4301, *1558, *0701, *1601	0,90	---	0,072	Lee et al., 2012 ²⁵

ns: no significativo, **p<0,05

Una posible explicación para la alta diversidad genética en este *locus* puede ser el origen múltiple de las poblaciones fundadoras de las razas²⁶ como ocurre en el Hartón del Valle, donde según datos de ADN mitocondrial esta raza tiene un 91,7% de razas Europeas, 5,5% de razas africanas y 2,7% de razas del medio Oriente¹ o en la raza Lucerna producto del cruce entre el Hartón del Valle, Holstein y Shorthorn. Luego la diversidad genética podría ser mantenida por algún mecanismo entre los que se cuentan la sobredominancia, la selección dependiente de las frecuencias y los sistemas reproductivos.

En los sistemas reproductivos se considera el apareamiento y aborto selectivo basado en el genotipo de CMH, los cuales han sido documentados en poblaciones de ratones y humanos y que puede ser lo suficientemente fuerte para mantener la diversidad genética el CMH^{36, 51}. Sin embargo, la alta diversidad de este *locus* en las razas estudiadas, así como en otros animales de granja^{27, 28}, no puede ser explicada por preferencias sexuales ya que la reproducción en estas razas ha sido controlada por los criadores de cada raza.

En grandes poblaciones como las de humanos, se han reportado un déficit significativo de homocigotos para los genes del CMH^{5, 19}. El exceso de heterocigocidad se ha interpretado como una consecuencia de la sobredominancia, ya que los individuos heterocigotos son capaces de reconocer un amplio espectro antígenos, aumentando así la eficiencia de estos individuos en comparación con individuos homocigotos. Varios estudios han demostrado que la heterocigocidad confiere ventajas selectivas contra enfermedades infecciosas (ventaja del heterocigoto), por ejemplo, humanos heterocigotos en *locus* HLA clase II mostraron tener resistencia contra el virus de la hepatitis C y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)^{4, 20}. En vacas Holstein con mastitis causada por *Escherichia* o *Streptococcus* se encontraron desviaciones significativas de EHW en el *locus* clase II DQA1, mostrando una ventaja del heterocigoto a la progresión de la enfermedad⁴⁷.

En el presente estudio las razas HV y HOL presentaron desviaciones significativas del EHW, con déficit de heterocigotos (F_{IS}) significativo solo en HV; resultados

similares para esta raza los presenta Hernández *et al.*, (2011)¹⁶, mientras que, Giovambattista *et al.*, (2013)¹² presenta un leve exceso pero significativo de heterocigotos. La explicación más probable para el déficit de heterocigotos en las razas estudiadas y en otras reportadas es que el coeficiente de selección de sobredominancia para el *locus* en mención puede ser considerablemente bajo probablemente inferior a 0,02³¹. Con este coeficiente de selección tan débil el aumento de heterocigotos solo aplicaría en poblaciones grandes y en ausencia de cuellos de botella, deriva genética y endogamia.

Una tercera hipótesis que podría explicar el alto nivel de polimorfismo del CMH propone que las frecuencias pueden ser explicadas por el equilibrio de selección, suponiendo que la presencia de un alelo en particular, en lugar del heterocigoto, es el factor crítico que termina la supervivencia y la aptitud diferencial. Si esto es correcto cada alelo DRB3 podría estar relacionado con la protección a alguna enfermedad infecciosa o asociados con distintos rasgos como la supervivencia o la fecundidad. El test apropiado para poner a prueba esta hipótesis es el de neutralidad (D), aunque las desviaciones de este test en las razas estudiadas no fueron significativas, los valores mayores de cero indican un posible efecto de selección balanceadora, mientras que el test de EWS mostró que ninguna de las razas se encontraba en equilibrio de selección balanceadora, lo que supone selección positiva o negativa contra algún alelo, donde los alelos más comunes en HV representan el 46,8% de las frecuencias alélicas acumuladas. Resultados similares son presentados en la raza Yacumeño¹² y Jersey⁴⁵. Igualmente se reportan varios microsatélites no neutrales en el *locus* BoLA-DRBP1 en razas bovinas Escandinavas²². Los efectos de la selección balanceadora también se reportan en otras especies como monos²⁹ y pecaríes⁵⁰. Adicionalmente, se ha reportado el efecto protector de varios alelos DRB3 a una gran variedad de enfermedades como la mastitis y la leucosis viral bovina, a enfermedades transmitidas por garrapatas, enfermedades parasitarias y con otras características como producción de leche, crecimiento y respuesta inmune^{2, 7, 14, 15, 42, 52, 53, 54}.

En conclusión los datos aquí mostrados son consistentes con la hipótesis que propone que el polimorfismo del gen en estudio puede ser explicado por el equilibrio de selección.

Conclusiones

La raza criolla Hartón del Valle tiene una alta diversidad genética en el *locus* BoLA-DRB3 representada por el alto número de alelos y su amplia distribución, en el valor de

heterocigocidad, de diversidad nucleotídica y bajos de valores de endogamia y de F_{IS} . Los datos sugieren que el origen del polimorfismo puede deberse en parte al origen de la raza, dado que el gen DRB3 codifica para el sitio de unión al péptido, estos valores altos de diversidad genética pueden ser entendidos como adaptaciones de cada raza, luego, esta alta variación puede ser mantenida mediante equilibrio de selección.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira por la financiación de la investigación.

Referencias

1. Álvarez L, Vera V, Cárdenas H, Barreto G, Muñoz J. Assessing the genetic diversity and ancestry of Hartón del Valle cattle using mitochondrial DNA. Rev Colomb. Cienc. Pecu. 2012; 25:14-26.
2. Baltian L, Ripoli M, Samfilippo M, Takeshima S, Aida Y, Giovambattista G. Association between BoLA-DRB3 and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. Mol Biol Rep 2012; 39(7): 7215-7220.
3. Baxter R, Hastings N, Law A, Glass E. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. Anim Genet 2008; 39(5): 561-563.
4. Carrington M, Nelson G, Martin M, Kissner T, Vlahov D, Goedert J. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. Science 1999; 283 (5408): 1748-1752.
5. Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. Hum Immunol 2001; 62(9): 1009-1030.
6. Davies C, Andersson L, Mikko S, Ellis S, Henen E, Lewin H *et al.*, Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. Anim Genet 1997; 28(3): 159-168.

7. Duangjindaa M, Jindatajak Y, Tipvong W, Sriwarothai J, Pattarajinda V, Katawtin, S *et al.*, Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. *Vet Parasitol* 2013; 196 (3-4): 314-320.
8. EMBL-EBI IPD-MHC. International Society for Animal Science. [acceso: 27 de noviembre de 2014]. URL:<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/index.html>.
9. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 2010; 10(3): 564-567.
10. Fernández I, Rios J, Gayosso A, Ulloa R, Alonso R. Polymorphism of *locus* DRB3.2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico. *Genet Mol Biol* 2008; 31(4): 880-886.
11. Giovambattista G, Golijow CD, Dulout FN, Lojo MM. Gene frequencies of DRB3.2 *locus* of Argentine Creole cattle. *Anim Genet* 1996; 27(1): 55-56.
12. Giovambattista G, Takeshima SN, Ripoli V, Matsumoto Y, Alvarez L, Saito H *et al.*, Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene* 2013; 519(1): 150-158.
13. Glass EJ, Oliver RA, Russell GC. Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle. *J. Immunol* 2000; 165(1): 134-138.
14. Gowane G, Sharma A, Vandre R, Sankar M. Association of DRB 3 EXON 2 Alleles with Productive and Reproductive. *J Ad Vet Res* 2013; 3(1): 31-35.
15. Gowane G, Sharma A, Sankar M, Narayanan K, Das B, Subramaniam S *et al.*, Association of BoLA DRB3 alleles with variability in immune response among the crossbred cattle vaccinated for foot-and-mouth disease (FMD). *Res Vete Sci* 2013; 95(1): 156-163.
16. Hernández D, Posso A, Benavides J, Muñoz J, Giovambattista G, Alvarez L. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2 en el ganado criollo Hartón del Valle por PCR-RFLP y PCR-SBT. *Rev Colom Cienc Pecua* 2011; 24(3): 390-390.
17. Hernández D, Posso A, Muñoz J, Giovambattista G, Alvarez L. Evaluación de la resistencia genética del ganado criollo Hartón del Valle al virus de la leucosis bovina. *AICA* 2011; 1:169-172.
18. Hernández D, Posso A, Muñoz J, Giovambattista G, Alvarez L. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2* en ganado criollo Colombiano. *Rev MVZ Córdoba* 2013; 18(Suppl. 1): 3665-3671.
19. Hollenbach JA, Thompson G, Cao K, Fernandez-Vina M, Erlich H, Bugawan T *et al.*, HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mesoamerican Natives. *Hum Immunol* 2001; 62(4): 378-390.
20. Hrabec P, Kuiken C, Yusim K. Evidence for human leukocyte antigen heterozygote advantage against hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2007; 46(6): 1713-1721.
21. Juliarena MA, Poli M, Ceriani C, Sala L, Rodriguez E, Gutierrez E, Dolcini G *et al.*, Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. *J Dairy Sci* 2009; 92(1): 375-381.
22. Kantanen J, Olsaker I, Holm L, Lien S, Vilkki J, Brusgaard K *et al.*, Genetic diversity and population structure of 20 north European cattle breeds. *J Hered* 2000; 91(6): 446-457.
23. Karimuriboa E, Morrison L, Black A, Turner C, Kamarage D, Ballingal K *et al.*, Analysis of host genetic factors influencing African trypanosome species infection in a cohort of Tanzanian *Bos indicus* cattle. *Vet Parasitol* 2011; 179 (1-3): 35-42.
24. Kelly L, D'Angelo M, Nimo A, Piaggio J, Postiglioni A, Nicolini P. Polimorfismo del gen DRB3.2 en bovinos criollos del Uruguay. *Arch Zootec* 2003; 52(197): 77-80.
25. Lee B-Y, Hur T-Y, Jung Y-H, Kim H. Identification of BoLA-DRB3.2 alleles in Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein populations using a next generation sequencer. *Anim Genet* 2012; 43(4): 438-441.

26. Liron J, Bravi C, Mirol P, Peral-Garcia P, Giovambattista G. African matrilineages in American Creole cattle: evidence of two independent continental sources. *Anim Genet* 2006; 37(4): 379-382.
27. Liu Y, Yan GQ, Wang XF. Polymorphism analysis of MHC-DRB3 gene in Dolang sheep with PCR-RFLP. *Yi Chuan* 2004; 26(1): 59-62.
28. Lunney J, Ho C-S, Wysocki M, Smith D. Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. *Dev Comp Immunol* 2009; 33(3): 362-374.
29. Luo M, Pan H, Liu Z, Li M. Balancing selection and genetic drift at major histocompatibility complex class II genes in isolated populations of golden snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*). *BMC Evol Biol* 2012; 12: 207-220.
30. Martínez R, Toro T, Montoya F, Burbano M, Tobón J, Ariza F. Caracterización del *locus* BoLA-DRB3 en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch Zootec* 2005; 54(206-207): 349-356.
31. Mikko S, Roed K, Schmutz S, Andersson L. Monomorphism and polymorphism at MHC DRB loci in domestic and wild ruminants. *Immunol Rev* 1999; 167: 169-178.
32. Miyasaka T, Takeshima SN, Sentsui H, Aida Y. Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *J Dairy Sci* 2012; 95(1): 420-431.
33. Miyasaka T, Takeshima S, Jimba N, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsushashi T, et al. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens* 2013; 81(2): 72-82.
34. Panei C, Suzuki K, Echeverria M, Serena M, Metz G, Gonzales E. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *Int J Dairy Sci* 2009; 4(3): 123-128.
35. Peakall R, Smouse P. GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 2012; 28(19): 2537-2539.
36. Potts W, Manning C, Wakeland. Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature* 1991; 352(6336): 619-621.
37. Rastislav M, Mangesh B. BoLA-DRB3 exon 2 mutations associated with paratuberculosis in cattle. *Vet J* 2012; 192(3): 517-519.
38. Ripoli M, Lirón J, De Luca J, Rojas F, Dulout F, Giovambattista G. Gene Frequency Distribution of the BoLA-DRB3 *Locus* in Saavedreño Creole Dairy Cattle. *Biochem Genet* 2004; 42(7-8): 231-240.
39. Russell GC, Smith JA, Oliver RA. Structure of the BoLA-DRB3 gene and promoter. *Eur J Immunogenet* 2004; 31(3): 145-151.
40. Saama P, Jacob B, Kehrl M, Freeman A, Kelm S, Kuck A, et al. Genetic Variation in Bovine Mononuclear Leukocyte Responses to Dexamethasone. *J Dairy Sci* 2004; 87(11): 3928-3937
41. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 4th edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
42. Schwaba E, Gearyb T, Baillargeonc P, Schwabd A, Fecteaua G. Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to *Neospora caninum* and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle. *Vet Parasitol* 2009; 165(1-2): 136-140.
43. Takeshima S, Ikegami M, Morita M, Nakai Y, Aida Y. Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics* 2001; 53(1): 74-81.
44. Takeshima S, Nakai Y, Ohta M, Aida Y. Short Communication: Characterization of DRB3 Alleles in the MHC of Japanese Shorthorn Cattle by Polymerase Chain Reaction-Sequence-Based Typing. *J Dairy Sci* 2002; 85(6): 1630-1632.
45. Takeshima S, Saitou N, Morita M, Inoko H, Aida Y. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene* 2003; 316:111-118.
46. Takeshima S, Aida Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J* 2006; 77(2): 138-150.

47. Takeshima S, Matsumoto Y, Chen J, Yoshida T, Mukoyama H, Aida Y. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by Streptococci and Escherichia species. *Tissue Antigens* 2008; 72(6): 525-531.
48. Takeshima S, Matsumoto Y, Miyasaka T, Araing-Ramirez M, Saito, Onuma M, et al. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens* 2011; 78(3): 208-213.
49. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725-2729.
50. Taylor S, Jenkins D, Arcese P. Loss of MHC and neutral variation in Peary caribou: genetic drift is not mitigated by balancing selection or exacerbated by MHC allele distributions. *PLoS One* 2012; 7(5): e36748.
51. Wedekind C, Furi, S. Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? *Proc Biol Sci* 1997; 264(1387): 1471-1479.
52. Yoshida T, Furuta H, Kondo Y, Mukoyama H. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Anim Sci J* 2012; 83(5): 359-366.
53. Zambrano J, Echeverri J, Lopez A. Análisis y frecuencias de los alelos del antígeno leucocitario bovino BoLA DRB3.2 en vacas del ható Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev Colom Cienc Pecua* 2009; 22(3): 448-449.
54. Zambrano J, Echeverri J, López A. Alelos del gen BoLA DRB3.2 están asociados con mastitis en vacas lecheras. *Rev Colom Cienc Pecua* 2011; 24(2): 145-156.