

## Diversidad genética y estudios de asociación en genes de clase II del complejo principal de histocompatibilidad en bovinos criollos americanos

María Florencia Ortega Masagué<sup>1</sup>  Juan Antonio Pereira Rico<sup>2</sup>  Ariel Loza Vega<sup>2</sup>, Guillermo Giovambattista<sup>1,3</sup> 

Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiarido (IIACS - CIAP - INTA), Tucumán, Argentina

### Genetic diversity and association studies in class II genes of the major histocompatibility complex in American Creole cattle.

**Abstract.** The major histocompatibility complex or MHC (called in the bovine species "bovine leukocyte antigen, BoLA") is composed of a large number of genes involved in the immune response within the same chromosomal region. Many of these genes have extraordinary levels of polymorphism. Furthermore, these loci have been associated with infectious and autoimmune diseases and with productive traits in different mammalian species. It is for this reason that the study of its structure, polymorphism and evolution has been of great interest to biologists, geneticists and veterinarians during the last decades. The objective of this review is to analyze the state of the art on the characterization of the genetic diversity of BoLA loci, with special emphasis on the BoLA-DRB3 gene in American Creole bovine breeds. In this sense, the methodologies used for the genotyping of this gene (serological and molecular) are detailed. In addition, the main results obtained from the study of the genetic diversity of the BoLA-DRB3 gene are described, as well as from the association studies of this locus with infectious diseases in American Creole cattle. Although much progress has been made in understanding the genetic diversity of the BoLA-DRB3 gene, there is still a long way to go.

**Key words:** Creole cattle, BoLA, genetic variability, disease resistance

**Resumen.** El complejo principal de histocompatibilidad o MHC (denominado en la especie bovina "antígeno leucocitario bovino, BoLA") está compuesto por un gran número de genes involucrados en la respuesta inmune dentro de una misma región cromosómica. Muchos de estos genes presentan niveles extraordinarios de polimorfismo. Además, estos loci han sido asociados a enfermedades infecciosas, autoinmunes y a caracteres productivos en diferentes especies de mamíferos. Es por esta razón, que el estudio de su estructura, polimorfismo y evolución ha sido de gran interés para biólogos, genetistas y veterinarios durante las últimas décadas. El objetivo de la presente revisión consiste en analizar el estado del arte sobre la caracterización de la diversidad genética de los loci del BoLA, con especial énfasis en el gen BoLA-DRB3 en las razas bovinas criollas americanas. En este sentido, se detallan las metodologías utilizadas para el genotipado de este gen (serológicas y moleculares). Además, se describen los principales resultados obtenidos a partir del estudio de la diversidad genética del gen BoLA-DRB3, así como de los estudios de asociación de este locus con enfermedades infecciosas en bovinos criollos americanos. Aunque mucho se ha avanzado en el conocimiento de la diversidad genética del gen BoLA-DRB3, aún existe un largo camino por recorrer.

**Palabras claves:** Bovinos criollos, BoLA, variabilidad genética, resistencia a enfermedades

Recibido: 2020-09-21. Aceptado: 2020-11-10

<sup>1</sup>Autor de correspondencia: María Florencia Ortega Masagué florenciaortega40@gmail.com y Guillermo Giovambattista guillermogiovambattista@gmail.com

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno Santa Cruz de la Sierra, Santa Cruz, Bolivia.

<sup>3</sup> IGEVET - Instituto de Genética Veterinaria (UNLP-CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, La Plata, Argentina.

## Introducción

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es una de las regiones del genoma más dinámica, siendo el componente primario del sistema inmune adaptativo. Su estudio ofrece una alternativa única para abordar problemas biológicos, tanto inmunológicos como evolutivos (Bohórquez *et al.*, 2020). El MHC está compuesto por un grupo numeroso de genes involucrados en la respuesta inmune que se dividen en tres grupos: genes de Clase I, II y III (Figura 1).

Los genes de clase I codifican para glicoproteínas de membranas que forman un heterodímero junto a una molécula de  $\beta 2$  microglobulina y se expresan en la superficie de toda célula somática nucleada. La principal función de los productos génicos de los genes de clase I es la presentación de péptidos antigenicos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos (CD8+), por lo que juegan un papel esencial en la defensa inmune contra patógenos intracelulares mediante la unión de péptidos derivados principalmente de proteínas virales y células cancerígenas.

Los genes de clase II codifican para glicoproteínas de membrana formadas por dos cadenas, una  $\alpha$  y una  $\beta$  (cada una de ellas posee dos dominios extracelulares,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) codificadas por diferentes genes (DRA y DRB, DQA y DQB). Estas glicoproteínas de la superficie celular se unen a los antígenos derivados de

patógenos o parásitos y los presentan a los linfocitos T CD4+ desencadenando una respuesta inmune adecuada. Es por ello, que los genes MHC clase II están predominantemente involucrados en el monitoreo del ambiente extracelular presentando péptidos principalmente derivados de parásitos (Klein, 1986; Sommer, 2005). En estas proteínas el péptido antigenico se aloja en una hendidura o bolsillo formado por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ . Muchos de estos genes presentan un alto nivel de polimorfismo localizado principalmente en el dominio  $\beta 1$  (codificado por el segundo exón de los genes DRB y DQB). Esta variabilidad genética es clave al momento del reconocimiento y presentación del péptido antigenico.

Entre las regiones cromosómicas ocupadas por los genes de clase I y II, se encuentran los genes clase III que codifican proteínas que desempeñan otras funciones inmunitarias, como por ejemplo, los componentes del sistema del complemento (C2, C3 y factor B) y moléculas relacionadas con la inflamación (citoquinas como TNF- $\alpha$ , linfotoxinas A y B) o proteínas de choque térmico.

En la especie bovina, el MHC es conocido como BoLA (*bovine leukocyte antigen* o antígeno leucocitario bovino), y se localiza en el cromosoma 23 (Spooner *et al.*, 1978; Aida, 1995). Esta región contiene un grupo de genes altamente polimórficos estrechamente

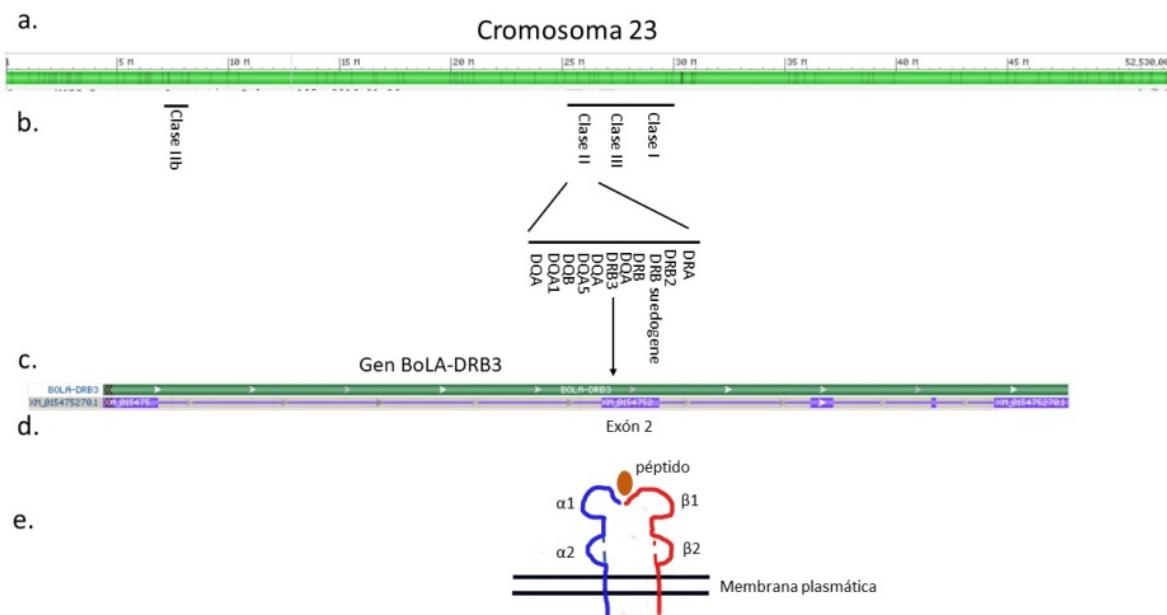


Figura 1. Estructura del complejo principal de histocompatibilidad bovino (BoLA). a. cromosoma 23 bovino, b. región del BoLA, c. estructura del gen BoLA-DRB3, d. segundo exón del gen BoLA-DRB3, e. representación de la glicoproteína de membrana codificada por el gen BoLA-DRB3. Las imágenes del cromosoma 23 bovino y del gen BoLA-DRB3 fueron tomadas del Genome Data Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/genome/>).

ligados y relacionados funcionalmente entre sí. En esta especie, un reordenamiento en la región de clase II condujo a la división en dos subregiones, clase IIa y clase IIb (Takeshima y Aida, 2006). Dentro de la región de clase IIa se encuentran los genes DR y DQ y en la de clase IIb los genes DY, DM y DO. El genoma bovino presenta un locus monomórfico DRA y 3 loci DRB, siendo el gen BoLA-DRB3 el único completamente funcional (Burke, 1991). Por otra

parte, el número de genes DQA y DQB varía dependiendo del haplotipo presente (Takeshima y Aida, 2006).

El objetivo del presente trabajo consiste en revisar el estado del arte sobre la caracterización de la diversidad genética de loci del BoLA, con especial énfasis en el gen BoLA-DRB3 dentro de las razas bovinas criollas americanas.

### Importancia del BoLA en sanidad y producción animal

El estudio de la diversidad genética de los genes del BoLA, y en especial del gen BoLA-DRB3, es de gran interés para los criadores, genetistas de poblaciones y biólogos evolutivos, entre otros, debido al rol central que cumplen en la respuesta inmune y en su extraordinario grado de polimorfismo. Por otra parte, el repertorio particular de alelos refleja procesos evolutivos como la adaptación a diferentes ambientes, selección natural y artificial, migración y deriva dentro y entre las poblaciones (Gosczynski *et al.*, 2014; Takeshima *et al.*, 2014).

Al igual que en otras especies de mamíferos, los genes del BoLA y en particular el gen BoLA-DRB3 ha sido

asociado con resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y endo o ectoparásitos (leucosis, dermatofilosis, mastitis, babesia, garrapatas, etc.), con diferentes variables inmunológicas y productivas (por ejemplo, litros de leche) y con variaciones a la respuesta diferentes vacunas (por ejemplo, aftosa, Theileria parva) (Takeshima y Aida, 2006). Estos resultados evidencian la importancia del estudio de la diversidad genética de los genes del BoLA tanto para su aplicación en programas de mejora como para el diseño de vacunas.

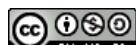
### Métodos de estudio del gen de clase II BoLA-DRB3

El análisis de la diversidad genética de los loci del BoLA comenzó hace más de 25 años con los estudios pioneros basados en su caracterización serológica (Davies *et al.*, 1992, 1994). Además de identificar serotipos e iniciar la estandarización de la nomenclatura, estos primeros trabajos mostraron diferencias entre las razas bovinas estudiadas. Así, por ejemplo, se reportaron variaciones interraciales en las frecuencias de los antígenos entre las razas europeas y africanas y se detectaron antígenos inéditos en las poblaciones africanas (Kemp *et al.*, 1988).

Posteriormente, el desarrollo de las técnicas de biología y genética molecular permitieron el análisis de las variaciones a nivel de ADN. La caracterización de los primeros alelos se basó en la secuenciación de clones de ADN genómico o de productos de PCR y de ADNc de transcriptos de diferentes razas bovinas (Muggli-Cockett y Stone, 1989; Sigurdardottir *et al.*, 1991; Mikko y Andersson, 1995; Maillard *et al.*, 1999). Sin embargo, estas metodologías no se emplearon para estudios poblacionales, sino que se utilizaron para el análisis de un bajo número de individuos en pocas razas bovinas y se focalizaron principalmente a la detección y reporte de variantes del gen BoLA-DRB3 a nivel molecular.

En 1992, Van Eijk y colaboradores desarrollaron un método de genotipificación basado en la amplificación

por PCR de la secuencia de ADN correspondiente al segundo exón del gen BoLA-DRB3 y la subsecuente digestión con tres enzimas de restricción (Rsa I, Hae III y BstY I). Con esta técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), los alelos se definían mediante la combinación de los patrones de restricción de estas tres enzimas (Figura 2). Inicialmente, esto permitió la identificación de 53 alelos, denominados de acuerdo a la siguiente nomenclatura: "NOMBRE DEL GEN.NÚMERO DE EXÓN\*NÚMERO DE ALELO" (Por ejemplo, BoLA-DRB3.2\*01 para el alelo 1). Este método simple fue un gran avance que permitió la caracterización de la diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en numerosas razas bovinas taurinas (Jersey, Holstein, Ayrshire, Black pied, Mongolian, Kalmyk, Yakut) y cebuinas (Gir, Brahman, Kankrej, Sistani, Malnad Gidda, Hallikar y Ongole) de diferentes continentes. Como se discute en la próxima sección, varias razas de criollos americanos también fueron caracterizadas mediante PCR-RFLP. Sin embargo, su utilidad está restringida por ser una técnica de genotipado indirecto basada en la combinación de patrones de restricción, entre sus limitaciones se pueden mencionar: a. Varias secuencias de ADN pueden tener los mismos sitios de restricción, por lo que un alelo definido por PCR-RFLP incluye usualmente a más de una variante definida por secuenciación directa, b. algunas combinaciones de los



patrones de restricción correspondientes a las tres enzimas utilizadas pueden ser explicadas por más de un genotipo, y c. Al no contar con la secuencia de ADN

no se obtiene información sobre los motivos aminoacídicos presentes.

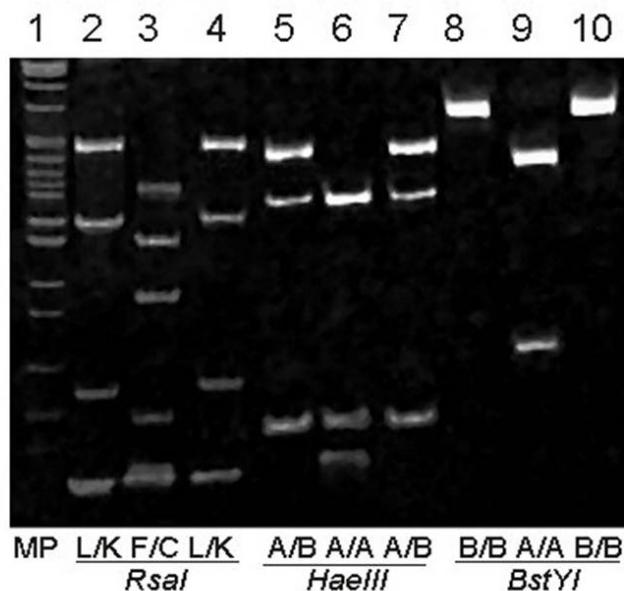


Figura 2. Patrones de restricción obtenidos por digestión de las enzimas Rsa I, Hae III y BstY I del producto de amplificación del exón 2 del gen BoLA-DRB3 resueltos en un gel de poliacrilamida 6% 1X TBE.

Posteriormente, se desarrollaron varios métodos basados en la amplificación del segundo exón del gen BoLA-DRB3 y su posterior secuenciación directa (PCR-SBT), sin la necesidad del clonado del producto de PCR (Takeshima *et al.*, 2011). Finalmente, la secuencia de ADN obtenida es analizada comparándola con la base de datos de todos los alelos reportados (Figura 3). Actualmente, la versión de PCR-SBT más utilizada es la reportada por Takeshima y colaboradores (2011). Esto permitió la detección de más 331 secuencias de ADN correspondientes a 163 alelos, muchos de los cuales poseen varios subtipos (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>). La nomenclatura estandarizada incluye NOMBRE DE LA ESPECIE-GEN\*NÚMERO DEL ALELO:SUBTIPO (Por ejemplo, BoLA-DRB3\*001:01 para el alelo 1 subtipo 1). Además, esta metodología fue de gran utilidad para la caracterización de varias razas bovinas a nivel poblacional, tanto taurinas (Jersey, Shorthorn, Holstein, Japonesa negra, Angus) y cebuinas (Nelore, Gir, Brahman) (Miyasaka *et al.*, 2011, 2012; Takeshima *et al.*, 2001, 2002, 2003, 2009, 2011). En 2007, Takeshima y colaboradores desarrollaron un método basado en PCR-SBT para otro de los genes de clase II bovino, el BoLA-DQA1. Como se describe en la próxima sección, solo unas pocas razas criollas han sido estudiadas mediante PCR-SBT hasta el momento.

Por último, cabe mencionar la utilización de las técnicas de secuenciación de nueva generación (next generation sequencing, NGS) para la caracterización de los loci del BoLA. La tecnología de NGS ha sido un gran avance para el estudio de los genomas de los animales domésticos y su variabilidad genética. Una variante de la metodología de NGS es la Targeted-NGS que prioriza la secuenciación simultánea de secuencias de ADN target en muchos individuos en lugar analizar un genoma o una transcriptómica completa. De esta forma se reduce la cobertura, pero se aumenta significativamente la profundidad de la secuenciación (número de lecturas por posición), lo que permite aumentar la confiabilidad de los SNPs o indels detectados. Esto último es de gran importancia para la determinación de los genotipos de los individuos analizados. En el año 2012, Lee y colaboradores desarrollaron un método basado en Targeted-NGS para el genotipado del gen BoLA-DRB3 en la raza coreana Hanwoo. Recientemente, un método de Targeted sequencing NGS para analizar el polimorfismo del BoLA, fue desarrollado por Takeshima *et al.* (2019), permitiendo analizar simultáneamente todos los loci de esta región. Aunque estas metodologías de NGS han sido aún escasamente utilizadas en bovinos, serán de gran utilidad para futuros estudios de caracterización genética y de asociación entre polimorfismos del BoLA y enfermedades infecciosas.

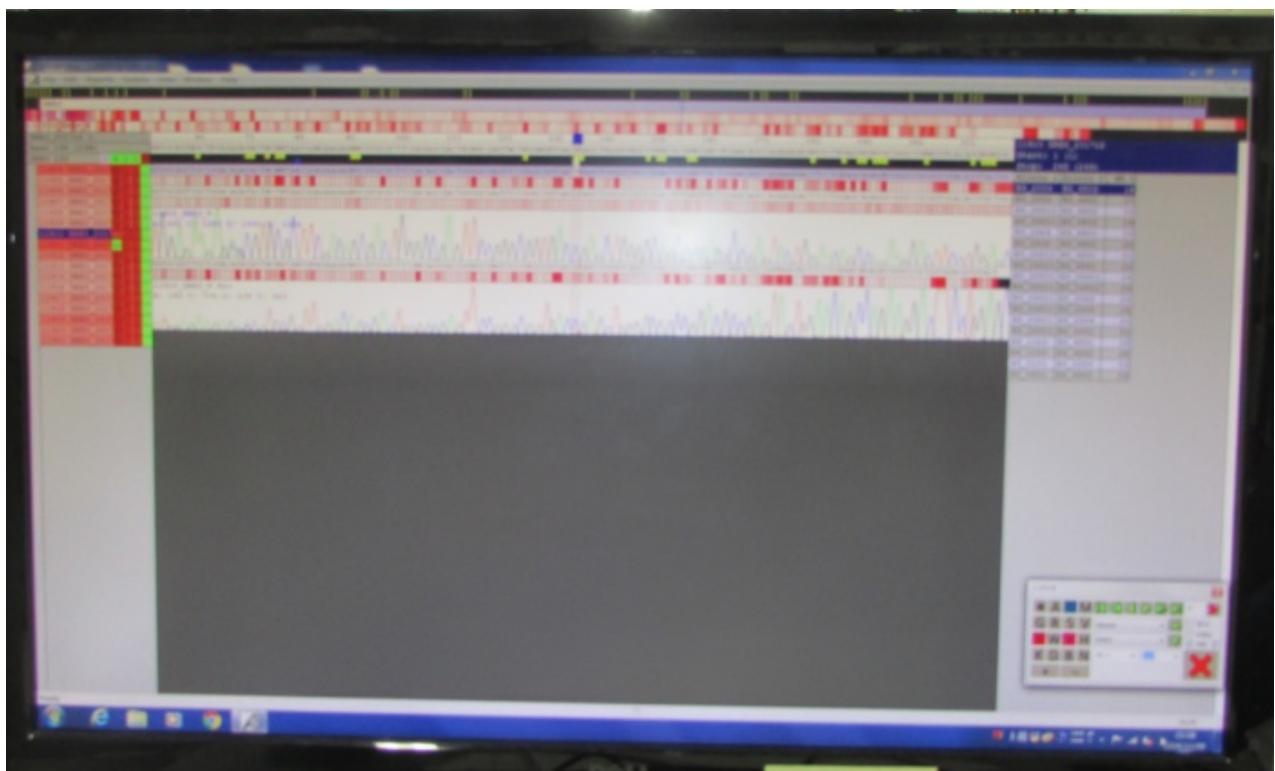


Figura 3. Determinación de los genotipos del gen BoLA-DRB3 mediante el software Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 (Conexio Genomics, Fremantle, Australia).

### Análisis de la variabilidad genética del gen BOLA-DRB3 en bovinos criollos

Ninguno de los estudios iniciales basados en métodos serológicos incluyó bovinos criollos. El primer estudio sobre la diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en una raza bovina criolla fue realizado en el año 1996 mediante la técnica de PCR-RFLP en el bovino Criollo Argentino (Giovambattista *et al.*, 1996). Desde ese trabajo inicial al menos 16 razas criollas de diferentes países de Latinoamérica fueron caracterizadas mediante esta metodología (Cuadro 1). Entre las razas estudiadas se encuentran los criollos de Argentina (Giovambattista *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2003), Bolivia (Ripoli *et al.*, 2004), Brasil (Miretti *et al.*, 2001), Colombia (Martínez *et al.*, 2005; Hernández Herrera *et al.*, 2013), México (Fernández *et al.*, 2008), Panamá (Villalobos-Cortés y González, 2018) y Uruguay (Kelly *et al.*, 2003). Estos trabajos mostraron que a pesar de la drástica reducción poblacional que han sufrido las poblaciones de bovinos criollos en muchos países de la región durante los últimos 100 años, debido a la competencia con razas introducidas altamente seleccionadas, aún conservan un alto nivel de diversidad en este importante gen involucrado en la respuesta inmune. En las razas estudiadas se detectaron 10 o más alelos definidos por PCR-RFLP, resultando en una heterocigosidad esperada de al menos 0.6 (Cuadro 1). Estos valores podrían ser aún

más altos ya que un alelo definido por PCR-RFLP involucra más de una variante definida por secuenciación del ADN. Por otra parte, algunos trabajos han reportado la posible presencia de nuevas combinaciones de los patrones de restricción de las tres enzimas empleadas por el método de PCR-RFLP (Fernández *et al.*, 2008), algunos de los cuales habían sido reportados por Gilliespie *et al.* (1999) y Behl *et al.* (2007). Sin embargo, como se mencionó en la sección anterior, las limitaciones de este método no permiten confirmar estos resultados, siendo necesario su clonado y secuenciación para determinar si corresponden o no a nuevos alelos, y de esta forma ajustarse a las recomendaciones de la IPD-MHC Database para el reporte de nuevas variantes de genes del MHC (Maccari *et al.*, 2017). Inicialmente, la estrategia para dar respuesta a esta problemática fue el clonado y secuenciación de los nuevos patrones de restricción identificados. En 2006, Félix Portillo y colaboradores reportaron ocho nuevos alelos mediante la técnica de clonado y secuenciación de 10 variantes identificadas por PCR-RFLP (secuencias número DQ174310-DQ174317), sin embargo, estas secuencias no fueron enviadas a la base de datos IPD-MHC Database.

Cuadro 1. Resumen de trabajos de caracterización del gen BoLA-DRB3 en razas criollas americanas mediante la técnica de PCR-RFLP. N = número de muestras analizadas, na = número de alelos detectados, he = heterocigosidad esperada.

Raza	País	N	na	he	Referencia
Criollo Argentino	Argentina	194	22	0.919	Giovambattista <i>et al.</i> , 1996
Criollo Argentino	Argentina	33	10	0.960	Miretti <i>et al.</i> , 2001
Caracú	Brasil	44	12	0.910	Miretti <i>et al.</i> , 2001
Pantaneiro	Brasil	30	13	0.630	Miretti <i>et al.</i> , 2001
Criollo Patagónico	Argentina	30	10	0.753	Martínez <i>et al.</i> , 2003
Criollo Uruguayo	Uruguay	51	23	0.916	Kelly <i>et al.</i> , 2003
Criollo Saavedreño	Bolivia	125	21	0.870	Ripoli <i>et al.</i> , 2004
Chihuahua	México	47	18	0.827	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Tamaulipas	México	51	34	0.916	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Blanco Orejinegro	Colombia	162	31	0.939	Martínez <i>et al.</i> , 2005

La mayor parte de las razas bovinas criollas han sido caracterizadas mediante marcadores genéticos autosómicos de tipo microsatélites y uniparentales del cromosoma Y y del ADN mitocondrial (Ginja *et al.*, 2019). Sin embargo, aún son escasos los estudios de caracterización de la diversidad genética del gen BoLA-DRB3 mediante la técnica de PCR-SBT en estas razas (Giovambattista *et al.*, 2013, en evaluación; Hernández Herrera *et al.*, 2011, 2015). Entre las razas bovinas criollas estudiadas hasta el momento se encuentran sólo dos razas criollas bolivianas (Criollo Yacumeño y Criollo del Altiplano) y una colombiana (Hartón del Valle). Estos trabajos mostraron que en las tres razas estudiadas se detectaron entre 23 y 37 alelos definidos por PCR-SBT y una heterocigosidad esperada superior al 0.90 (Cuadros 2 y 3), evidenciando por un lado el mayor poder de discriminación de esta técnica con respecto a la de PCR-RFLP y por otro la necesidad de caracterizar las poblaciones de bovinos criollos por secuenciación directa. Esto último permitirá poner de manifiesto el real nivel de diversidad genética del gen BoLA-DRB3. Por otra parte, estos análisis permitieron detectar dos nuevos alelos para este gen (BoLA-DRB3\*011:02 y BoLA-DRB3\*029:02) en las razas

analizadas (Giovambattista *et al.*, 2013, 2020), confirmado lo que se había sugerido en estudios previos utilizando PCR-RFLP y clonado-secuenciación. La presencia de alelos privativos refuerza las propuestas sobre la importancia de conservar estos importantes recursos zoogenéticos, y seguramente, la secuenciación de otras poblaciones de bovinos criollos pondrá en evidencia otras variantes inéditas. Otra característica que surge de los resultados obtenidos en las diferentes razas, ya sea por PCR-RFLP o por PCR-SBT, es que cada una de ellas tiene un perfil genético particular (combinación de alelos y frecuencias génicas), que podría ser consecuencia de procesos de estructuración poblacional y adaptación a diferentes ambientes (Giovambattista *et al.*, 2001), y aportando información de utilidad para el diseño de programas de conservación.

Finalmente, cabe mencionar que aún no se han llevado a cabo estudios de caracterización genética en otros genes del BoLA en razas criollas, ya sea de clase II (ej., BoLA-DQB) o de clase I.

Cuadro 3. Resumen de trabajos de caracterización del gen BoLA-DRB3 en razas criollas americanas mediante la técnica PCR-SBT. N = número de muestras analizadas, na = número de alelos detectados, he = heterocigosidad esperada.

Raza	País	N	na	he	Referencia
Criollo Yacumeño	Bolivia	112	35	0.950	Giovambattista <i>et al.</i> , 2013
Hartón del Valle	Colombia	66	24	0.94	Giovambattista <i>et al.</i> , 2013
Hartón del Valle	Colombia	66	37	0.73	Hernández Herrera <i>et al.</i> , 2011
Hartón del Valle	Colombia	93	27	0.941	Hernández Herrera <i>et al.</i> , 2015
Criollo del Altiplano	Bolivia	48	23	0.93	Giovambattista <i>et al.</i> , 2020



Cuadro 2. Frecuencias génicas de los alelos del gen BoLA-DRB3 definidos por PCR-RFLP reportadas en razas bovinas criollas. a: Giovambattista *et al.* (1996); b: Ripoli *et al.* (2004); c: Martínez *et al.* (2003); d: Kelly *et al.* (2003); e: Fernández *et al.* (2008); f, g: Martínez *et al.* (2005); h, i, j, k, l, m, n, ñ: Hernández Herrera *et al.* (2013).

Alelo BoLA	Argentino	Saavedreño	Patagónico	Uruguayo	Chihuahua	Tamaulipas	Blanco	Blanco	Casanareño	Costeño	Chino	Caqueteño	Hartón	Romosinuano	Sanmartinero
	(a)	(b)	Argentino	(d)	(e)	(f)	Orejinegro	Orejinegro	(i)	con	Santan-	(l)	del Valle (m)	(n)	(ñ)
			(c)			(g)	(h)		cuernos(j)	dereano (k)					
DRB3.2*01	0.011	0.0112	0.458	0.010			0.015								
DRB3.2*02					0.029							0.051		0.020	
RB3.2*03	0.003				0.118		0.039							0.033	0.033
DRB3.2*04							0.023								
DRB3.2*05	0.053	0.028					0.101								
DRB3.2*06		0.004				0.010	0.015		0.034				0.083		
DRB3.2*07	0.076	0.017	0.010									0.020			
DRB3.2*08	0.092	0.017	0.039			0.023					0.051	0.083			
DRB3.2*09			0.039			0.146	0.020								
DRB3.2*10	0.016		0.059	0.032					0.060		0.020	0.100	0.033		
DRB3.2*11	0.020	0.084	0.017	0.019		0.015						0.051			
DRB3.2*12	0.008					0.023		0.020			0.051				
DRB3.2*13			0.010		0.010		0.020	0.020						0.050	
DRB3.2*14			0.019			0.007		0.020						0.050	
DRB3.2*15	0.226	0.024	0.105	0.108	0.074	0.049	0.031	0.034	0.020	0.125	0.090	0.020		0.020	
DRB3.2*16	0.045	0.168		0.167	0.011		0.023	0.051	0.040	0.071	0.070		0.133		
DRB3.2*17					0.049	0.078	0.020		0.020		0.051	0.050	0.083	0.020	
DRB3.2*18	0.146	0.040	0.017	0.147	0.049	0.039	0.020						0.020		
DRB3.2*19			0.035		0.096	0.020	0.031					0.020			
DRB3.2*20	0.020	0.193	0.019	0.020	0.031			0.103	0.020	0.125	0.034	0.050	0.033	0.083	
DRB3.2*21	0-013	0.048					0.071					0.020	0.100		
DRB3.2*22	0.037	0.024				0.029	0.039		0.020		0.035				
DRB3.2*23	0.031	0.024			0.053	0.206	0.031	0.071	0.137	0.040	0.142	0.070	0.020	0.067	0.033
DRB3.2*24	0.120	0.024		0.069	0.383	0.176		0.053	0.070	0.153	0.071		0.050		0.350
DRB3.2*25	0.008	0.008				0.023		0.020	0.070			0.020			
DRB3.2*26	0.003							0.036		0.060		0.034		0.050	
DRB3.2*27	0.081	0.084		0.019			0.007	0.090		0.080					
DRB3.2*28	0.035					0.010	0.007	0.250	0.020	0.403	0.053	0.070	0.033	0.050	0.216
DRB3.2*29		0.008													
DRB3.2*30				0.010			0.109								
DRB3.2*31		0.035	0.029												
DRB3.2*32					0.010						0.020				
DRB3.2*33													0.020		
DRB3.2*34	0.012							0.034		0.036	0.020				
DRB3.2*35	0.008		0.010								0.020				
DRB3.2*36	0.116		0.116				0.035	0.051	0.100	0.178	0.051	0.050	0.020	0.033	
DRB3.2*37	0.080		0.080				0.250	0.103	0.020	0.160	0.103	0.067	0.050	0.067	
DRB3.2*39		0.017			0.069	0.015						0.066			
DRB3.2*40					0.020							0.034	0.100	0.020	
DRB3.2*42												0.034			
DRB3.2*43							0.020	0.120				0.033			
DRB3.2*44			0.010												

Cuadro 2. Frecuencias génicas de los alelos del gen BoLA-DRB3 definidos por PCR-RFLP reportadas en razas bovinas criollas. a: Giovambattista *et al.* (1996); b: Ripoli *et al.* (2004); c: Martínez *et al.* (2003); d: Kelly *et al.* (2003); e: Fernández *et al.* (2008); f, g: Martínez *et al.* (2005); h, i, j, k, l, m, n, ñ: Hernández Herrera *et al.* (2013). (Continuación)

Alelo BoLA	Argentino	Saavedreño	Patagónico	Uruguayo	Chihuahua	Tamaulipas	Blanco	Blanco	Casanareño	Costeño	Chino	Caqueteño	Hartón	Romosinuano	Sanmartinero
(a)	(b)	Argentino	(d)	(e)	(f)	Orejinegro	Orejinegro	(i)	con	Santan-	(l)	del Valle (m)	(n)	(ñ)	
		(c)				(g)	(h)		cuernos(j)	dereano(k)					
DRB3.2*45						0.021	0.010								
DRB3.2*50						0.011	0.010								
DRB3.2*53					0.010										
ibd						0.032									
bbb						0.021									
nbd						0.021	0.010								
seb						0.011									
taa							0.010								
tbb							0.039								
tbd							0.010								
ubb							0.010								
ubd							0.010								
vbd							0.020								
xbb**				0.053											
dba					0.020										
dbb						0.010									
fbb*				0.032											
gbb					0.021										
ibb*				0.096	0.020										
ibe					0.011										
kbd						0.010									
mab						0.010									
mbb						0.010									
naa						0.020									
gba						0.010									
nbe						0.020									
obd						0.010									
sba				0.021	0.010										



## Estudios de asociación en bovinos criollos

Como se mencionó anteriormente los genes de Clase II del BoLA, y especialmente el gen BoLA-DRB3, han sido asociados a resistencia/susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas, a variación en la respuesta inmune y a la respuesta a la vacunación (Takeshima y Aida, 2006). Además, este gen ha sido asociado a caracteres de producción. Por otra parte, las razas criollas presentan un alto nivel de adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales, destacándose en regiones marginales donde las razas comerciales altamente seleccionadas evidencian una menor eficiencia productiva. Entre los factores de adaptación que presentan estas razas nativas (*Bos taurus*) podemos mencionar la resistencia a enfermedades infecciosas, lograda, por ejemplo, por un menor nivel de infestación con garrapatas (Guglielmone et al., 1986). Conjuntamente, la función del gen BoLA-DRB3 y las características de las razas bovinas criollas, determinan la importancia de considerar estas poblaciones para estudiar genes relacionados a la respuesta inmune y a la resistencia a enfermedades infecciosas. A pesar de esto, son limitados los estudios entre los polimorfismos del gen BoLA-DRB3 y enfermedades infecciosas (Cuadro 4). Estos trabajos han sido realizados en razas colombianas (Blanco Orejinegro y Hartón del Valle) y han sido enfocados al estudio de asociación entre los alelos del gen BoLA-DRB3, genotipados por PCR-RFLP y/o PCR-SBT, y susceptibilidad/resistencia a

garrapatas, *Babesia* spp, *Brucella abortus* y *leucosis*. Estos estudios permitieron detectar variantes de susceptibilidad y resistencia a estos patógenos, como por ejemplo, Hernández et al. (2011) reportaron tres alelos (BoLA-DRB3\*1101, \*2709 y \*20012) asociados a resistencia a leucosis en la raza criolla colombiana Hartón del Valle; Martínez et al. (2005) detectaron asociaciones significativas entre bajos niveles de infestación por *Dermatobia hominis* y los alelos DRB3\*2701 y DRB3\*2801; y Bolaños et al. (2017) encontraron asociación del gen BoLA DRB3 (DRB3\*1101, \*20012, \*2006 y \*2703) con la infección natural de *Babesia* spp en el ganado criollo Hartón del Valle.

El elevado número de alelos presentes y el limitado número de individuos genotipados (entre 100 y 200 individuos) restringen los análisis estadísticos, basándose la mayoría de estos estudios en modelos de caso/control y cálculo de OR (Odd ratios). La validación de estos resultados, así como el estudio de asociación con otras enfermedades infecciosas, permitirán utilizar esta información en programas de conservación y mejoramiento de los bovinos criollos. Además, estos estudios basados en genes candidatos deberían ser complementados con estudios a nivel genómico utilizando tecnologías de genotipado masivo como, por ejemplo, microarrays de SNPs (polimorfismos de nucleótidos simples) o NGS.

Cuadro 4. Resumen de estudios de asociación realizados entre los polimorfismos del gen BoLA-DRB3 y enfermedades infecciosas en razas criollas americanas. N = número de animales analizados.

Raza	País	N	Metodología	Diseño	Enfermedad	Referencia
Blanco Orejinegro	Colombia	140	PCR-RFLP	modelo mixtos	Ectoparásitos y <i>Brucella abortus</i>	Martínez et al., 2005
Hartón del Valle	Colombia	100	PCR-RFLP y PCR-SBT	caso / control	Leucosis	Hernández Herrera et al., 2011
Hartón del Valle	Colombia	93	PCR-SBT	caso / control	Leucosis	Hernández Herrera et al., 2014
Hartón del Valle	Colombia	191	PCR-RFLP	caso / control	<i>Babesia</i> spp	Bolaños et al., 2017

## Conclusiones y perspectivas futuras

Los estudios de caracterización genética de las razas bovinas criollas americanas comenzaron en la década del ochenta con el estudio de los grupos sanguíneos. Durante las décadas pasadas la mayoría de las razas han sido caracterizadas mediante marcadores de tipo microsatélites, mitocondriales y del cromosoma Y, así como para algunos loci asociados a caracteres productivos (por ejemplo, terneza y producción lechera). Sin embargo, como se ha mencionado en la

presente revisión el estudio de genes involucrados en la respuesta inmune han sido limitados, a pesar que una de las principales características de las razas criollas es la resistencia a enfermedades. Solo unos pocos de estos trabajos han utilizado métodos directos de genotipado, como es la secuenciación directa, y por otra parte, los estudios de asociación se han basado en tamaño de muestras reducidas. Aunque mucho se ha avanzado en el conocimiento de la diversidad genética



del gen BoLA-DRB3 aún hay un largo camino por recorrer. La implementación de consorcios de investigación entre investigadores de diferentes caminos permitiría aumentar nuestro conocimiento

sobre los genes del sistema inmune en las razas bovinas criollos, y aportarían una valiosa información para apoyar su conservación y su valor como recurso zoogénético.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Argentino de Cooperación Sur-Sur y Triangular (FO.AR) por su

apoyo para la realización de la cooperación entre las Instituciones argentinas y bolivianas participantes.

### Literatura Citada

- Aida, Y. 1995. Characterization and expression of bovine MHC class II genes. *Bull. Soc. Fr. Jpn. Sci. Vet.* 6, 17–24.
- Behl, J.D.; Verma, N.K.; Behl, R.; Mukesh, M. y Ahlawat, S.P.S. 2007. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (*Bos indicus*). *J Dairy Sci* 90:2997-3001.
- Bohórquez, MD; Ordoñez, D; Suárez, DF; Vicente, B; Vieira, C; López-Abán, J; Muro, A; Ordoñez, I; Patarroyo MF. 2020. Major Histocompatibility Complex Class II (DRB3) Genetic Diversity in Spanish Morucha and Colombian Normande Cattle Compared to Taurine and Zebu Populations. *Front. Genet.* 10:1293.
- Bolaños, I; Hernández, D; Álvarez, D. 2017. Asociación de los alelos del gen BoLA-DRB3 con la infección natural de Babesia spp. en el ganado criollo Hartón del Valle. *Arch. Zootec.* 66 (253):113-120.
- Burke, M. G.; Stone, R. T.; Muggli-Cockett, N. E. 1991. Nucleotide sequence and northern analysis of a bovine major histocompatibility class II DR beta-like cDNA. *Anim. Genet.* 22, 343–352.
- Davies, C.J.; Andersson, L.; Joosten, I.; Mariani, P.; Gasbarre, L.C. y Hensen, E.J. 1992. Characterization of bovine MHC class II polymorphism using three typing methods: serology, RFLP and IEF. *Eur J Immunogenet.* 19(5):253–62.
- Davies, C.J.; Joosten, I.; Andersson, L.; Arriens, M.A.; Bernoco, D.; Bissumbhar, B.; Byrns, G.; van Eijk, M.J.; Kristensen, B.; Lewin, H.A. et al. 1994. Polymorphism of bovine MHC class II genes. Joint report of the fifth international bovine lymphocyte antigen (BoLA) workshop, Interlaken, Switzerland. *Eur J Immunogenet.* 21(4):259–89.
- Félix Portillo, M.; Ríos Ramírez, J.G.; Erosa de la Vega, G.E. y Rodríguez Almeida, F. 2006. Sequencing of new BoLA-DRB3.2 alleles detected in Mexican Creole cattle. *Téc Pecu Méx* 44:15-25.
- Fernández, I.G.; Ramírez, J.G.; Vázquez, A G.; Arvizu, R.U. y Morales, R.A. 2008. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4):880-886.
- Gilliespie, B.E.; Jayarao, B.M.; Dowlen, H.H. y Oliver, S.P. 1999. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *J Dairy Sci* 82:2049-2053.
- Ginja, C.; Gama, L.T.; Cortés, O.; et al. 2019. The genetic ancestry of American Creole cattle inferred from uniparental and autosomal genetic markers. *Sci Rep.* 9(1):11486.
- Giovambattista, G.; Golijow, C.D.; Dulout, F.N.; Lojo, M.M. 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim Genet.* 1996;27(1):55-56.
- Giovambattista, G.; Ripoli, M.V.; Peral Garcia, P.; Bouzat, J.L. 2001. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. *Anim Genet.* 32(5):240-247.
- Giovambattista, G.; Takeshima, S.N.; Ripoli, M.V.; et al. 2013. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene.* 519(1):150-158.
- Giovambattista, G.; Takeshima, S.N.; Moe, K.K.; Pereira Rico, J.A.; Polat, M.; Loza Vega, A.; Arce Cabrera, O.N.; Aida, Y. 2020. BoLA DRB3 genetic diversity in Highland Creole cattle from Bolivia. *HLA* 1–9. <https://doi.org/10.1111/tan.14120>.
- Goszczynski, D. E.; Ripoli, M. V.; Takeshima, S. N.; Baltian, L.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2014. Haplotype determination of the upstream regulatory region and the second exon of the BoLA-DRB3 gene in Holstein cattle. *Tissue Antigens* 83, 180–183. doi: 10.1111/tan.12293
- Guglielmone, A.A.; Mangold A.J.; Aguirre, D.H.; Bermúdez, A.C.; Gaido, A.B., 1986. Comparación de la raza criolla con otros biotipos bovinos respecto al parasitismo por *Boophilus microplus* e infecciones naturales de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. En *Ganado Bovino Criollo. Terceras Jornadas:1986. Cuartas Jornadas. Jesús María, Córdoba, Argentina. Tomo 2:1-6.*
- Hernández, D.; Posso, A.; Benavides, J.; Muñoz, J.; Giovambattista, G. y Alvarez, L. 2011. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2 en el ganado criollo Hartón del Valle por PCR-RFLP y PCR-SBT. *Rev Colom Cienc Pecu* 24(3): 390-390.



- Hernández, D.; Posso, A.; Muñoz, J.; Giovambattista, G.; Alvarez L. 2011. Evaluación de la resistencia genética del ganado criollo Hartón del Valle al virus de la leucosis bovina. AICA 2011; 1:169-172.
- Hernández Herrera, D.; Posso, A.; Muñoz, J.; Giovambattista, G.; Álvarez, L. 2013. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2\* en ganado criollo colombiano. Rev.MVZ Córdoba 18(Supl):3665-3671.
- Hernández, D.; Posso, A.; Muñoz, J; Giovambattista, G. y Álvarez, L. 2014. Asociación del locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano. Rev Colombiana Cienc Anim, 6: 319-326.
- Hernández Herrera, D. Y.; Muñoz Flórez, J. E.; Álvarez Franco, L. A. 2015. Diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 10(1), 18-30.
- Kelly, L.; Nicolini, P.; D'Angelo, M.; Nimo, A.; Rincón, G.; Piagio, J. y Postiglioni, A. 2003. Polimorfismo de gen DRB3.2 en bovinos criollos del Uruguay. Arch Zootec 52:77-80.
- Kemp, S.J.; Spooner, R.L.; Teale, A.J. 1988. A comparative study of major histocompatibility complex antigens in East African and European cattle breeds. Animal genetics. 1988;19(1):17-29.
- Klein, J. 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. : the trans-species hypothesis. Hum Immunol. 19(3):155-62.Wiley; ISBN: 9780471809531.
- Lee, B.Y.; Hur, T.Y.; Jung, Y.H.; Kim, H. 2012. Identification of BoLA-DRB3.2 alleles in Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein populations using a next generation sequencer. Anim Genet. 43(4):438-41.
- Maccari, G.; Robinson, J.; Ballingall, K.; Guethlein, L.A.; Grimholt, U.; Kaufman, J.; Ho, C.S.; De Groot, N.G.; Flück, P.; Bontrop, R.E.; Hammond, J.A. y Marsh, S.G.E. 2017. IPD-MHC 2.0: an improved inter-species database for the study of the major histocompatibility complex. Nucleic Acids Res., 45: D860-D864.
- Maillard, J.C.; Renard, C.; Chardon, P.; Chantal, I. y Bensaid, A. 1999. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. Anim Genet 30:200-203.
- Martinez, R.D.; Giovambattista, G.; Ripoli, M.V.; De Luca, J.C.; Dulout, F.N. 2003. Patagonian Argentine Creole cattle polymorphism: comparison with North-West populations of this breed, Research in Veterinary Science, 10.1016/S0034-5288(02)00190-X, 74, 3, (287-290).
- Martínez, R.; Toro, R.; Montoya, F.; Burbano, M.; Tobón, J.; Gallego, J. y Ariza, F. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. Arch Zootec 54:349-356.
- Mikko, S.; Andersson, L. 1995. Extensive MHC class II DRB3 diversity in African and European cattle. Immunogenetics,42:408-13.
- Miretti, M.M.; Ferro, J.A.; Lara, M.A.; Contel, E.P. 2001. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in South American cattle. Biochem Genet. 39(9-10):311-324.
- Miyasaka, T.; Takeshima S.N.; Matsumoto, Y.; Kobayashi, N.; Matsuhashi, T.; Miyazaki, Y.; Tanabe, Y.; Ishibashi, K.; Sentsui, H.; Aida, Y. 2001. The diversity of bovine MHC class II DRB3 and DQA1 alleles in different herds of Japanese black and Holstein cattle in Japan. Gene. 472(1-2):42-49.
- Miyasaka, T.; Takeshima, S.N.; Sentsui, H.; Aida, Y. 2012. Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese black and Holstein cattle in Japan. J Dairy Sci. 95(1):420-431.
- Muggli-Cockett, N.E.; Stone, R.T. 1989. Partial nucleotide sequence of a bovine major histocompatibility class II DR beta-like gene. Anim Genet 20:361-367.
- Ripoli, M.V.; Lirón, J.P.; De Luca, J.C.; Rojas, F.; Dulout, F.N.; Giovambattista, G. 2004. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreño Creole dairy cattle. Biochem Genet. 42(7-8):231-240.
- Sigurdardottir, S.; Borsch, C.; Gustavsson, K.; Andersson, L. 1991. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. Anim. Genet. 22:199-209.
- Sommer, S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Front. Zool. 2, 16. doi: 10.1186/1742-9994-2-16.
- Spooner, R.L.; Leveziel, H.; Grosclaude, F.; Oliver, R.A. et al. 1978. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. Immunogenetics 5: 325-346.
- Takeshima, S.; Ikegami, M.; Morita, M.; Nakai, Y.; Aida, Y. 2001. Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. Immunogenetics 53(1):74-81.
- Takeshima, S.; Nakai, Y.; Ohta, M.; Aida, Y. 2002. Short communication: characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. J Dairy Sci. 85(6):1630-1632.



- Takeshima, S.; Saitou, N.; Morita, M.; Inoko, H.; Aida, Y. 2003. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese black, Japanese shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene*. 316:111–118.
- Takeshima, S.N.; Aida, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim. Sci. J.* 77:138–150.
- Takeshima, S.; Miki, A.; Kado, M.; Aida, Y. 2007. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DQA1 exon 2. *Tissue Antigens* 69:189–199.
- Takeshima, S.N.; Matsumoto, Y.; Aida, Y. 2009. Short communication: establishment of a new polymerase chain reaction-sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex class II DRB3. *J Dairy Sci*. 92(6):2965–2970.
- Takeshima, S.N.; Matsumoto, Y.; Miyasaka, T.; Arainga-Ramirez, M.; Saito, H.; Onuma, M.; Aida, Y. 2011. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens*. 78(3):208–213.
- Takeshima, S. N.; Miyasaka, T.; Polat, M.; Kikuya, M.; Matsumoto, Y.; Mingala, C. N. et al. 2014. The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. *Meta Gene* 2, 176–190. doi: 10.1016/j.mgene.2013.12.005.
- Takeshima, S.N.; Kawamura, A.; Ishida, A.; Murakawa, Y.; Giovambattista, G.; Aida, Y. 2019. Target resequencing for bovine major histocompatibility complex region. 37th Conference of the International Society of Animal Genetics, del 7 al 12 de julio del 2019. Lleira, España.
- Van Eijk, M.J.T.; Stewart-Haynes, J.A.; Lewin, H.A. 1992. Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23, pp. 483–496
- Villalobos-Cortés, A.; González, R. 2018. Secuencias del gen BoLA-DRB3.2 de bovinos Guaymí y Guabalá de Panamá. *Ciencia Agropecuaria* 28:22–36.

