

# DIVERSIDAD GENÉTICA DE UN POLIMORFISMO DEL GEN LACTOFERRINA BOVINO (LTF) EN UNA POBLACIÓN DE VACAS HOLSTEIN DE COLOMBIA Y SU ASOCIACIÓN CON COMPONENTES DE LA LECHE (RESULTADOS PRELIMINARES)

GENETIC DIVERSITY OF LACTOFERRIN BOVINE GENE (LTF) IN HOLSTEIN BREED OF COLOMBIA AND ITS ASSOCIATION WITH COMPOSITION FEATURES OF MILK

Estudio poblacional del gen LTF y su asociación con características de la leche

Nancy Rodríguez C.<sup>1</sup>; MSc(c), Albeiro López H.<sup>1</sup>; Julián Echeverri Z<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

## Palabras clave:

Análisis  
molecular  
Caracterización  
genética  
Polimorfismo

## Keywords:

Molecular  
analysis  
Genetic  
characterization  
Polymorphism

## Abstract

In the present study we determined the allele and genotype frequencies of lactoferrin gene polymorphism and estimated some parameters of population structure in a Holstein population of Antioquia, Colombia. Significant associations were found between the lactoferrin gene and protein percentage and somatic cell count, findings make it possible to approach an appropriate molecular marker-assisted selection (MAS).

## Resumen

En el presente estudio se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de un polimorfismo del gen lactoferrina y se estimaron algunos parámetros de variabilidad genética en una población Holstein del departamento de Antioquia, Colombia. Se encontraron asociaciones significativas del gen de la lactoferrina con el porcentaje de proteína y con el recuento de células somáticas, hallazgos que hacen posible el planteamiento de un programa adecuado de selección asistida por marcadores moleculares (MAS).

## Introducción

La lactoferrina, LTF, es una glicoproteína monomérica. La lactoferrina bovina estimula o inhibe diversos componentes humorales y celulares de la inmunidad implicados en la prevención o resolución de infecciones y de la inflamación asociada a estas últimas. El Gen LTF bovino, fue mapeado en el cromosoma 22q24 34.5 kb. (Chaneton *et al.* 2008). Presenta polimorfismos en el exón 8, 9, y 15 sin generar cambios en la secuencia de aminoácidos (Wojdak-maksymiec *et al.* 2006) y polimorfismos en el exón 4 y en el exón 11 que causan cambios importantes en la misma; en el exón 4, en la posición 1155 A/G causa un cambio de isoleucina a valina, y el exón 11 en la posición 1415 C/T causa un cambio de histidina a triptófano, estos cambios activan elementos promotores (Chaneton *et al.* 2008). Un polimorfismo en el intrón 6 (C/T), está ligado a los cambios en los exones 4 y 1, separados por 14.5 kb. Cuando el intrón 6 se encuentra en su forma no mutada (Citosina), el exón 4 contiene una Adenina y el exón 11 una Citosina, cuando el intrón 6 se encuentra con su forma mutada (Timina) el exón 4 se encuentra con una Guanina y el exón 11 con una Timina (Seyfert *et al.* 1996).

Conocer la estructura genética de las poblaciones locales de Holstein es de gran importancia, ya que una población para un locus determinado, en este caso el lugar del polimorfismo del intrón 6, podría producir cambios y por ende producir efectos genéticos importantes en los parámetros de la población, es decir, cambios en la frecuencia génica, este resultado usual del equilibrio entre selección, mutación, migración y azar. Lo que

permitiría la interpretación de la evolución en la raza y la base para dilucidar sus efectos en las frecuencias génicas de las poblaciones de Holstein. El objetivo del presente trabajo fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen lactoferrina (LTF) y estimar algunos parámetros de estructura poblacional en una población holstein del departamento de Antioquia, Colombia.

### Material y métodos

En el estudio se incluyeron 510 vacas de la raza Holstein, pertenecientes a diez lecherías especializadas ubicadas en seis municipios del departamento de Antioquia; las cuales estuvieron incluidas en un programa de control lechero para medir parámetros de producción, calidad sanitaria y nutricional de la leche, con análisis de leche periódicos. Tales como producción de leche, porcentaje de proteína y grasa, y recuento de células somáticas (RCS). Se tomaron como subpoblaciones los municipios.

Para la obtención del DNA de sangre periférica se utilizó el método de "salting out" (Miller *et al.* 1988). Las muestras se amplificaron mediante la técnica de PCR seguida de una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y bromuro de etidio. Luego se realizó un análisis de los polimorfismos de longitud con enzimas de restricción (RFPL) usando la enzima de restricción EcoRI. El patrón de restricción esperado para el genotipo AA es un fragmento de 301pb, para el genotipo AB tres fragmentos (301pb, 201pb y 100pb), y para el genotipo BB dos fragmentos (201pb y 100pb). Las frecuencias alélicas y genotípicas, la prueba exacta de Hardy-Weinberg (HW), la Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) en cada población utilizando los algoritmos incluidos en el programa GENEPOP versión 4.0 (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Al igual que estadísticos F de Wright parámetros F y Rho. Los recuentos celulares de cada control se transforman a una escala lineal (SCS) de 1 a 9 mediante una transformación logarítmica según la expresión  $\text{Log}_2(\text{RCS}/100) + 3$ . Los porcentajes de proteína y grasa se calcularon con base en las lactancias completas que tenían información para las características. Se realizó un análisis de varianza basado en las fuentes de variación conocidas, Hato, número de partos, edad, para cada una de las variables dependientes (producción de leche ajustada a 305 días, porcentaje de grasa y proteína, y RCS) y test Duncan para comparación de medias, usando el paquete estadístico SAS 9.0. Usando el mismo paquete estadístico se realizó un análisis de regresión lineal simple para determinar la relación del efecto alélico y las variables en estudio, para este fin los genotipos AA, AB y BB se convirtieron a una escala cuantitativa 0, 1 y 2 respectivamente.

### Resultados y discusión

Se obtuvo amplificación del DNA de las 510 vacas. Las frecuencias de los alelos A y B fueron 0,78 y 0,22 respectivamente. Los alelos controlan la incidencia de tres genotipos AA, AB y BB, con frecuencias 0,60, 0,36 y 0,04 respectivamente. Solo la población de Pedro de los Milagros, mostró desvíos significativos ( $P \leq 0,05$ ) para el análisis de equilibrio de HW, esta desviación se debió a un exceso de heterocigotos; La población total se encontró exogámica en equilibrio de HW. La Heterocigosidad observada y esperada tuvo una variación de 0,27 a 0,42 y de 0,30 a 0,43, respectivamente, indicando a priori, una mediana variación entre las poblaciones. Los valores de Fis en las subpoblaciones fueron menores a cero, indicando leve exceso de heterocigotos en los municipios de San Pedro y Entrerrios, -0,12 y -0,11 respectivamente. Para Los municipios de Medellín, La Unión y Belmira el valor positivo de Fis indica un leve exceso de homocigotos con un parámetro estimado de 0,11, 0,07 y 0,03 respectivamente. El parámetro Fis estimado para la población total fue de -0,717. La comparación de  $H_o$  y  $H_e$  entre pares de municipios indicó que no se presenta diferenciación entre ninguna de las parejas, excepto entre el municipio de San Pedro de los Milagros y Entrerrios ( $P < 0,05$ ), indicando que todas las poblaciones pueden ser consideradas la misma unidad genética. Entre todas las parejas de subpoblaciones, el estadístico Fst estuvo en el rango de 0 a 0,05, indicando poca diferenciación genética según Wright. El Fst global fue 0,0099 ratificando la baja diferenciación entre poblaciones. Al considerar las poblaciones se observó un  $F_{IT}$  de -0,0611, que evidencia como la población en general se encuentra en exogamia. Cuando se analizaron las poblaciones mediante el estadístico Rho no se observaron diferencias. El genotipo no tuvo un efecto significativo sobre la producción de leche ( $R^2=0,32$ ), porcentaje de proteína ( $R^2=0,1$ ) y grasa ( $R^2=0,1$ ), ni para SCS ( $R^2=0,23$ ). Un análisis de medias de Duncan llevado a cabo posteriormente, mostró como las vacas con genotipo AA produjeron 840,7 Kg. de leche más por lactancia que las vacas con genotipo BB. De la misma

forma los individuos AB fueron superiores en 807,3 Kg. a los BB que presentaron el menor rendimiento, sin embargo estadísticamente no se detectaron diferencias significativas entre las medias ( $P>0,05$ ). El porcentaje de grasa de las vacas con el genotipo BB fue mayor que el de las vacas con genotipos AA y AB, con diferencias de 0,16 % y 0,12% respectivamente, sin embargo estadísticamente no se detectaron diferencias significativas entre las medias ( $P>0,05$ ). El análisis de medias de Duncan llevado a cabo para porcentaje de proteína mostró diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre las medias de los tres genotipos, denotando el genotipo BB como el más adecuado para porcentaje de proteína. Este mismo análisis para el SCS, mostró diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre las medias de los tres genotipos, denotando el genotipo AB como el más favorable para el SCS con un puntaje menor (Tabla I).

**Tabla I.** Asociación entre los genotipos de LTF y producción, composición y RCS de la leche (*Association between of LTF genotypes and production, composition and SCC of milk*)

Genotipo	Producción de leche (Kg.)	% Grasa	% Proteína	SCS
AA	5072 a	3,95 a	3,10 a	4,76 ab
AB	5038 a	3,99 a	3,13 ab	4,61 a
BB	4231 a	4,11 a	3,28 b	5,38 b
CV (%)	28,69	12,04	7,81	23,70

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa  $p<0,05$ .

El coeficiente de regresión (Beta) para producción de leche y SCS indica que por cada alelo B la producción disminuye en 135,47 litros por lactancia y 0,023 puntos el score de células somáticas respectivamente, sin embargo estadísticamente el modelo no detectó diferencias significativas, lo mismo ocurrió para el porcentaje de grasa lo cual indico como por cada alelo B aumentaba en 0,043. Para porcentaje de proteína se observó que por cada alelo B la proteína aumenta significativamente en 0,044%.

### Conclusiones

Con base en la población analizada se puede concluir que el gen de la lactoferrina bovina LTF no ha sido objeto de selección genética ni de otras fuerzas génicas que sugieran cambios en la estructura de las diferentes poblaciones, pese a que este gen se ha encontrado asociado a diferentes características sanitarias, en las poblaciones estudiadas la selección indirecta que se ha llevado a cabo, no ha provocado cambios que impliquen desviaciones del equilibrio de HW.

### Agradecimientos

Se agradece a los propietarios de las fincas en cada municipio por permitir en ellas este estudio, al Laboratorio de biología Molecular y celular de la Universidad Nacional Sede Medellín. Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (DIME).

### Bibliografía

- Chaneton L., Tirante L., Maito J., Chaves J., Bussmann L. (2008). Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitis bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 91: 1865-1873.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT 9.0. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC. 2004.
- Seyfert H.M., Henke M., Interthal H., Klusmann U., Koczan D., Natour S. (2002). Defining candidate genes for mastitis resistance in cattle: the role of lactoferrin and lysozyme. *J Anim Breed Genet.* 113: 269–276.
- Wojdak-maksymiec K., Kmiec M., Ziemak J. (2006). Associations between bovine lactoferrin genepolymorphism and somatic cell count in milk. *Vet Med.* 51: 14–20.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 16: 1215.