

Asociación del factor de crecimiento semejante a la insulina bovina-polimorfismo del gen del receptor I con rasgos de producción de leche en vacas lecheras iraníes Najdi y Holstein

A. Bakhtar¹, H.R. Rahmani¹, M.A. Edriss¹ y B.E. Sayed-Tabatabaei²

¹Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 8415683111,

²Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 8415683111, Iran

Correo electrónico: a.bakhtari@ag.iut.ac.ir

En este estudio, se seleccionaron 266 vacas Holstein (*Bos taurus*) y 41 vacas Najdi (*Bos indicus*) de forma aleatoria para estimar el polimorfismo en el alelo y las frecuencias genotípicas del factor de crecimiento semejante a la insulina-gen del receptor I (IGF-IR) en dos grupos genéticos de ganado lechero y determinar asociaciones entre este polimorfismo y el rendimiento lechero y la composición de la leche. Se extrajo el ADN genómico de la sangre y se utilizó para estudiar el polimorfismo genético IGF-IR mediante PCR-RFLP. En lo referente a los reportes hasta el momento, este gen tiene dos alelos (A y B). Los genotipos AB y BB no se detectaron en las vacas Holstein. Las frecuencias de los genotipos AA, AB y BB en las vacas Najdi fueron 0.707, 0.293 y 0.0, respectivamente. Las frecuencias de los alelos A y B fueron 0.854 y 0.146 en las vacas Najdi, respectivamente. La población en la granja Najdi estaba en equilibrio Hardy-Weinberg. En las vacas Najdi, los resultados mostraron que no hubo asociaciones significativas entre los genotipos y el rendimiento lechero y la composición de la leche ($P > 0.05$), pero el efecto de este polimorfismo para la duración del período de lactación fue significativo ($P < 0.05$). Parece que el alelo A del IGF-IR en *Bos taurus* descendió hasta ser fijo. En lo que respecta a la baja frecuencia del alelo B para este gen en las vacas Najdi (*Bos indicus*), el polimorfismo del gen IGF-IR no es un buen indicador de selección para estas vacas.

Palabras clave: IGF-IR, PCR-RFLP, frecuencia del gen, rendimiento lechero, duración del período de lactación.

Las técnicas biotecnológicas son una ayuda promisoría en el mejoramiento genético por identificación, mapeo y análisis de polimorfismos de genes que codifican rasgos. La selección asistida por marcadores puede aumentar la tasa de ganancia genética en el ganado sin incrementar el riesgo de la selección. Sin embargo, se han reconocido pocos marcadores genéticos para rasgos de producción de leche en ganado lechero. El factor de crecimiento semejante a la insulina-gen del receptor I (IGF-IR) es un candidato para enmendar el desequilibrio con los loci de rasgos cuantitativos (QTL). En el ganado, el gen IGF-IR ha sido mapeado hasta el cromosoma 21 ligado a Hel5 (Moody *et al.* 1996 y Schoenau *et al.* 2005) y muestra un polimorfismo en un intrón (Curi *et al.* 2005 y Akis *et al.* 2010). En humanos y ratones, este gen se localiza en el cromosoma 15 (Hongyu *et al.* 2003) y 7 (Yang-Feng *et al.* 1985), respectivamente. El eje IGF contiene dos ligandos (IGF-I y IGF-II), dos receptores (IGF-IR y IGF-IIR), seis de proteínas que se ligan al IGF y muchas proteasas (Grimber y Cohen 2000). El IGF-IR controla el tiempo medio de vida de la actividad de los IGF (Lei *et al.* 2008). En humanos, los polimorfismos del IGF-IR influyen en los niveles en plasma del IGF-I (Lu 2009). Li *et al.* (2006) mostraron que el IGF-IR desempeña un importante papel en la mediación de un efecto anabólico del zinc en el intestino delgado de cerditos destetados. El IGF-IR con estructura de glucoproteína pertenece a la familia de los receptores de tirosina quinasa, tales como el receptor de la insulina (Herbert y Rohan, 2000). El IGF-IR se encuentra embebido en la membrana de la superficie de la célula tales como en las células epiteliales mamarias que se activan por la unión de los IGF con los receptores (Schofield 1992 y Jones y Clemmons 1995). Este

receptor es heterotetrámero y contiene dos α -subunidades y dos β -subunidades que se enlazan juntas con los puentes disulfuro (Kawashima *et al.* 2005). Las α -subunidades se localizan extracelularmente y se combinan con los IGF y la insulina. Las β -subunidades se extienden a lo largo del citoplasma y contienen el área de la tirosina quinasa que inicia la vía de conducción de la señal intracelular (Blackesley *et al.* 1996). El IGF-IR es un regulador crítico de la supervivencia celular, el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo. La expresión del IGF-IR es mayor durante la galactopoyesis y la involución. La menor concentración de mRNA del IGF-IR se detectó durante el período tardío preparto (Plath-Gabler *et al.* 2001). La alta expresión del IGF-IR puede sugerir una importancia incrementada para el IGF-I endocrino que produce el hígado y puede explicar el efecto galactopoyético reconocido de la hormona de crecimiento exógeno (Schams *et al.* 1991 y Plath-Gabler, *et al.* 2001). La disminución del IGF-IR en las células epiteliales mamarias en la gestación tardía puede contribuir a un menor crecimiento y dar más oportunidad para la diferenciación celular (Baumrucker y Eröndu 2000). En este sentido, este gen y su potencial en el metabolismo y la producción pudieran estar relacionados. Los objetivos de este estudio fueron estimar el alelo y las frecuencias genotípicas de polimorfismo del gen IGF-IR en dos grupos genéticos de ganado lechero y determinar asociaciones entre este polimorfismo y el rendimiento lechero y la composición de la leche.

Materiales y Métodos

Muestras de animales. Las vacas usadas en este estudio se seleccionaron de forma aleatoria, mientras

que 266 vacas Holstein provenían de cuatro granjas lecheras industriales relevantes de la provincia de Isfahan, 41 vacas Najdi provenían de una granja en la provincia de Khuzestan. La raza Holstein es considerada como *Bos taurus* y las vacas Najdi como descendientes de *Bos indicus*.

Extracción de ADN. La muestra de sangre completa (10 mL) se recolectó por punción de la vena coccígea en tubos al vacío que contenían 2 % de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) como un anticoagulante. Las muestras de sangre se almacenaron a 4 °C hasta la extracción de ADN. El ADN genómico se extrajo de la sangre completa en enero de 2008 usando un procedimiento de sal saturada según Miller et al. (1988). Las concentraciones de ADN se cuantificaron usando 0.7 % tris-acetato-EDTA (TAE) gel agarosa. Para la detección de los genotipos IGF-IR, un fragmento del ADN 625 bp se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP). El ADN se amplificó en un volumen total de 20 µL con 50 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada cebador (cebador directo: 5'-CCC AAT GGA TTG ATC CTC ATGT-3' y cebador inverso: 5'-GCT GTG TAG TTC CCT GGG TT-3'), 0.25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3) y 1.5 U Taq ADN polimerasa. El PCR consistió en 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, 57 °C durante 30 s, y 72 °C durante 1 min. Este fragmento fue digerido por la enzima de restricción TaqI. Los productos PCR digeridos se sometieron a electroforesis en 2 % de gel de Tris-Borato-EDTA (TBE) y los fragmentos restringidos se determinaron bajo luz UV.

Análisis estadístico. Los rendimientos generales de leche, la grasa total de la leche y la proteína, la grasa de la leche y los porcentajes de proteína se obtuvieron de los registros de las granjas. Los rasgos de interés se analizaron mediante el procedimiento del Modelo Lineal General (GLM) del programa del sistema de análisis estadístico (SAS 2002), y las medias de los cuadrados mínimos de los genotipos se compararon por la prueba F. Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + b_1(LPL_{ij} - \overline{LPL}) + b_2(DP_{ij} - \overline{DP}) + b_3(OD_{ij} - \overline{OD}) + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = rasgo analizado; μ = media general para cada rasgo; G_i = efecto fijo del genotipo ($i=1,2$); b_1 = coeficiente de regresión lineal de la longitud del período de lactación; LPL_{ij} = duración del período de lactación para cada vaca; \overline{LPL} = duración media del período de lactación; b_2 = coeficiente de regresión lineal del período seco; DP_{ij} = período seco en cada vaca; \overline{DP} = período seco medio; b_3 = coeficiente de regresión lineal de días abiertos; OD_{ij} = días abiertos para cada vaca; \overline{OD} = media de días abiertos; e_{ij} = error aleatorio (Edriss et al. 2009, Bonakdar et al. 2010 y Yazdani et al. 2010).

Resultados y Discusión

El genotipo AA se caracterizó por la presencia de dos fragmentos de restricción de 580 y 45 bp y el genotipo BB se determinó por la presencia de tres fragmentos de 410, 170 y 45 bp. Los heterocigotos tuvieron cuatro fragmentos de 580, 410, 170 y 45 bp. Los datos se analizaron para el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de Chi cuadrado. El genotipo BB no se detectó en ninguna de las razas estudiadas (figura 1).

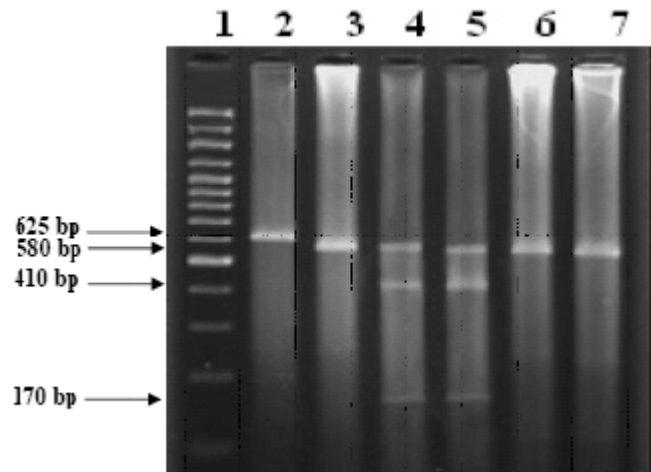


Figura 1. Determinación de genotipos en 2 % de gel agarosa. Línea 1; GeneRuler™ 100 bp más escalera ADN. Línea 2, producto PCR no fragmentado (625 bp); líneas 3, 6 y 7, genotipo AA (580 y 45 bp); línea 4 y 5, genotipo AB (580, 410, 170, y 45 bp).

Las frecuencias de los genotipos y los alelos de las vacas Holstein y Najdi se muestran en la tabla 1. La población de la granja estaba en equilibrio Hardy-Weinberg ($\chi^2=1.07$), este resultado demostró que en la granja Najdi las frecuencias de los alelos fueron estables, lo que se pudo deber al apareamiento aleatorio. No hubo observación para el genotipo BB en el rebaño Najdi; esto pudo estar relacionado con la baja frecuencia del alelo B. Moody et al. (1996) al estudiar un total de 108 cabezas de ganado vacuno que representaban ocho familias informativas del panel de referencia bovina internacional (IBRP) informaron una frecuencia alélica media de 0.7 para A y de 0.3 para B en *Bos indicus*. Estos valores para *Bos taurus*, son consistentes con este estudio. Pereira et al. (2003) en vacas Girolando obtuvieron frecuencias de 0.83 para el alelo A y 0.17 para el alelo B. En ganado Brangus la frecuencia de 0.8 para el alelo A se determinó por Mesquitam (2003). Curi et al (2005) estudiaron 384 toros que pertenecían a cuatro grupos genéticos diferentes, que incluían 79 Nellore (*Bos indicus*), y 30 Canchim (5/8 Charolais+3/8 Zebu) y 1/2 Simmental ($n = 30$) y 1/2 Angus ($n = 245$) que resultan de cruces de sementales Simmental o Angus y hembras Nellore. Estos animales representaron progenies de 45 toros diferentes y estos autores concluyeron que la frecuencia del alelo A fue

Tabla 1. Genotipo y frecuencias del alelo del gen IGF-IR en dos razas

Raza	N	Genotipos			Alelos	
		AA	AB	BB	A	B
Holstein	266	100.0 n = 266	0.0 n = 0	0.0 n = 0	100.0	0.0
sNajdi	41	0.71 N = 29	0.29 N = 12	0.0 N = 0	0.85	0.15

Tabla 2. Las medias de los mínimos cuadrados y los errores estándares de los rasgos de producción de leche

Genotipo	Rasgos de producción de leche					
	Rendimiento lechero (kg)	Grasa (%)	Grasa (kg)	Proteína (%)	Proteína (kg)	Duración del período de lactación
AA	364.84±13.25 ^a	3.96±0.18 ^a	15.27±0.88 ^a	3.60±0.06 ^a	14.11±1.05 ^a	130.71±6.17 ^a
AB	361.79±18.98 ^a	4.07±0.26 ^a	14.13±1.3 ^a	3.71±0.07 ^a	15.03±1.38 ^a	103.11±8.80 ^b

^{ab}Dentro de las mismas columnas valores con diferentes letras son significativamente diferentes a P < 0.05.

significativamente mayor que la del alelo B en todos los grupos. No se detectaron genotipos BB en los grupos 1/2 Simmental o 1/2 Angus. Schoenau *et al.* (2005) determinaron genotipos AA y AB con frecuencia alélica de 0.09 para B en vacas brasileñas Holstein que si no son negligible están en contraste con el presente estudio, lo que pudiera estar relacionado con la impureza de vacas brasileñas Holstein. Akis *et al.* (2010) al estudiar dos grupos formados por 50 cabezas de ganado del sur de Anatolia (SAR) y 50 de Ganado rojo del este de Anatolia (EAR) (*Bos indicus*) informaron que el alelo B tiene menor frecuencia que el alelo A. El genotipo BB se encontró solo en dos animales de la raza SAR y en uno de la raza EAR.

Los resultados de este estudio mostraron que no hubo asociaciones significativas entre los genotipos y el rendimiento lechero y la composición de la leche en vacas Najdi (tabla 2).

Pereira *et al.* (2003) observaron asociaciones significativas de los genotipos AA y AB con mayor producción de leche, comparados con el genotipo BB, también Schoenau *et al.* (2005) informaron que no hubo diferencia significativa en los genotipos AA y AB. En este estudio, los genotipos AA y AB fueron genotipos comunes en las vacas Najdi. Por tanto, no se pueden comparar con el genotipo BB para la producción de leche. La duración del período de lactación para las vacas con el genotipo AA fue más larga que la del genotipo AB (P < 0.05), este resultado es similar al de Schoenau *et al.* (2005) que mostró que los animales con el genotipo AA tuvieron un período de lactación significativamente mayor que los del genotipo AB (P < 0.05) e informaron que este resultado pudiera estar relacionado con la acción del IGF-I en la inhibición de la apoptosis celular en la glándula mamaria y el retraso de la involución de esta glándula, como consecuencia la duración del período de lactación se incrementará. En lo que respecta al polimorfismo IGF-IR, este está localizado en el intrón, y no se espera que se traduzca. Por tanto, la diferencia

entre la duración del período de lactación no está relacionada con el metabolismo que reata a la IGF-IR, y es poco probable que este polimorfismo se asocie con la acción del IGF que se expresa en otro cromosoma (cromosoma 5) u otros genes relacionados con la duración del período de lactación. Por tanto, es difícil concluir que hay un efecto directo de este polimorfismo en el rasgo duración del período de lactación. Parece que el alelo A del IGF-1R en *Bos taurus* descendió para ser fijo o al menos su polimorfismo no es detectable con este número de muestras. Consecuentemente, este polimorfismo no es útil en estudios sobre la identificación del locus de rasgo cuantitativo en *Bos taurus*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los departamentos de Ciencia Animal y Biotecnología de la Universidad de Tecnología Isfahan por proveer las instalaciones necesarias para llevar a cabo este trabajo. También queremos agradecer a la oficina de ayuda en asuntos ganaderos de Khuzestan por darnos su autorización para la recopilación de muestras de sangre.

Referencias

Akis, I., Oztabak K., Gonulalp, I. & Mengi, A.C. Un. 2010. IGF-1 and IGF-1R gene polymorphisms in East Anatolian Red and South Anatolian Red cattle breeds. *Russ. J. Genetics* 46:439

Baumrucker, C.R. & Erondy, N.E. 2000. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5:53

Blackesley, V.A., Scrimgeour, A., Esposito, D. & LeRoith, D. 1996. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: Does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:153

Bonakdar, E., Rahmani, H.R., Edriss, M.A. & Sayed Tabatabaei, B.E. 2010. IGF-I gene polymorphism, but not its blood concentration, is associated with milk fat and protein in Holstein dairy cows. *Genet. Mol. Res.* 9:1726

Curi, R.A., de Oliveira, H.N., Silveira, A.C. & Lopes, C.R. 2005. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene

- polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livest. Prod. Sci.* 94:159
- Edriss, M.A., Edriss, V. & Rahmani, H.R. 2009. Association of PIT-1 gene polymorphism with birth weight, milk and reproduction traits in Isfahan Holstein cows. *Arch Tierz* 52:445
- Grimber, A. & Cohen, P. 2000. Roles of insulin-like growth factors and to their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J. Cell Physiol.* 183:1
- Herbert, Y. & Rohan, T. 2000. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J. Nat. Cancer Inst.* 92:1472
- Hongyu, K., Wei, Z., Dan, L., Rongxing, S., Lihua, C., Huiqing, Y. & Xiaomin, L. 2003. The potential role of IGF-I receptor mRNA in rats with diabetic retinopathy. *Chinese Med. J.* 116:478
- Jones, J.I. & Clemmons, D.R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16:3
- Kawashima, Y., Kanzaki, S., Yang, F., Kinoshita, T., Hanaki, K., Nagaishi, J.I., Ohtsuka, Y., Hisatome, I., Ninomoya, H., Nanba, E., Fukushima, T. & Takahashi, S.I. 2005. Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:4679
- Lei, M., Peng, X., Zhou, M., Luo, Ch., Nie, Q. & Zhang, X. 2008. Polymorphisms of the IGF1R gene and their genetic effects on chicken early growth and carcass traits. *BMC Genetics.* 9:70
- Li, X., Yin, J., Li, D., Chen, X., Zang, J. & Zhou, X. 2006. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *J. Nutr.* 136:1786
- Lu, Y. 2009. Functional significance of genetic polymorphisms. *Front. Biol. China.* 4:266
- Mesquitam, F.S. 2003. Associação entre polimorfismos no gene do receptor de IGF-I e características produtivas em bovinos Brangus-Ibagé. 42f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleate cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215
- Moody, D.E., Pomp, D. & Barendse, W. 1996. Linkage mapping of the bovine insulin-like growth factor-1 receptor gene. *Mamm. Genome.* 7:168
- Pereira, M.F., Risso, J.M.R., Santos, P.S., Mundim, T.C.D., Capparelli, F.E., Franco, R.V.R., Queiroz, L.B., Silva, H.D., Benedetti, E. & Goulart, L.R. 2003. Análise do polimorfismo do gene IGF-1R sobre a produção de leite em bovinos da raça sintética Girolando. *Proceedings of the 498 Congresso Nacional de Genética, Aguas de Lindoia, S.P., Brasil,* p. 350
- Plath-Gabler, A., Gabler, C., Sinowatz, F., Berisha, B. & Schams, D. 2001. The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *J. Endocrinol.* 168:39
- SAS 2002. SAS/STAT® Software: Changes and enhancements thought. Release v.9.1.3. SAS Institute, Cary, NC, USA
- Schams D., Graf, F., Meyer, J., Graule, B., Mauthner, M. & Wollny, C. 1991. Changes of hormones, metabolites and milk after treatment with sometribove (recombinant methionyl bST) in Deutsches Fleck- and German Black and White cows. *J. Anim. Sci.* 69:1583
- Schoenau, W., Porciuncula, P.M., Zamberlan, G., Mesquita, F.S., Vieira, V., Oliveira, J.F.C. & Gonçalves, P.B.D. 2005. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 44, Número 4, 2010.* Association between IGF-IR gene polymorphisms and productive and reproductive traits in Holstein cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57:772
- Schofield, P. N., Ed. 1992. *The insulin-like growth factors: Structure and biological functions.* Oxford University Press, New York
- Yang-Feng, T.L., Ullrich, A. & Francke, U. 1985. Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B- cell leukemia. *Science* 228:728
- Yazdani, H., Rahmani, H.R., Edris, M.A. & Dirandeh, E. 2010. Association between A59V polymorphism in exon 3 of leptin gene and reproduction traits in cows of Iranian Holstein. *Afr. J. Biotechnol.* 9:5997

Recibido: 23 de febrero de 2010