

POLIMORFISMO DEL GEN DRB3.2 EN BOVINOS
CRIOLLOS DEL URUGUAY
GENE DRB3.2 POLYMORPHISM IN URUGUAYAN CREOLE CATTLE

Kelly, L.¹, P. Nicolini¹, M. D'Angelo¹, A. Nimo¹, G. Rincón¹, J. Piaggio² y A. Postiglioni¹

¹Lab. de Análisis Genéticos de Animales Domésticos. Área Genética. Facultad de Veterinaria. Lasplacas 1550. CP 11600. Montevideo, Uruguay. Email: gokelly@adinet.com.uy

²Dpto. de Bioestadística. Facultad de Veterinaria. Lasplacas 1550. CP 11600. Montevideo, Uruguay.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

BoLA. Marcadores genéticos.

ADDITIONAL KEYWORDS

BoLA. Genetic markers.

RESUMEN

Se estudió la variabilidad alélica del 2° exón del gen DRB3 (DRB3.2) del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Bovino (BoLA) en una muestra poblacional de 51 bovinos Criollos del Uruguay (BCU) y se comparó con el bovino Criollo Argentino (BCA). Se utilizó la técnica de PCR (semianidado)-RFLP (*RsaI*, *BstYI*, *HaeIII*), detectándose 22 alelos. El test de equilibrio génico y el F_{IS} (-0,006) resultaron no significativos. Doce alelos resultaron comunes a BCU y BCA, siendo el 15 y 18 los más frecuentes. El test exacto de Fisher resultó significativo para 13 alelos al evaluar las diferencias en las frecuencias génicas entre las dos poblaciones. El Índice de Heterocigosidad esperado (H_e), fue mayor para la población de BCU ($H_e= 0,911$) frente a BCA ($H_e= 0,888$). Se concluye que la población de BCU presenta un gran polimorfismo del gen DRB3.2, presentando características propias que lo diferenciarían de la población de BCA.

SUMMARY

The allelic variability on 2nd exon DRB3 gene (Bovine Major Histocompatibility Complex; BoLA) was studied in a sample of 51 Uruguayan Creole

Cattle (UCC). The results were compared with data from Argentinean Creole Cattle (ACC). The PCR(hemi-nested)-RFLP (*RsaI*, *BstYI* and *HaeIII*) was carried out and 22 alleles were detected. Hardy-Weinberg equilibrium test and F_{IS} (-0,006) were not significant. Twelve alleles were shared between UCC and ACC populations, being alleles 15 and 18 the most frequent ones. Fisher test was used to evaluate inter-population frequencies. A significant level was found in 13 alleles frequencies. The expected heterozygosity value (H_e) of UCC (0.911) was higher than in ACC ($H_e= 0.888$). This UCC sample presented a high degree of genetic variation in DRB3.2 gene, and differed from ACC.

INTRODUCCIÓN

Los bovinos Criollos del Uruguay forman parte de una reserva genética perteneciente al SE.PA.E (Servicios de Parque del Ejército). Se encuentra ubicada en el Fortín de San Miguel en la costa sureste del país. Desde su fundación en el 1945 esta población se ha mantenido aislada, sometida princi-

palmente a la acción de la selección natural (Postiglioni *et al.*, 1998a).

El BoLA juega un papel esencial en la respuesta inmune a agentes extraños. Se han descrito tres clases de genes: I, II y III, estando el gen DRB3 en la clase II. Este gen es muy polimórfico, detectándose en el exón 2 más de 63 alelos con la técnica de PCR-RFLP (Davies *et al.*, 1996). Nuestro objetivo es estudiar el gen DRB3.2 en BCU, con el fin de analizar su polimorfismo y compararlo con los datos descritos para el BCA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 51 muestras de ADN genómico seleccionadas al azar de un banco genómico de 166 BCU. Se tipificó el gen DRB3.2 por PCR (semianidado)-RFLP (van Eijk *et al.*, 1992). La amplificación se realizó en dos etapas, con los cebadores HLA030 (5' - A T C C T C T C T C T G C A G C A C A T T T C C - 3') y HLA031 (5' - T T T A A A T T C G C G C T C A C C T C G C C G C T - 3') (1ª etapa) y HLA30 y HLA32 (5' - T C G C C G C T G C A C A G T G A A A C T C T C - 3') (2ª etapa). La 1ª reacción se realizó con 2 µl (20 ng) de ADN en 23 µl de mezcla de: tampón de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂), 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y 1U de *Taq* polimerasa (Gibco) y su perfil térmico fue: desnaturalización a 94°C por 4 min, 10 ciclos de 1 min a 60°C y 1 min a 72°C, con una extensión final a 72°C por 5 min. Para la 2ª amplificación se utilizaron 2 µl del 1º amplificado y 48 µl de la mezcla ya descrita y su perfil térmico fue: 25 ciclos de 1 min a 94°C y 30 seg

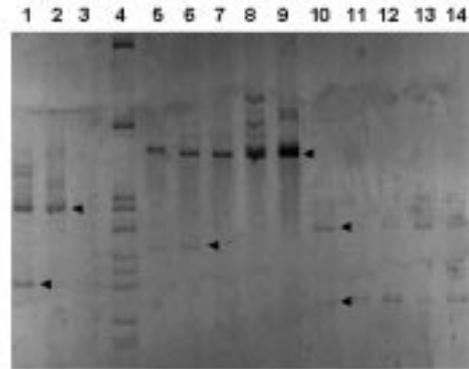


Figura 1. Electroforesis del gen DRB3.2 en BCU cortado con *RsaI* (1-2), *BstYI* (5-9) y *HaeIII* (10-14). (4) Marcador de peso molecular pBR322 cortado con *MspI*. (Electrophoresis of DRB3.2 gene in BCU digested with *RsaI* (1-2), *BstYI* (5-9) and *HaeIII*. (4) Weight marker pBR322 digested with *MspI*).

a 65°C, con una extensión final a 72°C por 5 min. Se dirigió a 37°C con 2,5 UI de *RsaI* y *HaeIII*, y a 60°C con 5 UI de *BstYI*. Los fragmentos se separaron en geles de poliacrilamida (8 p.100) y se tiñieron con Plata (Promega Q4132) (**figura 1**). La lectura de los alelos se realizó según la nomenclatura del 5th BoLA workshop (www2.ri.bbsrc.ac.uk/bola/dr3pcr.htm).

Para BCU se estimaron las frecuencias alélicas del DRB3.2 y el He. El valor F_{IS} (Weir y Cockerham, 1984) y el desvío del equilibrio de Hardy-Weinberg se calcularon mediante el test exacto del programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995), aplicando el método de cadena de Markov (Guo y Thompson, 1992). Para BCA se calculó el He según las frecuencias génicas descritas por Giovambattista *et al.* (1996). Las diferencias entre las frecuencias génicas de BCU y BCA se

POLIMORFISMO DEL GEN DRB3.2 EN BOVINOS CRIOLLOS DEL URUGUAY

Tabla I. Frecuencias génicas del locus DRB3.2 en bovinos Criollos uruguayos (BCU) y argentinos (BCA). (Gene frequencies of DRB3.2 locus in Uruguayan and Argentinean Creole cattle).

Patrón	Alelo	Frecuencias génicas en BCA*	Frecuencias génicas en BCU	TF
aaa	1	0,011	0,010	NS
bba	2	0	0,029	0,009
bbb	3	0,003	0,118	0,000
rcc	5	0,053	0	0,020
daa	6	0,003	0	NS
ecc	7	0	0,010	NS
faa	8	0,018	0,039	NS
fda	9	0	0,039	0,002
fba	10	0,026	0,059	NS
gea	11	0,020	0,019	NS
haa	12	0,008	0	NS
hba	13	0,013	0,010	NS
hbb	14	0	0,019	0,043
iba	15	0,226	0,108	0,008
jbd	16	0,045	0,167	0,000
lbf	18	0,146	0,147	NS
lbb	20	0,102	0,019	0,005
lbe	21	0,013	0	NS
mba	22	0,037	0	0,049
nba	23	0,031	0	NS
nbb	24	0,120	0,069	NS
oaa	25	0,008	0	NS
oab	26	0,003	0	NS
obf	27	0,081	0,019	0,027
obb	28	0,035	0	0,049
qcc	30	0	0,010	NS
ibf	31	0	0,029	0,009
cbb	35	0	0,010	NS
lba	36	0	0,049	0,000
kbi	44	0	0,010	NS
yba	53	0	0,010	NS

*Giovambattista *et al.*, 1996.

TF: Test exacto de Fisher: Valor de la probabilidad.
NS: no significativo, nivel de significación $\alpha=0,05$.

En **negrita** los alelos más frecuentes.

analizaron mediante el test exacto de Fisher ($\alpha=0,05$) (Intercooled Stata, 6.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la muestra de BCU estudiada se detectaron 22 de los alelos para el gen DRB3.2, lo que indicaría la existencia de una gran variabilidad genética en esta población. Estos datos confirman resultados anteriores obtenidos para otros marcadores genéticos (Postiglioni *et al.*, 1998b; Rincón *et al.*, 2000). El test del equilibrio Hardy-Weinberg fue no significativo ($\chi^2=5,2$) y el valor de F_{IS} fue -0,006. Lo que indica, un déficit de heterocigotas no significativo.

La **tabla I** muestra las frecuencias génicas calculadas para BCU y las del BCA (Giovambattista *et al.*, 1996). Si bien ambas poblaciones presentan 12 alelos en común, cada una de ellas tiene varios alelos no compartidos con la otra (10 en BCU y 9 en BCA). Trece alelos del total para las dos poblaciones, muestran diferencias significativas en sus frecuencias. Cinco de ellos son alelos compartidos, entre los que se encuentran varios de los más frecuentes (DRB3.2*03, 15, 16 y 20), mientras que de los 8 restantes, 5 están presentes sólo en BCU (DRB3.2*02, 09, 14, 31 y 36) y 3 sólo en BCA (DRB3.2*05, 22 y 28). El gran número de alelos compartidos por BCU y BCA reflejaría su origen común a partir del bovino Ibérico introducido en la región, pero la existencia de varios alelos propios a cada población determinaría diferencias entre ellas. Esta divergencia es resultado, probablemente, del efecto fundador ocurrido durante la formación de estas reservas, debido a que el

BCU está constituido por una única población proveniente de bovinos del sureste de Uruguay, mientras que el BCA está dividido en subpoblaciones aisladas provenientes del norte Argentino y de Entre Ríos.

El polimorfismo del gen en BCA sería menor, debido a que presenta menor número de alelos y un menor Índice H_e ($BCU=0,911$; $BCA=0,888$).

Concluimos, entonces, que la población de BCU presenta un gran polimorfismo del gen DRB3.2, presen-

tando características propias que lo diferenciarían de la población de BCA. Consideramos, por ello, de gran importancia el mantenimiento de esta reserva única de BCU como un patrimonio genético del Uruguay

AGRADECIMIENTOS

A: Dr. Guillermo Giovambattista; Dr. Atilio Aranguren y a la Sra. Iris Hernández.

BIBLIOGRAFÍA

- Davies, C.J., L. Andersson, S.A. Ellis, E.J. Hensen, H.A. Lewin, S. Mico, N.E. Muggli-Cockett and J.J. van der Poel. 1996. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996 report of the ISAG BoLA nomenclature Committee. *Anim. Genet.*, 28: 159-168.
- Giovambattista, G., C.D. Golijow, F.N. Dulout and M.M. Lojo. 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim. Genet.*, 27: 55-56.
- Guo, S.W. and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Postiglioni, A., L. Kelly y G. Rincón. 1998a. Las vacas de Hernandarias. *Posdata*, 210: 64-66.
- Postiglioni, A., G. Rincón y L. Kelly. 1998b. Caracterización genética de los bovinos Criollos del Uruguay. II Estudio de su variación genética. *Arch. Zootec.*, 47: 225-231.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hred.*, 86: 248-249.
- Rincón, G., M. D'Angelo, R. Gagliardi, L. Kelly, S. Llambí and A. Postiglioni. 2000. Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD's and microsatellites markers. *Research in Veterinary Science*, 69: 171-174.
- Van Eijk, M.J., J.A. Stewart-Haynes and H.A. Lewin. 1992. Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.*, 23: 483-496.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

Recibido: 15-5-01. Aceptado: 28-6-02.

Archivos de zootecnia vol. 52, núm. 197, p. 80.