

CARACTERIZACIÓN DEL GEN SLA-DQB EN EL CERDO PELÓN DE YUCATÁN MÉXICO

CHARACTERIZATION OF SLA-DQB GEN IN THE HAIR-LESS PIG IN YUCATAN MEXICO

V. Cen¹, A. Sierra^{1*}, R. Alonso², R. Zamora¹, J. Ortiz¹, A. Reyes¹

¹Instituto Tecnológico de Conkal (ITC). Km. 16.3 Antigua carretera Mérida-Motul. Conkal, Yucatán (México). ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. México. *sivaac2003@yahoo.com.mx

Palabras clave:

Polimorfismo
Endonucleasas
Resistencia a enfermedades

Keywords:

Polymorphism
Endonucleases
Disease resistance

Abstract

The major histocompatibility complex in swine leukocyte antigen known as, and is an important genetic region that influences disease resistance, level of polymorphism is associated with the host's immune capacity. The pig hair-less Yucatan is a local genotype that originated with pigs introduced during the conquest, and is believed to possess an innate resistance to disease. We analyzed the DQB gene polymorphism in the leukocyte antigens in Yucatan hairless pigs. DQB gene was amplified from 30 pigs and digested with two restriction enzymes HaeIII and RSAL. Were cloned and analyzed the sequences in ten pigs of different municipalities. HaeIII sites were detected: 84, 167, 168, 171, 190, 191, 201, 202, 219 and 220, generating five alleles of which three were new. With RSAL four sites were identified: 27, 111, 141 and 142, generating four alleles, of which two were new. It can be concluded that the local pig DQB gene Yucatan expressed a certain level of polymorphism, and information technologies were cloning by PCR (reaction polymerase chain) and enzymatic sequencing. You should continue the study using more samples

Resumen

El complejo mayor de histocompatibilidad en el cerdo se conoce como antígeno leucocitario, y es una región genética importante que tiene influencia en la resistencia a enfermedades, su nivel de polimorfismo se asocia a la capacidad inmune del hospedero. El cerdo pelón de Yucatán es un genotipo local que se originó con los cerdos introducidos durante la conquista, y se cree que posee una resistencia innata ante las enfermedades.

Se analizó el polimorfismo en el gen DQB de los antígenos leucocitarios en el cerdo pelón de Yucatán. Se amplificó el gen DQB de 30 cerdos y se digirieron con dos enzimas de restricción HaeIII y RsaI. Se clonaron y analizaron sus secuencias en diez cerdos de diferentes municipios. Los sitios detectados con HaeIII fueron: 84, 167, 168, 171, 190, 191, 201, 202, 219 y 220; generándose cinco alelos de los que tres fueron nuevos. Con RsaI se detectaron cuatro sitios: 27, 111, 141 y 142, generándose cuatro alelos, de los que dos fueron nuevos. Se puede concluir que el gen DQB del cerdo local de Yucatán manifestó un cierto nivel de polimorfismo, y las tecnologías más informativas fueron la clonación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación enzimática. Se recomienda continuar con el estudio utilizando mayor número de muestras..

Introducción

El cerdo pelón mexicano es un biotipo poco estudiado y valorado se encuentra en el país desde hace más de cuatro siglos, , representa un recurso de variabilidad genética importante, y se cree que es resistente a enfermedades, sin embargo no se cuentan con estudios suficientes que avalen dicho argumento (Lemus *et al.*, 2001). Es importante saber que la respuesta inmune está controlada en muchos casos, por genes que pertenecen a un grupo conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad, y en el cerdo es conocido como Antígenos Leucocitarios en Cerdo (SLA), este complejo es una región genética importante que tiene influencia en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas. La organización genómica de la región de los antígenos leucocitarios en cerdos es similar a la de los humanos y bovinos, en la clase II y III y clase I, respectivamente. Los *loci* de clase II codifican moléculas polimórficas que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígeno y constan de dos cadenas proteínicas, denominadas alfa y beta (Abbas, 2008). Cabe mencionar que las secuencias polimórficas de las moléculas se ubican alrededor de los segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$, inclusive entre ambos, pero se ha demostrado mayor polimorfismo en el segmento $\beta 1$. De los genes clase II solo

se reporta el SLA-DR y el SLA-DQ, quienes se han expresado a nivel de proteína (Lunney *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1992). En el cerdo y ser humano normalmente se expresan grandes cantidades de moléculas CMH clase II en el endotelio vascular renal y en los glomérulos, un hecho importante en el rechazo de trasplante renal (Tizard, 2002). Hasta la fecha existe la interrogante porque el cerdo local de Yucatán es resistente a enfermedades parasitarias e infecciosas.. En el presente trabajo se realizó un estudio preliminar del polimorfismo en el gen *DQB* de los Antígenos Leucocitarios en cerdos locales de Yucatán.

Material y métodos

El estudio abarcó 12 granjas ubicadas en diferentes municipios del estado de Yucatán (Cansahcab, Maní, Mérida-Periférico Oriente, Mérida-Dzununcan, Mérida-Xmatcuil, Motul, Peto, Sucilá, Tetiz, Timucuy, Tzacacab y Umán. Se utilizaron 30 muestras de ADN genómico de cerdos locales, que cumplieron con el estándar racial propuesto por Lemus y Alonso (2005), Para amplificar el ADN obtenido, se utilizó los iniciadores reportados por Fang *et al.* (2005), el *SLA-DQB* sentido (5' CGGAATTCCCCGCAGAGGATTTTCGTGTACC 3') y el *SLA-DQB* antisentido (5' CCGTCGTGCCTTCCTCTAT 3'), mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con un tamaño de producto esperado de 273 pares de bases (pb) que formó parte del intrón 1 y el exón 2. Se utilizaron dos enzimas de restricción para digerir los productos de PCR del gen *DQB*, la *HaeIII* y la *RsaI* con sitios de corte GG'CC y GT'AC, respectivamente. Se visualizaron los fragmentos obtenidos en geles de poliacrilamida (12%), teñidos con un kit de Nitrato de Plata, Silver Stain Plus. Las secuencias obtenidas se clonaron y se ligaron al vector de clonación pJET1.2, el cual se utilizó para transformar bacterias de *E. coli*. Finalmente se realizó una PCR con los iniciadores del gen *DQB* y después con los del vector de clonación para verificar si el crecimiento de colonias habían sido recombinantes, para llevar a cabo su secuenciación.

Resultados y discusión

Con la enzima *HaeIII* se encontraron dos sitios polimórficos con fragmentos de 84, 104 y 167 pb, los de menor tamaño no fueron visibles en geles de poliacrilamina (12%), de los que se generaron cuatro haplotipos AA, AB, AC y AD (Figura 1). Estos sitios de 84, 167, 190 y 219 pb correspondieron a los cerdos que provinieron de los municipios de Timucuy, Tetiz, Cansahcab y Súcila. Mientras que los de 167, 190, 201 y 219 pb fueron de cerdos que llegaron de la comunidad de Motul. Ambos sitios coinciden con los reportados por Shia *et al.* (1995) en los alelos D y F, respectivamente en un estudio realizado con diez razas de cerdos, donde el alelo D se encontró en las razas: Yorkshire, Hampshire, Duroc y Berkshire; y el F, en Yorkshire, Landrace, Duroc, Chester White, Berkshire y Poland China (Figura 2). Por su parte con la enzima *RsaI* se identificaron tres fragmentos de 84, 132 y 140 pb en dos haplotipos AA y AB. Como resultado de la clonación se detectaron cinco alelos con secuencias palindrómicas GG'CC (*HaeIII*), y cuatro con GT'AC (*RsaI*). . Los alelos C y G encontrados con la enzima *RsaI* también los reportan Fang *et al.* (2005) en razas de cerdos chinos y en dos especies de jabalí. En el presente trabajo se encontraron cinco alelos no reportados para el gen *DQB* a los que se les denominó X₁, X₂, X₃, Y₁, y Y₂., en los cerdos de los municipios de Mérida-Dzununcan (X₁ y Y₁), Umán (X₂ y Y₂) y Maní (X₃)..

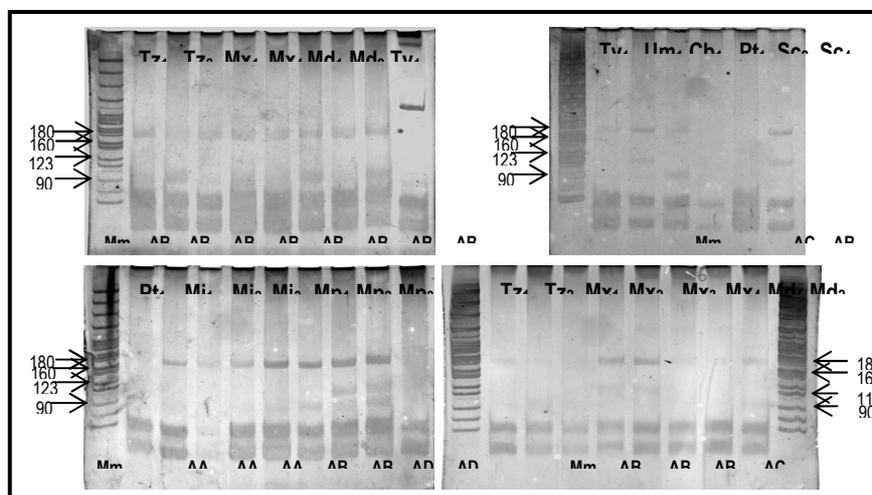


Figura 1. Haplotipos obtenidos con la enzima *HaeIII* en el gen *DQB* (*Haplotypes obtained with the enzyme HaeIII in the DQB gene*)

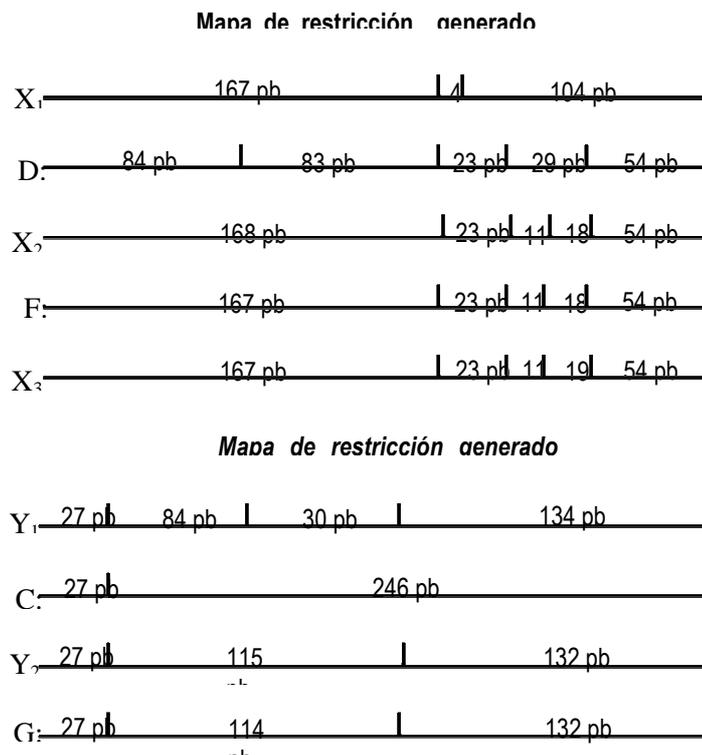


Figura 2. Mapas que ilustran los alelos encontrados en el gen DQB al ubicar las secuencias dianas de las enzimas de restricción HaeIII y RsaI (*Maps showing the alleles found in the DQB gene by placing the target sequences of restriction enzymes HaeIII and RsaI*)

Conclusiones

Se puede concluir que el gen DQB del cerdo local de Yucatán manifestó un cierto nivel de polimorfismo, y las tecnologías más informativas fueron la clonación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación enzimática. Se recomienda continuar con el estudio utilizando mayor número de muestras.

Bibliografía

- Abbas k. A., Lichtman A. H., Pillali S. (2008). Inmunología celular y molecular. 6^a edición. Elsevier. Barcelona España.
- Fang M., Braunschweig M., Hu X., Hu L., Feng J., Li N., Wu C. (2005) Genetic variation of exon 2 of SLA – DQB gene in Chinese pigs. *Biochemical Genetics*, Vol. 43:120.
- Hirsh F., Germa S., Gustafsson K., Pratt K., Sachs D.H., Leguern C. (1992). Structure and expression of class II genes in miniature swine. *Immunology*. 149: 841- 846.
- Lemus F. C., Ulloa A. R., Ramos K. M., Estrada F.J., Alonso, R. A. 2001. Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *J. Anim. Sci.* 79:1-6.
- Lemus F.C., y Alonso S. M. 2005. El cerdo pelón mexicano y otros cerdos criollos. 1^a. Edición. Editorial Universitaria. Universidad Autónoma de Nayarit.
- Lunney J. K. and Butler J. E. (1998). The Genetics of the Pig. Immunogenetics. Cap. 7. Edited by M.F. Rothschild M.F., Ruvinsky. Cabinternational.
- Shia, Y. C., Bradshaw, M., Rutherford, M. S., Lewin, H. A and Schook, L. B. (1995). Polymerase chain reaction based genotyping for characterization of SLA – DQB and SLA- DBR alleles in domestic pig. *Animal Genetic*. 26: 91-100.
- Tizard Ian R., Ph. D., B. Sc., B. V.M.S. (2002). Inmunología veterinaria. Mc Graw Hill Interamericana Editores, S. A de C. V. México, D.F.