



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA SUBREGIÓN IIA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD OVINO (OVAR MHC), EN LAS RAZAS CRIOLLO CHILOTE Y SUFFOLK DOWN.

Eric Andrés Hernández Zúñiga

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

PROFESOR GUÍA: DR. VÍCTOR MARTÍNEZ MONCADA

Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2015



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA SUBREGIÓN DE LA CLASE IIA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD OVINO (OVAR MHC), EN LAS RAZAS CRIOLLO CHILOTE Y SUFFOLK DOWN.

Eric Andrés Hernández Zúñiga

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : VÍCTOR MARTÍNEZ M.
PROFESOR CONSEJERO: EDUARDO KESSI C.
PROFESOR CONSEJERO: PATRICIO PÉREZ M.

SANTIAGO, CHILE

2015

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Quiero agradecer profundamente el constante e impagable apoyo de mi madre Ruth, quien fue la que impulso el desarrollo más importante, el personal, su coraje y su espíritu de superación durante toda su vida, inclusive en los momentos más difíciles en los cuales era complicado el recibir ayuda, me inspiró a ser esta persona, me inspiró a esforzarme y cumplir los sueños con entusiasmo y arduo trabajo.

A mi hermano Mauricio que también me apoyó y compartimos la Música hasta el día de hoy. También, a la hermosa familia que tengo, quienes me animaron en los momentos más difíciles y se alegraron con los logros... pequeños, pero logros al fin y al cabo.

Deseo expresar mi agradecimiento especial al Dr. Víctor Martínez por su guía durante este proceso y otorgarme una excelente oportunidad para mi desarrollo profesional en un sector innovador de la acuicultura de Chile.

También quiero agradecer a Moni, por su apoyo y enseñanzas en el laboratorio y de la vida. Por supuesto a las personas que me han apoyado siempre desde el laboratorio de FAVET-INBIOGEN.

Finalmente a todas aquellas personas y amigos con las que nos hemos encontrado en el camino y que hemos sido parte del desarrollo mutuo como personas, momentos inolvidables de alegría, pena, música y esparcimiento

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio poblacional, utilizando los marcadores intergénicos tipo SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) DQA2/DQB1, DQB2/DQA2 y BTNL2-C6orf10, ubicados en la subregión IIa del Complejo Principal de Histocompatibilidad ovino (*Ovar*-MHC), en las poblaciones ovinas presentes en el archipiélago de Chiloé, en particular la Criollo Chilota (OCH) y Suffolk Down (SD). El genotipado fue realizado por medio de PCR alelo específico en tiempo real (ASqPCR) y análisis de curvas de fusión en alta resolución con cambio de Tm de los partidores (HRM Tm-shift primers). No se observó diferencias significativas al comparar las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En la población OCH sólo DQA2/DQB1 se desvió del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) por deficiencia de heterocigotos (valor de $P < 0,05$), mientras que en SD todos estuvieron bajo EHW (valor de $P > 0,05$). En ambas poblaciones hubo LD entre DQA2/DQB1 y DQB2/DQA2 ($r^2 = 0,3778$, $r^2 = 0,5589$, valor de $P = 0,000$ y $0,0008$; respectivamente), observándose diferentes patrones haplotípicos entre las poblaciones. Los resultados sugieren, en conjunto con la literatura, una asociación no aleatoria entre los *loci* DQA2/DQB1 y DQB2/DQA2 relacionados con los genes de la cadena alfa y beta de la glicoproteína DQ presentadora de antígenos a los linfocitos T cooperadoras ($CD4^+$). Lo cual sienta las bases para realizar estudios evolutivos a mayor escala acerca de los patrones haplotípicos que se han establecido en las distintas razas de ovinos.

Palabras clave: Complejo Principal de Histocompatibilidad, variabilidad genética, desequilibrio de ligamiento, haplotipo, equilibrio de Hardy-Weinberg.

ABSTRACT

The aim of this work was to perform a population study using intergenic Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers DQA2/DQB1, DQB2/DQA2 and BTNL2/C6orf10 in the IIa sub-region of the ovine Major Histocompatibility Complex (*Ovar*-MHC), in Criollo Chilota (OCH) and Suffolk Down (SD) from Chiloé archipelago populations. Genotyping was performed by allele-specific real time PCR (ASqPCR) and High Resolution Melting analysis with Tm-shift primers methods. No significant differences when comparing the allelic frequencies was observed between populations. In OCH population, the DQA2 / DQB1 *locus* was deviated from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), due heterozygote deficiency (P value <0.05), whereas in SD all markers were under HWE (P value > 0.05). In both populations there were LD between DQA2 / DQB1 and DQB2 / DQA2 ($r^2 = 0.3778$, $r^2 = 0.5589$, P-value = 0.000 and 0.0008, respectively), showing different haplotype patterns among populations. The results suggest, together with literature, nonrandom association between DQA2/DQB1 and DQB2/DQA2 *loci*, that are related to alpha and beta chain genes of DQ glycoprotein which has the function of presenting antigens to helper T cells (CD4⁺). Which lays the foundation for evolutionary studies on a larger scale about the haplotype patterns that have been established in different sheep populations.

Keywords: Ovine Major Histocompatibility Complex, genetic variability, linkage disequilibrium, haplotype, Hardy-Weimberg equilibrium.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la genética de poblaciones entrega información acerca de la variabilidad, así como de las fuerzas que cambian la composición genética de las poblaciones animales (o humanas). Esto tiene gran importancia, debido a que la variabilidad genética cambia a consecuencia de procesos selectivos como el balance entre el flujo de genes entre distintas poblaciones, mutaciones y deriva génica (cambios aleatorios en las frecuencias alélicas y genotípicas). En particular, la presión de selección también se debe a la emergencia de patógenos, depredadores y cambios ambientales (originados por desastres naturales o por obra del ser humano) (Sommer, 2005). Por otra parte, ciertas poblaciones animales han sido sometidas a selección artificial (domesticación) durante largos periodos de tiempo, generando de esta forma los atributos específicos de cada raza. Este tipo de selección, si no es bien llevada a cabo, y no es realizada por medio de métodos de cruzamiento que disminuyan la consanguinidad entre los candidatos, conlleva a una disminución progresiva de la variabilidad genética, provocando en el largo plazo la disminución en la adecuación biológica (reproductivo y sobrevivencia) de las poblaciones.

El conocimiento de la variabilidad genética puede entregar un diagnóstico poblacional que permite orientar las decisiones que se tomen a futuro en la aplicación de programas de mejoramiento genético animal y de programas de conservación de recursos genéticos (Ujvari y Belov, 2011).

Una de las aproximaciones para medir el nivel de variabilidad genética de una población, está orientada hacia las regiones genómicas que tienen importancia funcional en la homeostasis de los organismos. Entre ellas, se encuentra el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), el cual juega un rol clave en el funcionamiento del sistema inmune, al participar en el reconocimiento antigénico, vigilancia e interacción patógeno-hospedero. Durante décadas esta región ha sido objeto de estudios de variabilidad y de asociación con la resistencia y susceptibilidad a enfermedades en humanos y animales, utilizando marcadores moleculares (secuencias conocidas del DNA que permiten diferenciar a los individuos de una población) como los polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) y microsatélites (repeticiones simples en tándem). Además, distintos estudios han focalizado los análisis en su rol evolutivo, ya que permite medir, de forma indirecta, la adaptación inmunológica de las poblaciones (Sommer, 2005; Ujvari y Belov, 2011).

En la especie ovina (*Ovis aries*), también se han realizado varias investigaciones acerca de la variabilidad genética y el rol de la región del MHC (*Ovar-MHC*), especialmente la subregión IIa, en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades (Buitkamp *et al.*, 1994; Keane *et al.*, 2007; Zhou y Hickford, 2004; Lee, 2009), ya que contiene a los genes que codifican para las glicoproteínas que participan en la presentación de antígenos derivados de proteínas exógenas a los receptores de los linfocitos T cooperadores (CD4+), los cuales liberarán citosinas, desencadenando la activación de las vías de señalización para la producción de anticuerpos antígeno-específico. Sin embargo, hasta la fecha han sido pocos los estudios que han dilucidado qué genes son responsables de dichas características, debido al fenómeno de desequilibrio de ligamiento (asociación no aleatoria entre dos o más *loci*), por lo que se requiere un mapeo más fino de las regiones genómicas que son candidatas para poder establecer dichas conclusiones (Dukkipati *et al.*, 2006).

En Chile, no se han realizado este tipo de estudios de variabilidad genética en ovinos, en circunstancias que existen recursos propios del país como lo es el Ovino Criollo Chilote (OCH) y otras razas como la Suffolk Down, las cuales se han ido adaptando a las distintas condiciones ambientales y de manejo. Es por ello, que este estudio se enfocará en la determinación de la variabilidad genética en los *loci* DQA2/DQB1, DQB2/DQA2 y BTNL2-C6orf10 en la subregión IIa del Complejo Principal de Histocompatibilidad ovino (*Ovar-MHC*) de las razas Criollo Chilote y Suffolk Down, con el objetivo, de contribuir al conocimiento acerca de la genética poblacional en esta región genómica asociada con la respuesta inmune adaptativa en ovinos, que tienen distinto origen geográfico y racial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología y Genómica Animal (FAVET-INBIOGEN) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Individuos y número de muestra

Este estudio se realizó con un total de 48 animales, los que pertenecen a la especie *Ovis aries*. Los ejemplares son representantes de la población de ovinos Criollos Chilotes ($n=32$) y Suffolk Down ($n=16$) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Butalcura. Las muestras fueron obtenidas a partir de la extracción de sangre desde la vena yugular que se dispusieron en tubos de ensayo de 10 mL con anticoagulante EDTA-K3 y fueron almacenadas a -20°C . Estas muestras están disponibles en el biobanco de FAVET-INBIOGEN.

Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó desde las muestras de sangre previamente obtenidas, para ello se utilizó el kit comercial "Blood" (Macherey Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA aislado fue suspendido en la solución tampón TE (10 mM Tris , 1 mM EDTA) y mantenido a 4°C . La determinación de la concentración del material genético se basó en la medición de la absorbancia de la muestra a 260 nm con un espectrofotómetro de tecnología nano (Biotek[®]).

Genotipado

Se desarrolló un conjunto de marcadores del tipo SNP (DQA2/DQB1, DQB2/DQA2 y BTNL2-C6orf10), los cuales se ubican en la subregión IIa del *Ovar* MHC. Estos marcadores se encuentran en regiones no codificantes y la distancia entre los marcadores se puede ver en la Figura Nro. 1.

Para el genotipado del marcador DQA1/DQB2 se utilizó el análisis de curvas de fusión en alta resolución (HRM), el cual se basa en la caracterización de las formas que presentan las curvas de denaturación de cada genotipo según el tamaño del amplicón, su composición nucleotídica y del polimorfismo contenido en la secuencia amplificada. Para el diseño de los partidores para este análisis, se consideró el método descrito por Wang *et al.* (2005), el cual se realiza por medio del análisis de HRM con partidores alelo específico

(AS) con cola de GC de distinto tamaño (6 bp y 14bp), lo que resulta en distintas temperaturas de fusión (T_m), obteniendo diferentes curvas para cada genotipo. Tras la obtención de las T_m s y el nivel de fluorescencia de cada curva, se empleó un análisis de grupos (*cluster*) con el algoritmo *k*-means, implementado en el programa de análisis estadístico R (R Development Core Team, 2005). Se consideró como criterio de agrupación un umbral de derivada de la fluorescencia sobre la temperatura que fuese mayor a 0,1. Este algoritmo, realiza una partición de las observaciones en un número fijo de grupos y calcula centros (centroide) para cada uno, posteriormente asigna las observaciones que se encuentran cercanas al centro del grupo de forma iterativa hasta lograr una correcta asignación de cada valor en un grupo.

Para los marcadores DQB2/DQA2 y BTNL2-C6orf10 se utilizó el método descrito por Wu *et al.*, 2005, el cual se basa en el cálculo del ΔC_t . Esta técnica requiere el diseño de partidores AS y tras el PCR en tiempo real (ASqPCR) se calcula la diferencia entre el C_t (ciclo umbral) del partidor con el alelo específico 1 y C_t del partidor con el alelo específico 2 (C_t AS1 – C_t AS2). Para establecer los puntos de corte de los ΔC_t que permitan la asignación de cada genotipo, se calculó la adición de un C_t al mayor valor de ΔC_t obtenido ($\Delta C_{t(\text{mayor})} + 1$) para los individuos homocigotos AS1, mientras que para los individuos homocigoto 2 se restó 1 C_t al menor valor de ΔC_t obtenido ($\Delta C_{t(\text{menor})} - 1$). Finalmente, para los individuos heterocigotos los puntos de corte inferior y superior se calcularon entre $\Delta C_{t(\text{mayor})} + 1$ y $\Delta C_{t(\text{menor})} - 1$, respectivamente.

El diseño de los partidores para los marcadores descritos anteriormente se realizó en el laboratorio FAVET-INBIOGEN, proceso que consideró la obtención de las secuencias que contienen los marcadores a través del buscador Nucleotide del sitio web National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2013), utilizando los números de acceso al GenBank descritos en la Tabla Nro 1. Posteriormente se diseñaron varios juegos de partidores AS para los tres marcadores con la ayuda del programa BatchPrimer3 (<http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>). La calidad de todos los partidores se optimizó *in silico*, utilizando el programa NetPrimer, en el cual se analizó la formación de estructuras secundarias (horquillas, hetero y homo dímeros) y temperatura de hibridación (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>). Además se realizó un alineamiento para asegurar de que generen sólo un producto de PCR a lo largo de todo el genoma del ovino, esto fue resuelto con la aplicación BLAST

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

PCR

La amplificación de las regiones que contienen a los tres marcadores, se realizó en un equipo de PCR en tiempo real de marca Illumina[®]. Los experimentos se efectuaron en duplicado, utilizando el kit KAPA[™] HRM FAST PCR con el siguiente protocolo: 1X Mastermix, 2 mM MgCl₂, 0,2 μM de cada partidor y 10 ng totales de DNA de cada individuo en un volumen final de 10μl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- Para el marcador DQA1/DQB2 el PCR fue llevado a cabo con 3 minutos de activación a 94°C, luego 40 ciclos a 95°C por 5 segundos, 30 segundos de hibridación de partidores. Una vez terminados los 40 ciclos se aumentó la temperatura a 94°C por 30 segundos, disminuyéndola posteriormente a 60°C, comenzando el análisis de la curva de denaturación, subiendo la temperatura gradualmente desde 60°C a 94°C de 0,1°C/medición.

- Para los marcadores DQB2/DQA2 y BTNL2/C6orf10 se realizó con 3 min de activación a 94° C, luego 40 ciclos a 95° C por 5 segundos y 30 segundos de hibridación de partidores. Además, se utilizó el protocolo llamado "Touchdown", el cual modifica la temperatura de hibridación de los partidores en diez grados celsius por sobre el partidor con mayor T_m, disminuyendo paulatinamente 0,8°C/ciclo hasta llegar a la T_m óptima de los partidores.

Determinación de la variabilidad genética.

A partir de los genotipos identificados en cada población, se calculó la frecuencia alélica de cada *locus*, el número de heterocigotos versus homocigotos, la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e). Además, se determinó si los *loci* analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (Falconer y Mackay, 1996), por medio del método de cadenas de Markov (Guo y Thompson, 1992). Los valores de estos estimadores fueron obtenidos mediante el programa estadístico GENEPOP versión 4.0 disponible en la web (Raymond y Rousset, 1995).

Por otra parte, se utilizó la prueba de proporciones en dos muestras independientes, para probar si existen diferencias entre las proporciones alélicas de los marcadores en ambas poblaciones:

$H_0: p_1 = p_2$; $H_1: p_1 \neq p_2$

$$Z_{prueba} = \frac{\frac{x_1}{n_1} - \frac{x_2}{n_2}}{\sqrt{p(1-p)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} ; \quad p = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2}$$

Donde:

p : Proporción muestral

x_1 : Número de aciertos en la muestra 1

x_2 : Número de aciertos en la muestra 2

n_1 : Número de observaciones de la muestra 1

n_2 : Número de observaciones de la muestra 2

La reconstrucción y la estimación de las frecuencias haplotípicas de ambas poblaciones (no emparentados), se realizó por medio del software desarrollado por Solé, *et al.* (2006) llamado SNPsats. Una vez obtenidos los haplotipos, se calcularon las co-variaciones alélicas por medio del desequilibrio de ligamiento (LD), estimado por los parámetros D' y r^2 . El primero, describe el nivel de desequilibrio de ligamiento de forma estandarizada y el segundo la correlación alélica entre distintos *loci*.

RESULTADOS

Genotipado

Para este estudio se diseñaron y optimizaron 3 juegos de partidores descritos en la Tabla Nro. 1. Para el marcador DQA1/DQB2, las condiciones de PCR se modificaron de forma tal que permitiera la discriminación y la ecualización de la señales de fluorescencia para cada genotipo. Las curvas de HRM se pueden visualizar en la Figura Nro. 2. Para los individuos homocigotos 1 (G/G) la T_m varió entre 79,1 - 80,2° C, mientras que para los homocigotos del alelo 2 (A/A) se observó una variación de 74,7 – 76,9° C. Finalmente, para los individuos heterocigotos (A/G) se pueden apreciar 2 picos en el nivel de fluorescencia, cada uno semejante al perfil de su respectivo alelo. El primero tiene un rango de variación entre 75,3 - 76,8° C, mientras que el mayor manifiesta una variación

entre 79,4 - 80,2° C. Al realizar el estudio de grupos para asignar cada genotipo, se pudo observar que existen 3 grupos claramente definidos (Figura Nro.3).

Tabla Nro. 1. Nombre, número de acceso al Genbank, secuencia y temperatura de fusión los partidores utilizados en el estudio.

Nombre	Nº de acceso al Genbank	Secuencia del partidor	Temperatura de fusión (°C)
DQB2/DQA2	GQ131508	F1: TACAGGGACTGGCTTTGGAG	56,6
		F2: TACAGGGACTGGCTTTGGAA	56,8
		RC: CTGACAGCAGCAAGAGTGAG	55,7
DQA2/DQB1	GQ131509	FC: ATATTGGAGGCACTGTGGGCAA	59,2
		R1: GCGGGCAGGGCGGC TAGATTTGGTATGTATTT C	66,1
		R2: GCGGGC TAGATTTGGTATGTATTT T	55,5
BTNL2/C6orf10	GQ131515	FC: GAGAGAGGGCTGGTTTGTAGAA	56,2
		R1: TGCCTAAGTGATGGAGAGTTT C	54,7
		R2: TGCCTAAGTGATGGAGAGTTT T	54,3

En el caso de DQB2/DQA2 y BTNL2/C6orf10. Los ΔC_t promedio y los puntos de corte para asignar cada individuo a un genotipo para cada marcador están descritos en la Tabla Nro. 2. Al graficar la distribución del valor de ΔC_t de cada individuo, se observan 3 grupos claramente definidos correspondientes a cada genotipo (Figura Nro. 4 y 5).

Tabla Nro. 2. ΔCt promedio y puntos de corte para los marcadores DQB2/DQA2 y BTNL2/c6orf10 de acuerdo a sus respectivos genotipos.

<i>Locus</i>	Genotipo	ΔCt promedio	Punto de corte del ΔCt
DQB2/DQA2	Homocigoto G/G	-12,89	$\Delta Ct \leq -10,34$
	Heterocigoto G/C	0,14	$-1,48 \geq \Delta Ct \leq 1,54$
	Homocigoto C/C	15,34	$\Delta Ct \geq 10,62$
BTNL2/C6orf10	Homocigoto G/G	-17,06	$\Delta Ct \leq -13,52$
	Heterocigoto A/G	-1,73	$-1,48 \geq \Delta Ct \leq 1,50$
	Homocigoto A/A	9,35	$\Delta Ct \geq 7,29$

Estudio poblacional

Las frecuencias alélicas de las poblaciones OCH y SD están descritas en la Tabla Nro. 3. La estructura genética de ambas poblaciones se muestra en la Tabla Nro. 4, la cual presenta la heterocigocidad observada y esperada, así como el test de Equilibrio de Hardy-Weinberg (H_0 = las frecuencias alélicas se mantienen de generación en generación debido a apareamiento al azar). Se observó que el marcador DQB2/DQA2 en la población OCH se desvía del EHW, debido a la deficiencia de heterocigotos ($P < 0,05$). Los marcadores DQA2/DQB1 y BTNL2/c6orf10 se encontraron en EHW. En la población SD, los tres marcadores se encontraron en EHW.

Tabla Nro.3. Frecuencias alélicas de los 3 marcadores provenientes de las poblaciones de ovinos OCH y SD.

<i>Locus</i>	Población OCH		Población SD	
	Frecuencia alélica AS1	Frecuencia alélica AS2	Frecuencia alélica AS1	Frecuencia alélica AS2
DQB2/DQA2	G (0,625)	C (0,375)	G (0,53)	C (0,47)
DQA2/DQB1	A (0,67)	G (0,33)	A (0,59)	G (0,41)
BTNL2/c6orf10	A (0,39)	G (0,61)	A (0,78)	G (0,22)

Tabla Nro. 4. Número de Homocigotos y Heterocigotos, H_o =Heterocigosidad observada, H_e = Heterocigosidad y test de equilibrio de Hardy-Weinberg (H_o = Existe apareamiento al azar en la población, por lo que se mantienen las frecuencias génicas y, por ende, las frecuencias genotípicas a través de las generaciones) de los 3 marcadores provenientes de las poblaciones de ovinos OCH y SD.

Locus	Población OCH					Población SD				
	Nº de Homocigotos	Nº de Heterocigotos	H_o	H_e	EWB	Nº de Homocigotos	Nº de Heterocigotos	H_o	H_e	EWB
DQB2/DQA2	26	6	0,18	0,48	3×10^{-4} *	9	7	0,43	0,51	0,45
DQA2/DQB1	22	11	0,34	0,44	0,10	9	7	0,43	0,49	0,50
BTNL2/c6orf10	18	15	0,46	0,49	0,46	11	5	0,31	0,35	0,56

Valor de $P < 0,05$. Se rechaza la hipótesis nula.

En relación a las proporciones de los alelos de cada marcador en las poblaciones estudiadas, se realizó la comparación utilizando la prueba de proporciones en dos muestras independientes, con un nivel de significancia del 5% (2,5% por tratarse de una prueba de Z de dos colas), en el cual se obtuvo el valor de Z para los marcadores DQB2/DQA2, DQA1/DQB2 y BTNL2/C6orf10 (0,54, -0,44 y 1,75; respectivamente), los que se encontraron fuera de la zona de rechazo ($Z=-1,96$ a $1,96$), por lo que no se rechaza la hipótesis nula (las proporciones de cada marcador son semejantes en ambas poblaciones). Por otro lado, al comparar las proporciones de los alelos en OCH con respecto a la raza Rylington Merino estudiada por Lee *et al.* (2012), se pudo observar que los *loci* DQB2/DQA2 y DQA1/DQB2 difieren significativamente las frecuencias alélicas (4,39 y -4,34; respectivamente), mientras que para BTNL2/C6orf10 no existe diferencia significativa (0,62) entre ambas poblaciones.

Haplotipos

La reconstrucción y las frecuencias haplotípicas estimadas en OCH, SD y también de Rylington Merino (RM) se presentan en la Tabla Nro. 5. Se observan 8 patrones y distintas frecuencias de los haplotipos presentes en las razas OCH, SD y RM, por ejemplo, GAG fue más frecuente en OCH (0,37) seguido por SD (0,149) y con una menor

representación en RM (0,079), mientras GAA fue mayor en SD (0,347) y OCH mostró una frecuencia similar a RM (0,188 y 0,171; respectivamente); CGA también fue más frecuentes en SD (0,333), luego sigue RM (0,235) y por último OCH (0,116). En el caso de CGG la raza OCH y RM tuvieron frecuencias similares (0,162 y 0,158; respectivamente), mientras que en SD este haplotipo presenta baja frecuencia (0,037) Por otro lado, los haplotipos que tuvieron menor representación fueron para OCH, SD y RM (CAG), los demás haplotipos no están representados en la población RM, en OCH no está presente el haplotipo GGA y en SD no se encuentra representado el haplotipo GGG.

Tabla Nro. 5. Frecuencias haplotípicas estimadas en las poblaciones SD, OCH Y RM.

	DQB2/DQA2	DQA1/DQB2	BTNL2/C6orf10	SD	OCH	RM
1	G	A	G	0,149	0,371	0,079
2	G	A	A	0,347	0,188	0,171
3	C	G	A	0,333	0,116	0,235
4	C	G	G	0,037	0,162	0,158
5	C	A	A	0,065	0,085	-
6	C	A	G	0,031	0,026	0,052
7	G	G	G	NA	0,049	-
8	G	G	A	0,034	NA	-

Desequilibrio de Ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (LD) en OCH y SD calculado con los parámetros D' , r^2 y las probabilidades están descritos en la Tabla Nro. 6 y 7. En ambas poblaciones el valor del LD fue significativo entre los marcadores DQB2/DQA2 - DQA1/DQB2 ($r^2= 0,3778$, $r^2= 0,5589$, valor de $P = 0,000$ y $0,0008$; respectivamente).

Tabla Nro. 6. Estimación del grado de desequilibrio de ligamiento por medio de los estadísticos D' , r^2 y valores de P en las población OCH.

Locus	DQB2/DQA2 (0 kbp)	DQA1/DQB2 (27 kbp)	BTNL2/C6orf10 (300 kbp)
		0,6807 ⁺	0,242 ⁺
DQB2/DQA2 (0 kbp)	-	0,3778 ⁺⁺	0,0548 ⁺⁺
		0,0000 ⁺⁺⁺	0,0609 ⁺⁺⁺
			0,0368 ⁺
DQA1/DQB2 (27 kbp)	-	-	0,00103 ⁺⁺
			0,7971 ⁺⁺⁺
BTNL2/C6orf10 BTNL2/Corf(300 kbp)	-	-	-

+ = valores de D' ; ++ = valores de estimados para r^2 ; +++ = valores de P (color rojo indica $P < 0,05$)

Tabla Nro. 7. Estimación del grado de desequilibrio de ligamiento por medio de los estadísticos D' , r^2 y valores de P en las población SD.

Locus/	DQB2/DQA2 (0 kbp)	DQA1/DQB2 (27 kbp)	BTNL2/C6orf10 (300 kbp)
		0,8455 ⁺	0,32296 ⁺
DQB2/DQA2 (0 kbp)	-	0,5589 ⁺⁺	0,02608 ⁺⁺
		0,0008 ⁺⁺⁺	0,38439 ⁺⁺⁺
			0,56337 ⁺
DQA1/DQB2 (27 kbp)	-	-	0,0622 ⁺⁺
			0,3359 ⁺⁺⁺
BTNL2/C6orf10 (300 kbp)	-	-	-

+ = D' ; ++ = r^2 ; +++ = P-values (color rojo indica $P < 0,05$)

DISCUSIÓN

Los métodos para el genotipado de marcadores moleculares utilizadas en este estudio (AS-HRM y ASqPCR), se han descrito en la literatura para distintos contextos y con resultados favorables, obteniendo una tasa de asignación >98%, con un nivel de precisión >99,9% (Wang *et al.* 2005) para AS HRM con cambio de T_m, para ASqPCR se describe una alta precisión corroborado con el genotipado vía espectrometría de masas MALDI-TOF (Wu *et al.* 2005). Ambos métodos son de bajo costo cuando se compara a otros como las sondas TaqMan®, siendo su implementación relativamente fácil. En este trabajo, se logró implementar con algunas dificultades, principalmente, debido a la complejidad de las secuencias nucleotídicas que se encuentran en el MHC ovino, el cual es altamente polimórfico (Lee *et al.* 2012). Para ilustrar este hecho, en la Figura Nro. 6, se puede observar que la secuencia obtenida de 571 pb que contiene a BTNL2/C6orf10 derivada de la raza Rylington Merino tiene al menos 14 SNPs, lo mismo sucedió con los marcadores DQB2/DQA2 y DQA1/DQB2 (6 SNPs/600 pb y 10 SNPs/605 pb, respectivamente), lo que limitó y obstaculizó el diseño de partidores y no permitió poder realizar comparaciones de tasas de asignación y precisión entre ambos métodos para el mismo marcador. En las razas OCH y SD se observó que, con el método de HRM con cambio de T_m, un rango de variación en la temperatura de fusión de cada genotipo debido a la existencia de un SNP adicional dentro de la secuencia amplificada, manifestándose en el cambio de la T_m del producto de PCR mayor a 1° C, evidenciado por los perfiles de curva de los 3 genotipos del SNP adicional.

En relación a la utilización de la metodología del ΔC_t descrita por Wu *et al.* (2005), se pudo observar que para los marcadores DQB2/DQA2 y BTNL2/C6orf10 solo 42% y 54,1% necesitó ser genotipado por esta técnica, respectivamente. Esto se debe a la incorporación del protocolo “touchdown”, el cual disminuye la posibilidad de error en la hibridación de los partidores. Lo anterior se traduce en dos resultados 1) sólo el alelo correspondiente al genotipo del individuo se amplifica o 2) que haya ocurrido un error en la hibridación, sin embargo, la diferencia entre ambas amplificaciones es suficiente para discriminar cada genotipo. En este estudio se observó una diferencia mínima de 300 y 2000 veces en el número de copias para DQB2/DQA2 (>2⁹) y BTNL2/C6orf10 (>2¹¹), respectivamente.

Al realizar el análisis poblacional, comparando las frecuencias alélicas entre OCH y SD, se observó que estas no difieren significativamente, al utilizar la prueba de Z ($P >$

0,05). Sin embargo, al ser analizados con el test de EHW para el *locus* DQA1/DQB2, existe una diferencia en ambas poblaciones, manifestado por el desvío de EHW en la OCH, debido a un déficit de heterocigotos. En el trabajo realizado por Lee *et al.* (2012), mostró que a diferencia de OCH en la raza Rylington Merino estos tres *loci* se encontraban en EHW.

La reconstrucción y estimación de las frecuencias haplotípicas, mostraron que ambas poblaciones y RM del estudio de Lee *et al.* (2012) presentaban distintas frecuencias para los 8 patrones haplotípicos inferidos por el algoritmo EM (Tabla Nro. 7). Esta diferencia significativa entre poblaciones se podría explicar por el distinto origen de las razas, lo que caracteriza a cada población, que depende del tamaño efectivo poblacional, procesos de domesticación y a su vez, en un contexto inmunológico, a los genes que han sido seleccionados para la adaptación de los individuos a las distintas clases de patógenos (Sommer, 2005).

El desequilibrio de ligamiento que se observó en ambas poblaciones fue significativo entre los marcadores DQB2/DQA2 - DQA1/DQB2, lo cual también fue descrito en el trabajo de Lee *et al.* (2012). Este par de *loci* se encuentran en regiones intergénicas con una distancia de 27 kpb dentro de la subregión IIa del *Ovar*-MHC y los resultados obtenidos entre estos dos marcadores en estas tres razas podrían ser indicativos de que existe una asociación entre ellos y los genes que tienen como función codificar para las cadenas alfa y beta de las moléculas DQ de MHC clase II, cuya función es la presentación de antígenos a los linfocito T cooperadores (CD+4).

CONCLUSIÓN

En este estudio se pudo implementar con éxito dos métodos de genotipado ASqPCR y HRM con cambio de Tm de los partidores, además se logró validar los marcadores DQA2/DQB1, DQB2/DQA2 y BTNL2-C6orf10 que se encuentran en la subregión IIa del MHC ovino en las razas Criollo Chilote y Suffolk Down, revelando que, junto con la raza Rylington Merino, existe una asociación no aleatoria entre el primer y segundo marcador, lo que puede ser indicativo de que los haplotipos para la cadena alfa y beta del gen DQ segregan en conjunto.

Para realizar un completo análisis de la variabilidad genética en estas dos razas, es necesario utilizar una mayor cantidad de marcadores, los cuales deben ser validados. Además, se puede generar una mayor cantidad de estos, secuenciando esta región

genómica en ambas razas, lo que aumentaría la cantidad de información acerca del MHC ovino que puede contribuir al conocimiento de cómo ha evolucionado este complejo génico en las distintas razas bajo diferentes condiciones ambientales y de domesticación.

BIBLIOGRAFÍA

- BUITKAMP, J.; GOSTOMSKI, D.; SCHWAIGER, F.; STEAR, M.; EPPLER, J.** 1994. Association between the ovine major histocompatibility complex DRB1 gene and resistance to *Ostertagia circumcincta* infestation. *Animal Genetics* 25: 59-60.
- DUKKIPATI, V.; BLAIR, H.; GARRICK, D.; MURRAY, A.** 2006. "Ovar-Mhc" – Ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to disease. *New Zealand Veterinary Journal* 54(4): 153-160.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C.** 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th ed. Longman, Harrow, Essex, UK. 5-10 pp.
- GUO, S; THOMPSON, E.** 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- KEANE, O; DODDS, K; CRAWFORD, A; MCEWAN, J.** 2007. Transcriptional profiling of *Ovis aries* identifies *Ovar-DQA1* allele frequency differences between nematode-resistant and susceptible selection lines. *Physiological Genomics* 30(3)253-261.
- LEE, C.** 2009. Characterization of the Ovine Major Histocompatibility Complex class II region. Thesis for degree of Doctor of Philosophy. Perth, Australia. Curtin University of Technology. School of Biomedical Sciences. 186 pp.
- LEE, C.; QIN, J.; MUNYARD, K.; SUBRAMANIAM, N.; WETHERALL, J.; STEAR, M.; GROTH, D.** 2012. Conserved haplotype blocks within the sheep MHC and low SNP heterozygosity in the Class IIa subregion. *Animal Genetics* 43: 429-437 pp.
- NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION).** 2013. Basic Local Alignment Search Tool. [En línea] < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> > [consulta: 20-05-2012].
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F.** 1995. GENEPOP (version 4.0): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM.** 2005. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

- SOLÉ, X; GUINÓ, E; VALLS, J; INIESTA, R; MORENO, V.** 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22(15): 1928-1929 pp.
- SOMMER, S.** 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* 2:16 doi:10.1186/1742-9994-2-16
- UJVARI, B; BELOV, K.** 2011. Major Histocompatibility Complex (MHC) markers in conservation biology. *International Journal of Molecular Science* 12: 5168-5186
- WANG, J; CHUANG, K; AHLUWALIA, M; PATEL, S; UMBLAS, N; MIREL, D; HIGUCHI, R; GERMER, S.** 2005. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with T_m-shift primers. *Biotechniques* 39:885-93 pp.
- WU, W; TSAI, H; PANG, J; WANG, H; HONG, H; LEE, Y.** 2005. Touchdown thermocycling program enables a robust single nucleotide polymorphism typing method based on allele-specific real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 339(2): 290-6.
- ZHOU, H; HICKFORD, J.** 2004. Allelic polymorphism in the ovine DQA1 gene. *Journal of Animal Science* 82: 8–16.

ANEXOS

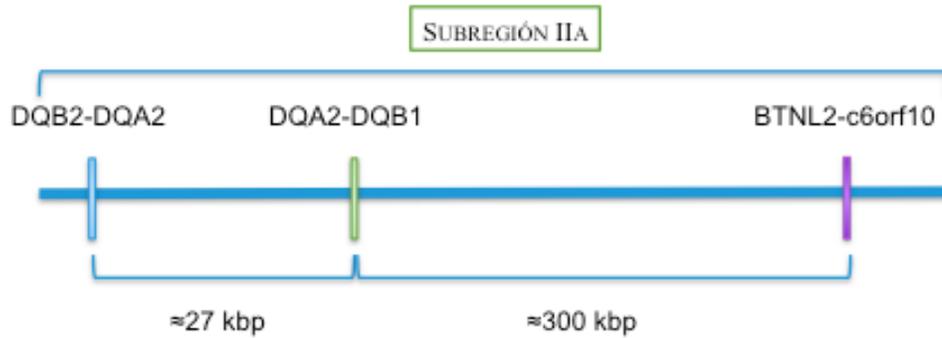


Figura Nro. 1. Distancia entre marcadores DQB2/DQA2, DQA1/DQB2 y BTNL2/C6orf10 en la subregión IIa del Complejo Principal de Histocompatibilidad ovino.

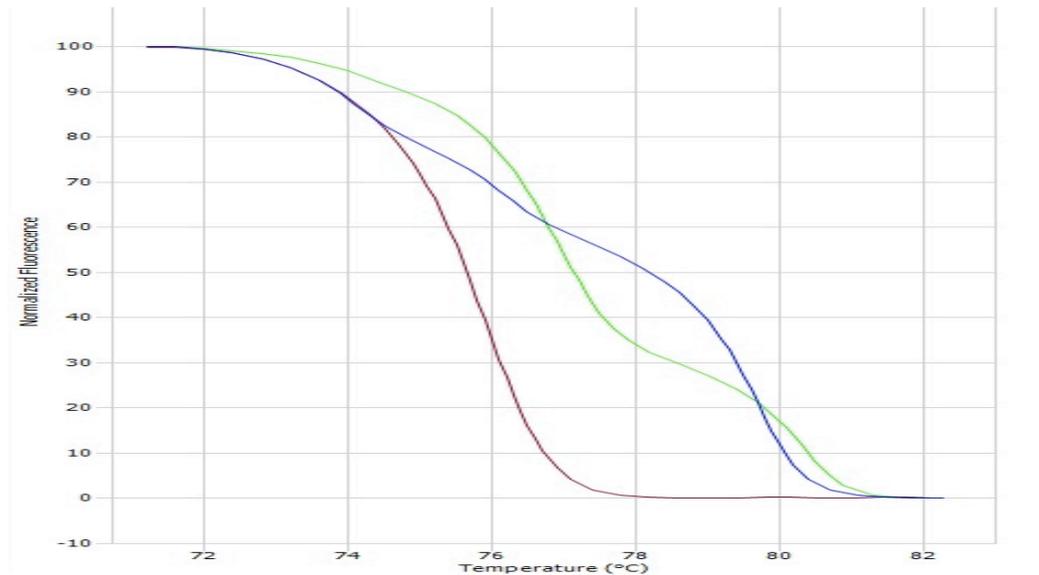


Figura Nro. 2. Curvas de HRM para el marcador DQA1/DQB2 1) Color rojo indica que los individuos pertenecen al genotipo A/A 2) Color verde corresponde a individuos con doble pico, los cuales son heterocigotos G/A y 3) El color azul indica a los individuos homocigotos para el alelo G/G.

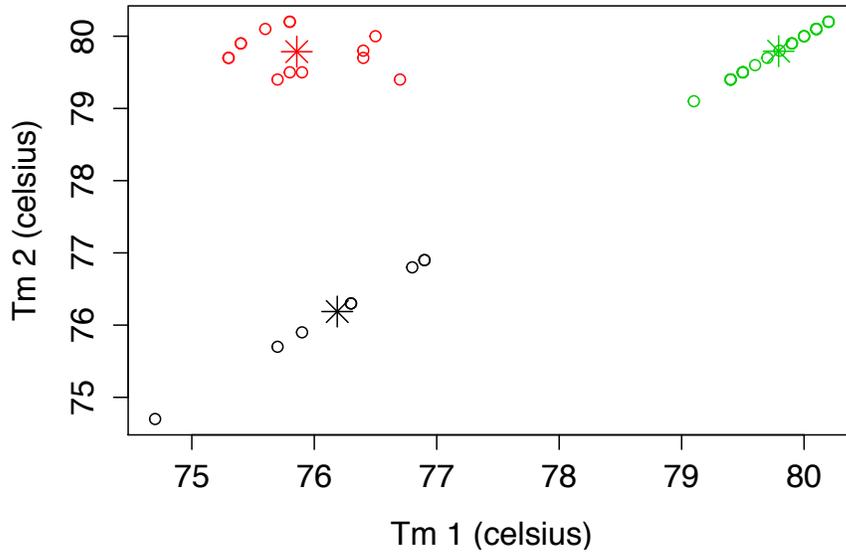


Figura Nro. 3 Análisis de grupos realizado con el algoritmo *k-means*. El color verde equivale al genotipo (G/G); rojo = (A/G); negro = (A/A). Los asteriscos muestran el centro de cada grupo (centroide) con su correspondiente color.

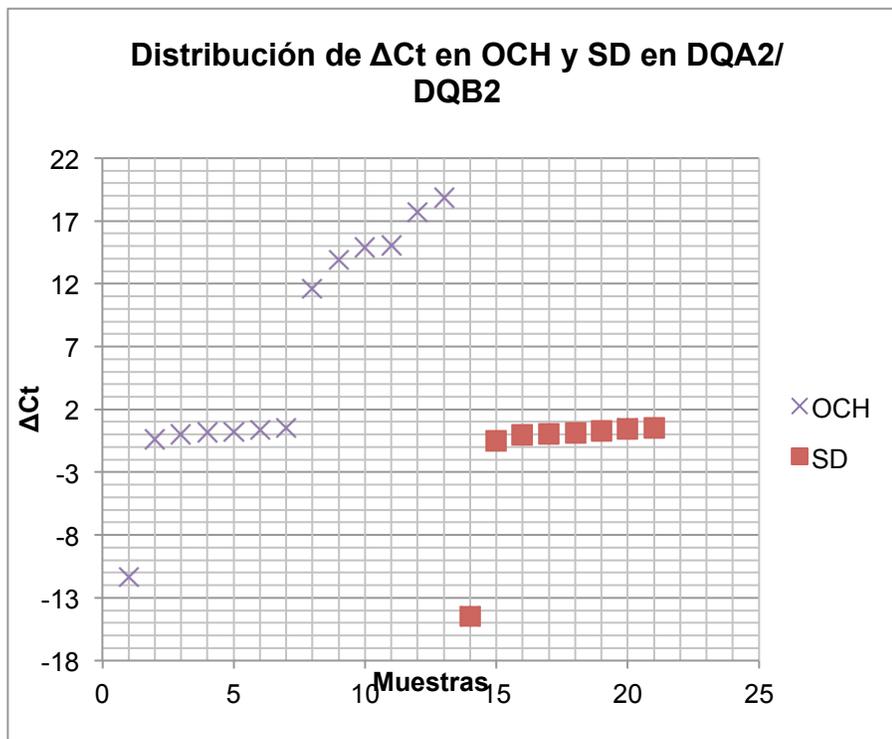


Figura Nro. 4. Distribución de los valores de ΔC_t en OCH y SD para el marcador DQA2/DQB2.

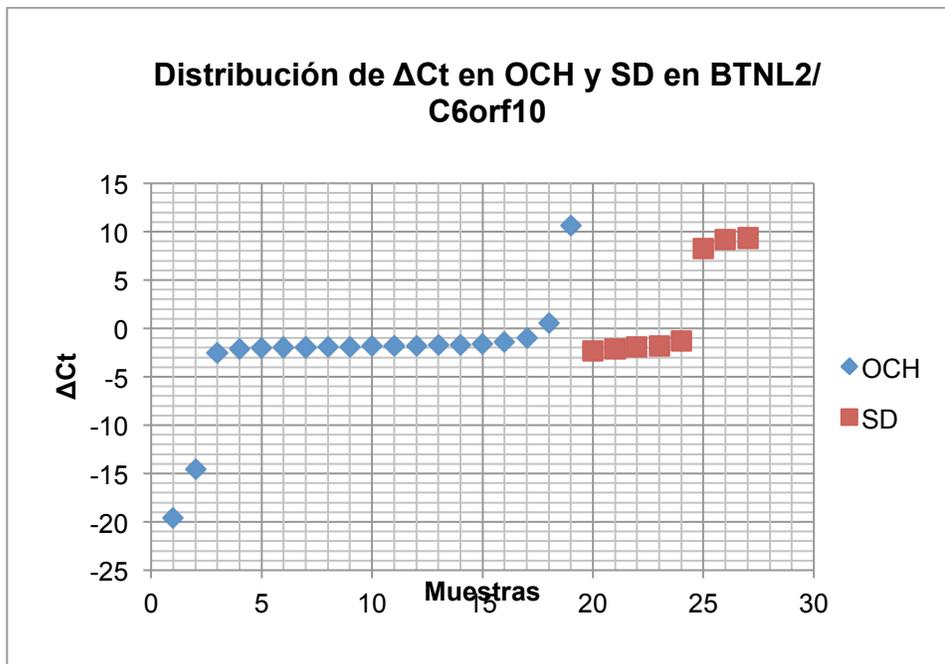


Figura Nro. 5. Distribución de los valores de ΔCt en OCH y SD para el marcador BTNL2/C6orf10.

>gi|239912245|gb|GQ131508.1| Ovis aries MHC class IIa region between DQB2 and DQA2 genomic sequence

```
1 CAAGTTCCTG TTCTCTCCST GGCYTACAGG GACTGGCTTT GGASTGGCTT TCTGTGCTGC
61 TTTKTAGTTG TCTGCCAGAG CTCACTCTTG CTGCTGTCA R GAGTGCWCAC AGGGAGCTGA
121 CTACAGTGTG GAGCGTGCAT GGGTGAGGTG CATGACTGT TAGGAGTGCC TGGGCTAGTT
181 GACGGGATTC AATGATGAGG CCTCCCCAGT GGATTGTTAG TAGACTTCTT GAGGAATCTG
241 TGCCTTTTTT AGATCTTCTT AGCGTTCTAT CTACCACATT ACCAGCCTCA TCCCACCCCA
301 GTTATGTAGC TCATGACATA GTACTCTGGA TAGGGTAAGA GAGAAACGAA TCTCTTCGGC
361 AGTTTCCTGC ACAGTTGAGG AAGACAGATG TTCCCTCACA AGTTCTCACT TTCCCTCCA
421 GGATAATTCA TGGGTTGAGA AGGTCCTTCC TGGCACCAAT CTGTGCTGCC TTGGGGAGGA
481 GTGAGGTCTT CCTCCTACTC TTTCCAATGT GTCCAAATTA TATTTCTTTG CTCCAGTGAT
541 GTCCTGAAG TTATCCACTG GAAAGTTAGA CTCCACAAA GTGTTTAAAA TTGTTCTCCA
```

>gi|239912246|gb|GQ131509.1| Ovis aries MHC class IIa region between DQA2 and DQB1 genomic sequence

```
1 TAGTTTCTTC ATTCTGTA YA TTAACCTCTT TGTTACCTC TTGGTCCACT GGCAAGCGAT
61 GGCAA YCATA GTCAAATTTT ATAAAATCT TACTGTGTC R TTTTGCAGAA GCATTTCTCT
121 TCCAGGAATC AGGACATCTA AATTGGGAGA ACCCAAR TTT ATAGGAACAG TTAGCATTAA
181 TTCCACAAC T AAGTTTCATA GTAAGAGGAG TCACTC MGT C TTGTTTACA TCCTTAGTTT
241 GAGACTGATA TCACATCTTA GAGGAS AGTG TCCTCCAGTC AACAM TGTTC AATCATTCTA
301 YTGGGTAGAT ACATCTTTAT AATGGGCCAT GTTGCCAAT GCTTTTACCC CTTTGTTCTT
361 AAATGGGTTC TGTGATCTGA GGCAACTACTG TGGCTGAGTA TTATGCCAAT AAATATGATG
421 TATCATGAAT CCTTGGATGG TAATAATATT GGAGGCACTG TGGGCAAAAA TAGTGAACCC
481 ATATG YRAAA TACATACCAA ATCTAGGAAG GAAAAATCAC TTACCTACCA AGGTGGAAGG
541 TTTTGATATA GTTAGTCTGC TGCCAATTA CTTGATCTTC CCAACGAATG ATGCTATATT
601 AAAAGTTCAG TGTCATTCTC TATTTTTGGT ATGTT
```

>gi|239912252|gb|GQ131515.1| Ovis aries MHC class IIa region between BTNL2 and C6orf10 genomic sequence

```
1 AGTGTCTG GTGAGAAGTC CTTACCCAG ASAGACACGA ACAGACAATA CTGGGAGGTA
61 GAAGTAAAAA CRAGGACAGA AGCTGGATCT GCAACTCGAT GCGTTCTGGG CATTGCTCA
121 GAGACAGCGA AGAGAGAGGG CTGGTTTGTG GAARCTCCAG KAAGAATTT TTGGGTTTTG
181 GKACAYGAGG AAGGAAAAGT CATAWTTCCC AACTCCCAGR AAAACTCTCC ATCACTTAGG
241 CAGCAGCCCC ACAGGATAGG AGTTTTCTG GACTGGR AAG CTGGGAACCT GTCCTTTAT
301 AACATGGCCC ACGGTCCCA CATCTATTCT TTYACTGGCA TCACCTTCTG TGGGACCCTT
361 TTYCCTTATT TTAGCCTTCG GGGTACTGGC GCATCTTGA CCATCTGCTC AACTTCAGAT
421 CACCCTGAGA ATTGTCCTGA TTCTTCTCYA AAGACCTCTC TAACTCATTT AAGTAGTTGT
481 GATAAAGTG TCCCCAAGA AGCTAACTCT CTGTTATAAG AAGTGAATGT CAGCWCTCC
541 RCTGCCTCTG CTCAGGCTTC TYACAGGTAT G
```

Figura Nro. 6. Descripción y número de acceso al GenBank de secuencias que contienen a los marcadores DQB2/DQA2, DQA1/DQB2 y BTNL2/C6orf10 en la Subregión IIa de Ovar-MHC. Se pueden apreciar, destacadas en amarillo, las variaciones en la secuencias en código ambiguo IUPAC