

Secuencia parcial de un fragmento de ADN de patos silvestres homólogo al complejo mayor de histocompatibilidad de *Gallus gallus*

Partial sequence of a DNA fragment from wild ducks homologous to the *Gallus gallus* major histocompatibility complex

Sofía González-Guzmán^a, Elizabeth Loza-Rubio^b, Virginia León-Régagnon^c, Gary García-Espinosa^a

RESUMEN

En el presente trabajo se amplificó por PCR un fragmento de nucleótidos de ADN genómico de pato doméstico (*Anas platyrhynchos domesticus*) que compartió un 93 % de similitud con un fragmento del MHC clase II de pollo (*Gallus gallus*), que correspondió a una secuencia similar a DAB1 (Disabled 1). La secuencia DAB1 también fue amplificada en nueve especies de patos silvestres del género *Anas* que posterior a un análisis por el polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (PLFR) con las enzimas Rsa I, Bsr I y Hind III, se observó que la especie *Anas americana*, *Anas platyrhynchos diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus* fueron sutilmente diferentes a la especie *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas streptera* y *Anas clypeata*. Se considera que ésta es la primera notificación que indica la presencia de secuencias similares a DAB1 en patos silvestres.

PALABRAS CLAVE: Complejo principal de histocompatibilidad clase I y II, DAB1, Patos.

ABSTRACT

In this study, a genomic DNA fragment from domestic duck (*Anas domesticus*) was amplified by PCR. Such fragment shared 93 % identity to the chicken (*Gallus gallus*) MHC class II, which correspond to DAB1- (Disabled 1)-like sequence. The DAB1 sequence was also amplified from nine wild duck species of the *Anas* genus, which after performing a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using the RsaI, BsrI, and HindIII enzymes, showed subtle differences when the *Anas americana*, *Anas platyrhynchos diazi*, and *Anas platyrhynchos domesticus* species were compared with the *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas streptera*, and *Anas clypeata* species. As far as we know, this is the first report showing the presence of DAB1-like sequences in wild ducks.

KEY WORDS: Class I, Class II, Major Histocompatibility Complex, DAB1, Ducks.

Los anseriformes es un orden formado por aproximadamente 150 especies que se encuentran distribuidas mundialmente. La familia con mayor número de especies es la *Anatidae* que está formada por aproximadamente 41 géneros y 147 especies, es considerada la familia con más reservorios naturales, de algunos agentes infecciosos como

The order Anseriformes includes ca. 150 species distributed worldwide. The family with the largest number of species is *Anatidae* and it includes ca. 41 genuses and 147 species. *Anatidae* is considered as the family with the largest number of natural reservoirs of some infectious agents, i.e.: type A orthomyxovirus; and types 1, 6 and 9 paramyxovirus^(1,2).

Recibido el 2 de diciembre de 2008. Aceptado para su publicación el 11 de mayo de 2009.

^a Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Tel. /Fax 5616692 gary@servidor.unam.mx. Correspondencia al cuarto autor.

^b Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

^c Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

orthomyxovirus tipo A, paramixovirus tipo 1, 6 y 9(1,2).

Muchos estudios en modelos vertebrados han demostrado que hay genes involucrados en la inmunidad innata y adaptativa, los cuales exhiben altos niveles de polimorfismo. El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) fue descubierto por primera vez en el ratón como una región genética que controlaba la habilidad de los trasplantes de tejidos neoplásicos o normales para ser exitosos. La siguiente especie animal en donde se ha descrito es en el pollo, en donde el locus B fue el primero en ser detectado como un sistema de grupo sanguíneo, esto debido a las reacciones de los eritrocitos con los anticuerpos específicos hacia los antígenos de los altamente polimórficos MHC clase I (BF) y MHC Clase IV (BG)⁽³⁾.

Un locus equivalente fue descubierto posteriormente en el humano, el complejo HLA (por sus siglas en inglés human leucocyte antigen)⁽⁴⁾. Locus similares se han descubierto en todas las especies de mamíferos, así como en los anfibios^(5,6). El MHC es de suma importancia para el sistema inmune de los vertebrados. Es una familia de multigenes que codifican moléculas claves receptoras que reconocen y se unen a péptidos de antígenos para su presentación a células especializadas y posteriormente iniciar una respuesta inmune.

Desde el punto de vista de la evolución, la principal característica del MHC es su amplia diversidad de sus locis que contiene una alta variación en sus genes funcionales descritos en los vertebrados, representado en las aves como una unidad mínima funcional.

La diversidad del MHC y su implicación evolutiva puede observarse al exhibirse menor diversidad en especies insulares, provocando una mayor susceptibilidad a enfermedades en comparación a las especies continentales, las cuales presentan una mayor diversidad, con una mayor resistencia a las enfermedades⁽⁵⁾.

Los estudios basados en el MHC han sido de ayuda para explicar la variación a la susceptibilidad o

Several vertebrate model studies have shown the presence of genes involved in both innate and adaptive immunity exhibiting high levels of polymorphism. The major histocompatibility complex (MHC) was first discovered in mice as a genetic region controlling the ability of neoplastic or normal tissue transplants to be successful. MHC has also been described in chickens, where locus B was first detected as a blood group system due to antigen-immune reactions between red cells and antibody against MHC class I (BF), Class IV (BG)⁽³⁾. Later on, an equivalent locus was described in humans: the human leukocyte antigen (HLA)⁽⁴⁾. Similar loci have been described in all mammal and several amphibian species^(5,6). The MHC play an important role to the animal immune system because it is a multigene family that codes key molecules that process and present antigenic peptides to specialized cells in order to initiate the immune response.

From the evolution point of view, the main characteristic of MHC in vertebrates is its wide loci diversity that contains a high variability on its functional genes, which in birds is represented for a minimal functional unit.

The MHC diversity and its implication on evolution can be observed because exhibit minor diversity in regional species causing a mayor susceptibility to diseases when compare to continental species with mayor diversity and less susceptibility to diseases⁽⁵⁾.

Chicken (*Gallus gallus*) B-F/B-L region is simple and compact, with 19 genes found in 92 Kb of DNA, as compared to quail (*Coturnix japonica*) which includes 41 genes in 180 Kb of DNA. On the other hand, in other bird types such as ducks (*Anas platyrhynchos*) only 5 genes in 36.8 Kb of DNA have been determined so far^(6,7,8).

MHC alleles have been associated with the susceptibility or resistance to various infectious diseases. This has been a valuable tool to determine populations susceptible to certain diseases^(9,10,11).

The MHC governing the resistance/susceptibility of chickens is thought to depend on the specificity of the peptidic binding to the MHC molecule-expressed

resistencia de enfermedades de animales domésticos y silvestres.

La región B-F/B-L del pollo (*Gallus gallus*) es simple y compacta, con 19 genes encontrados en 92 Kb de ADN en comparación con la codorniz (*Coturnix japonica*) que tiene 41 genes contenidos en 180 Kb de ADN. En cambio a otro tipo de aves como al pato (*Anas platyrhynchos domesticus*) sólo se han determinado hasta el momento cinco genes en 36.8 Kb de ADN^(6,7,8).

Los alelos del MHC han sido asociados a la susceptibilidad o resistencia de varias enfermedades infecciosas, lo que ha sido una herramienta valiosa para determinar poblaciones susceptibles a ciertas patologías^(9,10,11).

El MHC dependiente de la resistencia y susceptibilidad de los pollos se presume depende de la especificidad de la unión peptídica a la dominancia expresada por moléculas del MHC; esto se ve con mayor frecuencia en la resistencia de pequeños patógenos, o para virus que contengan pocos péptidos. Un buen ejemplo, es la resistencia al virus del sarcoma Rous (RSV) y la enfermedad de Marek^(10,12,13), que se atribuye a la presencia de péptidos apropiados ligados al MHC clase I y II (B-F/B-L) de células afectadas (tumor) para ser reconocidas por las células citotóxicas (T CD8, CD4)^(10,14).

En pato doméstico se han reportado tumores por virus de la reticuloendoteliosis aviar⁽¹⁵⁾, virus de leucosis aviar⁽¹³⁾ entre otros tumores no caracterizados⁽¹⁶⁾, pero no en patos silvestres. En el presente estudio se determinó si existen secuencias homólogas al MHC clase II en el ADN genómico de patos silvestres en vida libre.

Las muestras para la realización de esta investigación, se obtuvieron a partir de aves muertas por actividad cinegética en la Laguna de Chiconahuapan, Bienes Comunales, Almoloya del Río, Estado de México durante la temporada otoño-invierno.

Recolección de muestras: Se recolectaron muestras de hígado a partir de ocho especies de patos

dominance. This is most frequently seen in the resistance to small pathogens or to viruses containing a few peptides. A good example is the resistance to both Rous sarcoma virus (RSV) and Marek's disease (MD) virus^(10,12,13) which is attributed to the presence of class I and class II (B-F/B-L) MHC-bound peptides in tumor cells leading them to be recognized by cytotoxic (CD8, CD4) T cells^(10,14).

Tumors caused by avian reticuloendotheliosis (RE) virus⁽¹⁵⁾, avian leukosis (AL) virus⁽¹³⁾ and other non-characterized tumors have been reported in domestic ducks⁽¹⁶⁾, but not in wild ducks. The purpose of this research was to determine whether or not class II MHC homologous sequences exist in the wild duck genomic DNA.

Samples to conduct this research were obtained from ducks legally killed from Chiconahuapan (Bienes Comunales), Almoloya del Río in the State of Mexico during the hunting season (November 2006-March 2007).

Sample collection: Liver samples were collected from eight wild duck species and also from an adult domestic duck humanely killed in agreement with the American Veterinary Medical Association euthanasia guidelines (Table 1).

DNA extraction and PCR

Duck livers were preserved in 70% ethanol at ambient temperature. Genomic DNA extraction was

Cuadro 1. Especies de *Anátidos* utilizadas en el estudio

Table 1. Anatidae species used in this study

Common name	Scientific name	No. of animals
Blue-winged teal	<i>Anas discors</i>	3
Green-winged teal	<i>Anas crecca</i>	2
Cinnamon teal	<i>Anas cyanoptera</i>	3
Pintail	<i>Anas acuta</i>	2
American wigeon	<i>Anas americana</i>	1
Northern shoveler	<i>Anas clypeata</i>	3
Gadwall	<i>Anas strepera</i>	1
Mallard	<i>Anas platyrhynchos diazi</i>	4
Domestic duck	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	1

silvestres cazados legalmente durante la actividad cinegética de noviembre de 2006 a marzo de 2007 en la Laguna de Chiconahuapan. Así como muestras de un pato doméstico adulto que fue sacrificado humanitariamente de acuerdo a los lineamientos de eutanasia de la American Veterinary Medical Association (Cuadro 1).

Obtención de ADN y PCR

Los hígados de los patos fueron conservados a temperatura ambiente en etanol al 70%. La extracción de ADN genómico fue obtenida por medio de columnas del sistema comercial (QIAGEN QIAquick Gel Extracción, No cat. 28704), siguiendo el protocolo del fabricante, una vez obtenido el ADN genómico, se cuantificó en un espectrofotómetro (Marca: BECKMAN, Modelo: DU-640B).

Para la amplificación por PCR se diseñaron y utilizaron los siguientes iniciadores, sentido 5'-GCCCCACTCCCTGCGCTA-3' y antisentido 5'-GCAGATAGGAGATGTGAGAGGTTG-3'⁽⁷⁾ utilizando como templado ADN genómico de pato doméstico. Se preparó una reacción de PCR en un volumen total de 50 µl en tubos eppendorff de 0.2 ml (Marca: Axigen scientific, Modelo: Tubes PCR-02-C), la cual contenía 1X de amortiguador de polimerasa, 1 mM MgCl₂, 2 mM dNTP's (US Biological. No cat. D3191), 0.5U Taq polimerasa (Fermentas. No cat. EPO402), 10 µM oligonucleótidos (Invitrogen), 50 ng de ADN y agua DEPC para completar los 50 µl. Las condiciones del termociclador consistieron: un primer tiempo de 95 °C por 2 minutos y medio, el segundo tiempo consistió de 35 ciclos cada uno con la siguiente programación; para desnaturalización a 95 °C por 45 seg de alineamiento a 57 °C por 45 seg, la elongación a 72 °C por 45 seg. Al término de los 35 ciclos, se programó un único tiempo de 72 °C por 5 min. El análisis del producto de PCR se realizó en una cámara de electroforesis (Marca: Cleaver Scientific, Modelo: MSMIDI, Rango: 250 mA) en un gel de agarosa al 1%, mantenido a 100 volt por 25 min. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 50 pb (Fermentas. No cat. SM1133) y otro de 1 Kb (Fermentas. No cat. SM1163). El gel fue teñido

performed by columns using a commercially-available system (QIAGEN QIAquick Gel Extraction, cat. No. 28704), as per manufacturer's protocol. Once obtained the genomic DNA it was quantified by spectrophotometer (BECKMAN DU-640B).

For PCR amplification purposes, the following primers were designed and used: forward 5'-GCCCCACTCCCTGCGCTA-3' and the first backward 5'-GCAGATAGGAGATGTGAGAGGTTG-3'⁽⁷⁾ using domestic duck genomic DNA as a template. A PCR reaction was performed in a total volume of 50 µl in 0.2 ml eppendorf tubes (Axigen Scientific, Model: Tubes PCR-02-C) containing 1X polymerase buffer, 1 mM MgCl₂, 2 mM dNTP's (US Biological. cat. No. D3191), 0.5U Taq polymerase (Fermentas, cat. No. EPO402), 10 µM oligonucleotides (Invitrogen), 50 ng DNA and DEPC water q.s. 50 µl. Thermocycler conditions were as follows: Time 1, 95 °C for 2.5 min; Time 2, 35 cycles each with the following sequence: denaturing at 95 °C for 45 s, alignment at 57 °C for 45 s, elongation at 72 °C for 45 s. Once all 35 cycles were completed, one single cycle at 72 °C for 5 min was run. The PCR product analysis was performed using an electrophoresis chamber (Cleaver Scientific, Model: MSMIDI, Range: 250 mA) on 1% agarose gel, maintaining 100 V for 25 min. One 50 bp molecular weight marker (Fermentas, cat. No. SM1133) and one 1 Kb marker (Fermentas, cat. No. SM1163) were used. The gel was stained with 10X ethidium bromide (Sigma, cat. No. E7637) for 20 min then analyzed using a UV trans-illuminator (UVP, Model: 20, Range: 115 V, 60 Hz). The PCR product was purified from the 1% agarose gel, using a commercially-available column purification system (QIAGEN QIAquick Gel extraction, cat. No. 28704) which consisted of cutting the 750 bp band from the agarose gel using a scalpel then transferred to a 2 ml eppendorf tube (Axigen Scientific microtubes, model MCT-200-A). The DNA was purified using a commercially-available column system (QIAGEN QIAquick Gel extraction, cat. No. 28704) and preserved at -20 °C. Nucleotides were sequenced using an automatic sequencer (Perkin Elmer, Model: 310). The sequence was analyzed using the NCBI/BLAST software.

FRAGMENTO DE ADN DE PATOS SILVESTRES

Cuadro 2. Análisis y alineamiento entre la secuencia de 694 pb de nucleótidos de *Anas platyrhynchos domesticus* (AD) y el cromosoma 8 de *Gallus gallus* (DAB) (NW_001471740)

Table 2. Analysis and alignment of the 694 bp nucleotide sequence between *Anas domesticus* (AD) and *Gallus gallus* chromosome 8 (DAB1) (NW_001471740)

AD	-----CCGCCTGTGGACTTATAGGTATCACCAGTCTGGCTCACCAAATGGCATCACT
DAB1	CTAGCTACCGACCTGTGGACTTATAG-TATCACCAGT-TGGCTCACCAAATGG-ATCACT
	* *****
AD	GTTGGATGAGGCCTGAGACCCATCAGGCTAGAATACAAGAACATAACACCTTTTTTTTCTC
DAB1	GTTGGATGAGGCCTGAGACTCATCAGGCTAGAATACAAGAACATAACACCTTTTTTTTCTC

AD	AACAATAGAAAGTGAAAAGTCAACACGAGGTTATTTTCATGCTGTGGGCATAACAAGTAC
DAB1	AACAATAGAAAGTGAAAAGTCAACATGAGGTTATTTTCATGCTGTGGGCATAACAAGTAC

AD	ATCCTATCTCATGAAAAGTCAAGTGAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
DAB1	ATCCTATCTCATGAAAAGTCAAGTGAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT

AD	AATGTTTTTCTGTAGCTGATGCAGGCAGGAAAAGACTACACCAGTTGTGTCATTTTGTAC
DAB1	AATGCTTTTCTACAGCTGATGAAGGCAGGAAAAGACCATA-----TGTGTCATTTGTGTC
	**** ***** ** * * *****
AD	TCTGGGTCTGTATTTGTACAGACTCCTTCTTGCCTTTGGTTCACTTAGGCTCTTATCTGC
DAB1	TTTGGGTCTCTTTTGTACAGAGTCTTCTTGCCTTTGGCTCACTTAGGCTCTTATCTGC
	* ***** * *****
AD	CTAAGATACCTTGTGATTTAAAGTCACTCTCTTTTGTATACCATTCTTGCTTTGGTTCCAC
DAB1	CTAAGATACCTTGTGATTTCAAAGTCACTTTCATTTTGTATATATTTCTTGCTTTGGTCCAC
	***** ** *****
AD	TGAGACTAAGGCAAAGAAATAGCAAGGGCCAGAACATTGAGGAATGCAACACAACCTCTC
DAB1	TGAGTCTAAGGCAAAGAAATACCAAGGGCCAGAACATTGAGGAATGCAACACAACCTCTC
	**** *****
AD	GCATTTCTTTCTGCATCCTCAGCACTCATGTCACTTTACCTTGGACTCCCTTACCACCAG
DAB1	GCATTTCTTTCTGCATCCTCAGCACTCATGTCACTTTACCTTGGACTCCCTTACCACCAG

AD	TAAGTGAATGTTGGTACTGGATAAAGTAAATGTATATTACTTCATGTATGAACTCTGA
DAB1	TAAGTGAATGTTGGTACTGGATAAAGTAAATGTATATTACTTCATGTATGAACTCTGA

AD	GTTTGGTTCTCGCATGCAATATTAGGACACATCAACAGATA
DAB1	GTTTGGTTCTCGCATGCAATATTAGGACACATCAACAGATA

con bromuro de etidio 10X (Sigma. No cat. E7637) durante 20 min y analizadas en un transiluminador con luz UV (Marca: UVP, Modelo: 20, Rango: 115 volt 60 Hz). El producto de PCR fue purificado a partir del gel de agarosa al 1%, utilizando el sistema comercial de purificación en columnas (QIAGEN QIAquick Gel extraction. No cat. 28704) que consistió en cortar la banda de 694 pb del gel de agarosa con un bisturí y colocado en un tubo

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

The PCR product was cut using three restriction enzymes, i.e., Hind III (GIBCOBRL, cat. No. 15207-020), BsrG I (Fermentas, cat. No. ERO931), and RsaI (Invitrogen, cat. No. 15424-013) based on the restriction cutting analysis of the PCR product sequence using the Workbench 3.1 software. Restriction reaction was performed on a 30 µl volume which comprised a mix of ca. 50 ng DNA,

ependorff de 2 ml (Marca: Axigen scientific, Modelo: microtubos MCT-200-A). El ADN fue purificado siguiendo el protocolo del fabricante, conservado el producto a -20 °C. La secuencia de nucleótidos fue realizada en un secuenciador automático (Marca: Perkin Elmer, Modelo: 310). El análisis de la secuencia se realizó en el programa NCBI/BLAST.

Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (PLFR)

Para el corte del producto de PCR se utilizaron las enzimas de restricción Hind III (GIBCOBRL. No cat. 15207-020), BsrG I (Fermentas. No cat. ERO931) y RsaI (Invitrogen. No cat. 15424-013) con base al análisis de corte de restricción de la secuencia del producto de PCR por el software Workbench 3.1. El volumen de reacción de la restricción se llevó a cabo en 30 µl, compuesto por una mezcla de 50 ng de ADN aproximadamente, amortiguador de la enzima, BSA (Bovine serum, albumin acetylated 100X dilution) (Promega), y agua DEPC. La mezcla se incubó a 37 °C por 16 h, se analizó en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 10X (Sigma. No cat. E7637) y se observó en un transiluminador (Marca: UVP, Modelo: 20, Rango: 115 volt 60 Hz).

Se amplificó un fragmento de 694 pb a partir del ADN de *Anas platyrhynchos domesticus*, que al análisis (Cuadro 2) tuvo una secuencia con 93 % de similitud y un 7 % restante de inserciones y sustituciones respecto del cromosoma 8 de *Gallus gallus* (GenBank, NW_001471740) que corresponde a DAB1 (disabled 1) la cual es homóloga a las región BL- α de *Gallus gallus*, coja-DAB1 de *Coturnix japonica*, Agph-DAB1 de *Agelaius phoeniceus*; estas regiones están ubicadas en el MHC clase II de las respectivas especies^(12,17).

El fragmento de 694 pb también fue amplificado en las muestras de *Anas platyrhynchos diazi*, *A. discors*, *A. crecca*, *A. cyanoptera*, *A. acuta*, *A. americana*, *A. clypteata* y *A. strepera* (Figura 1).

Al análisis por PLFR se realizó en todos los fragmentos de 694 pb de las nueve especies de patos; se observó que en todas las especies de patos

enzyme buffer, 100X dilution acetylated bovine serum albumin (BSA, Promega), and DEPC water. The mix was incubated at 37 °C for 16 h, analyzed on 10X ethidium bromide-stained 3% agarose gel (Sigma, cat. No. E7637) then observed in the trans-illuminator (UVP, Model: 20, Range: 115 V, 60 Hz).

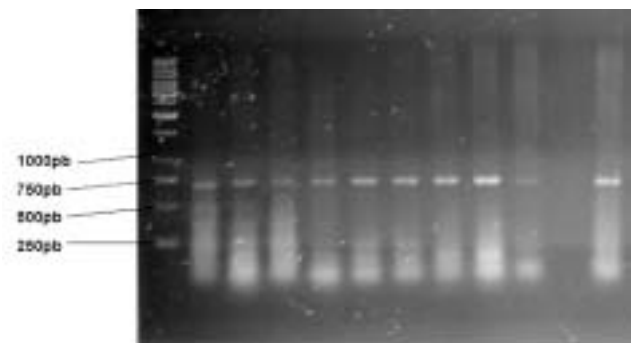
A 694 bp fragment from *Anas platyrhynchos domesticus* DNA was amplified (Table 2). When analyzed, this fragment had a sequence showing 93 % similarity and 7 % insertions/deletions with *Gallus gallus* chromosome 8 (GenBank, NW_001471740) corresponding to DAB1 (disabled 1), which is homologous to the *Gallus gallus* BL- α region, *Coturnix japonica* coja-DAB1, and *Agelaius phoeniceus* Agph-DAB1 regions. These regions are located in the class II MHC of their respective species^(12,17).

The 694 bp fragment was also amplified in samples from *A. platyrhynchos diazi*, *A. discors*, *A. crecca*, *A. cyanoptera*, *A. acuta*, *A. americana*, *A. clypteata*, and *A. strepera* (Figure 1).

The RFLP analysis of the 694 bp fragments from 9 different duck species showed that in all wild

Figura 1. Amplificación del fragmento de 694 pb en diferentes *Anátidos*. Gel de agarosa al 1%. 1)

Figure 1. Amplification of the 694 bp fragment from different ducks in 1% agarose gel



Lanes: 1) 1K molecular marker, 2) *Anas discors*, 3) *Anas crecca*, 4) *Anas cyanoptera*, 5) *Anas acuta*, 6) *Anas americana*, 7) *Anas clypteata*, 8) *Anas strepera*, 9) *Anas platyrhynchos diazi*, 10) *Anas platyrhynchos domesticus*, 11) Negative control without sample, 12) Positive control (*Anas platyrhynchos domesticus*)

silvestres la enzima de restricción Rsa I y BsrG I generó los mismos fragmentos. Sin embargo, la enzima Hind III mostró un patrón diferente de corte para las especies *A. platyrhynchos diazi*, *A. platyrhynchos domesticus* y *A. americana* (Figuras 2,3,4).

El análisis de PLFR con las enzimas BsrG I y Rsa I mostró que todas las muestras de *A. platyrhynchos diazi*, *A. platyrhynchos domesticus*, *A. americana*, *A. discors*, *A. crecca*, *A. cyanoptera*, *A. acuta*, *A. clypeata* y *A. strepera*, tienen los mismos sitios de corte. Para la enzima Hind III no se encontró la región de corte para los ejemplares *A. discors*, *A. crecca*, *A. cyanoptera*, *A. acuta*, *A. clypeata*, *A. strepera*, lo que las diferencia de la especie *A. platyrhynchos domesticus*, *A. platyrhynchos diazi* y *A. americana*, por corte con enzimas de restricción.

En este estudio se evidencia por medio de la enzima Hind III que tres especies de patos podrían tener una relación filogenética diferente. Actualmente conocemos que el MHC del pato está compuesto por cinco genes polimórficos contenidos en 36.8 Kb de ADN, pero se desconoce si hay diferencia entre individuos de la misma especie y mismo género^(7,17,18).

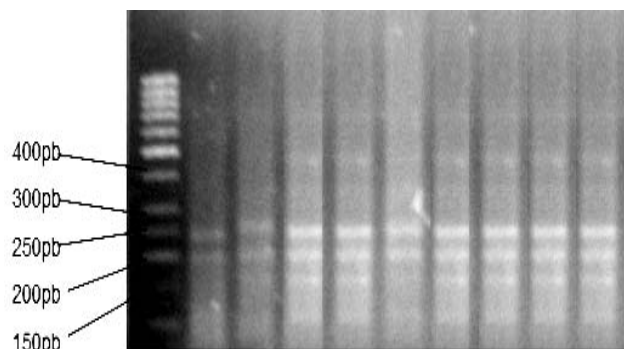
La organización genómica del MHC, varía considerablemente entre diferentes especies de aves. Los estudios en aves filogenéticamente cercanas al pollo, pero distintamente ubicadas geográficamente, muestran patrones similares, como por ejemplo el faisán de collar (*Phasianus colchicus*) el cual tiene dos regiones de genes de MHC, uno de los cuales tiene propiedades similares al locus *Rfp-Y* del pollo. El pavo (*Meleagris gallopavo*) también muestra una organización de genes tan simple como el MHC del pollo. Por otra parte el MHC de la codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) muestra una mayor complejidad, con al menos 12 loci de clase I en una región físicamente separada de los genes de clase II. Los genes de MHC también han sido caracterizados en pingüinos, charadriiformes, y passeriformes; estos estudios han demostrado que existe una gran variación en la organización del MHC entre las diferentes especies de aves, pero comparten similitud dentro de las aves del mismo orden taxonómico sin importar hasta ahora su

duck species, both RsaI and BsrGI restriction enzymes resulted in the same fragments, nevertheless, the Hind III enzyme resulted in a different cutting pattern for the *Anas platyrhynchos diazi*, *Anas domesticus* and *Anas americana* species (Figures 2,3,4).

The RFLP analysis using the BsrG I and Rsa I enzymes showed that all samples from *Anas platyrhynchos diazi*, *Anas platyrhynchos domesticus*, *Anas americana*, *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas clypeata*, and *Anas strepera* have the same cleavage sites. For the Hind III enzyme, the cleavage region was not found in *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas clypeata*, or *Anas strepera* which makes these species different from all other duck species studied.

In this study, Hind III enzyme evidence that tree ducks could be phylogenetically different. It is known that the duck MHC is comprised by 5 polymorphic genes contained in 36.8 Kb of DNA^(7,17,18). What remains unknown is whether

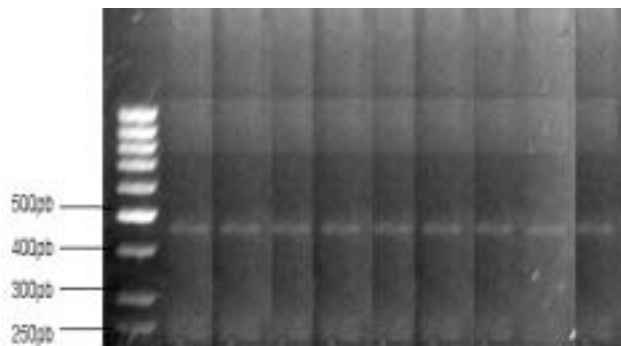
Figura 2. Sitios de corte por la enzima Rsa I, de amplificación del fragmento de 694 pb de *Anátidos*. Gel de agarosa al 3%, corte con enzima de restricción RsaI
Figure 2. RsaI restriction enzyme cleavage sites of the amplified 694 bp fragment from different *Anatidae* species on 3% agarose gel



Lanes: 1) 50 bp molecular marker, 2) *A. discors*, 3) *A. crecca*, 4) *A. cyanoptera*, 5) *A. acuta*, 6) *A. americana*, 7) *A. clypeata*, 8) *A. strepera*, 9) *A. platyrhynchos diazi*, 10) *A. platyrhynchos domesticus*

Figura 3. Sitios de corte por la enzima BsrG I, de amplificación del fragmento de 694 pb de *Anátidos*. Gel de agarosa al 3%, corte con enzima de restricción BsrG I

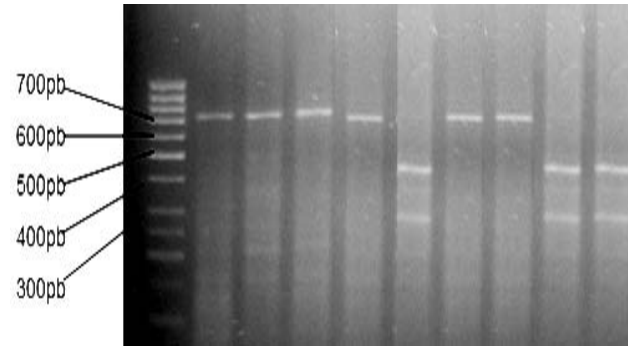
Figure 3. BsrGI restriction enzyme cleavage sites of the amplified 694 bp fragment from different *Anatidae* species on 3% agarose gel



Lanes: 1) 50 bp molecular marker, 2) *A. discors*, 3) *A. crecca*, 4) *A. cyanoptera*, 5) *A. acuta*, 6) *A. americana*, 7) *A. clypteata*, 8) *A. strepera*, 9) *A. platyrhynchos diazi*, 10) *A. platyrhynchos domesticus*

Figura 4. Sitios de corte por la enzima Hind III, de amplificación del fragmento de 694 pb de *Anátidos*. Gel de agarosa al 3%, corte con enzima de restricción Hind III

Figure 4. Hind III restriction enzyme cleavage sites of the amplified 694 bp fragment from different *Anatidae* species on 3% agarose gel



Lanes: 1) 50 bp molecular marker, 2) *A. discors*, 3) *A. crecca*, 4) *A. cyanoptera*, 5) *A. acuta*, 6) *A. americana*, 7) *A. clypteata*, 8) *A. strepera*, 9) *A. platyrhynchos diazi*, 10) *A. platyrhynchos domesticus*

localización geográfica. Esto explica lo observado en este estudio, donde las diferencias del MHC II (DAB1) son compartidas entre las diferentes especies de patos silvestres del género *Anas* que en este estudio comparten el mismo hábitat y región geográfica. Debido a que las especies de patos silvestres de este estudio son abundantes y con amplia distribución en el continente americano, se esperaría que tengan una mayor diversidad del MHC respecto de aquellas especies que se encuentran restringidas a una área y en menor abundancia⁽⁵⁾. Sin embargo, el resultado del PLFR del DAB1 no se evidenció en este estudio.

La expresión de varios genes de MHC da a los animales la ventaja de aumentar la posibilidad de presentar los péptidos de antígenos al sistema inmune. Al mismo tiempo al estar expresado varias veces el MHC, se reduce el número de diferentes receptores de células T, los cuales se hacen más especializados a favor de obtener una mayor eficiencia en la respuesta inmune⁽¹⁹⁾.

Entendiendo la asociación MHC-enfermedad en el cáncer y otras enfermedades, podría lograrse el

or not a difference exists in this region among individuals of the same species, within the same genus.

The MHC genomic organization varies considerably between different species. However, phylogenetical studies from others birds located geographic distantly show similar patterns to the chicken. One example is the Common pheasant (*Phasianus colchicus*) which has two MHC regions, where one of them share properties to the chicken Rfp-Y locus. The turkey (*Meleagris gallopavo*) also shows a similar chicken-like MHC organization. In the other hand, the MHC of Japanese quail (*Coturnix japonica*) shows a mayor complexity including al least 12 loci of MHC class I separate from MHC class II region. The MHC genes are also characterized in penguins, Charadriiformes and Passeriformes, where it has shown a big variation into its genomic organization and between different avian species, but similar into avian species of the same taxonomic branch regardless of the geographic location. This information explains why the MHC (DAB1) is shared between different wild ducks of

desarrollo de marcadores moleculares como alternativa al desafío directo en unidades de experimentación y al estudio en especies aviares amenazadas o en peligro de extinción.

LITERATURA CITADA

1. Webby RJ, Webster RG. Emergence of influenza A viruses. *The Royal Society* 2001;356:1817-1828.
2. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique Et Technique (OIE)* 2000;19:443-462.
3. Fulton JE, Juul-Madsen HR, Ashwell CM, McCarron AM, Artyhur JA, O'Sullivan NP, Taylor Jr RL. Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 2006;58:407-421.
4. Bremnes B, Rode M, Gadde-Dahi M, Nordeng TW, Jacobsen J, Ness S, Bakke O. The MHC class II associated chicken invariant chain share functional properties with its mammalian homologous. *Exper Cell Res* 2000;259(2):360-369.
5. Piertney S, Oliver M. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 2006;96:7-21.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 5a ed. Madrid España: Elsevier; 2006.
7. Moon DA, Veniamin S, Parks-Dely J, Magor K. The MHC of the duck (*Anas platyrhynchos*) contains five differentially expressed classes I genes. *J Immunol* 2005;175:6702-6712.
8. Kaufman J. *The avian MHC*. Avian Immunology. 1st ed. USA: Academic Press; 2008:159-182.
9. Lamont SJ. The chicken major histocompatibility complex and disease. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1998;17:128-142.
10. Westerdhal W, Passerine J. MHC: genetic variation and disease resistance in the wild. *J Ornithol* 2007;148:S469-2477.
11. Blackwell JM. Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. *Trends Mol Med* 2001;7:521-526.
12. Garrigan D, Edwards S. Polymorphism across and exon-intron boundary in an avian MHC Class II B gene. *Mol Biol Evol* 1999;16:1599-1606.
13. Van der Iaan MP, Soubieux D, Mérat L, Bouret D, Luneau G, Dambrine G, Thoraval P. Genetic analysis of a divergent selection for resistance to Rous sarcomas in chickens. *Genet Sel Evol* 2004;36:65-81.
14. Zavala G, Cheng S. Detection and characterization of avian leukosis virus in Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 2003;209-215.
15. Salas CE, Icochea ED, González R, Falcón N. Evidencia serológica de anticuerpos contra el virus de la reticuloendoteliosis en gallinas reproductoras de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 2005;16:187-190.
16. Reece RL, Saif M, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly A, McDougald L, Swayne DE. Other tumors of unknown etiology. In: *Diseases of poultry*. 11th ed. Iowa State University Press, Ames. 2003:465-516.
17. Hosomichi, K, Miller, MM, Goto RM, Wang Y, Suzuki S, Kulski J.K, Nishibori M, Inoko H, Hanzawa K, Shiina, T. Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken *Mhc-B* Haplotype diversity. *J Immunol* 20008;181:3393-3399.
18. Chun X, Tuanjun HU, Tianyao Y, Wang GX, Hu TJ, Yang TY. cDNA cloning and genomic structure of the duck (*Anas platyrhynchos*) MHC class I gene. *Immunogenetics* 2004;56:304-309.
19. Ekblom R, Grahn M, Höglund J. Patterns of polymorphism in the MHC class II of a non-passerine bird, the great snipe (*Gallinago media*). *Immunogenetics* 2003;54:734-741.

End of english version
