

Secuenciación de nuevos alelos BoLA-DRB3.2 detectados en ganado Criollo mexicano

Sequencing of new BoLA-DRB3.2 alleles detected in Mexican Creole cattle

Monserrath Félix Portillo^a, José Gonzalo Ríos Ramírez^a, Gilberto Enrique Erosa de la Vega^b, Felipe Rodríguez Almeida^a

RESUMEN

Se determinó la secuencia nucleotídica de diez alelos BoLA-DRB3.2 detectados por PCR-RFLP en ganado Criollo mexicano. La metodología utilizada para determinar dicha secuencia fue la SBT (sequence based typing). De los diez alelos analizados se logró determinar que dos correspondieron a los alelos DRB3*1602 y DRB3*1501 ya reportados en la base de datos BoLA. Los ocho restantes tuvieron secuencias nucleotídicas diferentes a las publicadas con anterioridad. Tres de los alelos definidos en este estudio mostraron homología máxima del 99 % al compararse con los alelos oficialmente reportados; cuatro más tuvieron 98 % de homología y uno de ellos mostró una identidad máxima del 94 %. Se concluyó que estos ocho alelos no han sido reportados previamente. Las secuencias peptídicas deducidas para estos alelos mostraron diferencias en el rango del 2 hasta el 51 % con respecto a los péptidos publicados oficialmente. El análisis de la secuencia de estos nuevos alelos respalda la hipótesis de que el ganado Criollo mexicano posiblemente tiene mayor potencial genético para responder a una gama más amplia de antígenos patógenos, que las otras razas de bovino estudiadas hasta el momento.

PALABRAS CLAVE: SBT, Rodeo, Resistencia a enfermedades, Polimorfismo genético.

ABSTRACT

The nucleic acid sequence of ten BoLA-DRB3.2 alleles detected by PCR-RFLP in Mexican Creole cattle was determined. The methodology used to determine such sequence was the SBT (sequence based typing). It was possible to determine that two alleles, correspond to DRB3*1602 and DRB3*1501 previously reported to the BoLA database. The remaining eight alleles had nucleic acid sequences different from those already published. When compared to the officially reported alleles, three of those defined in this study showed maximal homologies of 99 %, four had 98 % homology and one showed maximal identity of 94 %, therefore the conclusion was that those 8 alleles are unreported. The amino acid sequences deduced for these alleles showed differences from 2 to 51 % with respect to the officially published peptides. The sequence analysis of these new alleles supports the hypothesis that Mexican creole cattle possibly has a higher genetic potential to respond to a wider range of pathogen antigens than the other bovine races studied to date.

KEY WORDS: SBT, Rodeo, Disease resistance, Genetic polymorphism.

INTRODUCCIÓN

El ganado Criollo mexicano es un recurso genético que presenta características especiales de adaptación a ecosistemas agrestes. En los últimos años se ha convertido en un biotipo de mucho interés para las actividades deportivas de rodeo Americano. Tan

INTRODUCTION

The mexican Creole cattle is a genetic resource that shows special features of adaptation to rustic environments. Within the last few years it has become a biotype of great interest for the sport activities of the American rodeo. In 2003 alone,

Recibido el 12 de mayo de 2005 y aceptado para su publicación el 5 de septiembre de 2005.

^aFacultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua. Calle Paseo de Delicias 15158. Col. Paseos de Chihuahua. 31109 Chihuahua, Chihuahua.

^bFacultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

sólo en el año 2003, el estado de Chihuahua exportó 19,196 cabezas⁽¹⁾ hacia los Estados Unidos de Norteamérica, por sus cualidades de resistencia, velocidad, y agilidad, así como por la forma, grosor y fortaleza de los cuernos⁽²⁾. Una de las características más distintivas del ganado Criollo es su gran capacidad de resistencia a enfermedades, lo que le convierte en un reservorio potencial de germoplasma útil para futuros cruzamientos⁽³⁾. Por lo anterior, es importante conocer las características genóticas de algunos de los loci del complejo principal de histocompatibilidad bovino (bovine leucocyte antigen, BoLA) del ganado Criollo mexicano, ya que este complejo está asociado a la susceptibilidad o resistencia a enfermedades^(4,5,6,7). Debido a características de expresión genética, el locus DRB3.2 es el más adecuado para ser sometido a genotipificación⁽⁸⁾.

La característica de resistencia a enfermedades que el Criollo muestra, hace suponer que el locus DRB3.2 del gen BoLA es altamente polimórfico y que esta población tiene una gran heterocigocidad, presentando formas alélicas que hasta el momento no han sido identificadas en otras razas de ganado⁽³⁾. En estudios previos realizados sobre el gen BoLA-DRB3.2 en ganado Criollo mexicano, se evaluaron las frecuencias alélicas, las distancias genéticas y el grado de diferenciación de los Criollos con respecto a otras razas^(9,10). Las frecuencias de los nuevos alelos que se encontraron por PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo por longitud de los fragmentos de restricción), fluctuaron entre 0.010 y 0.053⁽⁹⁾. Al considerar todos los alelos, la mayor frecuencia fue de 0.158⁽¹⁰⁾. Los resultados sustentan la hipótesis de que posiblemente el ganado Criollo mexicano debe sus cualidades de adaptación a la amplia base genética que posee, así como al grado de polimorfismo de algunos de sus genes, sobre todo los relacionados con resistencia a enfermedades, cualidades de las que otras razas carecen⁽⁸⁾. En estos trabajos se demostró la existencia de nuevos patrones de este gen detectados por PCR-RFLP en poblaciones criollas mexicanas; sin embargo, para asegurar que estos patrones de RFLP's representan nuevos alelos, es indispensable secuenciar los fragmentos en los que tales patrones fueron detectados.

the state of Chihuahua exported 19,196 head of cattle⁽¹⁾ to the United States of North America, due to its characteristic resistance, velocity and agility, as well as to the shape, thickness and strength of the horns⁽²⁾. One of the most distinctive features of the Creole cattle is its great capability to resist diseases which makes it a potential reservoir of germplasm useful for future crosses⁽³⁾. Therefore, it is important to know the genotypic characteristics of some of the loci of the bovine major histocompatibility complex (bovine leucocyte antigen, BoLA) of the mexican Creole cattle, because this complex is associated with the susceptibility or resistance to diseases^(4,5,6,7). In view of its genetic expression characteristics, the DRB3.2 locus is the most suitable to be use for genotyping⁽⁸⁾.

The characteristic disease resistance that the Creole cattle shows, suggests that the DRB3.2 locus of the BoLA gene is highly polymorphic and that this population has a great heterozygosity, showing allelic forms that have not been identified so far in other bovine races⁽³⁾. In studies done previously regarding the BoLA-DRB3.2 gene in mexican Creole cattle, the allelic frequencies, genetic distances and the differentiation degree compared to other races were determined^(9,10). The frequencies of the new alleles that were found by PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction length polymorphism) fluctuated between 0.010 and 0.053⁽⁹⁾. When considering all of the alleles, the greatest frequency was 0.158⁽¹⁰⁾. The results support the hypothesis that possibly the Creole cattle owes its qualities of adaptation to the vast genetic background that it possesses, as well as to the degree of polymorphism of some of its genes, and mostly those related to the disease resistance, qualities that the others races lack⁽⁸⁾. In these studies, the existance of new patterns of this gene was demonstrated by PCR-RFLP in mexican Creole populations; however, in order to confirm that these RFLP patterns represent new alleles, it is indispensable to sequence the fragments from which such patterns were detected.

The objective of this work was to determine the nucleotide sequence of the samples whose BoLA-DRB3.2 patterns defined by RFLP's were previously

El objetivo de este trabajo fue determinar la secuenciación nucleotídica de las muestras cuyos patrones de RFLP's del BoLA-DRB3.2 fueron detectados previamente en ganado Criollo mexicano. Mediante la información generada se tendrá un conocimiento más amplio acerca de la diversidad genética para la resistencia a enfermedades, conduciendo así al uso potencial del ganado Criollo de rodeo en cruza comerciales, con el fin de aprovechar esa diversidad y la protección inmunológica que provee.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se secuenció el exón 2 del gen BoLA-DRB3.2 en ganado Criollo. Las clonas a partir de las cuales se secuenciaron los fragmentos de ADN correspondientes a los alelos en este estudio, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estas clonas fueron generadas en el trabajo realizado por Fernández⁽⁹⁾ sobre ganado Criollo mexicano. Diez clonas de bacterias *Escherichia coli* DH10b fueron suspendidas en un volumen aproximado de 2 ml de caldo LB con ampicilina y semicongeladas. Las clonas se refieren como A₁₆, K₁₄, C₁₁, P₄₂, B₇₁, D₂₄, C₄₂, C₆₁, Q₁₃ y L₈₂, que tienen clonado al plásmido pUC19/SmaI que contiene un fragmento de 284 pb correspondiente al BoLA-DRB3.2.

La fase inicial del trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua. La fase final de secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Químicas de la misma Universidad.

Las clonas fueron sembradas en agar y caldo LB con ampicilina (100 µg/ml). Para obtener el ADN plasmídico, se realizó el procedimiento conocido como minipreparación de ADN⁽¹¹⁾. La integridad del ADN fue evaluada corriendo 5 ml del producto obtenido de la minipreparación en una electroforesis

detectada en ganado Criollo mexicano. Along with the information generated will come a wider knowledge about the genetic diversity for disease resistance, thus leading to the potential use of the rodeo Creole cattle in commercial crosses, with the goal of taking advantage of that diversity and the immune protection that it provides.

MATERIALS AND METHODS

The exon 2 of the BoLA-DRB3.2 in Creole cattle was sequenced. The clones from which the DNA fragments were sequenced in this study, were provided by the Molecular Genetics Laboratory of the Veterinary Medicine and Zootechny Department of the Autonomus National University of Mexico. Such clones were generated in the work done by Fernández⁽⁹⁾ on mexican Creole cattle. Ten clones of *Escherichia coli* DH10b were resuspended in a volume of 2 ml of LB broth with ampicillin and were semifrozen. The clones are referred to as A₁₆, K₁₄, C₁₁, P₄₂, B₇₁, D₂₄, C₄₂, C₆₁, Q₁₃ and L₈₂. They carry the plasmid pUC19/SmaI that has an insert with the 284 bp corresponding to the BoLA-DRB3.2.

The initial phase of the work was done in the Molecular Biology Laboratory and the Microbiology Laboratory of the Zootechny Department of the Autonomus University of Chihuahua. The sequencing final phase was performed in the Immunology Laboratory of the Chemistry Sciences Department of the same University.

The clones were growth in LB agar and broth with ampicillin (100 µg/ml). In order to obtain the plasmid DNA, the DNA minipreparation procedure was followed⁽¹¹⁾. The integrity of the DNA was assessed by running 5 µl of the obtained product in a 1% agarose electrophoresis gel prestained with 0.5 µg/µl ethidium bromide.

The DRB3.2 PCR products present in the plasmid DNA were obtained using the primers F-HL030: 5'ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' and R-HL032: 5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTC TC-3' in a standard amplification protocol⁽⁷⁾.

en gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio 0.5 mg/ml.

Los productos de PCR del exón 2 del locus DRB3 presentes en el ADN plasmídico fueron obtenidos utilizando los iniciadores (primers) F-HL030: 5'ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' y R-HL032: 5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3' en un protocolo estándar de amplificación⁽⁷⁾.

El volumen total de la reacción de amplificación para secuenciar fue de 20 μ l conteniendo Ready ReactionPremix™20X, BigDyeSequencingBuffer™5X, primer HL030 ó HL032 3.2 pmol y 10 ng del producto de PCR como templado. Se secuenciaron los productos de PCR 5'-3' y 3'-5' de cada muestra.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador BioRad™ Cyclor V.3.021 en las siguientes condiciones: 96 °C por 1 min seguido de 26 ciclos de 30 seg a 96 °C, 15 segundos a 50 °C y 4 min a 60 °C. Al término de los 26 ciclos, se enfriaron las reacciones a 4 °C hasta antes de su almacenamiento.

Los productos de PCR fueron purificados con etanol al 70%, sometidos a 95 °C por 2 min y a baño de hielo antes de ser sometidos a secuenciación en un equipo automático ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Blast-2sequences del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI, National Center for Biotechnology Information).

Posteriormente, fueron comparadas con los alelos BoLA-DRB3 publicados en el Comité de Nomenclatura BoLA utilizando el programa Blast-nucleotide-nucleotide del NCBI⁽¹²⁾. De las secuencias de ADN obtenidas se dedujeron las secuencias peptídicas que se generan. Para ello se utilizaron los programas Translate Tool del ExPaSy (Expert Protein Analysis System) y Blast-protein-protein del NCBI. Se realizó un análisis de RFLP's simulado utilizando el programa Restrict del EMBOSS⁽¹³⁾ (European Molecular Biology Open Software Suite).

The total volume of the sequencing amplification reaction was 20 μ l containing ReadyReactionPremix™ 20X, BigDyeSequencingBuffer™5X, primer HL030 or HL032 3.2 pmol and 10 ng of the PCR product as template. The 5'-3' and 3'-5' PCR products of each sample were sequenced.

The reactions were carried out in a BioRad™Cyclor V.3.021 under the following conditions: 96 °C for 1 min followed by 26 cycles of 30 seg at 96 °C, 15 sec at 50 °C and 4 min at 60 °C. After 26 cycles, the reactions were cooled down to 4 °C before being stored.

The PCR products were purified with 70% ethanol and then subjected to 95 °C for 2 min and cool down in an ice bath before being sequenced in an ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) automated equipment.

The obtained sequences were analysed using the program Blast-2sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Afterwards, they were compared to the BoLA-DRB3 alleles published by the BoLA Nomenclature Committee using the program Blast-nucleotide-nucleotide from the NCBI⁽¹²⁾. The peptide sequences that are generated were deduced from the DNA sequences using the programs Translate Tool del ExPaSy (Expert Protein Analysis System) and Blast-protein-protein from the NCBI. An RFLP's analysis was simulated using the program Restrict from the EMBOSS⁽¹³⁾ (European Molecular Biology Open Software Suite).

RESULTS AND DISCUSSION

The newly obtained sequences in this study, are shown under the format of the BoLA Nomenclature Committee, so it is possible to make a direct comparison between the alleles in such database and the sequences obtained in this study. The accession numbers (GenBank) assigned to such sequences are: DQ174310-DQ174317 and correspond to the alleles A16, K14, C11, P42, B71, D24, C42 and C61 in this study, respectively.

In Table 1 the allele DRB3*0101 is shown a consensus sequence in the first line and the analysed sequence in the next one.

SECUENCIA DE ALELOS BoLA-DRB3.2 EN GANADO CRIOLLO

Cuadro 1. Secuencias nucleotídicas de los alelos A16, K14, C11, P42, B71, D24, C42 y C61, comparadas con el alelo DRB3*0101

Exon 2	10	20	30	40	50	60	70
DRB3*0101	CAT TTC CTG GAG TAT TCT AAG AGC GAG TGT CAT TTC TTC AAC GGG ACC GAG CGG GTG CGG TTC CTG GAC AGA						
Allele A16	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele K14	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C11	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele P42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele B71	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele D24	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C61	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
DRB3*0101	TAC TAC ACT AAT GGA GAA GAG ACC GTG CGC TTC GAC AGC GAC TGG GGC GAG AAC CGG GCC GAG GTG ACC GAG						
Allele A16	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele K14	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C11	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele P42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele B71	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele D24	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C61	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
DRB3*0101	GGG CGG CAG GAC GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GAC TTC CTG GAG GAG AAC CGG GCC GAG GTG ACC GAG						
Allele A16	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele K14	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C11	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele P42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele B71	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele D24	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C61	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
DRB3*0101	GTG TGC AGA CAC AAC TAC--GGG GGT ATG GAG AGT TTC ACT GTG						
Allele A16	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele K14	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C11	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele P42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele B71	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele D24	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C42	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **
Allele C61	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **	*** **

*Identical nucleotides with respect to the sequence DRB3*0101

-Nucleotide-free positions with respect to the sequence DRB3*0101

Bold letters indicate allele differences with respect to the consensus sequence DRB3*0101

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nuevas secuencias obtenidas en este estudio se muestran bajo el formato utilizado por el Comité de Nomenclatura del BoLA con la finalidad de poder hacer una comparación directa entre los alelos ahí reportados y las secuencias obtenidas en el presente trabajo. Los numeros de accesoión (GenBank) asignados a dichas secuencias son DQ174310-DQ174317 y corresponden a los alelos A16, K14, C11, P42, B71, D24, C42 Y C61 de este estudio, respectivamente.

En el Cuadro 1 se observa el alelo DRB3*0101 como secuencia consenso en la primera línea y en la siguiente la secuencia de la muestra analizada.

En el alelo de la clona A₁₆ (alelo A₁₆ en este estudio) se detectaron cambios en dos posiciones nucleotídicas en la secuencia de ADN, siendo la primera de ellas una deleción en la posición 169 y la segunda una inserción de T en la posición 231. El alelo DRB3*0201 es la secuencia con la que mayor homología tuvo esta muestra con un 99 % de similitud. En cuanto a la secuencia peptídica que estos alelos codifican, la homología fue del 69 %. La disminución en la homología peptídica es notable (Cuadro 2). Esto se puede explicar si se observa que el cambio en el marco de lectura en la posición 169 se recorre a causa de la deleción

In the clone A₁₆ allele (allele A₁₆ in this study) changes in two nucleotide positions were found, the first of them being a deletion in the position 169 and the second being a T insertion in the position 231. The DRB3*0201 allele is the sequence with which the most homology was found to this sample, showing a 99 % similarity. The homology in the peptide sequence that these alleles code was 69 %. The decrease in the peptide homology is significant (Table 2). This can be explained if the change in the reading frame is observed. This is shifted onwards in the position 169 as an effect of the present deletion and from that point on, the peptide chain is different to the one encoded by the DRB3*0201 allele. On the contrary, it is evident that the peptide differences of a 49 % amongst the sequences encoded by the K₁₄ allele and the DRB3*1601 allele, are due to the multiple nucleotide changes that such a sample had: a CT inversion in the positions 30 and 31, changes of C, C, A and T at the positions 61, 110, 195, 199 and 238, respectively; it showed single insertions of A, C, G and C in the positions 109, 205, 210 and 219, respectively; it also had double insertions of CT and CG in the positions 193 and 240, respectively. In spite of all these nucleotide differences, the homology between the K₁₄ allele and the DRB3*1601 allele was 94 %.

The C₁₁ allele had only one insertion of a G in the position 10 and showed a 99 % homology with the

Cuadro 2. Péptidos deducidos de los alelos A16, K14, C11, P42, B71, D24, C42 y C61, comparados con el alelo DRB3*0101

Table 2. Peptides deduced from the alleles A16, K14, C11, P42, B71, D24, C42 and C61, compared to the allele DRB3*0101

Péptido deducido	10	20	30	40	50	60	70	80	
DRB3*0101	EYSKSECHFF	NGTERVRFLD	RYYTNGEETV	RFDSWDGFEFR	AVTELGRQDA	EYWNSQKDFL	E EKRAEVDRV	CRHNYGGMES	FTV...
Allele A ₁₆	***T*****	*****	**FH***F*	*****Y*	*****P**	***TARRSWS	GRGPRWTRTA	-DTT***V**	*****
Allele K ₁₄	**T*K**Y**	*****L**	**FH***F*	***TRL*RVP	GGDRARAAGR	QVLEQPEGLP	GRKT**RGWTPY	****FR*SVR	VSLCSG
Allele C ₁₁	**T*K*****	*****	**FH***F*	*****Y*	*****P**	K*****	****A**TH	*****VG**	***HG
Allele P ₄₂	**T*K**Y**	*****	**FH***F*	*****Y*	*****P**	*****	****A**TY	*****VG**	***QRR
Allele B ₇₁	**T*KDVISS	T*PSGCGSWT	DTSIMEKSSC	AST*****Y*	*****P**	K*****	****AACGHV	LQTH**VG**	***QRR
Allele D ₂₄	*****	*****E	**FY*****	*S*****Y*	*****P**	*****E *	RRG*****	**P*****R.	
Allele C ₄₂	*****	*****E	*SFY***N*	*S*****Y*	*****P**	*****E *	RRG*****	**P*****R.	
Allele C ₆₁	*****	*****E	*SFY***N*	*S*****Y*	*****P**	*****E *	**R***EGL	*****VG**	***QRR

Identical aminoacid with respecto to the sequence DRB3*0101

-Aminoacid-free positions with respect to the sequence DRB3*0101

Bold letters idicate allele differences with respect to the consensus sequence DRB3*0101

presente y a partir de ese punto la cadena peptídica es diferente a la codificada por el DRB3*0201. Por el contrario, es evidente que las diferencias peptídicas del 49 % entre las secuencias codificadas por el alelo K₁₄ y el alelo DRB3*1601 se deben a los múltiples cambios nucleotídicos que tuvo dicha muestra: una inversión CT en la posición 30 y 31, cambios de C, C, A, C y T en las posiciones 61, 110, 195, 199 y 238, respectivamente; presentó inserciones sencillas de A, C, G y C en las posiciones 109, 205, 210 y 219, respectivamente; tuvo también dobles inserciones de CT y CG en las posiciones 193 y 240, respectivamente. A pesar de todas estas diferencias nucleotídicas, la homología entre el alelo K₁₄ y el alelo DRB3*1601 fue del 94 %.

El alelo C₁₁ tuvo sólo la inserción de una G en la posición 10 y un 99 % de homología de ADN con el alelo DRB3*1601, mientras que entre las secuencias peptídicas la homología fue de un 98 % (Cuadro 2). El alelo P₄₂ presentó un 99 % de identidad con el alelo DRB3*1601 mostrando una inversión de C por T en las posiciones 30 y 31, estos cambios generan un péptido cuya homología con el codificado por DRB3*1601 fue del 98 %. Se puede especular entonces, que la naturaleza de la cadena se conserva.

Cuatro alelos de las clonas estudiadas tuvieron un 98 % de identidad con alelos ya reportados. La clona B₇₁ tuvo deleciones en las posiciones 27 y 228, una A en la posición 205 y una inserción de T en la 206. Estos cambios la hacen 98 % homóloga al alelo DRB3*1601 y los péptidos codificados tienen una identidad del 84 % al compararlos entre sí.

El alelo D₂₄ tuvo una A en la posición 45, una doble inserción de AC en la posición 190 y una inserción de A en la 202; su identidad máxima fue de 98 % con el alelo DRB3*0201 y la homología entre los péptidos que codifican se mantuvo en un 95 %.

El alelo C₄₂ tuvo una homología del 98% con dos alelos diferentes, el DRB3*1202 y el DRB3*0902. Los cambios que tuvo la secuencia de esta muestra

DRB3*1601 allele, whereas their peptide sequences had a homology of 98 % (Table 2). The P₄₂ allele exhibited a 99 % identity with the DRB3*1601 allele showing an inversion of a C for a T in the positions 30 and 31. These changes generate a peptide whose homology to the one encoded by the DRB3*1601 allele was 98 %. It is possible to speculate then, that nature of the chain is conserved.

Four alleles of the studied clones had a 98 % identity to previously reported alleles. The allele B₇₁ had deletions in the positions 27 and 228, an A in the position 205 and a T insertion in the position 206. These changes make it 98 % homologous to the DRB3*1601 allele and the encoded peptides have an identity of 84 % when compared to each other.

The D₂₄ allele had an A in the position 45, a double insertion of AC in the position 190 and an A insertion in the 202 position; its maximum identity was 98 % with the DRB3*0201 allele and the homology between the encoded peptides remained a 95 %.

The C₄₂ allele has a homology of 98 % with two different alleles, DRB3*1202 and DRB3*0902. The changes that this sequence had with respect to the consensus sequence were: a C in the position 104 and a G in the position 240, an inversion AG in the position 190, it has changes in the whole codon AGA in the position 193 and GGC in the 196 position, a CG in the position 241 and a T insertion in the position 244. The peptide that is generated has an identity of 95 % with the sequences encoded by the alleles DRB3*1202 and DRB3*0902.

The allele of the C₆₁ clone has an identity of 98% with the DRB3*0902 allele, which, along with other DQA, DQB and DRB2 alleles, has been reported as a resistance factor to persistent lymphocytosis⁽¹⁴⁾. The sequence of the C₆₁ allele has an A in the position 213, a G in the position 214 and a T in the position 217. These nucleotide changes result in a peptide whose homology to the one encoded by the DRB3*0902 allele is 95 %.

Taking into account that the genetic code is "redundant and degenerate"⁽¹⁵⁾, the small decreases

con respecto a la consenso son: una C en la posición 104 y una G en la 240, una inversión AG en la posición 190, tiene cambios de codón completo de AGA en la posición 193 y de GGC en la 196, un CG en la posición 241 y una inserción de T en la 244. El péptido que genera tiene una identidad del 95 % con las secuencias codificadas tanto por el alelo DRB3*1202 como por el DRB3*0902.

El alelo de la clona C₆₁ tiene una identidad del 98% con el alelo DRB3*0902, mismo que junto con otros alelos DQA, DQB y DRB2, ha sido reportado como factor de resistencia a linfocitosis persistente⁽¹⁴⁾. La secuencia del alelo C₆₁ presenta una A en la posición 213, una G en la posición 214 y una T en la 217. Estos cambios nucleotídicos dan como resultado un péptido cuya homología con respecto al codificado por el DRB3*0902 es del 95 %.

Tomando en cuenta que el código genético es “redundante y degenerado”⁽¹⁵⁾, se pueden atribuir a este hecho las disminuciones pequeñas en la homología de secuencias de ADN y secuencias de aminoácidos, como en el caso de los alelos de las clonas D₂₄, C₁₁ y P₄₂. En virtud de esta “degeneración” del código genético, los alelos que tienen inversiones de nucleótidos pueden estar codificando al mismo aminoácido que la secuencia consenso y la secuencia de mayor similitud que no poseen dichas inversiones, como es el caso de las clonas K₁₄ y C₄₂.

En general, las secuencias definidas en este estudio muestran variaciones importantes materializadas en sustituciones no homólogas (no silenciosas). Esto confirma lo reportado por otros investigadores⁽¹⁶⁾, quienes afirmaron que la mayoría de la variación de las secuencias alélicas en los genes de clase II se encuentra dentro del segundo exón, y más aún, que los sitios de unión a antígeno codificados en el segundo exón muestran un exceso significativo de sustituciones no silenciosas, no así en otros sitios del exón 2, indicando que la selección diversificante está restringida a los sitios responsables de la unión a antígeno⁽¹⁷⁾.

Respecto a las diferencias encontradas al comparar los péptidos de la secuencia consenso con los

in homology of the DNA and aminoacid sequences can be explained, like in the case of the alleles of the clones D₂₄, C₁₁ y P₄₂. In virtue of this “degeneracy” of the genetic code, the alleles that have nucleotide inversions can code for the same aminoacid than the consensus sequence and than the sequence with greatest similarity, even though these do not contain such inversions, as in the case of the clones K₁₄ and C₄₂.

In general, the sequences defined in this study show important variations expressed in non-homologous substitutions (non silent). This confirms the reports of other researchers⁽¹⁶⁾, who assured that most of the variation in the allelic sequences of the class II genes are within the second exon, moreover, that the antigen binding sites encoded by the second exon show a significant excess of non-silent substitutions, as opposed to other sites in the exon 2, indicating that the diversifying selection is restricted to the sites responsible for the antigen binding⁽¹⁷⁾.

Regarding the differences found when comparing the peptides of the consensus sequence and the ones deduced from the newly analysed sequences in this study (Table 2) it should be considered that, in the class II BoLA molecules, the change of one single aminoacid in the antigen binding site, strongly influences the strength and specificity of such binding⁽¹⁸⁾. It can be said then, that the peptide differences of the sequences here reported with respect to ones officially published, have a direct impact on the nature of the antigenic peptides that will be recognised by the class II BoLA molecules in the mexican Creole cattle and, consequently, on the immune response triggered against such antigenic peptides.

Considering that in future studies the genetic analysis of the BoLA-DRB3.2 is required and that the sequence-based tipification is expensive, a simulated RFLP's analysis was performed in order to report the RFLP patterns that are obtained from the new alleles here studied. This enzymatic restriction was done using the enzymes RsaI, BstYI and HaeIII as proposed in previous studies^(19,20) for the BoLA tipification. The results are shown in Table 3.

péptidos deducidos de las nuevas secuencias analizadas en este estudio (Cuadro 2) se debe considerar que en la molécula BoLA clase II, el cambio de un solo aminoácido en el sitio de unión a antígeno afecta fuertemente la avidéz y especificidad de esa unión⁽¹⁸⁾. Se puede aseverar entonces, que las diferencias peptídicas de las nuevas secuencias aquí reportadas con respecto a las oficialmente publicadas, tienen injerencia directa sobre la naturaleza de los péptidos antigénicos que serán reconocidos por las moléculas del BoLA clase II del Criollo Mexicano y, consecuentemente, sobre la respuesta inmune montada contra los patógenos que generan tales péptidos antigénicos.

Tomando en cuenta que en estudios futuros se requiera el análisis genético del BoLA-DRB3.2 y que la tipificación basada en secuenciación es cara, se realizó un análisis simulado de RFLP's para reportar los patrones que se obtienen de los alelos nuevos aquí estudiados. Esta restricción enzimática se hizo utilizando las enzimas RsaI, BstYI y HaeIII propuestas en otros estudios anteriores^(19,20) para la tipificación del BoLA. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.

Las secuencias de los alelos A₁₆, P₄₂, C₄₂ y C₆₁ restringidas dieron fragmentos de tamaños reportados para cada enzima; sin embargo, la combinación de las literales correspondientes de las tres enzimas no dieron como resultado un patrón reportado al que pueda ser asignado un alelo.

La digestión del alelo B₇₁ dió fragmentos reportados para las enzimas BstYI y HaeIII pero no para RsaI, de manera que no puede asignársele un número de alelo. El alelo C₁₁ dió un fragmento reportado sólo para la enzima BstYI. Los alelos K₁₄ y D₂₄ dieron fragmentos de tamaños que no corresponden a ningún patrón para ninguna de las enzimas. Las variaciones de los tamaños restringidos con respecto a los reportados oficialmente se deben, evidentemente, a que algunos de los nuevos alelos aquí reportados tienen inserciones o deleciones en la secuencia.

Los patrones de restricción aquí obtenidos no corresponden a los reportados previamente⁽⁹⁾

Cuadro 3. Restricción enzimática simulada sobre las secuencias obtenidas de los nuevos alelos

Table 3. Simulated enzymatic restriction of the new alleles sequences

CLONE	ENZYME		
	RsaI	BstYI	Hae III
A ₁₆	141/39/50/51 (e)	195/86 (c)	167/48/66 (c)
K ₁₄	142/39/59/52	292	168/54/70
C ₁₁	142/39/103	284 (b)	168/52/64
P ₄₂	141/39/54/50 (f)	284 (b)	167/52/65 (a)
B ₇₁	141/39/55/49	284 (b)	167/52/65 (a)
D ₂₄	142/39/54/50	197/88	168/52/65
C ₄₂	141/39/105 (n)	87/112/86 (e)	167/47/5/66 (a)
C ₆₁	180/104 (n)	87/112/85 (e)	167/52/65 (a)

The resultant pattern for each enzyme is indicated in parenthesis

The sequences of the alleles A₁₆, P₄₂, C₄₂ and C₆₁ restricted gave fragment sizes according to the ones reported for each enzyme; however, the combination of the corresponding letters for the three enzymes did not give reported patterns to which an allele can be assigned.

The digestion of the B₇₁ allele resulted in fragments sizes reported for the enzymes BstYI and HaeIII but not for RsaI, so an allele number cannot be assigned to it. The C₁₁ allele gave a fragment size reported only for the enzyme BstYI. The alleles K₁₄ and D₂₄ gave fragment sizes that do not correspond to any of the patterns for any of the enzymes. The size variations of the restricted fragments, regarding the ones officially reported are due, evidently, to the fact that some of the new alleles reported here have insertions or deletions in their sequences.

The restriction patterns here obtained do not correspond to the ones previously reported⁽⁹⁾ when analysing the same clones. This can be due to a confusion in the sample management during the study or in their transport process. Another possibility is that a non-verifiable error in a critical point of the analysis was committed in that study. It is important, however, to point out that a restriction analysis based on the knowledge of the

habiendo analizado las mismas clonas. Esto puede deberse a una confusión en el manejo de las clonas durante el estudio o en el proceso de transporte de las mismas. Otra posibilidad es que haya habido en aquel estudio un error no verificable en algún punto crítico del análisis o del estudio de las muestras. Es importante, sin embargo, señalar que un análisis de restricción basado en el conocimiento de la secuencia de un fragmento de ADN es más preciso que aquel realizado directamente (no en simulación) sobre el material genético.

De las 10 clonas analizadas por secuenciación del BoLA-DRB3, las clonas L₈₂ y Q₁₃ dieron homologías del 100% con los alelos DRB3*1501 y DRB3*1602 previamente reportados^(19,21,22). Tres clonas mostraron homologías del 99 % con respecto a alelos reportados, cuatro mostraron homologías del 98 % y una tiene 94 % de identidad con un alelo ya reportado.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se logró la genotipificación de ocho nuevos alelos BoLA-DRB3.2 detectados en ganado Criollo mexicano, cumpliendo así con el objetivo principal de este trabajo. La técnica SBT mostró ser útil y efectiva para definir las secuencias de los nuevos alelos encontrados en un estudio anterior, de cuyos resultados se partió para la realización de esta investigación. Se recomienda la realización de estudios de inmunogenética con los nuevos alelos identificados, que permitan comprobar la relación enfermedad/resistencia-BoLA-DRB3.2 que se ha postulado para el ganado Criollo mexicano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean mostrar su aprecio al Dr. Héctor Osbaldo Rubio Arias, Investigador del INIFAP por su ayuda y comentarios para mejorar el presente manuscrito y al Dr. Rogelio Alonso, Profesor-Investigador de la Facultad de Medicina y Veterinaria por proporcionarnos las clonas estudiadas.

DNA sequence of a fragment is more precise than that performed directly (not simulated) on the genetic material.

Out of the 10 clones analysed by sequencing of the BoLA-DRB3, the clones L₈₂ and Q₁₃ gave homologies of 100% with the alleles DRB3*1501 and DRB3*1602 previously reported^(19,21,22). Three clones showed homologies of 99 % when compared to the reported alleles, four showed 98 % homologies and one has 94 % identity with a reported allele.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The genotyping of eight new BoLA-DRB3.2 alleles detected in Mexican Creole cattle was accomplished, fulfilling the objective of this work. The SBT technique proved to be useful and effective to define the sequences of the new alleles found in a previous study, the results of which were the starting point for this research. It is recommended to perform immunogenetic studies with the newly identified alleles, so the disease/resistance-BoLA-DRB3.2 relationship that has been postulated for the Mexican Creole cattle can be confirmed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to show their gratitude to Dr. Héctor Osbaldo Rubio Arias, INIFAP's researcher, for his help and comments to improve this manuscript and to Dr. Rogelio Alonso, Professor-Researcher in the Department of Veterinary Medicine and Zootechny of the UNAM for providing us with the clones studied.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. SDR. Secretaría de Desarrollo Rural. Informe estadístico de la movilización de ganado en el estado de Chihuahua 1998-2003. Área de informática y estadística ganadera. Chihuahua. 2003.
2. Ríos RJG. El ganado Criollo, un auténtico producto Chihuahuense de exportación. Síntesis Agropecuaria 1997:3-5.

SECUENCIA DE ALELOS BoLA-DRB3.2 EN GANADO CRIOLLO

3. Rios RJG, Rodríguez AF, Espinoza VJI, Fierro LC. Los Criollos para rodeo y su contribución hacia la sustentabilidad de los sistemas de producción. IV Congreso Iberoamericano de Razas Autóctonas y Criollas. Tampico, Tams. 1998:198-204.
4. Félix-Portillo M. Implementación de la técnica para la tipificación de antígenos de histocompatibilidad de bovino (BoLA) [tesis licenciatura]. Chihuahua, Chih: Universidad Autónoma de Chihuahua; 2002.
5. Sitte K, Brinkworth R, East IJ, Jazwinska EC. A single aminoacid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Veter Immunol Immunopath* 2002;(85):129-135.
6. Maillard JC, Berthier D, Chantal I, Thevenon S, Sidibe I, Stachurski F, Belemsaga D, Razafindraibe H, Elsen JM. Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genet Sel Evol* 2003;35(Suppl 1):193-200.
7. Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scout HM, Dekkers JCM, Leslie KE. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim Gen* 1998;(29):185-193.
8. Fernández, GI, Ríos, RJG, Alonso MR, Gayosso, VA, Castro, MC 2002. Frecuencias génicas en el locus DRB3.2 en ganado bovino Criollo del norte de México. XXXVIII Reunión anual de investigación pecuaria. INIFAP. Puebla, México. 2002.
9. Fernández GIG. Frecuencias génicas del locus DRB3.2 en ganado bovino Criollo del Norte de México [tesis doctoral]. Chihuahua, Chih: Universidad Autónoma de Chihuahua; 2001.
10. Leyva BI. Genotipificación y análisis del locus DRB3.2-BoLA mediante PCR-RFLP y clonación en dos poblaciones de ganado Criollo [tesis maestría]. Chihuahua, Chih: Universidad Autónoma de Chihuahua; 2002.
11. Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW. Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor Laboratory. 1984.
12. National Center for Biotechnology Information, NCBI [on line] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>. Accessed: February 15, 2004.
13. European Molecular Biology Open Software Suite, EMBOSS [on line] http://ngfnblast.gbf.de/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=restrict. Accessed: April 15, 2004.
14. Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri E, Russo S, Lewin HA, van Eijk MJT. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genetics* 1996;(27):337-341.
15. Lewin B. *Genes VII*. 7ma. edición Madrid, España: Editorial Marbán Libros, S.L.; 2001.
16. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;(364):33-39.
17. Hughes AL, Yeager M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Ann Rev Genetics* 1998;(32):415-435.
18. Sitte K, Brinkworth R, East IJ, Jazwinska EC. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Veter Immunol Immunopath* 2002;(85):129-135.
19. Gelhaus A, Schnittger L, Mehlitz D, Horstman RD, Meyer CG. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. *Anim Gen* 1995;(26):147-153.
20. van Eijk MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. Extensive polymorphisms of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Gen* 1992;(23):483-496.
21. Mikko S, Spencer M, Morris B, Stabile S, Basu T, Stormont C, Andersson L. A comparative analysis of Mhc DRB3 polymorphisms in the American Bison (*Bison bison*). *J Heredity* 1997;(88):499-503.
22. Mikko S, Andersson L. Extensive MHC classII DRB3 diversity in African and European cattle. *Immunogenetics* 1995;(42):408-413.

