ITEA (2000). Vol. **96A N.° 3,** 169-172

CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ALELOS MHC-DRB DE CABRA MONTESA (*CAPRA PYRENAICA*)

M. Amills*, N. Jiménez*, A. Riccardi*, J. Folch, A. Sánchez***

* Unitat de Genètica, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, España

** Unidad de Tecnología en Producción Animal, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Diputación general de Aragón, Apdo. 727, 50080 Zaragoza, España

RESUMEN

En el presente trabajo, se ha caracterizado el polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la cabra montesa *(Capra pyrenaica)*. Con esta finalidad, se secuenció el exón 2 del gen *DRB* en seis individuos no emparentados procedentes de distintas áreas geográficas. Únicamente se detectaron 2 tipos alélicos que presentaban una similitud nucleotídica del 83%. Ello indica que el polimorfismo del gen *DRB* en la cabra montesa es muy limitado, probablemente debido a los cuellos de botella poblacionales que esta especie sufrió durante los s. XIX y XX. Estos resultados serán de gran interés en la caracterización genética de la cabra montesa, contribuyendo a establecer un criterio de selección, respecto a la reintroducción de esta especie en áreas geográficas en las que su tamaño efectivo se haya reducido significativamente, basado en la utilización de marcadores genéticos.

SUMMARY

We have characterized the polymorphism of the major histocompatibility complex (MHC) in the Spanish ibex *(Capra pyrenaica)* by sequencing the second exon of the *DRB* gene in six unrelated individuals from different geographic areas. Our results demonstrate that the polymorphism of the *DRB* gene is very reduced in the Spanish ibex, with only two major allelic lineages which show 83% nucleotide similarity. These results are likely explained by the severe population bottlenecks that this species suffered in the XIX and XX centuries. These results will contribute to the genetic characterization of the Spanish ibex and to the establishment of selection criteria for the reintroduction of this species.

Introducción

La cabra montesa *(Capra pyrenaica)* es un cáprido salvaje autóctono de la Península Ibérica estrechamente emparentado con el ibex alpino *(Capra ibex)*. La distribución geográfica de esta especie comprende los macizos montañosos del centro (Gredos y Batuecas) y este (Beceite-Tortosa, Muela de Cortés, Cazorla, Nevada y Ronda) de la Península. Aunque inicialmente existían cuatro subespecies de cabra montesa, *C. p. hispanica* (CPH), *C. p. victoriae* (CPV), *C. p. lusitanica* (CPL) y *C. p. pyrenaica* (CPP), la caza excesiva y la progresiva destrucción de su hábitat natural posiblemente propició la extinción de CPL y CPP (MANCEAU, 1992).

La caracterización genética de la cabra montesa constituiría una herramienta fundamental para diseñar estrategias óptimas de repoblación en aquellas zonas geográficas en las que esta especie haya experimentado un declive demográfico. De este modo, podría implementarse la reintroducción de nuevos ejemplares que aporten variabilidad genética adicional a las poblaciones receptoras, incrementando su eficacia biológica global. El gen *DRB* del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tiene un profundo efecto sobre la resistencia genética a numerosas enfermedades y además presentan niveles muy elevados de polimorfismo, por lo que constituiría un excelente marcador genético para seleccionar ejemplares destinados a la repoblación de áreas que posean un bajo número efectivo de individuos. En el presente trabajo, se ha evaluado la variabilidad del exón 2 del gen MHC-*DRB* de cabra montesa (*Capy-DRB*) mediante clonación y secuenciación de producto *DRB* amplificado a partir de seis individuos de distinta procedencia geográfica y subespecie.

Material y métodos

Los ejemplares de cabra montesa analizados, su procedencia geográfica y subespecie, y el alelo *DRB* identificado en cada uno de ellos pueden observarse en el cuadro 1. La amplificación del segundo exón del gen DRB se realizó de acuerdo a Amills et al (1996). El producto amplificado fue clonado en un plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y secuenciado en ambas direcciones mediante el kit ABI PRISM Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron analizadas en un secuenciador ABI 373 (Perkin Elmer Biosystems). Los alineamientos de las secuencias se realizaron mediante el programa CLUSTALW.

Resultados y discusión

La molécula DR del MHC de clase II tiene como función primordial la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T *helper*, jugando por ello un papel clave en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Hughes y Yeager 1998). Los dominios α_1 y β_1 de la molécula DR codifican el lugar de unión al antígeno o ABS (*antigen-binding site*), una estructura en forma de surco capaz de acomodar péptidos de 13-21 aminoácidos para que puedan ser reconocidos por el receptor del linfocito T (HUGHES y YEAGER, 1998). El exón 2 del gen *DRB*

Cuadro 1
Procedencia, subespecie y alelo identificado en cada uno de los individuos analizados

Individuo	Procedencia	Subespecie	Alelo
128	Muela de Cortés	CPH	Capy-DRB1.1
B24	Beceite-Tortosa	CPH	Capy-DRB1.2
187	Batuecas	CPV	Capy-DRB1.3
66	Gredos	CPV	Capy-DRB1.4
150	Beceite-Tortosa	CPH	Capy-DRB1.5
183	Batuecas	CPV	Capy-DRB1.6

codifica el dominio β_1 de la molécula DR y posee una elevada variabilidad en especies como la vaca (63 alelos), la oveja (70 alelos) y la cabra doméstica (28 alelos) (AMILLS *et al.*, 1998). Paradójicamente, los resultados obtenidos en cabra montesa demuestran que los niveles de variabilidad del exón 2 del gen *DRB* son muy bajos en esta especie (ver cuadro 1). Sólo se encontraron 2 tipos mayoritarios de alelos: uno de ellos incluye los alelos *Capy-DRB1.1* y *Capy-DRB1.2*, mientras que el otro comprende los alelos *Capy-DRB1.3*, *Capy-DRB1.4*, *Capy-DRB1.5* y *Capy-DRB1.6*. La similitud nucleotídica promedio entre ambos grupos de aproximadamente el 83%. La similitud nucleotídica promedio intragrupo, en cambio, fue muy elevada y oscilaba entre el 98-99,5%.

Los resultados obtenidos indican bajos niveles de polimorfismo en el gen *DRB* y concuerdan con los datos obtenidos por JIMÉNEZ *et al.* (1999), que indicaban la existencia de bajos niveles de variabilidad genética en las distintas subespecies de cabra montesa. Las poblaciones de cabra montesa han sufrido importantes cuellos de botella poblacionales durante los s. XIX y XX, con tamaños efectivos que en algunos núcleos no sobrepasaban los 30 individuos (MANCEAU, 1992). Probablemente, ello haya favorecido el mantenimiento de determinados tipos alélicos por un mero efecto de deriva genética.

En general, se asume que el extraordinario polimorfismo detectado en los genes MHC de humano, ratón y otras especies resulta necesario para asegurar la presentación efectiva de un amplio espectro de péptidos de distinta secuencia y longitud a los linfocitos T (HUGHES y YEAGER, 1998). En otras palabras, la gran variabilidad genética del MHC sería una condición necesaria para que estas especies animales pudieran generar una respuesta inmune adaptativa eficiente contra una gran variedad de microorganismos patógenos (MIKKO *et al.*, 1999). No obstante, existen numerosos ejemplos de especies animales (*Alces alces, Castor fiber, Panthera leo persica, Ovibos moschatus* etc.) en las que a pesar de que existe un reducido polimorfismo a nivel del MHC (MIKKO *et al,*. 1999) no se observa una mayor susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas. Aunque la resolución de esta aparente paradoja todavía sigue pendiente, la caracterización del gen *DRB* y otros genes MHC en la cabra montesa contribuirá decisivamente a comprender mejor la interacción de esta especie con los microorganismos patógenos de su entorno natural. Asimismo, el gen *DRB* podría ser incluido como marcador genético para seleccionar individuos destinados a repoblar áreas geográficas en las que esta especie escasee.

Bibliografía

AMILLS *et al.*, 1996. Vet. Immunol. Immunopathol. 55: 255-260

AMILLS *et al.*, 1998. Rev. Sci. Tech. 17:108-20.

HUGHES y YEAGER, 1998. Annu. Rev. Genet. 32: 415-435.

JIMÉNEZ *et al.*, 1999. ITEA 20: 300-302.

MANCEAU, 1992. Polymorphisme des sequences d'ADN mitochondrial dans le genre Capra. Application a la conservation du bouquetin des Pyréneées. Tesis Doctoral (CNRS UMR 5553).

MIKKO *et al.*, 1999. Immunol. Rev. 167: 169-178.

```
                1                                                  50
Capy-DRB1.1 CTGGAGTATT ATAAGGCCGA GTGTCATTTC TCCAACGGGA CCGGGCGGGT
Capy-DRB1.2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Capy-DRB1.3 ---AG----- G----AGA-- ---------- -----T---- ---A------
Capy-DRB1.4 ---AG----- G----AGA-- ---------- -----T---- ---AA-----
Capy-DRB1.5 ---AG----- G----AGA-- ---------- -----T---- ---A------
Capy-DRB1.6 ---AG----- G----AGA-- ---------- -----T---- ---A------

               51                                                 100
Capy-DRB1.1 GCGGTTGCTG CACAGATTCT ACACTAATGG AGAAGAGACC GTGCGCTTCG
Capy-DRB1.2 ---------- ---------- ----C----- ---------- ----------
Capy-DRB1.3 ----C-T--- G------A-- T-CAT----- G-------T- ----------
Capy-DRB1.4 ----C-T--- G------A-- T-CAT----- --------T- ----------
Capy-DRB1.5 ----C-T--- G------A-- T-CAT----- --------T- ----------
Capy-DRB1.6 ----C-T--- G------A-- T-CAT----- --------T- ----------

              101                                                 150
Capy-DRB1.1 ACAGCGACTG GGGCGAGTTC CGGGCGGTGA CCGAGCAGGG GCAGGAGGAC
Capy-DRB1.2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Capy-DRB1.3 ---------- ---------- -----A---- -------T--- --G-CC---T
Capy-DRB1.4 ---------- ---------- -----A---- -------T--- --G-CC---T
Capy-DRB1.5 --G------- ---------- -----A---- -------T--- --G-CC---T
Capy-DRB1.6 ---------- ---------- -----A---- -------T--- --G-CC---T

              151                                                 200
Capy-DRB1.1 GCCGAGTACT GGAACAGCCA GAAGGACTTC CTGGAGCAGA AGCGGGCCGA
Capy-DRB1.2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Capy-DRB1.3 ---------- ---------- ------GA-- ------AGC- G-A--A---C
Capy-DRB1.4 ---------- ---------- ------GA-- ------AGC- G-A--A---C
Capy-DRB1.5 ---------- ---------- ------GA-- ------AGC- G-A--A---C
Capy-DRB1.6 ---------- ---------- ------GA-- ------AGC- G-A--A---C

              201                                  237
Capy-DRB1.1 GGTGGACACG GTGTGCAGAC ATAACTACGG GGTCCTT
Capy-DRB1.2 ---------- ---------- ---------- -------
Capy-DRB1.3 ---------- TAC------T -C--------- ----GG-
Capy-DRB1.4 ---------- TAC------T -C--------- ----GG-
Capy-DRB1.5 ---------- TAC------T -C--------- ----GG-
Capy-DRB1.6 ---------- TAC------T -C--------- ----GG-
```

Figura 1. Alineamiento CLUSTALW de secuencias *Capy-DRB* (exón 2)