



## APLICACIÓN DEL MÉTODO BAYESIANO PARA EL ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN DRB1.2 Y LA RESISTENCIA A PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN LA RAZA CORRIEDALE

Nicolini, M.P<sup>1</sup>; Kelly, L<sup>1</sup>; Ciappesoni, G<sup>2</sup>; Castells, D<sup>3</sup> & Postiglioni, A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Area Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. A. Lasplacas 1550.

Montevideo-Uruguay. E-mail: paula.nicolini@gmail.com.

<sup>2</sup> INIA-Las Brujas. Ruta 48. Km 10. Rincón del Colorado, Canelones-Uruguay.

<sup>3</sup> CIEDAG-SUL. Ruta 7. Km. 140. Cerro Colorado, Florida-Uruguay.

### RESUMEN

Las parasitosis gastrointestinales (PGI) constituyen una de las principales limitantes sanitario-económicas de la producción ovina en Uruguay. Como control complementario al actual tratamiento con drogas antihelmínticas, se ha propuesto la inclusión de ovinos resistentes a estas parasitosis en los esquemas de producción. Una aproximación a la identificación de animales resistentes está dada por la caracterización de marcadores genéticos. El gen DRB1 del Complejo Mayor de Histocompatibilidad ovino (Ovar) se considera candidato en este sentido. El objetivo de este trabajo es aplicar un enfoque Bayesiano al estudio de asociación entre el polimorfismo del gen DRB1 y la resistencia/susceptibilidad a las PGI en 39 corderos Corriedale pertenecientes a 9 familias de medio-hermanos paternos, evaluados para resistencia genética a PGI a través del recuento de huevos del parásito en fecas (HPG). En los 9 carneros padres se tipificó el exón 2 del Ovar-DRB1 mediante PCR(semianidado)-RFLP(Rsal), detectándose los siguientes genotipos RFLP: Rs6/Rs6, Rs7a/Rs7a, Rs6/Rs7a, Rs6/Rs13, Rs7a/Rs13, Rs11/Rs11, Rs1/Rs13 y Rs13/Rs13. Se utilizó el método Bayesiano para evaluar el efecto de los genotipos RFLP paternos sobre el recuento de HPG de los corderos. Los resultados indican que los genotipos con efectos sobre el fenotipo HPG se agrupan en: 1) genotipos que disminuyen el recuento de HPG (Rs6/Rs6); 2) genotipos que aumentan el recuento de HPG (Rs6/Rs13, Rs6/Rs7a y Rs13/Rs13) y 3) genotipos que producen tanto aumentos como disminuciones en el recuento de HPG (Rs11/Rs11, Rs1/Rs13 y Rs7a/Rs13). El efecto observado para los genotipos Rs6/Rs6 y Rs13/Rs13 concuerdan con los resultados obtenidos para la misma muestra mediante procedimientos estadísticos frecuentistas como lo es el GLM (General Linear Model).

### INTRODUCCIÓN

La raza Corriedale representa el 60% de las razas ovinas explotadas en el Uruguay. Una de las principales limitantes sanitario-económicas de su producción está determinada por las parasitosis gastrointestinales (PGI). El tratamiento de estas infecciones con drogas antihelmínticas se ha visto amenazado por el desarrollo de resistencia parasitaria a las mismas. Como control com-

plementario se ha propuesto la inclusión de ovinos resistentes a estas parasitosis en los esquemas de selección. Una aproximación a la identificación de animales resistentes está dada por la caracterización de marcadores genéticos de resistencia/susceptibilidad a estas infecciones. Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), por tener una participación clave en la respuesta inmunitaria en vertebrados, se consideran candidatos a ser utilizados en este sentido. En particular, los estudios se han centrado en el gen DRB1, ya que, debido al extenso polimorfismo que presenta en su exón 2, codificante de la región de reconocimiento de péptidos antigénicos, permite responder a una amplia gama de antígenos. El objetivo del presente trabajo es aplicar un enfoque Bayesiano para el análisis de asociación entre el polimorfismo del gen Ovar-DRB1.2 y la resistencia/susceptibilidad a las PGI en ovinos Corriedale pertenecientes a 9 familias de medio-hermanos paternos evaluadas para resistencia genética a PGI a través del recuento de HPG. El método Bayesiano consiste en obtener una función densidad de probabilidad para determinado parámetro de interés, o lo que es lo mismo, la distribución de posibles valores del parámetro. Utilizando el procedimiento de Cadena de Markov Monte-Carlo (MCMC) se obtienen muestras aleatorias de dicha distribución.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con una muestra de 39 corderos Corriedale y sus 9 carneros padres. La muestra de corderos pertenece a una población de 399 animales, utilizada en la Prueba de Progenie 2002 realizada por el Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) para evaluar los carneros respecto a la resistencia genética a PGI a través del recuento de HPG. Se realizaron 2 muestreos de materias fecales, uno a los 8 meses (HPG1) y otro a los 11 meses de edad (HPG2). Al momento de cada muestreo los corderos fueron desparasitados con Ivermectina+Levamisol. A partir de la distribución normalizada del recuento de HPG (transformación logarítmica de HPG1 y HPG2) obtenida para la población de 399 corderos se seleccionó una muestra de 39 corderos: 20 corderos del extremo de Bajo HPG (promedio de 410 HPG) y 19 corderos del extremo de Alto HPG (promedio de 4347). A partir de las muestras sanguíneas de los 9 carneros padres se extrajo ADN genómico mediante la técnica fenol cloroformo (John et al., 1991). La



tipificación del exón 2 del gen Ovar-DRB1 se realizó mediante PCR (semianidado)-RFLP(Rsal) (van Eijk et al., 1992). El análisis de asociación entre el polimorfismo RFLP del Ovar-DRB1.2 y el fenotipo HPG se realizó mediante el método Bayesiano para evaluar las diferencias entre los efectos de los genotipos RFLP paternos (Gx-Gy) sobre la variación del recuento promedio de HPG1 y HPG2 de los corderos. Se aplicó el programa WinBUGS 1.3 (Spiegelhalter et al., 2000) utilizando el procedimiento MCMC con 10.000 iteraciones para estimar la función densidad de probabilidad para las diferencias entre los efectos de los genotipos paternos. Dado que en ovinos una diferencia de 500 HPG es relevante a la hora de monitorear las poblaciones para aplicar el correspondiente tratamiento antihelmíntico, se buscó determinar cuales eran los genotipos paternos cuyo efecto, en relación con el resto de los genotipos, y con probabilidades iguales o superiores al 80%, resultaba en una disminución o un aumento de 500 HPG en el recuento de HPG de los corderos. Asimismo, también se determinó cuales eran los genotipos que significaban una diferencia aun mayor (1000 HPG) entre efectos genotípicos. Cuando el signo del valor de la media para la diferencia entre los efectos genotípicos es negativo, esto implica que el genotipo Gx produce una disminución de 500 HPG (o de 1000 HPG) en el recuento de HPG de los corderos respecto al genotipo Gy. Por otra parte, cuando el signo del valor de la media es positivo, significa que el genotipo Gx aumenta el recuento de HPG en 500 HPG (o 1000 HPG), respecto al genotipo Gy.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados en la Tabla I indican que, respecto al genotipo paterno Rs6/Rs7a, los genotipos Rs6/Rs6, Rs1/Rs13 y Rs11/Rs11, tienden a disminuir el recuento de HPG de corderos en un valor de 500 huevos. En relación con el genotipo Rs6/Rs13, el genotipo Rs11/Rs11 produce una disminución de 500 HPG en el recuento de HPG. Por otra parte, en referencia al genotipo Rs7a/Rs13 se observa con alta probabilidad, que el genotipo Rs6/Rs6 implica una disminución de 500 HPG en el recuento de HPG, que el genotipo Rs6/Rs13 produce aumentos de 500 y de 1000 HPG y que el genotipo Rs6/Rs7a genera un aumento de 1000 HPG en el recuento de HPG de los corderos. Asimismo, respecto al genotipo Rs6/Rs6, mientras que el genotipo Rs11/Rs11 genera aumentos de 500 y de 1000 HPG en el recuento de HPG de los corderos, el genotipo Rs6/Rs13, implica un aumento de 500 HPG, mientras que el genotipo Rs1/Rs13 produce el aumento de 1000 HPG. En relación con el genotipo Rs7a/Rs7a, el genotipo Rs1/Rs13 implica tanto aumentos de 500 HPG como de 1000 HPG en el recuento de HPG, mientras que el genotipo Rs13/Rs13 produce el aumento de 500 HPG. Finalmente, el genotipo Rs13/Rs13 genera, con una probabilidad del 92%, aumentos de 1000 HPG en el recuento de HPG de los corderos, respecto al genotipo Rs1/Rs13.

A partir de estos resultados se observa que los

genotipos paternos con efectos sobre el recuento de HPG de los corderos pueden dividirse en 3 grupos: 1) genotipos cuyo efecto produce solo disminuciones en el recuento de HPG (Rs6/Rs6); 2) genotipos que solamente producen aumentos en el recuento de HPG (Rs6/Rs13, Rs6/Rs7a y Rs13/Rs13) y 3) genotipos que producen tanto aumentos como disminuciones en el recuento de HPG (Rs11/Rs11, Rs1/Rs13 y Rs7a/Rs13).

En el caso de los carneros representados en los grupos 1 y 2, se observó que los resultados del análisis Bayesiano, concuerdan con la información referente a los valores DEP (Diferencia Esperada en la Progenie) estimados para estos carneros en Pruebas de Progenie del SUL (Tornera 2001, Dr. D. Castells, comunicación personal). Es decir, los carneros con el genotipo ubicado en el grupo 1, cuyo efecto es disminuir el recuento de HPG, presentan valores DEP con signo negativo, mientras que los carneros representados en el grupo 2 presentan valores DEP con signo positivo, indicando que la tendencia esperada en la diferencia entre la media del recuento de HPG de la progenie de estos carneros, respecto a la media de los corderos de otros carneros, es hacia la disminución o el aumento del recuento de HPG, respectivamente. Al considerar los carneros representados en el grupo 3, no es posible relacionar los efectos de sus genotipos y el signo de sus valores DEP, ya que los 3 genotipos se asocian tanto con aumentos como con disminuciones del HPG, a pesar que los DEPs estimados para estos carneros tienen signo positivo o negativo.

Al comparar los resultados obtenidos para esta muestra mediante el enfoque Bayesiano y un enfoque frecuentista como el procedimiento GLM (General Linear Model) (Nicolini, 2006) se observó que en ambos procedimientos el genotipo Rs6/Rs6 se asoció con disminuciones en el recuento de HPG, mientras que el genotipo Rs13/Rs13 se asoció con aumentos en dicho recuento. La ventaja de la aproximación Bayesiana es que posibilita la construcción de todo tipo de intervalos de confianza para estimar el valor del parámetro de interés, lo que permite dar respuesta a preguntas sobre nuestros datos que no sería posible responder con la clásica aproximación frecuentista de la estadística (Hernández et al., 2005).

## SUMMARY

Gastrointestinal parasites (GIP) represent the major sanitary and economic constraint of sheep production in Uruguay. Inclusion of resistant sheeps in breeding schemes has been proposed as a complementary control to the current anthelmintic treatment. One approximation to the identification of these resistant animals is given by the characterization of genetic markers. The DRB1 gene of the ovine Major Histocompatibility Complex (Ovar) is considered a candidate gene in this sense. The objective of this work is to apply a Bayesian method to the study of associations between DRB1 gene polymorphism and GIP resistance/susceptibility in 39 Corriedale lambs belonging to 9 half-



**Tabla I.-** Resultados de la aproximación Bayesiana (WinBUGS 1.3) para estimar las diferencias entre los efectos de los genotipos RFLP Ovar-DRB1.2 de carneros sobre el recuento de HPG de corderos. Se indican solamente aquellas diferencias entre efectos que implican un aumento o disminución de 500 HPG y/o de 1000 HPG en el recuento de HPG de corderos, con una probabilidad (P) igual o mayor al 80%; Media: media para las 10.000 iteraciones de las diferencias entre los efectos de pares de genotipos paternos; D.E: desvío estándar.

Pares genotípicos paternos entre los que se estima la diferencia entre sus efectos	Media	D.E	P (%)	
			500 HPG	1000 HPG
Rs6/Rs6 – Rs6/Rs7a	-1163	398	96	-----
Rs6/Rs6 – Rs7a/Rs13	-969	377	89	-----
Rs6/Rs7a – Rs7a/Rs13	193	400	-----	98
Rs1/Rs13 – Rs6/Rs7a	-916	428	82	-----
Rs1/Rs13 – Rs6/Rs6	246	426	-----	97
Rs1/Rs13 – Rs7a/Rs7a	40	406	87	98
Rs6/Rs13 – Rs6/Rs6	1017	376	82	-----
Rs6/Rs13 – Rs7a/Rs13	48	359	88	99
Rs11/Rs11 – Rs6/Rs13	-821	379	81	-----
Rs11/Rs11 – Rs6/Rs6	196	400	80	96
Rs11/Rs11 – Rs6/Rs7a	-966	388	88	-----
Rs13/Rs13 – Rs1/Rs13	418	416	-----	92
Rs13/Rs13 – Rs7a/Rs7a	459	391	-----	90

sib families, evaluated for genetic resistance to GIP through faecal egg count (FEC). Exon 2 of the Ovar-DRB1 gene was typified in the 9 sires using PCR(heminested)-RFLP(Rsal). The following RFLP genotypes were identified: Rs6/Rs6, Rs7a/Rs7a, Rs6/Rs7a, Rs6/Rs13, Rs7a/Rs13, Rs11/Rs11, Rs1/Rs13 y Rs13/Rs13. Bayesian method was applied to evaluate the effects of sire genotypes on lambs FEC values. Results indicated that genotypes with effects on the FEC phenotype can be grouped as follow: 1) genotypes that diminish FEC (Rs6/Rs6); 2) genotypes that rise FEC (Rs6/Rs13, Rs6/Rs7a and Rs13/Rs13) and 3) genotypes that both rise and diminish FEC (Rs11/Rs11, Rs1/Rs13 and Rs7a/Rs13). The effects observed for genotypes Rs6/Rs6 and Rs13/Rs13 are congruent with results obtained in the same sample using a frequentist procedure such General Linear Model.

### BIBLIOGRAFÍA

Hernández P, Guerrero L, Ramírez J, Mekawy W, Pla M, Ariño B, Ibáñez N, Blasco A (2005) A Bayesian approach to the effect of selection for growth rate on sensory meat quality of rabbit. *Meat Science*, 69: 123-127.

John S W M, Weitzner G, Rozen R, Scriver C R (1991) A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research* 19: 408.

Nicolini M.P (2006) Estudio del polimorfismo del gen DRB1.2 del MHC ovino. Búsqueda de asociaciones con resistencia a parásitos gastrointestinales. Tesis de Maestría. PEDECIBA, UdelaR. 197 pp.

Spiegelhalter DJ, Thomas A, Best NG (2000) WinBUGS Version 1.3 User Manual. Cambridge: Medical Research Council Biostatistics Unit.

van Eijk MJ, Stewart-Haynes JA, Lewin HA (1992) Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.*, 23: 483-496.