

Universidad Nacional de Río Negro
Sede Alto Valle y Valle Medio
Choele Choel, Río Negro
Medicina Veterinaria



Variación del MHC-B en Líneas de pollos Campero
INTA y en Pollos Parrilleros y su correlación con
peso vivo

**Trabajo Final de Grado para obtener el Título de Médico
Veterinario**

Autor: Remolins Crolla, José Santiago

Directora: Beker, María Pía

Agosto de 2022

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	6
Objetivos Generales	7
Objetivos específicos	7
Introducción	8
Complejo Mayor de Histocompatibilidad	8
Moléculas de Clase I del MHC	9
Moléculas de Clase II del MHC	12
Moléculas de Clase III del MHC	14
El MHC y la enfermedad	14
Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Gallus gallus	17
Técnicas de genotipificación del MHC-B	20
Microsatélite LEI0258	20
Pollos Campero INTA	20
Pollos Parrilleros	21
Materiales y Métodos	23
Pollos Camperos INTA	23
Pollos Parrilleros	23
Extracción de sangre	24
Extracción de ADN	24
Amplificación por PCR del VNTR LEI0258	25
Estimación y procesamiento de los resultados	28
Resultados y discusión	30

Alelos de LEI0258 identificados en la muestra de pollos parrilleros	30
Asociación entre Peso Vivo y alelos LEI0258	32
Alelos de LEI0258 identificados en las líneas A, AS y ES que dan origen al Campero INTA	33
Conclusiones	38
Referencias	39

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. <i>Disposición de las regiones génicas del MHC en diferentes especies de animales domésticos</i>	9
Figura 2. <i>Esquema de una molécula de clase IA del MHC</i>	10
Figura 3. <i>Diagrama de la estructura de una molécula de clase II del MHC en una membrana celular</i>	13
Figura 4. <i>Esquema de unión al antígeno por moléculas del MHC y la inmunidad</i>	14
Figura 5. <i>Los animales heterocigotos MHC pueden responder a un mayor número de antígenos</i>	15
Figura 6. <i>Cromosoma 16 de Gallus gallus con ubicación de los genes del MHC-B</i>	18
Figura 7. <i>Mapa simplificado de los genes del MHC-B de pollos</i>	19
Figura 8. <i>Esquema de cruzamientos de líneas maternas (A y ES) y paternas (AS o AH) para la obtención del híbrido de tres vías Campero INTA</i>	21
Figura 9. <i>Imagen de gel de agarosa 1</i>	27
Figura 10. <i>Imagen de gel de agarosa 2</i>	28
Tabla 1. <i>Frecuencias Alélicas Parrilleros</i>	30
Tabla 2. <i>Frecuencias Genotípicas Parrilleros</i>	30
Figura 11. <i>Histograma de distribución del peso vivo de pollos parrilleros en la muestra</i>	31
Figura 12. <i>Distribución de peso vivo en función de genotipos</i>	32
Figura 13. <i>Frecuencias alélicas de la línea AS</i>	34
Figura 14. <i>Frecuencias genotípicas de la línea A</i>	34
Figura 15. <i>Frecuencias genotípicas de la línea ES</i>	35
Figura 16. <i>Frecuencias genotípicas de la línea ES</i>	36
Figura 17. <i>Frecuencias genotípicas de la línea A</i>	36
Figura 18. <i>Frecuencias genotípicas de la línea AS</i>	37

Agradecimientos

A mi familia, por su apoyo incondicional durante toda mi carrera, sin el que me hubiera sido imposible realizarla. A mis compañeros y compañeras por la ayuda en las tareas, el estudio y los momentos compartidos. A los docentes y no docentes de la UNRN. En especial a Gabriela Marisa Iglesias, por su dirección, el esfuerzo en mi formación, motivarme en la investigación y la confianza en mi trabajo; María Belén Buglione y su equipo de investigación por colaborar con conocimientos, datos y materiales fundamentales para este trabajo; y a María Pia Beker, por su dedicación, los consejos y las correcciones, al ser mi tutora en el presente trabajo.

Resumen

En el presente trabajo se detallan las tareas de investigación relacionadas al Complejo Mayor de Histocompatibilidad-B (CMH-B) en aves, en las que pude participar durante mi experiencia como becario CIN, bajo la dirección de Mg. Gabriela M. Iglesias.

Se analizó la variabilidad de los genes del CMH-B a través de un marcador, LEI0258, fuertemente ligado, en líneas maternas (A y ES) y paternas (ES) que dan origen al pollo Campero INTA (en el marco del PI 40-A-498 dirigido por Gabriela Iglesias). Además, se genotificaron mediante LEI0258 los pollos parrilleros experimentales (broilers) de manera de poder establecer una asociación entre dicho marcador y el peso vivo (PV) de los animales. Este grupo de aves formaba parte de un ensayo dirigido por la Dra. María Belén Buglione, en el marco del PI 40-A-614.

Como resultado, se obtuvieron 6 alelos y 18 genotipos en las distintas poblaciones que dan origen al Campero INTA, siendo las más variable la línea ES, seguida de la línea A y la menos variable la línea AS. El alelo de mayor frecuencia fue el de 381pb.

Por otro lado, en el ensayo de los pollos parrilleros, el análisis indicó una tendencia de asociación ($p < 0,1$) entre el genotipo 357/381 y un mayor PV, mientras que el 295/381, con menor PV (se observó una diferencia de 460 g). Finalmente, el modelo utilizado evidenció que el alelo *357 (frecuencia de 16,7%) tendría asociación positiva y el alelo 205 (frecuencia 6,7%) asociación negativa ($p < 0,05$) con PV. Del análisis surge que la frecuencia de los alelos con asociación positiva para la característica de PV (357 y 381 pb) representan aproximadamente el 50 % de los alelos en la población estudiada, por lo que dichas variantes podrían ser valoradas positivamente en el desarrollo del plan de selección

Abstract

This paper details the research tasks related to the Major Histocompatibility Complex-B (MHC-B) in birds, in which I was able to participate during my experience as a CIN fellowship, under the direction of Mg. Gabriela M. Iglesias. The variability of the MHC-B genes was analyzed through a marker, LEI0258, strongly linked, in maternal (A and ES) and paternal (ES) lines that give rise to the INTA Campero chicken (within the framework of PI 40- A-498 directed by Gabriela Iglesias). In addition, a sample of broilers was genotyped using LEI0258 in order to establish an association between LEI0258 marker and the live weight (LW) of the animals. This group of birds was part of a trial directed by Dra. Belén Buglione, within the framework of PI 40-A-614. As a result, 6 alleles and 18 genotypes were obtained in the different populations that give rise to the Campero INTA, the most variable being the ES line, followed by the A line and the least variable, the AS line. The allele with the highest frequency was that of 381pb. On the other hand, in the broiler chicken trial, the analysis indicated an association trend ($p < 0.1$) between the 357/381 genotype and a higher LW, while the 295/381, with lower LW (it was observed a difference of 460 g). Finally, the model used showed that the *357 allele (frequency 16.7 %) would have a positive association and the 205 allele (frequency 6.7 %) had a negative association ($p < 0.05$) with PV. From the analysis it emerges that the frequency of the alleles with positive association for the PV characteristic (357 and 381 bp) represent approximately 50 % of the alleles in the population studied, so these variants could be positively valued in the development of the selection plan.

Objetivos Generales

- Analizar la variabilidad del MHC-B mediante el VNTR LEI0258 en las líneas que le dan origen al pollo Campero INTA.
- Establecer la asociación entre los distintos alelos del MHC-B, a través del marcador LEI0258, con características productivas de pollos parrilleros comerciales, tal como el peso vivo (PV) final.

Objetivos específicos

- Determinar los genotipos de los genes del MHC-B mediante el análisis indirecto de un microsatélite (LEI0258) en:
 - a. 195 animales de las líneas que dan origen al pollo Campero INTA, (78, 78 y 39 animales de las líneas AS, A y ES, respectivamente)
 - b. 37 de Pollos parrilleros experimentales (línea sintética).
 - c. Establecer la relación entre este marcador con peso final a faena en la muestra de pollos parrilleros.

Introducción

Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El primer Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) se describió en cepas murinas utilizando técnicas de trasplante de tumores y tejidos entre diferentes cepas de ratones. Esta región se denominó H-2 y es homóloga a otros MHC de otras especies (Klein & Sato, 1998).

El complejo mayor de histocompatibilidad puede definirse como el clúster organizado de genes que controlan la presentación de antígenos y así determinan la susceptibilidad a enfermedades infecciosas o autoinmunes (**Figura 1**). Las moléculas del MHC son utilizadas por las células presentadoras de antígenos para ligar y presentar antígenos, éstas son altamente polimórficas, es decir que muestran una enorme heterogeneidad de variaciones estructurales, que permiten a cada individuo responder a una serie distinta de antígenos. Todos los vertebrados poseen moléculas de histocompatibilidad, en general en estos, el MHC contiene loci de Clase I, loci de Clase II y loci de Clase III. Al comparar los MHC de distintos mamíferos se observa que algunas regiones están muy bien conservadas, mientras que otras son extraordinariamente diversas. También la disposición exacta y el número de loci varía entre las especies. En general los loci de clase II y de clase III son ortólogos, es decir derivan claramente de un ancestro y no han experimentado reorganizaciones importantes. Por el contrario, los genes de clase I se han reorganizado muchas veces por delección y duplicación y sus secuencias de aminoácidos difieren ampliamente, por lo que se dice que son parálogos (Tizard, 2009).

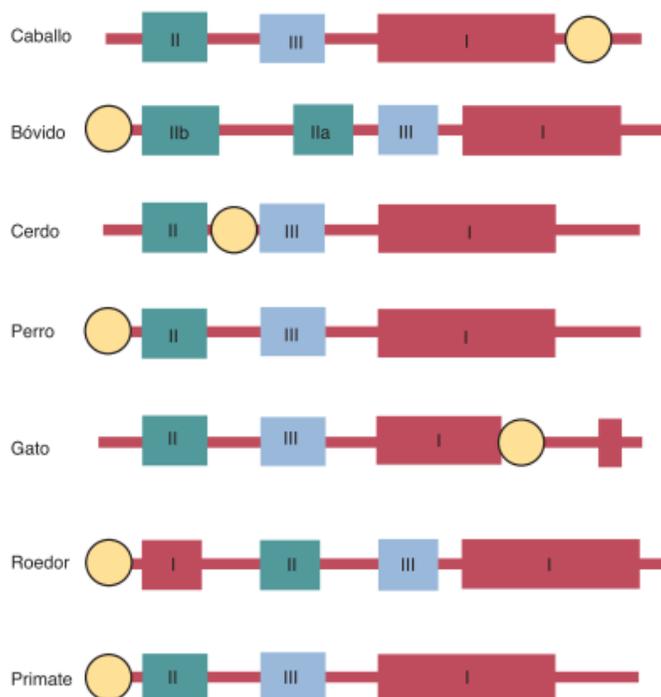


Figura 1. Disposición de las regiones génicas del MHC en diferentes especies de animales domésticos. Adaptado de Tizard I., 2009.

El nombre colectivo que se da a las proteínas codificadas por estos genes del MHC también es diferente para cada especie, en los seres humanos estas moléculas se denominan antígeno de leucocitos humanos (HLA), en los perros se denomina DLA, en conejos RLA, en los bóvidos BoLA, etc. En algunas especies las moléculas del MHC se identificaron como antígenos del grupo sanguíneo, antes de que se conociera su verdadera función. En estos casos la nomenclatura no sigue la regla general: en el ratón se denomina H-2, y en los pollos se denomina B. La serie completa de alelos que se localizan en el MHC de un animal en uno de los cromosomas que lo portan (materno o paterno) se denomina “haplotipo del MHC”. (Tizard, 2009)

Moléculas de Clase I del MHC

Las moléculas de clase I del MHC están presentes en la mayoría de las células nucleadas. Estas se encuentran codificadas en los loci de clase I que a su vez pueden clasificarse en loci altamente

polimórficos (clase IA) y poco polimórficos (clase IB, IC o ID). Se entiende por polimorfismo a las diferencias estructurales en las proteínas codificadas por un mismo locus.(Tizard, 2009)

Las moléculas de clase IA constan de 2 cadenas glicoproteicas unidas (**Figura 2**). La cadena α de 45 kDa se asocia a una cadena más pequeña llamada β_2 -microglobulina (β_2M) de 12 kDa. La cadena α se inserta en la membrana celular y esta consta de cinco dominios: tres extracelulares (denominados α_1 , α_2 y α_3 , cada uno de unos 100 aminoácidos), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. El lugar de unión al antígeno en las moléculas de clase IA se localiza en los dominios α_1 y α_2 . La β_2M consta de un único dominio y contribuye a estabilizar la estructura.(Tizard, 2009)

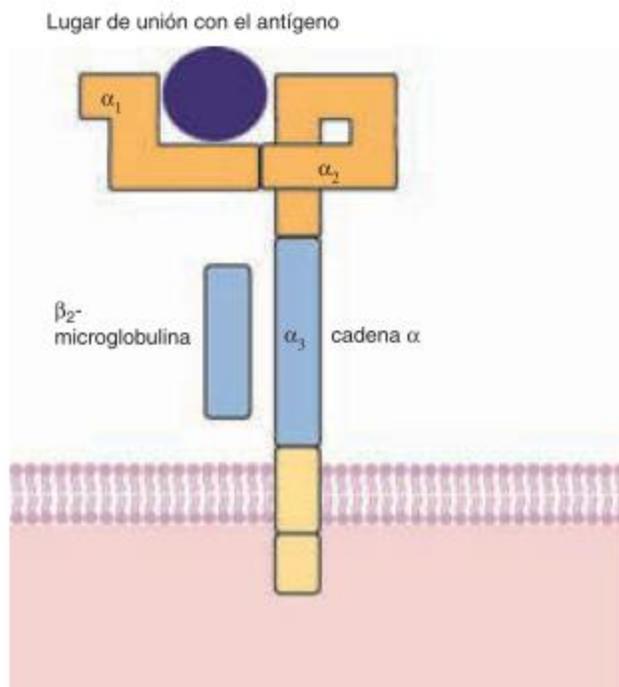


Figura 2. Esquema de una molécula de clase IA del MHC

Nota: Diagrama de la estructura de una molécula de clase I-A del MHC en una membrana celular. Su lugar de unión al antígeno está formado por el plegamiento de sus dominios α_1 y α_2 . Adaptado de Tizard I., 2009

El tamaño de la región de clase I del MHC varía en cada especie, los roedores y los seres humanos poseen las más grandes, dentro de los mamíferos el cerdo posee la más pequeña. La región de clase I del pollo es mucho más pequeña que la de los mamíferos. El número de loci de clase I-A varía entre los mamíferos, sin embargo, no todos son funcionales, en las ratas solo se expresan 2 o 3

genes de los más de 60 loci que posee; los restantes son pseudogenes (genes deficitivos que no pueden ser expresados).(Tizard, 2009)

Algunos loci de clase IA codifican un número muy elevado de alelos. Estas diferencias alélicas producen variaciones en las secuencias de aminoácidos de los dominios α_1 y α_2 . Esta variación recibe el nombre de polimorfismo. El polimorfismo extremo se restringe a 3 o 4 pequeñas regiones de los dominios α_1 y α_2 . En general este polimorfismo conlleva el cambio de 2 o 3 aminoácidos en estas regiones mientras que en las otras hay poca variación (Tizard, 2009).

Estudios han demostrado que los dominios α_1 y α_2 de las moléculas de clase IA se pliegan para formar un surco entre ambas. El suelo del surco está formado por una lámina- β plana, mientras que las paredes las forman dos hélices- α . Este surco se une a péptidos antigénicos de nueve aminoácidos. Las regiones variables están localizadas a lo largo de las paredes de este surco, el mismo que determina la afinidad de la molécula por determinados antígenos y así desencadena la respuesta inmune. Estas variaciones de aminoácidos son el resultado de variaciones en la secuencia génica de los alelos del MHC. La variación de nucleótidos en el ADN son el resultado de mutaciones puntuales, recombinación recíproca y conversión génica. Las mutaciones puntuales son simples cambios en los nucleótidos de manera individual, la recombinación recíproca implica el intercambio de ADN entre dos cromosomas. En la conversión génica, se intercambian pequeños bloques de ADN entre genes de clase I diferentes, de forma no recíproca (“donación”), los bloques de ADN “donados” pueden derivar de genes de clase I no polimórficos, de pseudogenes no funcionales o de genes de clase I polimórficos. Los genes de clase I del MHC tienen el grado de mutación más elevado de cualquier gen de línea germinal conocido (en el ratón 10^{-3} mutaciones por gen, por generación). Esto implica que se debe adquirir una ventaja significativa de este polimorfismo.(Tizard, 2009)

En la superficie de las células de los mamíferos también se expresan muchas moléculas de clase I no polimórficas. Algunas de estas están codificadas por genes del MHC, mientras que otras se encuentran codificadas en otros cromosomas. Estas se clasifican según su origen evolutivo.

Las moléculas de clase IB se expresan en menos tejidos que las moléculas de clase IA, son parte del MHC, pero su polimorfismo es limitado y posiblemente originen precursores de clase IA mediante duplicación génica. En los ratones se localizan en tres clúster denominados Q, T y M; y

codifican proteínas de los linfocitos reguladores e inmaduros y células hematopoyéticas. Constan de una cadena α de (44 kDa) asociados con la β_2 -microglobulina. Su forma es similar a las moléculas de clase IA. Dado que no son polimórficas, estas moléculas pueden unirse a un número limitado de antígenos. Son receptores moleculares asociados a patógenos (PAMP).(Tizard, 2009).

Los genes de clase IC son moléculas de bajo polimorfismo que se localizan en MHC, posiblemente se originaron antes de la divergencia de los mamíferos placentarios. Este grupo incluye MICA y MICB, moléculas especializadas implicadas en la comunicación entre linfocitos T y células NK, estos no se unen a antígenos(Tizard, 2009).

Los genes de clase ID son genes no polimórficos relacionados con los de clase I, pero no se localizan en el cromosoma del MHC. Estos pueden ligar PAMPs, muchas de estas moléculas están implicadas en la inmunidad innata (Tizard, 2009).

Moléculas de Clase II del MHC

Las moléculas de clase II (**Figura 3**) codifican moléculas polimórficas que se expresan en las células presentadoras profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B). Los mamíferos difieren en la expresión de moléculas de clase II. En los roedores se expresan en las mencionadas anteriormente y pueden inducirse en linfocitos T; queratinocitos y células del endotelio vascular. Los linfocitos T murinos en reposo no expresan moléculas de clase II, pero en perros, gatos, visones y caballos se expresan constitutivamente en casi todos los linfocitos T adultos en reposo. En cerdos se expresan en semen. En seres humanos y cerdos se expresa en el endotelio vascular de los riñones y en glomérulos. La expresión de moléculas de clase II se favorece en células de división rápida y en células tratadas con interferón- γ .(Tizard, 2009).

Las moléculas de clase II están constituidas por dos cadenas proteicas, denominadas cadena α (31 a 34 kDa) y β (25 a 29 kDa). Cada cadena tiene dos dominios extracelulares, un péptido de conexión, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Una tercera cadena denominada cadena Li o γ se asocia con las moléculas intracelulares de clase II (Tizard, 2009).

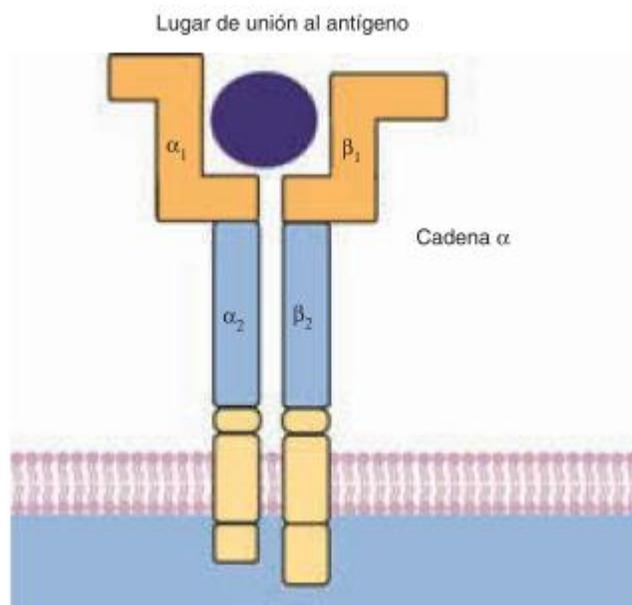


Figura 3. Diagrama de la estructura de una molécula de clase II del MHC en una membrana celular

Nota: El lugar de unión al antígeno está formado por dos cadenas peptídicas (α_1 y β_1). Adaptado de Tizard, 2009.

La región de clase II completa posee tres loci pareados. En los primates son DPA y DPB, DQA y DQB, y DRA y DRB. Los genes de las cadenas α se denominan A y los de las cadenas β se denominan B. Algunos genes son polimórficos. En los humanos también puede haber algunos loci no polimórficos, como DM y DO cuya función es regular la carga de fragmentos antigénicos en el surco. No todos los mamíferos poseen un “lote completo” de genes de clase II, ya que todos los loci poseen genes para ambas cadenas y algunos contienen muchos *pseudogenes* que pueden utilizarse mediante conversión génica para producir polimorfismo adicional (Tizard, 2009).

Las proteínas de clase II tienen un surco donde se aloja el antígeno, configurado por los dominios α_1 y β_1 sus paredes están formadas por 2 hélices- α paralelas y su suelo por una lámina- β . El polimorfismo resulta de variaciones en los aminoácidos que forman los lados del surco, que se generan de la misma manera que en las moléculas de Clase IA. Otras moléculas codificadas en el MHC de clase II también participan en el procesamiento de antígenos. Estas incluyen el

transportador de proteínas para el procesamiento de antígenos-1 (TAP1) y TAP2 y algunos componentes del proteosoma (Tizard, 2009).

Moléculas de Clase III del MHC

Los loci de clase III del MHC codifican proteínas muchas de las cuales están asociadas a la inmunidad innata, como algunas proteínas del complemento (C4, C2 y factor B). también posee genes que codifican la enzima 21-hidroxilasa implicada en la síntesis de esteroides, el citocromo p450, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), varias linfoquinas, algunos receptores de las células NK y varias proteínas de choque térmico (Tizard, 2009).

El MHC y la enfermedad

La función de las moléculas del MHC es presentar antígenos a las células del sistema inmune, por consiguiente, ésta es regulada por los genes del MHC. Si una molécula extraña no puede ubicarse en el surco de al menos una molécula del MHC, no estimulará la inmunidad adquirida (**Figura 4**). Así, los alelos del MHC determinan la susceptibilidad a las enfermedades en las que las respuestas inmunes juegan un papel significativo, tanto sean estas infecciosas o autoinmunes. Las moléculas de clase IA y clase II son polimórficas, cada alelo del MHC se une a una serie diferente de péptidos antigénicos. Cuanto más variado sea el MHC de un animal, a más antígenos podrá responder. Por esta razón un animal heterocigoto para el MHC expresara más alelos y podrán unirse a una variedad más amplia de péptidos antigénicos que un animal homocigoto (Tizard, 2009).

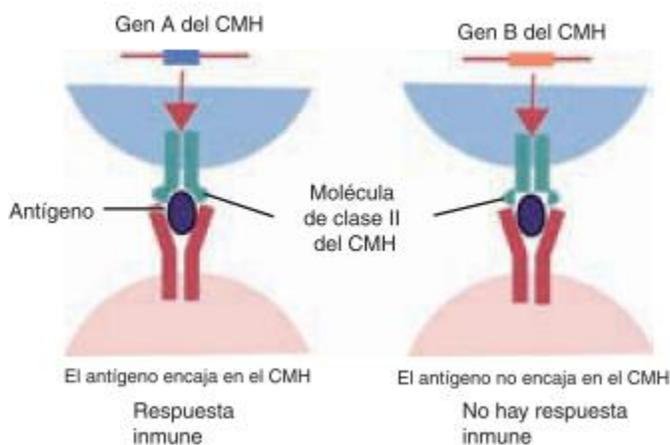


Figura 4. Esquema de unión al antígeno por moléculas del MHC y la inmunidad

Nota: Solo las moléculas que se unan al surco de la molécula del MHC iniciarán una respuesta inmune. Adaptado de Tizard, 2009.

El polimorfismo del MHC se mantiene en las poblaciones por un proceso denominado “selección sobredominante” o “ventaja heterocigótica”, los heterocigotos para el MHC están en ventaja porque pueden responder a antígenos más variados y así están más preparados para sobrevivir a las enfermedades infecciosas. En la **Figura 5** se puede observar un esquema de cómo es la respuesta a los antígenos de animales heterocigotas Vs los homocigotas para el MHC (Tizard, 2009).

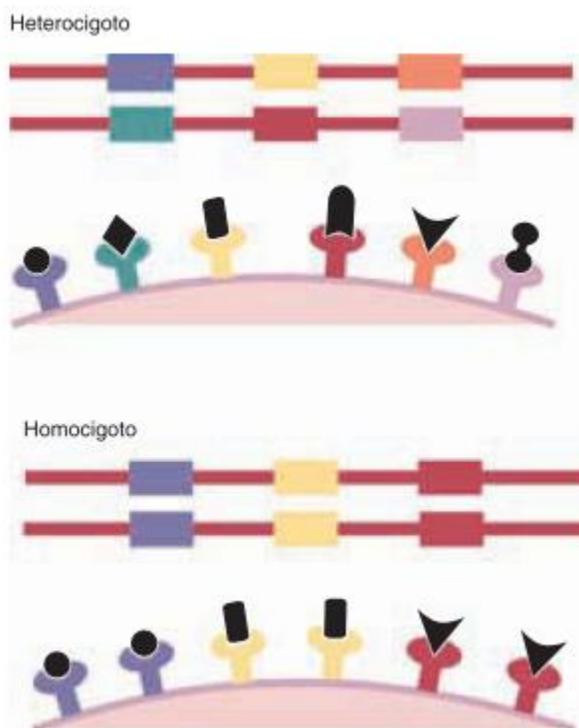


Figura 5. Los animales heterocigotos MHC pueden responder a un mayor número de antígenos Adaptado de Tizard, 2009.

Cada molécula de clase IA y clase II puede unirse aproximadamente a 2.500 antígenos distintos (poseen cierta inespecificidad) ya que el surco de estas se une fuertemente (por interacciones no covalentes) al armazón del péptido más que a sus cadenas aminoacídicas laterales. Sin embargo, existen restricciones estructurales que limitan la eficiencia de unión en cada alelo. Dado esto es posible que solo uno o dos péptidos de una molécula antigénica se unan a cada molécula correcta del MHC. La capacidad de unir a los antígenos por parte de las moléculas del MHC debe ser un factor limitante para generar inmunidad. El aumento de la diversidad de las moléculas del MHC amplía claramente la cantidad de péptidos que pueden ligar y así aumenta la resistencia a las

infecciones. Ya que la mayoría de los individuos son heterocigotos para el MHC cada individuo expresa generalmente seis moléculas de clase IA distintas. En los humanos cada locus HLA-A, -B y -C codifica dos moléculas. El número de moléculas expresadas del MHC no es mayor, ya que incrementaría el riesgo de ligar y presentar antígenos propios lo que exigiría eliminar muchos más linfocitos T autorreactivos durante el desarrollo. De esta manera, seis moléculas de clase IA del MHC distintas, suponen un equilibrio razonable entre maximizar el reconocimiento de antígenos extraños y minimizar el reconocimiento de autoantígenos. Algunos loci de clase IA del CHM contienen genes altamente polimórficos (algunos con más 100 alelos), ya que nunca puede haber más de 2 alelos por locus en cada individuo, este gran número de alelos parece ser necesario para maximizar el polimorfismo a nivel poblacional. Un motivo para esto es la población como un todo de la enfermedad. Dado el polimorfismo del MHC, la mayoría de los individuos de una población tienen un lote único de moléculas de clase IA y cada individuo puede responder a una serie completa de antígenos. Cuando una enfermedad nueva afecta a una población, este polimorfismo aumenta la posibilidad de que al menos algunos individuos tengan moléculas del MHC que se puedan unir a los antígenos microbianos nuevos e iniciar la inmunidad. Cuando se estudia el MHC de una gran muestra de ratones o humanos, no hay ningún haplotipo que alcance una frecuencia alta. En otras palabras, la diversidad de los haplotipos del MHC confiere ventajas a nivel poblacional, más que individualmente. Esto refleja la incapacidad del hospedador por igualar la variabilidad antigénica de los microorganismos invasores, un microorganismo siempre será capaz de mutar y evadir la respuesta inmune con mayor rapidez con la que una población de mamíferos desarrolla resistencia frente al mismo. Los cambios en un alelo del MHC, aunque pueda incrementar la resistencia a un microorganismo, puede al mismo tiempo disminuir la resistencia a otro. Es más ventajoso para los mamíferos de una población poseer múltiples alelos del MHC diferentes y únicos, de forma que cualquier patógeno que se disemina a través de la población tendrá que adaptarse a cada individuo (Tizard, 2009).

Los animales sociales altamente sociables, como los seres humanos o los ratones, que se organizan en estructuras sociales basadas en densidades de población altas, a través de las cuales la enfermedad puede diseminarse rápidamente, generalmente presentan un extenso polimorfismo del MHC. Por el contrario, las especies solitarias que viven en densidades de poblaciones bajas tienen mucho menos polimorfismo. Los guepardos poseen un mínimo polimorfismo del MHC como resultado de ciertos “cuellos de botella” de población, debido a esta falta de diversidad en el MHC,

estos no rechazan aloinjertos de otros guepardos no relacionados, de igual manera la peritonitis infecciosa felina produce un 60 % de mortandad (en los gatos domésticos es del 1 % al 2 %) y puede ocasionar la potencial extinción de la especie. Se han descrito en muchas especies ejemplos de relaciones entre determinados haplotipos del MHC y la resistencia a una enfermedad infecciosa, e incluso asociados con otros parámetros reproductivos y productivos (Tizard, 2009).

La selección de haplotipos específicos del MHC, tiene una potencial utilidad para desarrollar variedades de animales domésticos resistentes a la enfermedad. No obstante, es preciso señalar que al seleccionar un locus en un gen específico también se puede seleccionar inadvertidamente la susceptibilidad frente a una enfermedad concreta que resida en el loci íntimamente ligados (Tizard, 2009).

Es interesante mencionar que, en condiciones controladas, los ratones (y los seres humanos) prefieren emparejarse con individuos incompatibles en el MHC. Dichos emparejamientos generan perfectamente una ventaja heterocigota, que podría conducir a una mayor resistencia a la enfermedad. Este tipo de emparejamiento también permitiría evitar la endogamia, que puede ser la función más importante del emparejamiento basadas en el MHC en las especies con patrones de emparejamiento de este tipo. (Tizard, 2009)

Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Gallus gallus

En primeros estudios el MHC-B del pollo fue identificado como uno de varios antígenos eritrocitarios dentro de los sistemas de grupos sanguíneos distinto de “A” por lo que se lo llamó “Complejo B”. Posteriormente se demostró que el rechazo a injertos de piel estaba relacionado con las diferencias de este sistema y que poseían las mismas funciones que las moléculas de histocompatibilidad, aun así, la nomenclatura utilizada continúa siendo B. El complejo B se encuentra en un clúster (B-F /B-L) ubicado en el cromosoma 16 del pollo (**Figura 6**), este contiene dos genes de Clase I y dos genes de Clase II. Junto a estos se encuentran ligados otros genes relacionados con la respuesta inmune y presentación de antígenos, como los genes TAP1, TAP2 y una copia de los genes B-G (Iglesias, 2022 en prensa).

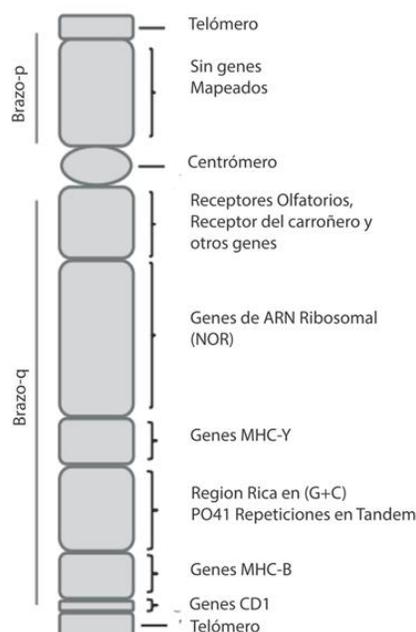


Figura 6. Cromosoma 16 de *Gallus gallus* con ubicación de los genes del MHC-B Modificado del original de Miller y Taylor, 2016.

El MHC-Y codifica moléculas de Clase I y Clase II atípicas, parecidas a las presentes en los mamíferos, y se encontró poca relación con la resistencia a enfermedades (Miller *et al.*, 1994).

El complejo B es muy compacto respecto a la región cromosómica que ocupa (unos 250 kb), comparado con los mamíferos (en humanos el HLA ocupa 4000 kb). En la nomenclatura del complejo B del pollo los genes de Clase I se denominan B-F, los genes de Clase II, B-L; y existe un tercer grupo de genes presente en las aves de la familia de las gallinaces de Clase IV, denominados B-G, hasta la fecha los genes B-G solo han sido encontrados en estas aves y su función no es del todo conocida, se ha demostrado que participan en la inmunidad y sus moléculas presentan muchas similitudes a la butirofilina. una representación gráfica de estos genes se aprecia en la **Figura 7**.

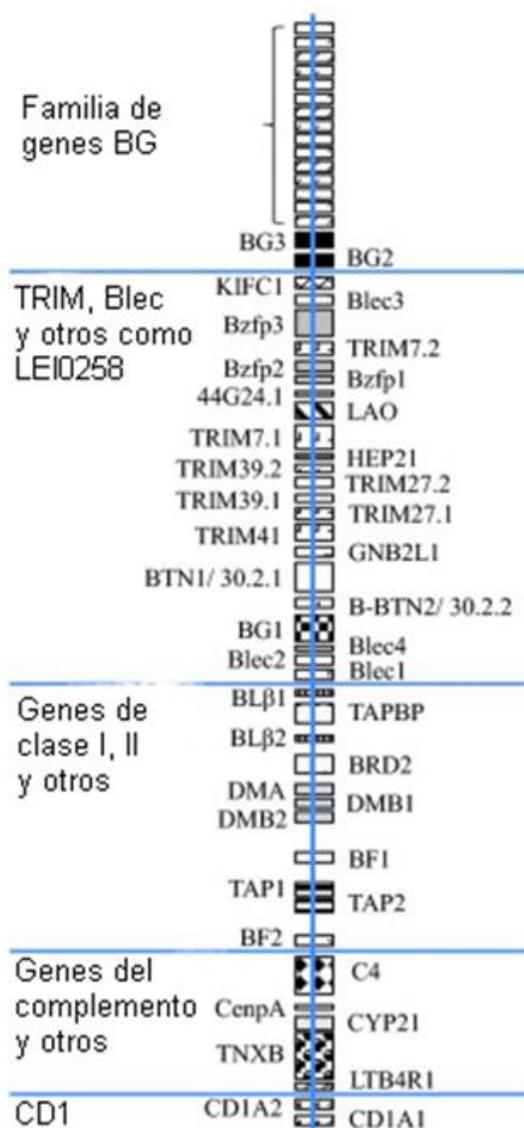


Figura 7. Mapa simplificado de los genes del MHC-B de pollos

Nota: Se muestra la región del cromosoma 16 y todos los genes con sus ubicaciones en el mismo.

Modificado del original de Miller y Taylor, 2016. Por Iglesias, G. 2022.

Existen actualmente revisiones muy completas y actualizadas del MHC-B, la disposición de sus genes, variedad de alelos y su asociación con resistencia a diferentes enfermedades como las publicadas por Miller y Taylor, 2016; y más recientemente por Iglesias, 2022.

La importancia del estudio de la variabilidad del MHC-B, radica en que esta, ha sido asociada con la resistencia a diversas enfermedades producidas por virus, bacterias y parásitos externos e internos (Iglesias, 2022 en prensa).

El conocimiento de los haplotipos del MHC-B de las líneas que dan origen al Pollo Campero INTA, sería una contribución importante en el desarrollo de planes de mejoramiento genético y selección que involucren bases en la resistencia a enfermedades.

Técnicas de genotipificación del MHC-B

Se describieron veintinueve haplotipos distintos (B1 – B29) para el MHC-B utilizando antisueros, sin embargo, es difícil producir anticuerpos con la misma especificidad y en ocasiones estos, pueden dar lugar a reacciones cruzadas entre distintos tipos de MHC-B (Fulton *et al.*, 2001).

Microsatélite LEI0258

El microsatélite LEI0258 es una región VNTR (número variable de repetición en tándem) situado dentro del MHC-B. El LEI0258 contiene repeticiones en tándem de 12 y 13 pb más varias deleciones en la región flanqueante que dan lugar a las diferencias de tamaño que diferencian a los alelos (Fulton *et al.*, 2006). Dado al gran tamaño de las dos repeticiones en tándem, la variación de tamaño alélico es grande. Los alelos se pueden distinguir fácilmente utilizando electroforesis para separar los productos de PCR en geles de agarosa. Los tamaños de los alelos del marcador, coinciden con los serotipos definidos previamente, por ejemplo, el haplotipo B21 tiene un alelo de 357 pb permitiendo inferir el serotipo. Este VNTR se ha utilizado para identificar variaciones del MHC-B líneas de postura de huevos, como Leghorn; y biotipos de pollos originarios de múltiples países. (Iglesias, 2022 en prensa)

Pollos Campero INTA

La línea de pollos sintéticos Campero fue desarrollada por el Ingeniero Bonino y colaboradores, durante la década del 1980 en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en su Estación Experimental Agropecuaria ubicada en Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Esta es una línea de crecimiento lento, que podría funcionar bien con terminación a pasto, sin un insumo significativo de alimento y se adapta bien adaptado a las condiciones de producción en Argentina. También la EEA INTA Pergamino ha desarrollado y promovido un protocolo para la producción del Campero, basado en la normativa francesa para la producción del pollo “Label Rouge” que en ese país ocupa de un 10 al 20 % del mercado de carne aviar en Francia. Es un híbrido experimental de tres vías producto del cruzamiento de machos de la población sintética paterna (AS y AH) por hembras de una línea híbrida C (línea ES x A), tal como se puede ver en la **Figura 8**. Es un pollo de crecimiento lento, carne más firme y buenas características organolépticas. Es de relevante

importancia para los pequeños productores y los programas de seguridad alimentaria, como Prohuerta (INTA-MDS), destinado al autoconsumo.

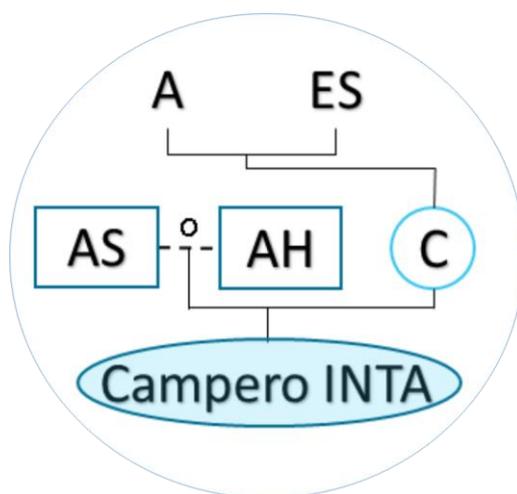


Figura 8. Esquema de cruzamientos de líneas maternas (A y ES) y paternas (AS o AH) para la obtención del híbrido de tres vías Campero INTA. Elaboración propia.

Pollos Parrilleros

Los pollos parrilleros o *broilers* hace referencia a una variedad de pollo desarrollada específicamente para la producción de carne. También son conocidos como pollos parrilleros. Este tipo de aves se alimentan especialmente a gran escala para la producción eficiente de carne y se desarrollan mucho más rápido que un huevo de otra variedad con un propósito dual (huevos + carne). Tanto los machos como las hembras *Broilers* se sacrifican para poder consumir su carne. Las líneas genéticas utilizadas por las empresas argentinas en la producción de pollo de engorde son Cobb, Ross y Arbor Acres (Ruiz, 2016). La mayoría de las razas de pollos de engorde se pueden comprar en un criadero como pollitos de un día de vida. Los Pollos Parrilleros analizados en este trabajo comprenden un grupo de 37 animales, pertenecientes al PI-40-614, cuyo objetivo es (entre otros) la reducción de los residuos agrícolas de la actividad de las industrias jugueras, mediante su bioconversión por hongos del género *Pleurotus*. Este en su proceso de fermentación sólida, producen una significativa cantidad de enzimas capaces de degradar celulosa y lignina de los residuos agroindustriales y usarlos como nutrientes para su crecimiento y fructificación (Elisashvili *et al.*, 2008), dando como producto setas comestibles para la alimentación humana y

Pleurotina (sustrato remanente de la biodegradación), usada para la alimentación animal, ambos considerados de elevado valor nutricional (Rosa Catalina Bermúdez Savón I *et al.*, 2014).

Materiales y Métodos

Pollos Camperos INTA

Las muestras de sangre de las líneas A, AS y ES se obtuvieron gracias a la gentileza del personal del INTA Pergamino, donde se mantienen y multiplican estas líneas. Las mismas se encontraban refrigeradas hasta poder realizar la extracción de ADN.

Pollos Parrilleros

La crianza de pollos alimentados con un suplemento de pleurotina se realizó durante el año 2018 (datos provistos por el grupo de investigación PI-40-614, quienes fueron los encargados de llevar a cabo este ensayo): el estudio se realizó con un total de 37 aves, las mismas fueron criadas durante 55 días en 2 jaulas de 20 animales cada una, criados bajo las normas éticas vigente (Pardo Caballos, 2005) (Pardo Caballos, 2005; SENASA, 2010) en Choele Choel, en un predio correspondiente a la Escuela de Medicina Veterinaria y Producción Agroindustrial de la Universidad Nacional de Río Negro.

Una jaula se identificó como grupo control (C), cuyas aves fueron alimentadas con un balanceado comercial, la otra jaula se identificó como tratamiento (T) cuyas aves recibieron de alimentación un balanceado comercial con suplementación de pleurotina al 3 %. Tanto el agua como el alimento se suministraron *ad libitum* en cada grupo. Se realizaron repeticiones consecutivas, considerando la posible interacción del tipo de alimentación con las condiciones ambientales.

En cada grupo, se calculó consumo alimenticio, ganancia total de peso y la eficiencia alimenticia. Durante la faena de los mismo se registró el peso vivo, peso limpio sobre el cadáver desangrado, desplumado, eviscerado, sin cabeza ni garras; también se realizó la extracción de sangre durante el sacrificio de los animales, donde se tomaron 2,5 ml de sangre proveniente de la vena yugular en tubos comerciales con anticoagulante EDTA. La sangre se refrigeró para su conservación hasta posterior uso para proceder a la extracción del ADN.

Extracción de sangre

La obtención de sangre de los pollos parrilleros se llevó a cabo por recolección durante la faena, en la cual se extrajeron 2,5 ml de sangre por animal, proveniente de la vena yugular. Para evitar su coagulación, se recolectaron en tubos comerciales con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Las muestras de sangre de las líneas que dan origen al pollo Campero, fueron cedidas por personal del INTA Pergamino a cargo de la Dra. Zulma Canet. Se colectaron en tubos de 1,5 ml con EDTA. Las mismas se mantuvieron refrigeradas en freezer a -20 °C hasta su procesamiento.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de todas las poblaciones se utilizó el método salino (Dra. Janet Fulton, comunicación personal). Para el procedimiento se prepararon las siguientes soluciones:

- Buffer de Lisis (3ml/muestra): 5ml de TrisHCl 1 M + 100 ml de EDTA 0,5 M + 25 ml de SDS 10% p/v + 370 ml H₂O.
- EDTA 0,5 M pH8: 186,1g de EDTA (di hidrato) + 800 ml de H₂O, disolviendo en agitador magnético a 60°C, corrigiendo el pH con pH-metro y titulando con solución de NaOH 1M
- SDS 10% (200 µL / Muestra)
- Proteinasa K 20mg/ml (16 µL / Muestra)
- Solución de NaCl 5M (1mL / Muestra)
- Etanol 100% (8 mL / Muestra)
- Etanol 70% (1mL / Muestra)
- Buffer TE (Tris-EDTA) pH 8 (1 mL / Muestra)

Procedimiento:

Se colocaron 8 ml de etanol 100 % en tubos Falcon de 14 ml por cada muestra y se guardaron en freezer a -20°C.

Se re-suspendieron 50 µL del paquete de glóbulos rojos de cada muestra de sangre en 3 ml de Buffer de Lisis, en tubos Falcon de 15 mL. Los tubos se agitaron con vortex a alta velocidad hasta obtener la disolución homogénea de las muestras, se añadió 200 µL de solución SDS 10 % a cada

tubo y se invirtieron una vez para mezclar. Luego se agitaron con vortex a alta velocidad, se añadió 16 µL de Proteinasa K 20 mg/ml y se invirtieron 10 veces para mezclar. Luego se colocaron los tubos a incubar en baño térmico a 42 °C durante 24 h. Posteriormente se retiraron los tubos del baño térmico y se añadió 1 ml de solución de NaCl 5M, se mezcló con vortex a alta velocidad hasta homogeneizar el contenido, se centrifugaron los tubos a 5000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante de estos se trasvasó cuidadosamente por la pared a los tubos con 8 ml de etanol 100 % refrigerados a -20 °C previamente. Se extrajo la condensación de ADN sobrenadante y colocaron en tubos tipo Eppendorf de 2 ml con 1 ml de etanol 70 %, se centrifugaron a alta velocidad (10000 rpm) durante 20 minutos para la formación del pellet de ADN en su base. Se descartó el alcohol sobrenadante y se colocaron invertidos levemente destapados para secar durante 15 minutos aproximadamente a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 1 ml de buffer TE pH 8 y se dejaron a temperatura ambiente 2 días para resuspender el pellet.

La cantidad y calidad de ADN resultado de la extracción se estimó realizando electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (EtBr) y observación en transiluminador UV a 312 nm.

Amplificación por PCR del VNTR LEI0258

Para la amplificación por PCR se utilizó kit “Invitrogen – Taq DNA Polymerase, Recombinant”

Se preparó un “Master Mix” a volumen de reacción final de 20 µL para cada tubo de PCR, con las siguientes soluciones:

- 10X PCR Buffer sin MgCl₂: 2 µL
- 100 mM dNTPs Mix: 0,4 µL
- 50 mM MgCl₂: 0,6 µL
- 5 µM Primer Forward: 0,4µL
- 5 µM Primer Reverse: 0,4 µL
- Taq ADN Polimerasa: 0,15 µL
- Agua ultrapura: 15,55 µL.

Se colocó 19,5 µL de Master Mix en tubos de PCR previamente rotulados para cada muestra y se le agregó 0,5 µL de ADN de muestra correspondiente, uno con 19,5 µL de Master Mix con 0,5 µL de ADN de una muestra de genotipo conocido homocigota B-21 (357 pb) como control positivo y un tubo con 19,5 µL de Master Mix más 0,5 µL de Agua Ultrapura como control negativo. A todos

los tubos se les dio un Spin a 10000 rpm en centrífuga y luego se colocaron en termociclador con el siguiente programa: 1er T° 94°C - 5'; 35 ciclos de tres temperaturas: 94 °C – 1', 62,5°C – 1', 72°C - 1'; seguido finalmente por un último ciclo a 72°C – 5', 4°C – mantenimiento. La temperatura de alineación de los primers (62,5 °C) fue aumentada 0,5 °C del programa original, para lograr una mayor especificidad, ya que en la puesta a punto de la técnica se observaron algunas bandas de amplificación inespecífica.

Visualización de las bandas de amplificación de LEI0258

El producto de la PCR se sembró en geles agarosa al 2,5 % con tinción de EtBr (1,875 g de agarosa + 75ml de Buffer TBE 0,5 x + 3 µL de EtBr) y peine de 16 pocillos, en los cuales se sembraron 10 µL de los marcadores de peso molecular (100 – 1000 pb y 50 – 1000 pb), 10 µL de cada muestra y los controles positivo y negativo de la reacción homogeneizados con 4 µL de loading buffer respectivamente.

Electroforesis

Los geles se corrieron en cuba electroforética con buffer TBE 0,5X a 70 V, 400 mA por 2 h 40 minutos.

Para la documentación de los geles se tomaron fotografías con cámara digital de 10 Mpx, en transiluminador UV de fondo oscuro a 312 nm, utilizando un cono oscuro y un filtro naranja de fotografía. En la **Figura 9** y **10** se ilustran imágenes representativas de este paso.

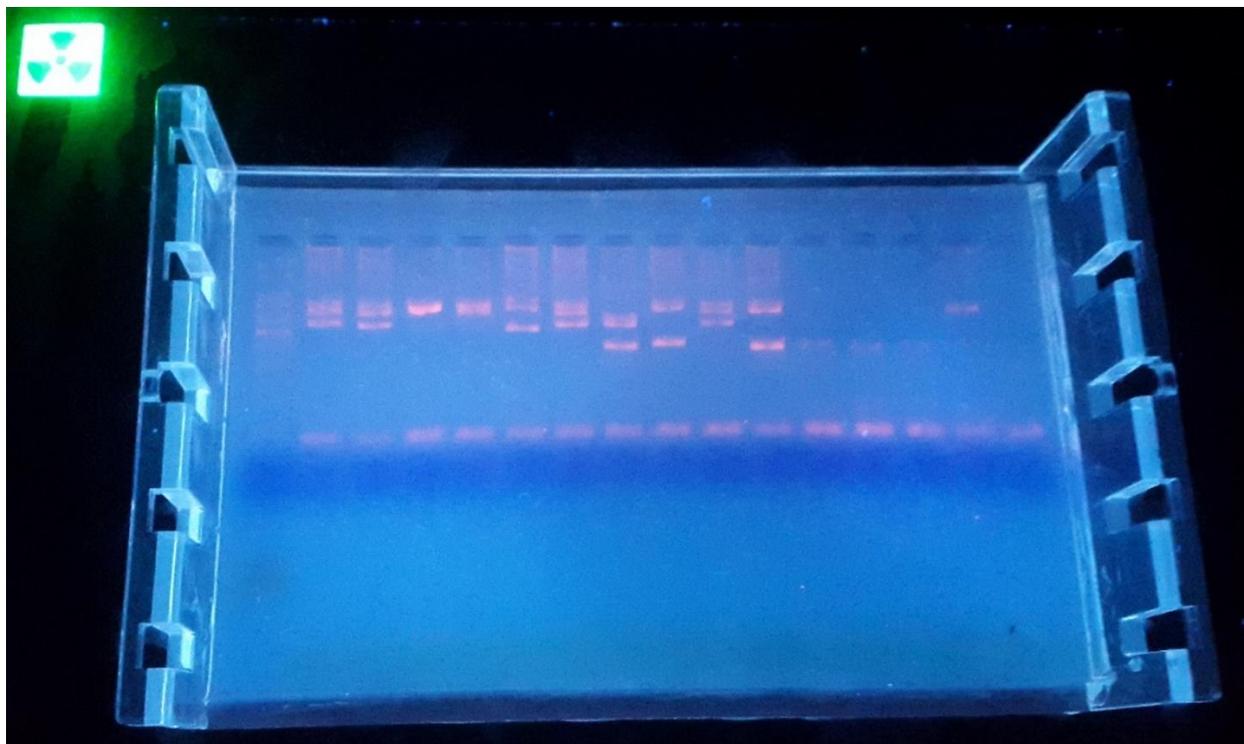


Figura 9. *Imagen de gel de agarosa 1*

Nota: se observa el producto de PCR del LEI0258 después de la electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio sobre transiluminador de luz ultravioleta, como se aprecia a simple vista, tomada de forma natural. Imagen propia.

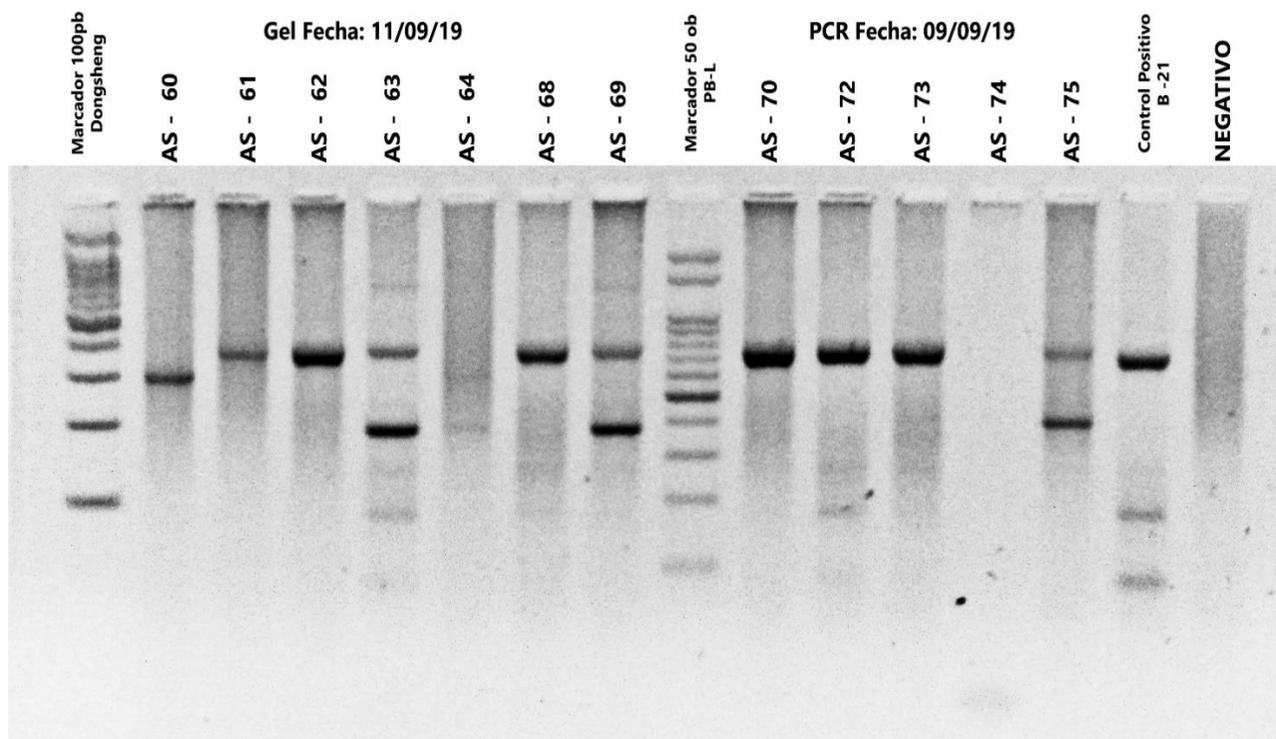


Figura 10. *Imagen de gel de agarosa 2*

Nota: Imagen de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, la imagen fue tomada en blanco y negro, con filtro naranja de fotografía y con ayuda de cono oscuro. Se aprecian algunos productos de PCR del LEI0258 de la línea AS de pollos Campero INTA, dos marcadores de peso molecular, control positivo y negativo de la reacción, rotulados en los carriles correspondientes. Imagen propia.

Estimación y procesamiento de los resultados

El cotejo del tamaño de las bandas obtenidas se realizó mediante estimación visual y el análisis con Software Gel Analyzer 2010, comparando la distancia su distancia de migración, con los marcadores de peso molecular y el control positivo B-21 (de 357 pb). Para una mayor precisión en la estimación del tamaño de las bandas resultantes (de las líneas A, AS y ES y de los Parrilleros) se emplearon tamaños de bandas de tamaño conocidos (Chazara *et al.*, 2013; Fulton *et al.*, 2006). Para el análisis genético de las poblaciones, los resultados fueron tabulados en hojas de cálculo de MS. Excel y exportados a archivos compatibles con el software Genepop, mediante el cual se determinaron las frecuencias génicas y genotípicas de las poblaciones, heterocigosidad observada y esperada, equilibrio de Hardy Weinberg y diferenciación génicas y genotípicas entre las poblaciones (Prueba exacta de G). Para la asociación de los genotipos del VNTR LEI0258 con la

característica peso final a la faena, se utilizó el Software IBM SPSS Statistics 25, mediante el cual se hizo un análisis de distribución de la muestra y el test de correlación de Pearson y Speerman, entre alelos y genotipos y la característica peso vivo final a la faena. Para la expresión de los resultados se utilizaron tablas y gráficos generados con el este mismo software y Microsoft Excel.

Resultados y discusión

Alelos de LEI0258 identificados en la muestra de pollos parrilleros

En 37 muestras de pollos parrilleros, se encontró un total de 7 alelos LEI0258 (295, 381, 261, 193, 357, 205, 443 pb) y 13 genotipos (11 disómicos y 2 trisómicos).

Una síntesis de sus frecuencias alélicas y genotípicas se detallan en la Tabla 1 y Tabla 2 respectivamente. El alelo que se presentó con mayor frecuencia fue el de 381 pb (0,40), que en la nomenclatura según serología se denomina B13.1 o c2v y está asociado con mayor susceptibilidad a Sarcoma de ROUX y mayor tasa de crecimiento (Wang *et al.*, 2014), seguido del alelo de 295 pb (0,21) y 357 pb (0,15) y el de menor frecuencia fue el de 261 pb (0,03)

Tabla 1. *Frecuencias Alélicas Parrilleros*

Alelo	381	295	357	205	193	443	261
Frecuencia	0,40	0,21	0,15	0,10	0,06	0,05	0,03

Nota: La presente tabla expresa los diferentes alelos identificados, y ordenados de acuerdo a su frecuencia, de mayor a menor. Producción propia.

El genotipo de mayor frecuencia fue 381/381 (0,19), seguido en orden por 357/295 (0,16), 357/381 y 205/381 (0,11). Y los de menor frecuencia fueron 295/295, 261/261, 357/357 y 193/381/443 (frecuencias de 0,3)

Tabla 2. *Frecuencias Genotípicas Parrilleros*

Genotipo	381/ 381	357/ 295	357/ 381	205/ 381	381/ 295	295/ 381/ 443	193 /295	193/ 381	205/ 205	295/ 295	261/ 261	357/ 357	193/ 381/ 443
Frecuencia	0,19	0,16	0,11	0,11	0,08	0,08	0,05	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03

Nota: la presente tabla expresa las frecuencias genotípicas pollos parrilleros ordenadas de mayos a menor. Producción propia.

Se analizaron los datos obtenidos del peso vivo al momento de la faena de los 37 pollos parrilleros utilizando el software IBM-SPSS. Los valores de peso oscilaron entre un mínimo 2.715 g y un peso máximo de 4.330 g, con una media de 3.553,11g. Para una visualización grafica de estos datos se realizó un hietograma de distribución del peso vivo (**Figura 11**).

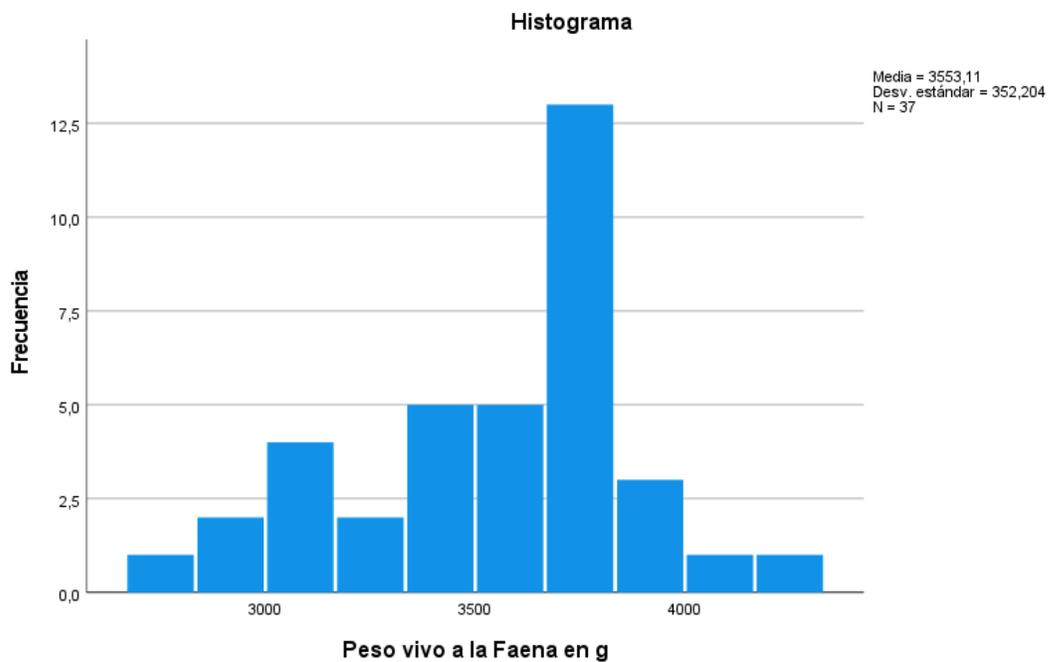


Figura 11. *Histograma de distribución del peso vivo de pollos parrilleros en la muestra*
Elaboración propia.

Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para la característica peso vivo final a la faena, determinándose que los valores de esta variable se presentaban con una distribución normal en la muestra (valor de significancia $< 0,5$).

Para poder relacionar las variantes del microsatélite LEI0258 y su asociación con el peso vivo final a la faena, se realizó una gráfica, donde se aprecian los genotipos, grupos perteneciente y su peso vivo final a la faena (**Figura 12**).

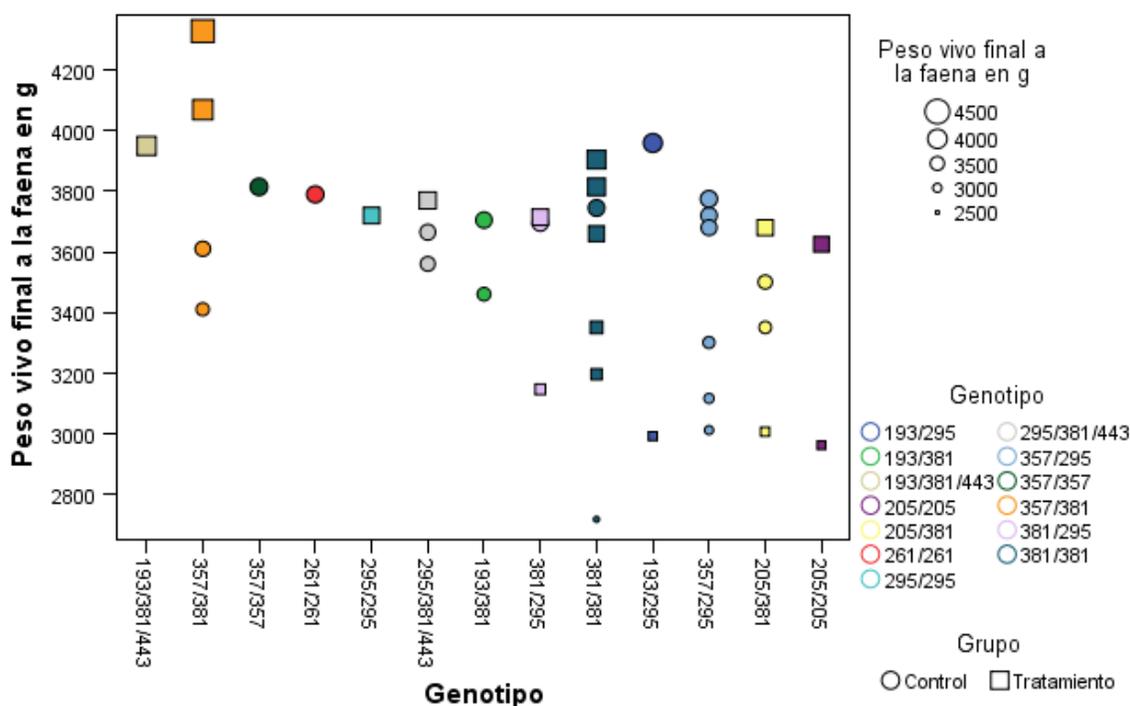


Figura 12. Distribución de peso vivo en función de genotipos

Nota: se ilustra el peso vivo (escala y tamaño) en función de los genotipos de parrilleros (posición en x y color) de mayor a menor de acuerdo a la media del peso vivo del genotipo, la forma (cuadrado o círculo) indica si se trataba de un individuo del grupo control o tratamiento con pleurotina.

Asociación entre Peso Vivo y alelos LEI0258

No se observa una clara correlación entre algún genotipo del MHC para el VNTR LEI0258 y la variable peso vivo a la faena. Para un análisis más exhaustivo de estos resultados, se analizaron estos datos mediante el método de correlación de Pearson y Spearman utilizando el software IBM SPSS Statistics 25. Debido al elevado polimorfismo del VNTR LEI0258 en las muestras y el bajo número de animales utilizados, no se obtuvieron resultados con significancia aceptable para afirmar una correlación, se observó una tendencia ($p < 0,1$) de correlación negativa del alelo de 205 pb y el peso vivo final a la faena.

Este análisis fue ampliado en un posterior estudio (Beker *et al.*, 2022) en el que se incluyeron 46 animales del ensayo del año 2019 (con iguales características) sumando un total de 83 aves. En dicho ensayo, se hallaron un total de 11 alelos (193, 205, 261, 295, 307, 309, 321, 357, 381, 443 y

552 pb) de los cuales el de 381 pb fue el de mayor frecuencia (38,2 %), y el de 552 pb, el de menor frecuencia (0,6 %) 23 genotipos (18 disómicos y 5 trisómicos) en esta población, de los cuales, el genotipo 193/381 fue el de mayor frecuencia (14,6 %) y los genotipos 205/295, 205/307, 261/261, 261/381, 261/381, 307/357, 309/357, 193/261/357, 193/295/552 y 193/381/443 los de menor frecuencia (1,2 %). En este estudio se indicó una tendencia de asociación ($p < 0,1$) entre el genotipo 357/381 y un mayor PV, mientras que el 295/381, con menor PV (se observó una diferencia de 460 g). Finalmente, el modelo utilizado evidenció que el alelo 357 (frecuencia de 16,7 %) tendría asociación positiva y el alelo 205 (frecuencia 6,7 %) asociación negativa ($p < 0,05$) con PV. Del análisis surge que la frecuencia de los alelos con asociación positiva para la característica de PV (357 y 381 pb) representan aproximadamente el 50 % de los alelos en la población estudiada, por lo que dichas variantes podrían ser valoradas positivamente en el desarrollo del plan de selección.

Alelos de LEI0258 identificados en las líneas A, AS y ES que dan origen al Campero INTA

Un total de 6 alelos del marcador LEI0258 (193-381 pb) y 18 genotipos se identificaron en 195 pollos pertenecientes a líneas que dan origen al pollo Campero INTA. La línea que presentó la mayor variabilidad tanto alélica como genotípica fue la línea ES donde se encontraron 6 alelos y 13 genotipos. En la línea A se identificaron 5 alelos y 11 genotipos, mientras que la menor variabilidad se encontró en la línea AS, donde se encontraron 4 alelos y 8 genotipos para el LEI0258. El alelo de 381 pb presentó la mayor frecuencia (48 % en línea A y 72 % en línea AS), mientras que el de 205 pb fue el más frecuente en (49 %) en la línea ES. El alelo de LEI0258 de 205 pb, que recibe la nomenclatura B13 según serología, confiere mediana resistencia a Gumboro y a Marek, mayor tamaño del huevo y peso de la yema, mientras que el B13.1 o c2v (alelo LEI0258 de 381 pb) está asociado a mayor susceptibilidad a Sarcoma ROUX y mayor tasa de crecimiento. (Wang *et al.*, 2014). Los alelos identificados en las líneas AS, A, y ES que dan origen al pollo Campero INTA y sus correspondientes frecuencias se resumen en las **Figuras 13, 14 y 15**, respectivamente.

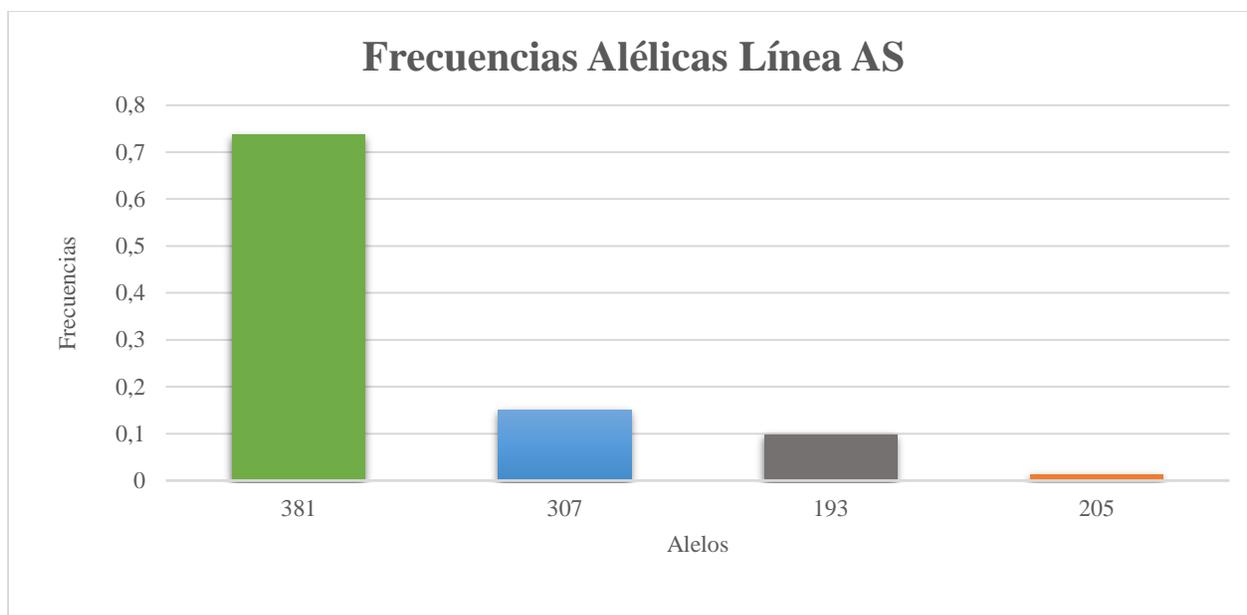


Figura 13. *Frecuencias alélicas de la línea AS*

Nota: La presente ilustración expresa las frecuencias alélicas de la línea AS ordenadas de mayor a menor. Producción propia.

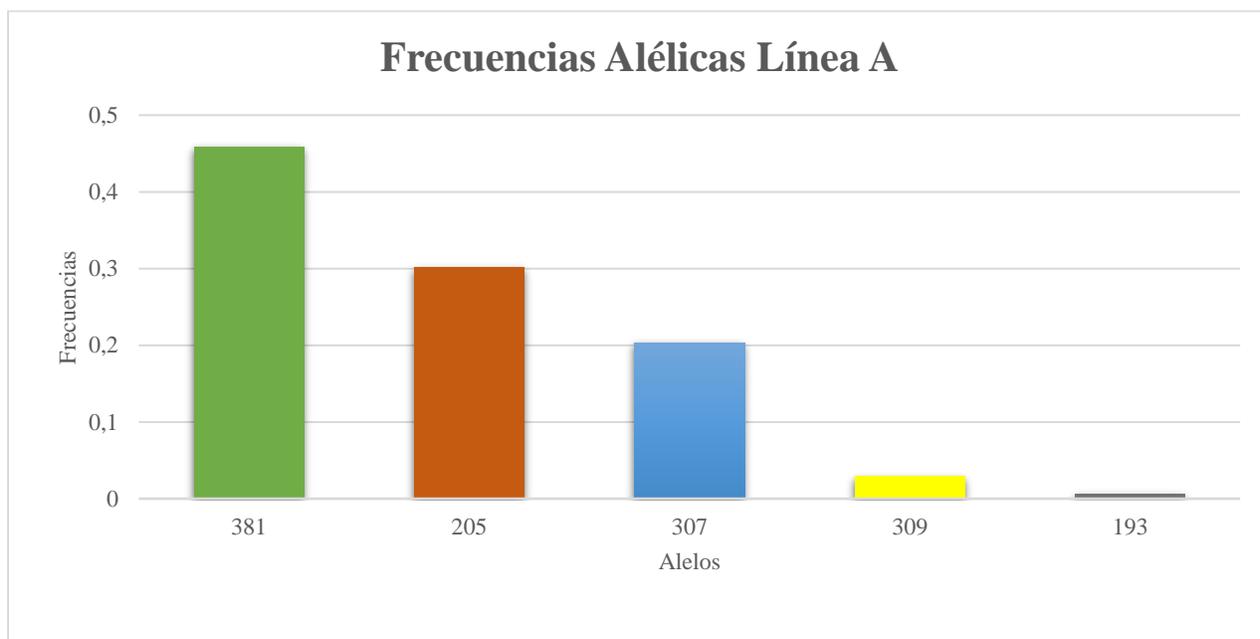


Figura 14. *Frecuencias genóticas de la línea A*

Nota: La presente ilustración expresa las frecuencias alélicas de la línea A ordenadas de mayor a menor. Producción propia.

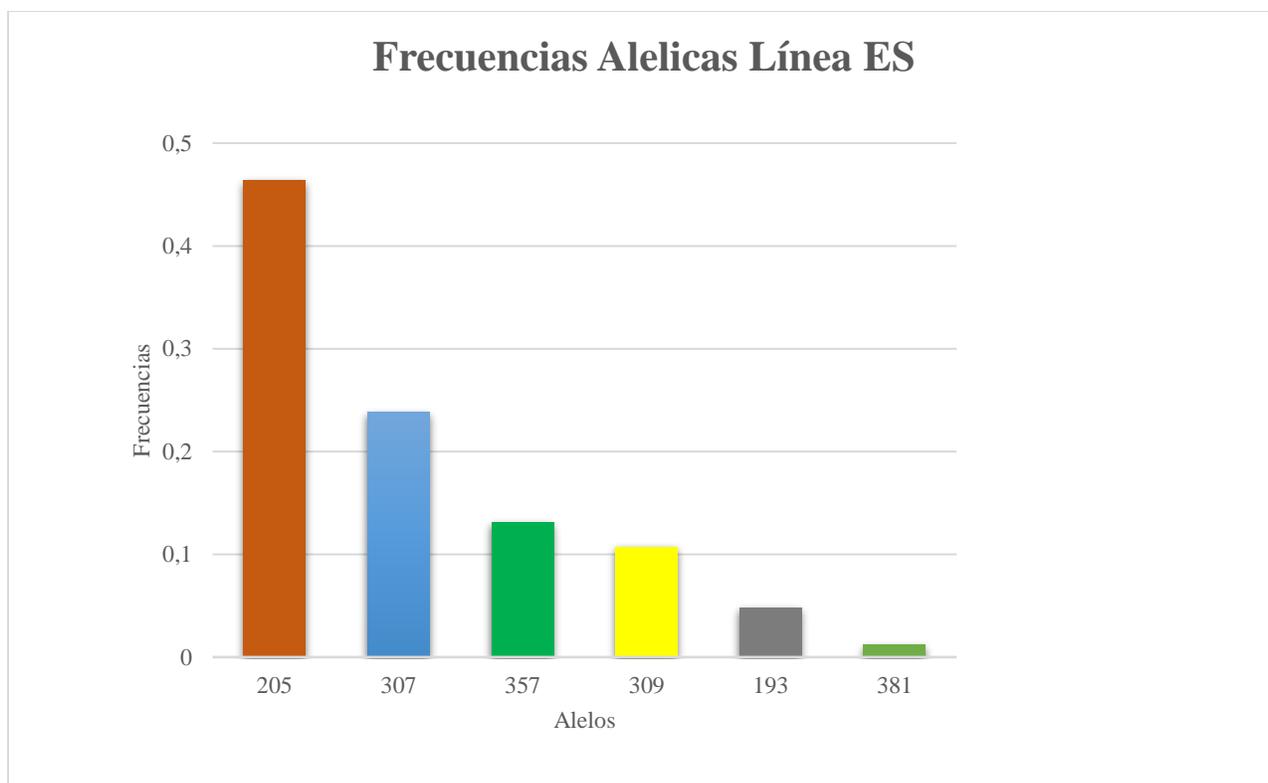


Figura 15. *Frecuencias genotípicas de la línea ES*

Nota: La presente ilustración expresa las frecuencias alélicas de la línea ES ordenadas de mayor a menor. Elaboración propia.

En la línea materna A el genotipo LEI0258 más frecuente fue 381/381 (0,27), seguido del alelo 205/381 (0,21), mientras que el que se identificó con menor frecuencia fue 309/381 (0,01). Mientras que en la línea ES se presentó con mayor frecuencia el genotipo 205/307 (0,31) y en menor frecuencia el 357/357 (0,02). La línea paterna AS presentó con mayor frecuencia el genotipo 381/381 (0,58) y el genotipo 205/381 presentó la menor frecuencia (0,01). Las frecuencias genotípicas de estas líneas se resumen en las **Figuras 16, 17 y 18**, respectivamente.

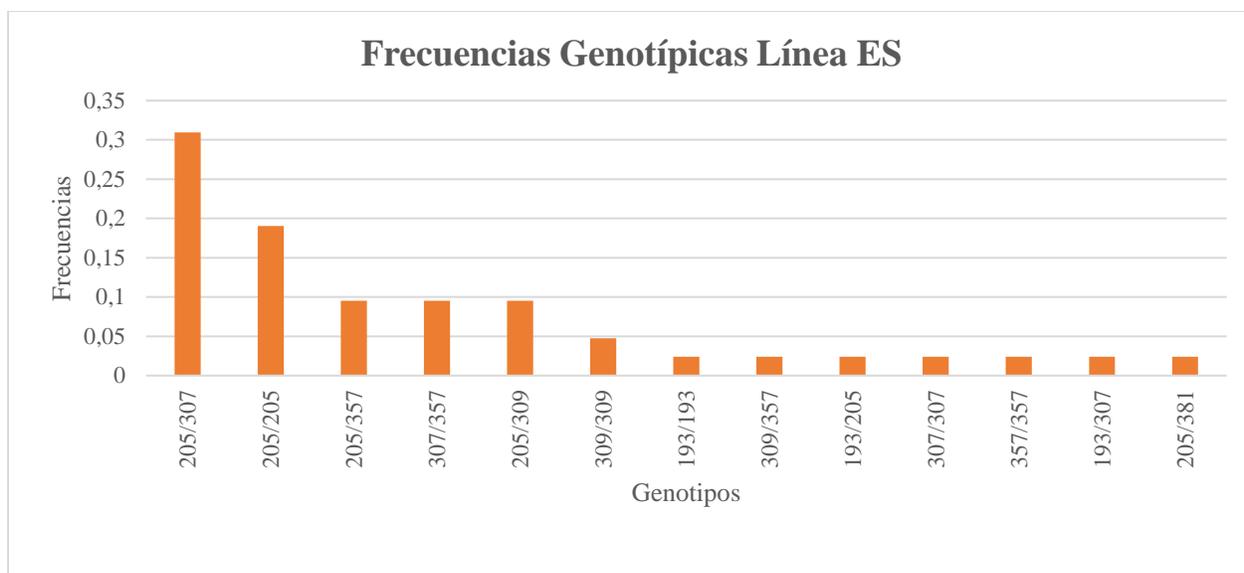


Figura 16. Frecuencias genotípicas de la línea ES

Nota: La presente figura expresa las frecuencias genotípicas de la línea ES ordenadas de mayor a menor. Producción propia.

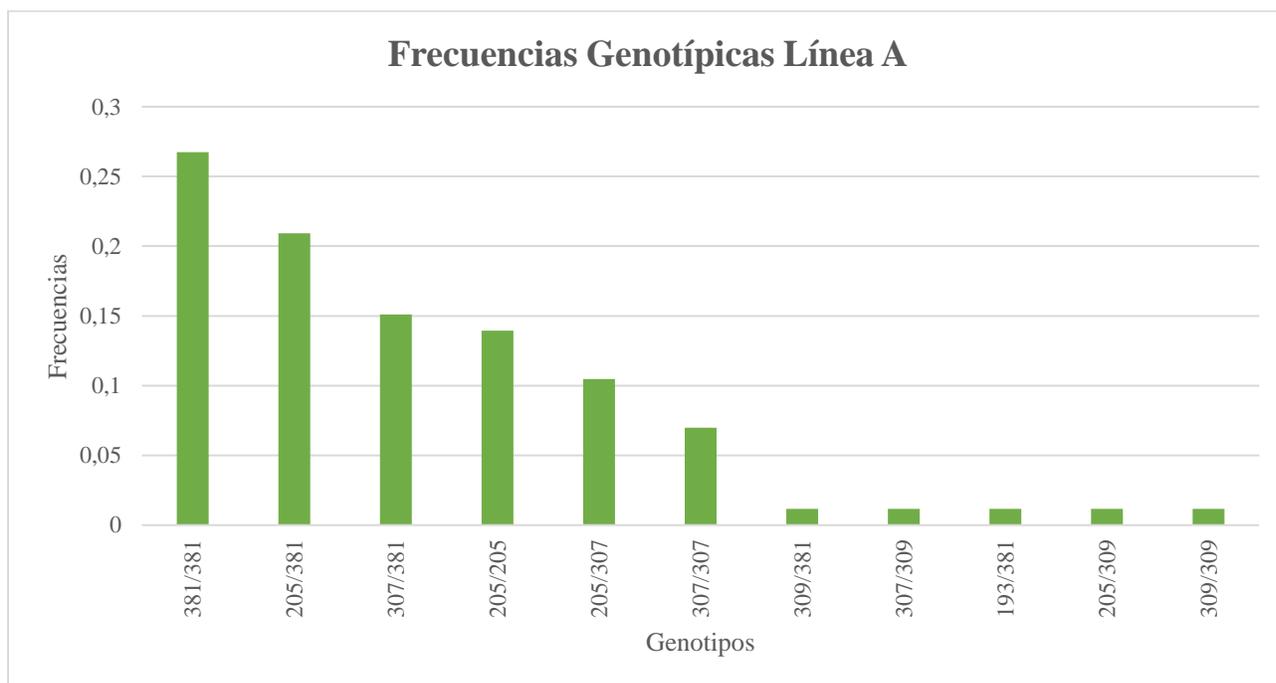


Figura 17. Frecuencias genotípicas de la línea A

Nota: La presente ilustración expresa las frecuencias genotípicas de la línea A ordenadas de mayor a menor. Producción propia.

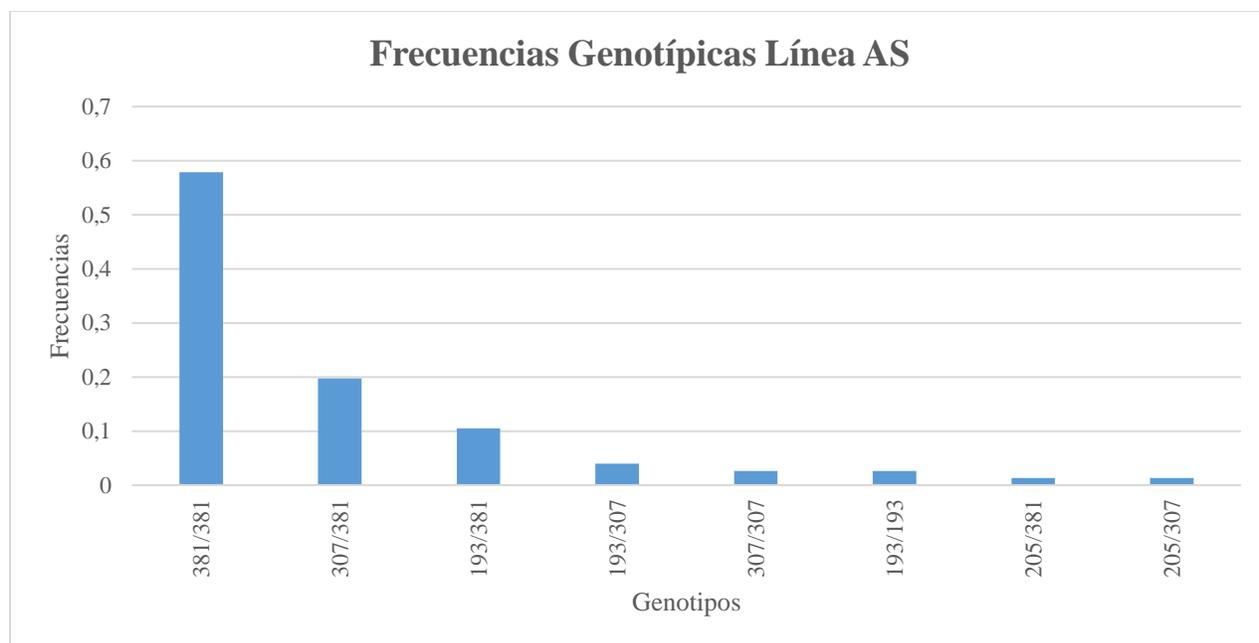


Figura 18. *Frecuencias genotípicas de la línea AS*

Nota: La presente ilustración expresa las frecuencias genotípicas de la línea ES ordenadas de mayor a menor. Elaboración propia.

Comparando los alelos LEI0258 obtenidos de Parrilleros y los de las líneas A, AS y ES que dan origen a la raza Campero INTA, se pudo determinar que estas poblaciones son distintas, tanto desde el punto de vista génico, como genotípico (Prueba exacta de G, $p < 0,05$).

Conclusiones

Los resultados de esta investigación lograron determinar, mediante el análisis indirecto del microsatélite LEI0258, la variabilidad genética del MHC-B, frecuencias alélicas y genotípicas, de dos de las líneas maternas (A y ES) y una paterna (AS) que dan origen al pollo Campero INTA. También con la misma metodología, se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de pollos parrilleros y se pudo establecer tendencias en correlación de estas y su peso vivo final a la faena, que fueron confirmadas y ampliadas en un análisis con mayor potencia estadística. Estos resultados, sumados a los de investigaciones futuras pueden contribuir de manera importante en el desarrollo de planes de mejoramiento genético y selección que incluyan bases genéticas en la resistencia a enfermedades y caracteres productivos. En lo personal, la realización de este trabajo fue una experiencia muy enriquecedora, donde pude profundizar en conocimientos construidos durante la carrera de Medicina Veterinaria. Además, formando parte de un equipo de investigación, bajo la dirección de mis docentes a cargo (de los que quiero destacar su incesante apoyo y acompañamiento). Pude profundizar en el aprendizaje en metodologías de revisiones bibliográficas, técnicas de biología molecular, análisis y procesamiento de datos de investigación; y confección de artículos para presentaciones científicas, entre otros. Lo que me motiva a continuar con mi formación en el campo científico, para lo cual tengo intenciones de postularme a una beca CONICET de doctorado, y de esta manera poder aportar en la construcción de conocimientos científico-tecnológicos para el desarrollo de nuestra región.

Referencias

- Beker, M. P., Remolins, J. S., Sánchez, M., Buglione, M. B., Amatta, R., Maizon, D. O., & Iglesias, G. M. (2022). “Estudio de asociación entre alelos del marcador LEI0258 del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y el peso vivo en pollos parrilleros” *L Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Regionales SAG-NEA. 2 al 05 de octubre de 2022.*
- Chazara, O., Chang, C. S., Bruneau, N., Benabdeljelil, K., Fotsa, J. C., Kayang, B. B., Loukou, N. E., Osei-Amponsah, R., Yapi-Gnaore, V., Youssao, I. A. K., Chen, C. F., Pinard-Van Der Laan, M. H., Tixier-Boichard, M., & Bed’Hom, B. (2013). Diversity and evolution of the highly polymorphic tandem repeat LEI0258 in the chicken MHC-B region. *Immunogenetics*, 65(6), 447–459. <https://doi.org/10.1007/S00251-013-0697-6>
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., & Kvesitadze, G. (2008). Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, 99(3), 457–462. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.01.011>
- Fulton, J. E., Hunt, H. D., & Bacon, L. D. (2001). Chicken major histocompatibility complex class I definition using antisera induced by cloned class I sequences. *Poultry Science*, 80(11), 1554–1561. <https://doi.org/10.1093/PS/80.11.1554>
- Fulton, J. E., Juul-Madsen, H. R., Ashwell, C. M., McCarron, A. M., Arthur, J. A., O’Sullivan, N. P., & Taylor, R. L. (2006). Molecular genotype identification of the Gallus gallus major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 58(5–6), 407–421. <https://doi.org/10.1007/s00251-006-0119-0>
- Iglesias, G. M. (2022). “Análisis y revisión de la variación del MHC-B. en pollos. Síntesis del trabajo en líneas sintéticas INTA”. Aprobado para su publicación en *CIENCIA VETERINARIA en el Vol. 24 (2). Julio – diciembre.*
- Miller, M. M., Goto, R., Zoorob, R., Auffray, C., & Elwood Briles, W. (1994). Regions of homology shared by Rfp-Y and major histocompatibility B complex genes. *Immunogenetics*, 39(1), 71–73. <https://doi.org/10.1007/BF00171802>

- Pardo Caballos, A. (2005). Ética de la experimentación animal: directrices legales y éticas contemporáneas. *Cuadernos de Bioética*, ISSN 1132-1989, Vol. 16, Nº 58, 2005, Págs. 393-418, 16(58), 393–418. <http://www.hsus>.
- Rosa Catalina Bermúdez Savón I, D. C., Nora García Oduardo I, D. C., Serrano Alberni, M. I., Idilia Rodríguez Castro, M. I., & Mustelier Valenzuela III, I. (2014). *Conversion of Agroindustrial Residues Into added-Value products by solid state fermentation*. XXXIV(3), 263–275.
- Ruiz, B. (2016). Repuntan pollo y huevo en la avicultura latinoamericana. *Industria avícola*, 63, 10-38.
- Tizard, I. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria* (S. L. Elsevier España, Ed.; 8º).
- Wang, H., Ma, T., Chang, G., Wan, F., Liu, X., Liu, L., Xu, L., Chen, J., & Chen, G. (2014). Molecular Genotype Identification of Different Chickens: Major Histocompatibility Complex. *The Open Access Journal of Science and Technology*, 2, 1–7. <https://doi.org/10.11131/2014/101111>