

# POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA PEPTIDASA-B EN BOVINOS CRIADOS EN BRASIL

## GENETIC POLYMORPHISM OF PEPTIDASE-B IN CATTLE SERVANTS IN BRAZIL

Lara, M.A.C., J.R.B. Sereno, U.G.P. Abreu y E.P.B. Contel

Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo. Cx. Postal 60. CEP 13460-000. Nova Odessa, SP. Brasil. E-mail: malara@izsp.br

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Bovinos autóctonos. Distancias genéticas. Heterocigosidad. Relaciones genéticas.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Native cattle. Genetic distance. Heterozygosity. Genetic relationships.

### RESUMEN

El presente estudio fue conducido con el objeto de investigar la presencia de diferentes formas de la Pep-B en razas bovinas y sus distancias genéticas, a partir de sus frecuencias alélicas. Fueron utilizadas 1691 muestras de sangre de vacunos de origen *Bos taurus taurus*, pertenecientes a las razas especializadas (Frisona, Pardo-Suiza y Jersey), naturalizadas brasileñas (Pantaneira, Caracú y Mantiqueira) y argentina (Criollo Argentino) y razas de origen *Bos taurus indicus* (Nelore y Gir). En las razas Frisona, Pardo-Suiza, Jersey y Criollo Argentino, el locus Pep-B mostró ser monomórfico, con la fijación del alelo *Pep-B<sup>2</sup>*. En las razas Pantaneira y Mantiqueira fueron observados los siguientes fenotipos: *Pep-B<sup>2</sup>*, *Pep-B<sup>3</sup>*, *Pep-B<sup>1-2</sup>*, *Pep-B<sup>2-3</sup>* y *Pep-B<sup>1-3</sup>* mientras que en las demás, los fenotipos fueron *Pep-B<sup>1</sup>*, *Pep-B<sup>1-2</sup>* y *Pep-B<sup>2</sup>*. La presencia del alelo *Pep-B<sup>3</sup>*, en las razas Mantiqueira y Pantaneira, sustenta la hipótesis de que, ese alelo, pueda ser marcador de razas Ibéricas, pues según los datos históricos, ambas razas tuvieron en su origen la participación de los bovinos oriundos de la Península Ibérica. El cluster formado por las razas Mantiqueira y Pantaneira, refuerza la hipótesis de origen

monofilética y, por tanto esas razas pudieron tener un ancestro común, probablemente el *Bos taurus primigenius*, introducido por los portugueses y españoles durante la colonización de América del Sur.

### SUMMARY

The present study was done to investigate the presence of peptidase-B variants in bovine breeds and to calculate the genetic distance them. 1695 samples of red cells from *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* were used. *Bos taurus taurus* was represented by specialized breeds (Frisona, Brown-Swiss and Jersey), naturalized Brazilian (Pantaneira, Caracu and Mantiqueira) and one Argentine (Argentine Creole), while two breeds from *Bos taurus indicus* were investigated, Nelore and Gir. The locus Pep-B showed to be monomorphic in Frisona, Brown-Swiss, Jersey and Argentinean Creole, with the fixation of the allele *Pep-B<sup>2</sup>*. In Pantaneira and Mantiqueira breeds were observed the following phenotypes: *Pep-B<sup>2</sup>*, *Pep-B<sup>3</sup>*, *Pep-B<sup>1-2</sup>*, *Pep-B<sup>2-3</sup>* and *Pep-B<sup>1-3</sup>*, while in the other ones, the

*Arch. Zootec. 49: 31-37. 2000.*

phenotypes were *Pep-B<sup>1</sup>*, *Pep-B<sup>1-2</sup>* and *Pep-B<sup>2</sup>*. The presence of the allele *Pep-B<sup>3</sup>*, in Mantiqueira and Pantaneira, sustains the hypothesis that it can be a genetic marker of Iberian breeds, because according to the historical data both had in its origin the participation of the bovine originated from the Iberian Peninsula. The cluster formed by Mantiqueira and Pantaneira breeds, reinforces the hypothesis of a monophyletic origin and, therefore those breeds could have a common ancestral, probably the *Bos taurus primigenius*, introduced by the Portuguese and Spanish during South America colonization.

### INTRODUCCIÓN

El polimorfismo genético de la *Pep-B* eritrocitaria fue descrito, en bovinos, por Del Lama *et al.* (1992). La variabilidad detectada por esos autores fue explicada como oriunda de la existencia de dos alelos autosómicos codominantes, que fueron denominados *Pep-B<sup>1</sup>* y *Pep-B<sup>2</sup>*. En este estudio, el alelo *Pep-B<sup>1</sup>* fue detectado en todas las razas de origen *Bos indicus* y cruzadas, sugiriéndose su empleo como marcador genético de ellas.

Recientemente, el alelo *Pep-B<sup>3</sup>* fue descrito en bovino Mantiqueira (Lara y Contel, 1997). En el mencionado estudio, el análisis de padres y progenies confirmó que la síntesis de las variantes de la peptidasa-B es controlada por un único *locus* que presenta tres alelos codominantes: *Pep-B<sup>1</sup>*, *Pep-B<sup>2</sup>* y *Pep-B<sup>3</sup>*.

El presente estudio fue conducido con el objeto de investigar la presencia de distintas formas de la *Pep-B* en razas bovinas y sus respectivas distancias genéticas a partir de sus frecuencias alélicas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Las 1695 muestras sanguíneas investigadas en el presente estudio fueron recolectadas en 25 rebaños de bovinos, ubicados en varios estados del Brasil, incluyéndose el rebaño Criollo Argentino. El criterio adoptado fue el más casual posible con el intento de obtener una muestra bien representativa de cada raza, excepto en los rebaños Pantaneiro, Mantiqueira y Gir en que fueron incluidas familias completas, el que permitió verificar la segregación de las variantes de la peptidasa-B. Las razas bovinas investigadas fueron las siguientes: Frisona (4), Pardo-Suiza (6), Jersey (2), Caracú (3), Mantiqueira (1), Pantaneira (2), Criollo Argentino (1), Nelore (5) y Gir (1). Los números entre paréntesis indican el número de rebaños que ha sido hecho los muestreos. La preparación de las muestras y las análisis de electroforesis fueron realizada de acuerdo con los métodos de Lewis y Harris (1967) y Lara y Contel (1997).

Las estimas de las frecuencias alélicas y genotípicas fueron obtenidas empleándose el programa para ordenador GENEPOP versión 1.2 (Raymond y Rousset, 1995). Ese programa permitió verificar el ajuste de las frecuencias genotípicas a las proporciones teóricas de Hardy-Weinberg y, todavía, comparar las frecuencias alélicas entre pares de razas, obteniéndose valores exactos de probabilidades, para el test de Fisher. Los índices de diversidad (Nei, 1973) y las distancias genéticas entre razas fueron estimadas empleándose el programa DISPAN (Kumar *et al.*, 1993).

## POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN BOVINOS BRASILEÑOS

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

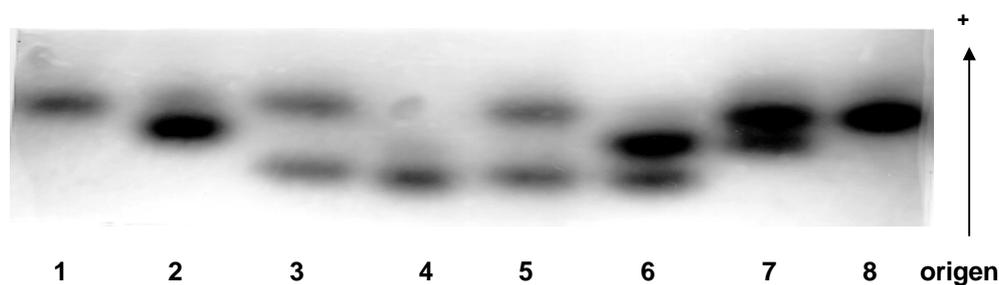
La actividad enzimática de la Pep-B reveló seis fenotipos distintos (**figura 1**). Los bovinos homocigotos, denominados *Pep-B<sup>1</sup>*, *Pep-B<sup>2</sup>* y *Pep-B<sup>3</sup>*, presentaron patrón de una banda con movilidad anódica creciente. Los heterocigotos *Pep-B<sup>1</sup>/Pep-B<sup>2</sup>*, *Pep-B<sup>1</sup>/Pep-B<sup>3</sup>* y *Pep-B<sup>2</sup>/Pep-B<sup>3</sup>* presentaron un perfil eletroforético correspondiente al somatorio de las bandas observadas en los homocigotos, indicando para esa enzima una estructura monomérica, como ya propuso para Pep-B humana (Harris y Hopkinson, 1976) y bovina (Del Lama *et al.*, 1992).

Considerando que la peptidasa estudiada en este trabajo fue revelada con el mismo sustrato (l-leucilglicil-glicina) utilizado previamente por Saison (1973) y Del Lama *et al.* (1992) en hemolisados bovinos, se concluye que

la enzima investigada corresponde a la descrita por esos autores, que la denominaron Pep-B.

Las frecuencias alélicas y desvíos patrón estimado para siete razas de origen *Bos taurus* (Frisona, Pardo-Suiza, Jersey, Caracú, Mantiqueira, Pantaneira y Criollo Argentino) y dos razas de origen *Bos indicus* (Nelore y Gir) están presentados en la (**tabla I**). Los tests exactos de Fisher revelaron para todas las razas investigadas que las proporciones fenotípicas observadas para la peptidasa-B se encontraban de acuerdo con las proporciones esperadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

En todas las razas europeas especializadas (Frisona, Pardo-Suiza, Jersey) y en el Criollo Argentino fue detectado sólo el alelo *Pep-B<sup>2</sup>* y, en las otras razas los alelos *Pep-B<sup>1</sup>* y *Pep-B<sup>2</sup>*, más el *Pep-B<sup>3</sup>* fue exclusivo para las



Muestras 1 y 8, fenotipo *Pep-B<sup>3</sup>*; muestra 2, fenotipo *Pep-B<sup>2</sup>*; muestra 3 y 5, fenotipo *Pep-B<sup>1</sup>/Pep-B<sup>3</sup>*; muestra 4, fenotipo *Pep-B<sup>1</sup>*; muestra 6, fenotipo *Pep-B<sup>1</sup>/Pep-B<sup>2</sup>*; muestra 7, fenotipo *Pep-B<sup>2</sup>/Pep-B<sup>3</sup>*.

**Figura 1.** Perfil eletroforético de la peptidasa-B en eritrocitos de bovinos, revelado con el sustrato l-leucilglicil-glicina. Eletroforesis en gel de almidón de maíz en la concentración de 14 p.100, tampón citrato/fosfato pH 5,9. Migración en el sentido indicado. (Electrophoretic pattern of B-peptidase in bovine erythrocytes showed with l-leucilglycyl-glycine substrate. Starch gel electrophoresis with 14 percent citrate/phosphate buffer, pH 5.9. Arrow shows migration course).

**Tabla I.** Estimaciones de las frecuencias alélicas y respectivos desvíos patrón para el locus de Peptidasa-B obtenidos para nueve razas bovinas. (Allelic frequencies estimate and respective standard error to peptidase-B locus from nine breeds obtained).

Razas	N	Frecuencias Alélicas		
		<i>Pep-B</i> <sup>1</sup>	<i>Pep-B</i> <sup>2</sup>	<i>Pep-B</i> <sup>3</sup>
Frisona	109	0	1	0
Pardo-Suíza	97	0	1	0
Jersey	87	0	1	0
Caracú	223	0,0292 ± 0,0078	0,9708 ± 0,0078	0
Mantiqueira	118	0,1186 ± 0,0196	0,8178 ± 0,0245	0,0636 ± 0,0166
Pantaneira	104	0,1667 ± 0,0317	0,8086 ± 0,0319	0,0192 ± 0,0094
Criollo Argentino	40	0	1	0
Nelore	658	0,8906 ± 0,0088	0,0194 ± 0,0088	0
Gir	255	0,8020 ± 0,0181	0,1980 ± 0,0181	0

N= Tamaño del muestreo

Mantiqueira y Pantaneira. La variabilidad genética detectada en las razas Nelore y Gir está de acuerdo con los relatos de Del Lama *et al.* (1992).

Esos autores reportaron la ocurrencia del alelo *Pep-B*<sup>1</sup> en cinco razas cebuínas, cruzadas (Canchim y Santa Gertrudis) y bovinas italianas (Marchi-

**Tabla II.** Estimaciones de las distancias genéticas entre nueve razas bovinas de acuerdo con el método de NEI (1972) a partir de las frecuencias alélicas del locus de Peptidasa-B. (Genetic distance estimate between nine bovine breeds agreeing Nei methods (1972) from allelic frequencies by peptidase-B locus).

	F	PS	J	C	Cr.A	M	P	N
PS	0,0000							
J	0,0000	0,0000						
C	0,0004	0,0004	0,0004					
Cr.A	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004				
M	0,0124	0,0124	0,0124	0,0084	0,0124			
P	0,0198	0,0198	0,0198	0,0140	0,0198	0,0004		
N	2,1043	2,1043	2,1043	1,8856	2,1043	1,3371	1,1387	
G	1,4280	1,4280	1,4280	1,3134	1,4280	0,9782	0,8407	0,0066

F= Frisona; PS= Pardo-Suíza; J= Jersey; C= Caracú; Cr.A= Criollo Argentino; M= Mantiqueira; P= Pantaneira; N= Nelore, G= Gir.

## POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN BOVINOS BRASILEÑOS

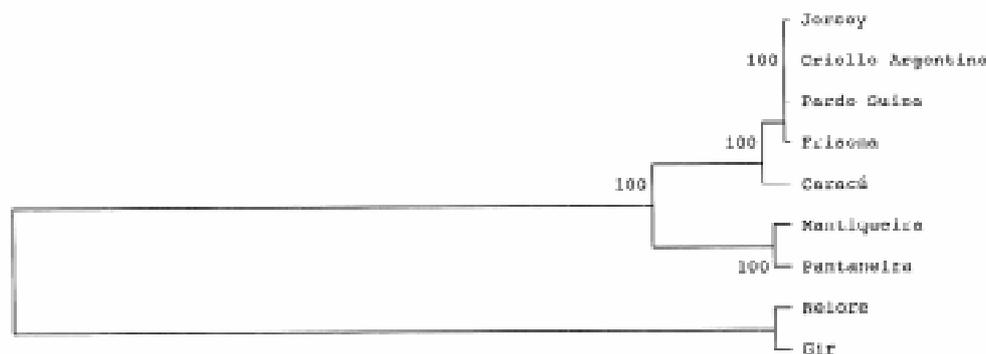
giana y Chianina), sugiriendo su uso como marcador de razas cebuínas.

En las razas bovinas naturalizadas, las frecuencias del *Pep-B<sup>1</sup>* se presentaron en la siguiente orden creciente: Caracú < Mantiqueira < Pantaneira. Considerando el alelo *Pep-B<sup>1</sup>* como marcador genético de razas cebuínas, se sugiere para la raza Pantaneira mayor participación de genes cebuínos con relación a las demás. La ocurrencia del alelo *Ca<sup>z</sup>* de la anhidrasa carbónica, considerado gen específico de razas cebuínas, en frecuencias considerables en la raza Pantaneira está de acuerdo con tal suposición (Lara *et al.*, 1998), sin embargo ese alelo (*Ca<sup>z</sup>*) no ha sido detectado en las razas Caracú y Mantiqueira (Lara, 1998). Esos resultados permiten sugerir que el alelo

*Pep-B<sup>1</sup>* probablemente no sea específico de razas cebuínas, como en el caso del alelo *Ca<sup>z</sup>*, sin embargo sea el más común en razas de origen *Bos indicus*.

La presencia exclusiva del alelo *Pep-B<sup>3</sup>* en la raza Mantiqueira y Pantaneira, ambas oriundas de bovinos introducidos por los portugueses y españoles durante la colonización del Brasil (Guaragna *et al.*, 1988; Mazza *et al.*, 1994), refuerza la hipótesis comentada anteriormente (Lara y Contel, 1997) de que dicho alelo pueda ser marcador de razas Ibéricas.

Las frecuencias estimadas de los heterocigotos variaron de 5,68 a 31,97 p.100, sin embargo en las razas Frisona, Pardo-Suiza, Jersey y Criollo Argentino, el locus de la peptidasa-B se mos-



**Figura 2.** Dendrograma construido de acuerdo con el método de UPGMA, a partir de las estimas de distancias genéticas de NEI (1972), demostrando las relaciones genéticas entre nueve razas bovinas. (Números presentados en cada uno corresponden a los valores del porcentaje de bootstrap, obtenidos a partir de 1000 replicaciones empleándose el programa DISPLAN). (Dendrograma constructed by UPGMA methods the starting genetics distancias estimate by Nei (1972), showing genetic relationship between nine bovine breeds (numbers showed in each point be corresponded with percentage values by bootstrap obtained with 1000 replications by DISPLAN programe).

tró monomórfico. En las demás razas investigadas, los valores de heterocigosidad se presentaron en la siguiente orden creciente: Caracú < Nelore < Mantiqueira < Gir < Pantaneira, siendo los valores de heterocigosidad estimados en 0,0568; 0,1950; 0,3144; 0,3182 y 0,3197, respectivamente.

Las probabilidades referentes al test de Fisher aplicado en tablas de contingencia revelaron que los alelos *Pep-B*<sup>1</sup>, *Pep-B*<sup>2</sup> y *Pep-B*<sup>3</sup> ocurrieron en frecuencias específicas en cada grupo racial. Entre pares de razas, las diferencias en frecuencias alélicas fueron también altamente significativas.

El análisis de la diversidad en poblaciones subdivididas de Nei (1973), realizada a partir de frecuencias alélicas de la *Pep-B*, reveló un índice relativa-

mente elevado de divergencia genética entre las razas, siendo los valores de  $H_T$ ,  $H_S$  y  $G_{ST}$  estimados en 0,3616, 0,1333 y 0,6313, respectivamente.

Como se puede ver en la **tabla II**, las distancias genéticas entre pares de razas, estimadas también a partir de las frecuencias alélicas de la *Pep-B*, se mostraron de acuerdo con las esperadas, ya que los valores mayores fueron obtenidos en pares donde una raza era de origen *Bos taurus* y, la otra, *Bos indicus*. Las relaciones genéticas entre razas están ilustradas en la **figura 2**.

En conclusión, el *locus* de la peptidasa-B se mostró muy informativo, pudiendo ser considerado de gran aplicación en estudios de caracterización genética y de relaciones filogenéticas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Del Lama, S.N., M.A. Del Lama, M.A. Mestriner and N. Mortari. 1992. Peptidase B polymorphism in cattle erythrocytes. *Biochem. Genet.*, 30: 247-255.
- Guaragna, G.P., L.B. Gambini, A.L. Figueiredo e F.L. Pires. 1988. Eficiência reprodutiva do rebanho Mantiqueira da Estação Experimental de Zootecnia de Pindamonhangaba I. Efeito de fatores de meio. *B. Industr. Anim.*, 45: 33-72.
- Harris, H. and D.A. Hopkinson. 1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 1993. DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis. Molecular Evolutionary Analysis, Pennsylvania State University Parky.
- Lara, M.A.C. and E.P.B. Contel. 1997. A new allele of peptidase-B in cattle. *Brazil. J. Genet.*, 21: 9-12.
- Lara, M.A.C. 1998. Variabilidade genética em Bovinos e Bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Brasil. 215 p.
- Lara, M.A.C., J.R.B. Sereno, U.G.P. Abreu, A.S. Mariante and E.P.B. Contel. 1998. Genetic diversity in Pantaneiro cattle determined by protein polymorphism. In: Fourth Global Conference on Conservation of Domestic Animal Genetic Resources, Kathmandu, Nepal, p. 9-10.
- Lewis, W.H.P. and H. Harris. 1967. Human red cell peptidases. *Nature*, 215: 351-355.
- Mazza, M.C.M., C.A.S. Mazza, J.R.B. Sereno, S.A. Santos and A.O. Pellegrin. 1994. Ethnobiology and Conservation of Pantaneiro cattle in Brazil. Corumbá, Mato Grosso do Sul, EMBRAPA-Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. 61 p.

## POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN BOVINOS BRASILEÑOS

- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70: 3321-3323.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. Genepop (version 1.2): Populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86: 248-249.
- Saison, R. 1973. Red cell peptidase polymorphism in Pigs, Cattle, dogs na Mink. *Vox Sanguinis*, 25: 173-181.