

**ASOCIACIÓN DEL LOCUS *BoLA-DRB3.2* CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS  
BOVINA EN RAZAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS**

**DARWIN YOVANNY HERNÁNDEZ HERRERA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS  
PALMIRA  
2010**

**ASOCIACIÓN DEL LOCUS *BoLA-DRB3.2* CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS  
BOVINA EN RAZAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS**

**DARWIN YOVANNY HERNÁNDEZ HERRERA**

**Trabajo de grado para optar el título de Magister en Ciencias Agrarias línea  
de investigación Producción Animal Tropical**

**DIRIGIDO POR:  
Zoot., M. Sc., Ph.D LUZ ANGELA ALVAREZ FRANCO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS  
PALMIRA  
2010**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE PALMIRA

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

### ACTA DE JURADO DE TESIS

#### MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS LINEA DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

En Palmira a los 26 días del mes de Mayo de 2010, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores GUILLERMO GIOVAMBATTISTA, VERONICA RIPOLI y JAVIER ANTONIO BENAVIDES M.

Para calificar la Tesis de Grado de:

## DARWIN YOVANNY HERNANDEZ HERRERA

Titulada:

“Asociación del Locus *BoLA-DRB3.2* con el Virus de la Leucosis Bovina en Razas Criollas y Colombianas” bajo la dirección de la profesora Luz Ángela Álvarez Franco Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes GUILLERMO GIOVAMBATTISTA, VERONICA RIPOLI y JAVIER ANTONIO BENAVIDES, M. y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA

GUILLERMO GIOVAMBATTISTA

VERONICA RIPOLI

JAVIER A. BENAVIDES M.

## **DEDICATORIA**

A mi Padre que me ha guiado por el camino de la sabiduría.

A mi Madre, mi Hermana, mi tía Mimi, Cheche, Nana y Sandra.

A mis nuevos Hermanos y su Madre.

A la Muñeca y la Miñequita.

Al todo Poderoso.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la profesora Luz Ángela Álvarez Franco directora y guía constante en el trabajo, profesor Jaime Eduardo Muñoz Flórez consejero incondicional en todo momento, Andrés Mauricio Posso Terranova apoyo incesante en el laboratorio, Jaime Rosero Alpalá por su esfuerzo en la consecución de las muestras, demás compañeros de laboratorio.

A la Dirección Nacional de Investigación por la financiación del proyecto.

A todos los que de alguna u otra forma hicieron posible la finalización de la investigación.

La facultad y los jurados de tesis  
no se harán responsables de las ideas  
emitidas por el autor  
Artículo 24, resolución 04 de 1974

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN .....	17
1. REVISIÓN DE LITERATURA .....	21
1.1 LEUCOSIS BOVINA .....	21
2.1.1 Definición.....	21
2.1.2 Etiología .....	22
2.1.3 Síntomas .....	22
2.1.4 Lesiones .....	24
2.1.5 Transmisión del VLB .....	25
2.1.6 Diagnóstico.....	26
2.2 LA LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA (LBE) EN COLOMBIA.....	28
2.3 EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD BOVINO (BoLA) ...	30
2.3.1 Organización genómica de la región BoLA .....	30
2.4 GEN BOLA-DRB3.....	34

2.4.1 Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2* .....	34
2.4.2 Asociación del BoLA-DRB3 con enfermedades y características productivas.....	37
2.5 LAS RAZAS BOVINAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS.....	38
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
3.1 MUESTRAS DE ADN .....	42
3.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	42
3.3 DETECCIÓN DEL PROVIRUS DE LA LEUCOSIS VIRAL BOVINA.....	44
3.3.1 Extracción de ADN de los controles de PCR.....	44
3.3.2 Amplificación .....	44
3.3.3 Electroforesis.....	45
3.4 POLIMORFISMOS DEL GEN BOLA-DRB3.2 .....	45
3.4.1 Amplificación del gen DRB3 .....	45
3.4.2 Restricción.....	46
3.4.3 Electroforesis.....	46
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47



4. RESULTADOS.....	49
4.1 PRESENCIA DEL VLB EN LAS RAZAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS. ....	49
4.2 POLIMORFISMOS DEL GEN BOLA-DRB3.2 .....	53
4.3 ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DEL GEN BOLA-DRB3.2 CON EL VLB.....	60
5. DISCUSIÓN .....	71
5.1 PRESENCIA DEL VLB EN LAS RAZAS CRIOLLAS Y SINTETICAS COLOMBIANAS. ....	71
5.2 POLIMORFISMOS DEL GEN BoLA-DRB3.2 .....	74
5.3 ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DEL GEN BoLA-DRB3.2 CON EL VLB.....	79
6. CONCLUSIONES .....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	85
ANEXO .....	100

## LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Reportes de la variabilidad del gen DRB3.2 en ganados del mundo. ....	35
Tabla 2. Asociación de los alelos BoLA-DRB3.2* con enfermedades y características productivas en diferentes ganados. ....	39
Tabla 3. Origen de las muestras del Banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. ....	43
Tabla 4. Porcentaje de presencia del VLB en el ganado Criollo, RSC y controles.	50
Tabla 5. Porcentaje de presencia del VLB por finca en el ganado Criollo, RSC y controles. ....	52
Tabla 6. Porcentaje de presencia del VLB por sexo en el ganado Criollo, RSC y controles. ....	53
Tabla 7. Número promedio de alelos (NPA) y distribución en el ganado criollo, RSC y controles. ....	55
Tabla 8. Frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3.2 en el GCC y razas control...	56
Tabla 9. Heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho), equilibrio Hardy-Weinberg y valores de Fis en GCC, RSC y controles (* P ( $\alpha < 0.05$ ); **P ( $\alpha < 0.01$ ))	59
Tabla 10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con diferentes niveles de estructura jerárquica en el GCC y controles (**P $\alpha < 0.01$ ). ....	61

Tabla 11. Cálculo del OR para los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* en el GCC y controles (N = neutral, S = susceptible, R = resistente). .....62

Tabla 12. Clasificación de los genotipos del gen DRB3 de acuerdo a la Resistencia, Susceptibilidad o Neutralidad a la presencia del virus en el GCC y controles. *NN*, neutral/neutral; *NR*, neutral/resistente; *NS*, neutral/susceptible; *RR*, resistente/resistente; *RS*, resistente/susceptible; *SS*, susceptible/susceptible; *P*, presencia del virus; *A*, ausencia del virus. ....65

## LISTA DE FIGURAS

pág.

- Figura 1. Estructura molecular del BoLA I y II. Los círculos negros representan sitios de unión glicosídica. S-S indican enlaces disulfuro. Las cadenas clase I son codificadas por *genes clase I*. El círculo en blanco representa sitios de unión glicosídica conservada entre humanos y bovinos. Las molécula clase II constan de una cadena  $\alpha$  codificada por genes A y una cadena  $\beta$  codificada por genes B (Takeshima & Aida, 2006). .....31
- Figura 2. Mapa genético del cromosoma 23 del bovino (Takeshima & Aida, 2006). .....32
- Figura 3. Producto de PCR amplificado Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular 100bp; carril 2: testigo positivo; carril 3: testigo negativo; carril 4: individuo positivo a la presencia del virus; carril 5: individuo negativo a la presencia del virus. ....49
- Figura 4. Frecuencia de los alelos utilizados para el cálculo del OR (en color azul alelos categoría N, en color verde categoría R y en color rojo categoría S). .....70

## LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo 1. *Patrones de restricción de las enzimas RsaI, BstYI y HaeIII en el gen BoLA-DRB3.2\** ..... 100

Anexo 2. *Determinación de los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* mediante PCR-RFLP* ..... 101

## GLOSARIO

AMOVA	Análisis de varianza molecular
BON	Raza Bovina Criolla Blanco Orejinegro
BoLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Bovino (Antígenos de los Leucocitos Bovinos)
BRAH	Raza Bovina Control Brahman
CAS	Raza Bovina Criolla Casanareño
CQT	Raza Bovina Criolla Caqueteño
CCC	Raza Bovina Criolla Costeño con Cuernos
ChS	Raza Bovina Criolla Chino Santandereano
DRB3.2	Gen del complejo BoLA clase II, exón 2
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FIS	Coeficiente de endogamia
FST	Coeficiente de diferenciación
He	Heterocigocidad esperada
Ho	Heterocigocidad observada
HOLS	Raza Bovina Control Holstein
HV	Raza Bovina Criolla Hartón del Valle
LUC	Raza Bovina colombiana Lucerna
PCR	Técnica de amplificación de fragmentos de ADN denominada: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-RFLP	Técnica molecular denominada: Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
RS	Raza Bovina Criolla Romosinuano
SM	Raza Bovina Criolla San Martinero
VEL	Raza Bovina colombiana Velásquez
VLB	Virus de la Leucosis Bovina

## RESUMEN

En 330 muestras de ADN de ocho razas bovinas criollas (BON, CQT, CAS, CCC, ChS, HV, RS y SM, dos razas sintéticas colombianas LUC y VEL y dos controles B y H) se evaluó la presencia del VLB (detección de provirus - PCR anidada), los polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2\* (PCR semianidada - RFLP) y la asociación entre ambos (OR). Se encontró menor porcentaje de presencia del VLB en las razas criollas (31,3%) y colombianas que en las controles (38,2%) siendo mayor en los ganados de la región Andina que en los Llanos y Norte de Colombia, mayor presencia en las hembras que en los machos, mayor en los ganados de leche que en los de carne, se determinó que la presencia del virus depende de la raza. Se determinaron 41 alelos BoLA-DRB3.2\* los más frecuentes fueron \*28, \*37, \*24, \*23, \*20, \*27, \*8, \*16, \*39 (0.17, 0.11, 0.10, 0.09, 0.09, 0.07, 0.07 y 0.06 respectivamente), alta diversidad genética ( $H_e = 0.878$ ), una diferenciación genética altamente significativa ( $F_{st} = 0.044$ ) al igual que el coeficiente de endogamia ( $F_{is} = 0.249$ ) similares a otros ganados criollos de Suramérica. Se estimaron asociaciones entre la ausencia (resistentes) del VLB y los alelos \*21, \*24 y \*37 y entre la presencia (susceptibles) del VLB y los alelos \*6 y \*42 en los ganados criollos; en los ganados controles se encontró asociación positiva con el alelo \*13 y negativa con los alelos \*23 y \*28. El 10% de los individuos fue genotipificado como RR el 2.5% como SS y el 57% fue de genotipo neutral (NN). Los resultados indican que el ganado criollo colombiano posee genes de resistencia a enfermedades.

**Palabras clave:** Bovinos criollos, Complejo mayor de Histocompatibilidad, Marcadores moleculares, Resistencia a enfermedades.

## ABSTRACT

330 DNA samples from 8 Creole bovine breeds (BON, CQT, CAS, CCC, ChS, HV, RS and SM), 2 Colombian breeds synthetics (LUC and VEL) and 2 controls (B and H) were evaluated for the presence of VLB (provirus detection – Nested PCR), BoLA-DRB3.2\* gen polymorphism (Nested PCR – RFLP) and its association each other (OR). Less percentage of VLB in Creole (31,3%) and Colombian breeds (38,2%) was found than in control breeds (38,2%), being higher in animals from Andean region than in West valleys and North region, a greater presence in females than in males, higher in milk cattle for meat. We determinate that presence of virus depends on breed cattle. 41 alleles of BoLA-DRB3.2\* were detected, being \*28, \*37, \*24, \*23, \*20, \*27, \*8, \*16, \*39 those with higher frequency (0.17, 0.11, 0.10, 0.09, 0.09, 0.07, 0.07 y 0.06 respectively), high genetic diversity ( $H_e = 0.878$ ), genetic differentiation highly significant ( $F_{st}=0.044$ ) and inbreeding coefficient ( $F_{is} = 0.249$ ) similar to other Creole South American breeds. Relation between absence of VLB (resistant) and \*21, \*24, \*37 alleles and presence (susceptible) and \*6, \*42 alleles was found in cattle Creoles in controls gained positive association was found with allele \* 13 and negative with alleles \* 23 and \* 28. 10% of samples were genotyped as RR, 2.5% as SS and 57% as a neutral genotype. Results shown that Colombian Creole breeds have important disease resistant genes.

**Key words:** Creole bovines, Hystocompatibility complex, molecular markers, disease resistant.



## INTRODUCCIÓN

Martínez, (1992) señala que los bovinos criollos se caracterizan por su habilidad para reproducirse, longevidad, rusticidad y por su capacidad para aprovechar forrajes toscos y de escaso valor nutritivo. Además, expresan características adaptativas de gran importancia como tolerancia al calor y humedad y resistencia a ciertas enfermedades, lo cual incrementa su valor como recurso genético (Casas y Valderrama, 1998; Vásquez, 2005).

El virus de la Leucosis Bovina (VLB) es un virus linfotrópico presente en las poblaciones bovinas de muchos países. La infección generalmente cursa en forma crónica y asintomática y puede producir linfocitosis persistente (LP) en un 30 % de los animales portadores del virus. La entidad clínica se denomina Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) y está referida a animales serológicamente positivos. Luego de un prolongado período, en general de 3 a 5 años, solo una baja proporción de animales desarrollan tumores (0.1 – 5 %) (González *et al.*, 2001).

La infección se transmite fundamentalmente en forma horizontal o por vía iatrogénica, por exposición de los bovinos susceptibles a los linfocitos “B” portadores del virus. La sangre y la leche son los principales vehículos para la transmisión y la vía transplacentaria puede ser responsable de aproximadamente el 5% de terneros infectados nacidos de madres portadoras. La prevalencia aumenta a partir de los 6 meses de edad, con la mayor incidencia entre los 2 y 3 años, siendo mayor en plantales de bovinos de leche que en bovinos de carne (González *et al.*, 2001).

En varios países existen programas oficiales para el control y erradicación de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB). El diagnóstico se realiza rutinariamente por

métodos serológicos. La inmunodifusión (ID) ha sido por muchos años la prueba de elección por su alta especificidad y aceptable sensibilidad. Recientemente se desarrollaron distintos equipos comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche. Estas pruebas presentan la desventaja de no poder detectar la enfermedad en estadios tempranos de ésta o en animales jóvenes (González *et al.*, 2001).

Los estudios sobre la presencia del VLB en Colombia son variables, dependiendo de la región de muestreo de los animales y de la técnica serológica utilizada. En el Nororiente del país el porcentaje de presencia varía entre el 3.9 y el 14.64% utilizando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IGDA) (Aguilar *et al.*, 1989; Trujillo, 1989; Ruiz, 1995). Ramírez *et al.*, (2002) reportan una presencia del 37.5% en novillas y un 71.9% en vacas. En el departamento de Córdoba se encontró un 21.5% de positivos utilizando la técnica de ELISA (Betancour y Rodas, 2008). En la sabana de Bogotá (principal zona lechera de Colombia) se reporta una presencia del 45.28% (Alfonso *et al.*, 1998). Griffiths *et al.*, (1982) encontraron prevalencias en ganado de leche de 24.9 % para la región Andina, 14.4 % para la región Caribe y 15.3 % para el piedemonte Llanero. En ninguno de estos estudios se han muestreado las razas criollas y colombianas.

La PCR es una prueba conveniente para detectar ADN proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, es un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano del VLB (González *et al.*, 2001). En Colombia no existen estudios que reporten el uso de la PCR para la detección del virus en las razas criollas.

El primer reporte sobre asociación entre el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y enfermedad en ganado bovino lo hizo Martínez *et al.*, 2005, quienes

analizaron el efecto del BoLA (Antígenos de los leucocitos Bovinos) clase I sobre la incidencia de mastitis (Martínez *et al.*, 2005).

El CMH ha sido asociado con caracteres productivos (producción de leche, proteína y grasa en leche (Machado *et al.*, 2005; Do Nascimento *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2009b)) y con enfermedades (linfocitosis persistente, carga proviral, brucelosis, garrapatas, mastitis) (Lewin *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1993; Dietz *et al.*, 1997b; Mirsky *et al.*, 1998; Aida, 2001; Martínez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2006; do Nascimento *et al.*, 2006; Juliarena *et al.*, 2008; Panei *et al.*, 2009)).

En el ganado criollo colombiano se ha estudiado la diversidad genética mediante marcadores microsatélites (Bedoya *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2001; Barrera *et al.*, 2006, Álvarez, 2009), RAMs, microsatélites aleatorios en Hartón del Valle (Piedrahita *et al.*, 2008) y en algunos genes relacionados con la resistencia natural (Nramp1) (Aftosa y Brucelosis) (Trujillo y Valderrama, 2006) y la calidad de la carne (leptina) (Guerra *et al.*, 2005).

En cuanto a la caracterización del gen BoLA-DRB3 solo se reportan dos razas criollas estudiadas, el Blanco Orejinegro y el Lucerna (Martínez *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2006) pero no se conoce en otras razas bovinas criollas y colombianas.

Algunos polimorfismos en el gen *BoLA-DRB3* se han relacionado con el desarrollo de resistencia o susceptibilidad al VLB. Lewin *et al.*, (1988) y Xu *et al.*, (1993) revelaron que la presencia de los aminoácidos Glu-Arg (ER) (en la posición 70-71) y Glu, Arg y Val (en las posiciones 74, 77 y 78) de la cadena BoLA-DR $\beta$  estaban asociados con ausencia de LP y de desarrollo de tumores respectivamente (Aida, 2001). Los alelos que codifican el motivo ER son DRB3\*11, DRB3\*23 y DRB3\*28 (Lewin *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1993). Estudios posteriores confirmaron la asociación

del alelo DRB3\*11 (Sulimova *et al.*, 1995; Zanotti *et al.*, 1996; Mirsky *et al.*, 1998), DRB3\*23 y DRB3\*28 (Sulimova *et al.*, 1995) con resistencia, y de los alelos DRB3\*8 (Zanotti *et al.*, 1996; Sulimova *et al.*, 1995), DRB3\*16, DRB3\*22 y DRB3\*24 con susceptibilidad a LP producida por la infección del VLB (Sulimova *et al.*, 1995).

Colombia es considerado uno de los países más diversos en recursos zoogenéticos, puesto que en cada una de las regiones naturales y las cuencas hidrográficas de los ríos Orinoco y Amazonas, posee una raza bovina criolla (*Bos taurus*) adaptada. El **Romosinuano** y **Costeño con Cuernos**, en la Costa Atlántica (zona Norte), el **Chino Santandereano** y el **Blanco Orejinegro** en la zona montañosa de clima medio, el **Hartón del Valle** en el Valle del Río Cauca, y el **Sanmartinero** y el **Casanareño** en las planicies orientales u Orinoquia Colombiana (Martínez, 1992). Además de dos razas colombianas: el **Lucerna** y el **Velásquez** en el Valle del Cauca y Caldas respectivamente.

El estudio de estas razas criollas y colombianas junto con la comparación con otras razas foráneas (Cebú y Holstein) es trascendental para el conocimiento de este patrimonio nacional y para generar razones convincentes ante los productores para su conservación, valoración y uso como recurso potencial en la seguridad alimentaria.

## 1. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1 LEUCOSIS BOVINA

#### 2.1.1 Definición

La leucosis bovina Enzoótica (LBE), es una enfermedad infecciosa producida por un retrovirus, el virus de la leucosis bovina (VLB), que afecta las células de la línea linfoide, los linfocitos "B" (Beyer *et al.*, 2002; Dequiedt *et al.*, 1999; Schwartz & Levy, 1994). Es una enfermedad linfoproliferativa y se caracteriza por presentar una forma tumoral (linfosarcoma, LS; linfoma maligno, LM) (Dees *et al.*, 1996), linfocitosis persistente (LP), que se manifiesta con un incremento sostenido del número absoluto de linfocitos en la corriente sanguínea (Stone *et al.*, 1995) y una tercera forma en la cual los animales tienen anticuerpos (anti-VLB) sin linfocitosis persistente, ni lesiones tumorales (Chamizo, 1995; Nguyen & Maes, 1993).

La forma tumoral o linfosarcoma aparece en general en los animales mayores de dos años y con más frecuencia en animales entre cinco y ocho años. Esta forma de la enfermedad se desarrolla cada año en 0,5 a 1% de los animales infectados en el rebaño y evoluciona rápidamente hacia la muerte (Toma *et al.*, 1990).

La LP ha sido definida por el Comité Internacional de Leucosis Bovina (1986) como "un incremento en el número absoluto de linfocitos de tres o más desviaciones estándar sobre la media normal determinada para cada raza y grupo etario. Este concepto debe ser aplicado al incremento de linfocitos circulantes que persisten por más de tres meses (Chamizo, 2005).

### 2.1.2 Etiología

El VLB pertenece al grupo de los *Retroviridae*, y como tal posee una reverso-transcriptasa responsable de la síntesis de una copia de ADN a partir de ARN viral. El ADN formado (provirus) puede conservarse en el núcleo de diversas células del hospedero y esta propiedad es la causa de las características particulares de las diferentes infecciones debidas a retrovirus (Toma *et al.*, 1990; Evermann, 1992; Heuvel *et al.*, 2003).

Las proteínas estructurales del VLB comprenden las proteínas internas *p15*, *p24*, *12* y *14* y las glicoproteínas de envoltura *gp30* y *gp51* (que es más abundante). Se han identificado diferentes epitopos de *gp51* para desarrollar las pruebas de competición de ELISA, que permiten revelar la presencia de anticuerpos “anti-*gp51*” en los bovinos infectados (Jimenez *et al.*, 1995; DeGiuseppe *et al.*, 2004).

### 2.1.3 Síntomas

La manifestación clínica de LBE comienza después de los dos años de edad; en la mayoría de los casos los síntomas son inespecíficos y variables ya que dependen de la localización del proceso neoplásico y del grado de afección de los órganos vitales. Se ha observado anemia, emaciación e infertilidad (Chamizo, 2000).

El signo más evidente que permite sospechar de la enfermedad es el aumento bilateral más o menos simétrico de los ganglios linfáticos explorables (Chamizo, 1995; Chamizo, 1997; Shell *et al.*, 2004).

La exoftalmia por la afección del tejido retro-ocular o de las estructuras internas del ojo, puede considerarse como una manifestación específica de la enfermedad

(Malatestinic, 2003), así como la presencia de masas tumorales subcutáneas en diferentes localizaciones (linfadenopatías) (Chamizo, 2005).

- **Linfocitosis persistente (LP):**

Se define como un aumento sostenido en el número promedio de linfocitos para la raza y grupo etario más dos veces la desviación estándar. Desde hace mucho tiempo se conoce que en hatos con alta incidencia de linfosarcoma, aproximadamente un 30% de animales clínicamente normales desarrollan linfocitosis persistente. Desde el punto de vista morfológico son normales, no obstante se ha descrito la presencia de células atípicas, lo cual ha sido considerado como un estado pre-leucémico (Chamizo, 2005). La asociación entre LP y LS dio lugar a que se postulara que ambos procesos se deberían al mismo agente patológico y fue la base para el establecimiento de las claves hematológicas para el diagnóstico de la leucosis bovina.

- **Linfosarcoma (LS):**

Es común en adultos de más de cuatro años, se observa el agrandamiento de los linfonodos, se presenta taquicardia, pulso yugular positivo, timpanismo ruminal con reflujo abomasal, indigestión, diarrea, exoftalmos, mucosas pálidas, heces oscuras y malolientes, tumoraciones en útero, vagina y región perivaginal, disminución paulatina de la producción de leche hasta el cese total, disminución de parámetros reproductivos, disminución progresiva de la condición corporal, finalizando con la muerte del animal (Chamizo, 2005).

- **Leucemia**

Desde el punto de vista de la hematología, se debe distinguir el término leucemia de LP. La leucemia corresponde a la presencia de células tumorales o anormales detectadas en la corriente sanguínea indicadoras de la transformación neoplásica de la médula ósea o de la presencia de linfosarcoma (LS) (Chamizo, 2005). Las células neoplásicas aparecen entre un 5 a 10% de los casos de LS; son células grandes, con un núcleo redondeado, indiferenciado y grandes nucléolos, cromatina laxa y citoplasma abundante, alto contenido de basófilos y con presencia de vacuolas. Las mitosis son comunes y numerosas. La presencia de anomalías en el cariotipo como: aneuploidias con cromosomas adicionales, son pruebas claras del carácter neoplásico de estas células. Las anomalías pueden variar de un animal a otro pero se mantienen constantes en el mismo animal, lo cual demuestra que el tumor es monoclonal (Chamizo, 2005; Knapen *et al.*, 1994).

#### **2.1.4 Lesiones**

Los tumores en los ganglios linfáticos son comunes, la afección puede ser generalizada, diseminada o localizada (25%); los ganglios frecuentemente afectados son los iliacos (65 a 83%), intratorácicos (62 a 74%), mesentéricos (66%) y los superficiales (pre escapulares, pre crurales y de la región cervical) (41 a 62%). Los ganglios se muestran a menudo lisos o con nódulos, sin adherencia a tejidos circundantes, de consistencia blanda y edematosa o firme turgente y friable (Chamizo, 2005).

La médula ósea puede estar infiltrada en muchos de los casos (40%) de color blanco gris o blanco. El bazo se afecta entre un 10 a 50%, puede estar aumentado



de tamaño o con esplenomegalia tumoral, además de nudos blanquecinos en el parénquima. El corazón a pesar de que no es un órgano linfoide presenta una frecuencia de afección de un 40 a 90%, con nódulos de diferente tamaño o áreas infiltradas de forma difusa y color blanquecino con límites mal definidos en el espesor del miocardio, visibles a través de pericardio y endocardio. El músculo esquelético se ve afectado con menor frecuencia. El útero presenta una frecuencia de afección entre un 12 a 50% con hiperplasia de sus paredes de color blanco, gris o mate (Chamizo, 2005).

El abomaso parece infiltrado por una masa tumoral con engrosamiento de su pared y presencia de úlceras, que se encuentran con mayor frecuencia en el intestino delgado. En los riñones las lesiones aparecen en un 50% de los casos, produciendo hemorragias visibles en la superficie del órgano y la vejiga presenta ulceraciones (Chamizo, 2005).

El tejido retro ocular puede afectarse provocando la protrusión del globo ocular o exoftalmo, infiltración tumoral en la córnea y en la cámara anterior de ojo. El hígado presenta aumento de tamaño y coloración pálida difusa. En el pulmón las lesiones tumorales son raras pero pueden presentarse de forma infiltrativa difusa y nodular. Se nota la presencia de masas tumorales en el tejido subcutáneo de la región abdominal (Chamizo, 2005).

### **2.1.5 Transmisión del VLB**

El conocimiento acerca de la epizootiología de LBE estuvo limitado hasta que se hizo el primer aislamiento del VLB, que permitió su uso en pruebas serológicas. Lo primordial fue determinar si el modo de transmisión del VLB era por infección del feto, a partir de sus progenitores (vertical) o como resultado de la infección

posnatal contagiada entre animales de un mismo grupo (horizontal) (DiGiacomo, 1992a; DiGiacomo, 1992b; DiGiacomo, 1992c; Chamizo, 2005).

La vaca infectada por VLB, puede transmitirlo a su ternero a través del calostro o de la leche. Se ha reportado que un 18% de los terneros procedentes de vacas infectadas, estaban ya infectados al nacer (Chamizo, 2005). La vía horizontal es la de mayor responsabilidad en la transmisión del VLB (DiGiacomo, 1992a; DiGiacomo, 1992b; DiGiacomo, 1992c).

El VLB no se encuentra en secreciones y excreciones del ganado bovino infectado, sin embargo si estas se ponen en contacto con sangre más específicamente con linfocitos, pueden ser fuente de transmisión del VLB (Chamizo, 2005).

La transmisión por vía de insectos hematófagos no parece tener relevancia en condiciones naturales. La inoculación intradérmica de linfocitos procedentes de animales infectados, induce la infección en ganado receptor así como la infusión rectal de sangre procedente de vacas infectadas (Sprecher *et al.*, 1991).

La transferencia iatrogénica de sangre puede resultar en altas tasas de infección del ganado bovino (DiGiacomo, 1992c). El riesgo de infección es ocho veces mayor cuando el ganado bovino sano es muestreado inmediatamente después del ganado infectado (Chamizo, 2005).

### **2.1.6 Diagnóstico**

Las tres pruebas serológicas comúnmente usadas en el diagnóstico de la enfermedad son: radioinmunoensayo (RIA), inmunodifusión en agar gel (IGDA) y ensayo por quelación enzimática (ELISA). Las pruebas de Dot Blot y PCR han

sido menos utilizadas (Cockerel *et al.*, 1992; Ungar *et al.*, 1991; Wang, 1991; Salman *et al.*, 1990).

La IGDA resulta un indicador confiable de infección por VLB (Chamizo, 2005) y presenta un alto grado de especificidad debido en gran parte a la estabilidad del genoma viral (Chamizo, 2005).

Las pruebas RIA y ELISA son más sensibles que la prueba de IGDA, pero esta última tiene la ventaja de ser menos costosa y más fácil de realizar (Have & Hoff, 1991). La prueba de ELISA tiene la ventaja cuando se trata de analizar muchas muestras provenientes de leche, por su habilidad de detectar un bajo nivel de anticuerpos anti-VLB (Nguyen & Maes, 1993).

La prueba de *dot blot* es altamente repetible y tiene concordancia con la prueba IGDA. Los resultados con *dot blot* se obtienen en un periodo de análisis más corto que la IGDA. Ha sido desarrollada para la detección de anticuerpos anti-VLB (Jacobs *et al.*, 1991).

La prueba de IGDA no puede distinguir entre los anticuerpos adquiridos pasivamente (calostrales) y los adquiridos mediante infección natural (Hugh-Jones, 1992). Otra desventaja que presentan estas técnicas es que no pueden detectar animales jóvenes infectados o animales en estadios tempranos de la infección.

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) ha sido utilizada para la detección temprana del VLB en animales menores de seis meses (Agresti *et al.*, 1993; Kelly, 1993) y evita reacciones falso positivas, causadas por transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Otra ventaja radica en la capacidad para detectar el virus en animales inmunotolerantes

(Fechner *et al.*, 1996). La sensibilidad es del 96% y la especificidad del 45% de la PCR con respecto a la prueba de IGDA (Fechner *et al.*, 2006).

La principal desventaja de la PCR es que las variaciones en la secuencia nucleotídica de algunos aislamientos del virus, podrían inducir a errores en la hibridación de los oligonucleótidos disminuyendo consecuentemente la sensibilidad del PCR (Marsolais *et al.*, 1994; Fechner *et al.*, 1997). Igualmente, no se puede descartar que en el proceso de extracción de ADN (hemólisis y lavado de eritrocitos) puedan persistir trazas de inhibidores que afecten la sensibilidad del PCR (Panaccio y Lew, 1991).

## **2.2 LA LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA (LBE) EN COLOMBIA**

Salman *et al.*, (1990) reportan que la LBE presenta una distribución mundial y los países con mayor prevalencia son Venezuela con 49%, Japón 44% y Filipinas con 32%. En Florida se reporta una prevalencia de 48% y en Baja California (México) del 32%.

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en Colombia entre 1996 y 2004 se presentaron 198 focos de la enfermedad, 1083 casos y 39 muertes.

En Antioquia, Aguilar *et al.*, (1989) estudiaron la prevalencia de LBE en hatos lecheros del Municipio de San Pedro de los Milagros, por medio de la técnica IGDA y encontraron un 12.07% de prevalencia, con la mayoría en el grupo etario de 5 a 9 años.

Ruiz, (1995) encontró un 3.9% de seropositividad a LBE, mediante IGDA. Trujillo, (1989) estudió la prevalencia de títulos de anticuerpos a LBE en el hato Paysandú (Antioquia) hallando un 14.65% de infección.

Ramírez *et al.*, (2002) en tres fincas de Antioquia, con la técnica ELISA, no encontraron presencia de LBE en los terneros, las novillas fueron 37,5% seropositivas a la infección, 54% negativos y 8,3% sospechosos. El 71,9% de las vacas fueron seropositivas, 19,5% negativas y 8,6% sospechosas.

Alfonso *et al.*, (1998) determinaron la prevalencia del VLB en vacas productoras de leche en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y Chiquinquirá, principal área lechera de Colombia, mediante la técnica de inmunodifusión doble en gel de agar con antígeno gp-51. Se estableció una prevalencia serológica del 45,28%, con un nivel de confianza del 95%.

Griffiths *et al.*, (1982) encontraron prevalencias de 24.9 % para la región Andina, 14.4 % para la región Caribe y 15.3 % para el piedemonte Llanero.

Utilizando la técnica de inmunodifusión, en bovinos de la Costa Norte de Colombia se detectó la presencia del VLB en el 1,5% animales examinados. El porcentaje de positivos aumentó gradualmente con la edad, de 0,2% en animales menores de 7 meses, 0,6% de 7 a 12 meses, y 4,7% en animales mayores de un año. El 9,4% y el 1,4% de los *Bos taurus* y los *Bos indicus*, respectivamente, fueron positivos, mientras que ninguno de los animales cruzados fueron positivos (Orjuela, 2000). En el municipio de Montería departamento de Córdoba se encontró un 21.5% de positivos a la enfermedad utilizando la técnica ELISA con mayor seroprevalencia en el grupo etario mayor de 7 años, en las razas cruzadas, en explotaciones doble propósito y en machos (Betancour y Rodas, 2008).

No existen reportes de la presencia del VLB en el ganado criollo colombiano.

### **2.3 EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD BOVINO (BoLA)**

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de los bovinos es conocido como Antígenos de los Leucocitos Bovinos (BoLA) y se localiza en el cromosoma 23; su descubrimiento fue atribuido a Amorena y Stone (1978) y a Spooner *et al*, (1978).

Los Antígenos de los Leucocitos Bovinos son glicoproteínas que se ubican en la superficie celular y cuya función principal es la presentación de péptidos a las células T (Alan *et al.*, 1991).

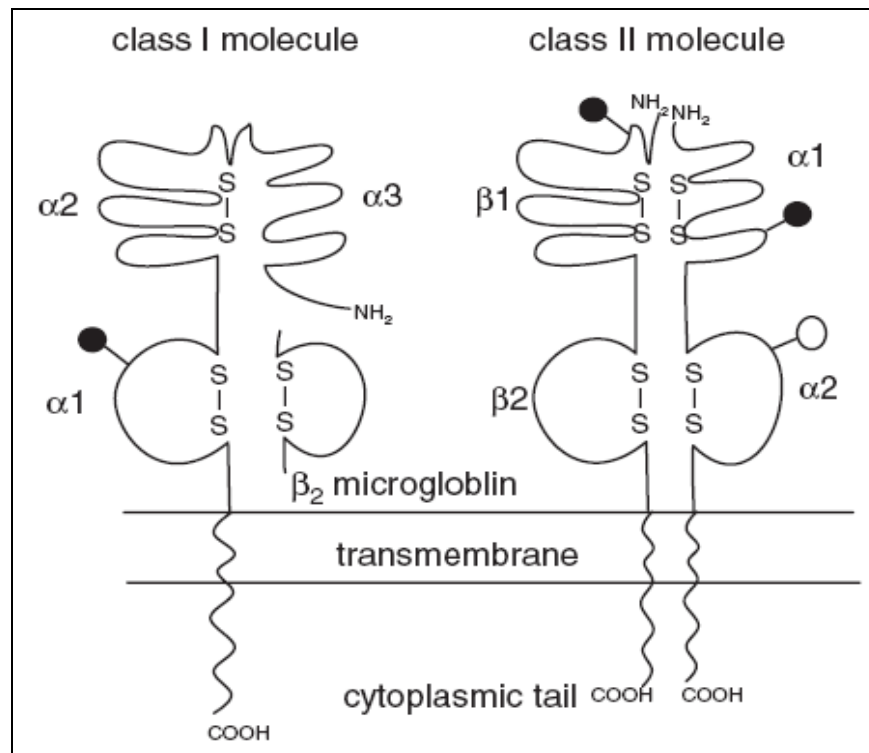
Existen tres clases de antígenos leucocitarios bovinos, los antígenos clase I constan de dos cadenas polipeptídicas codificadas por locus diferentes. La cadena que atraviesa la membrana celular tiene un peso molecular aproximado de 45000 daltons y la cadena más corta llamada microglobulina  $\beta 2$  tiene un peso aproximado de 12000 daltons. Los antígenos clase II son dos cadenas de un tamaño similar (Figura 1) (Nicholas, 1990).

#### **2.3.1 Organización genómica de la región BoLA**

En general la estructura del BoLA está relativamente conservada en los mamíferos y se divide en tres regiones, llamadas clase I, clase II y clase III, cada una con diferente función (Figura 1).

Los genes BoLA clase I codifican proteínas implicadas en el reconocimiento por parte de las células T citotóxicas de las células huésped que han sido infectadas y en la presentación de péptidos a las células citotóxicas T CD8<sup>+</sup> (Takeshima & Aida, 2006; Tamarin, 1996).

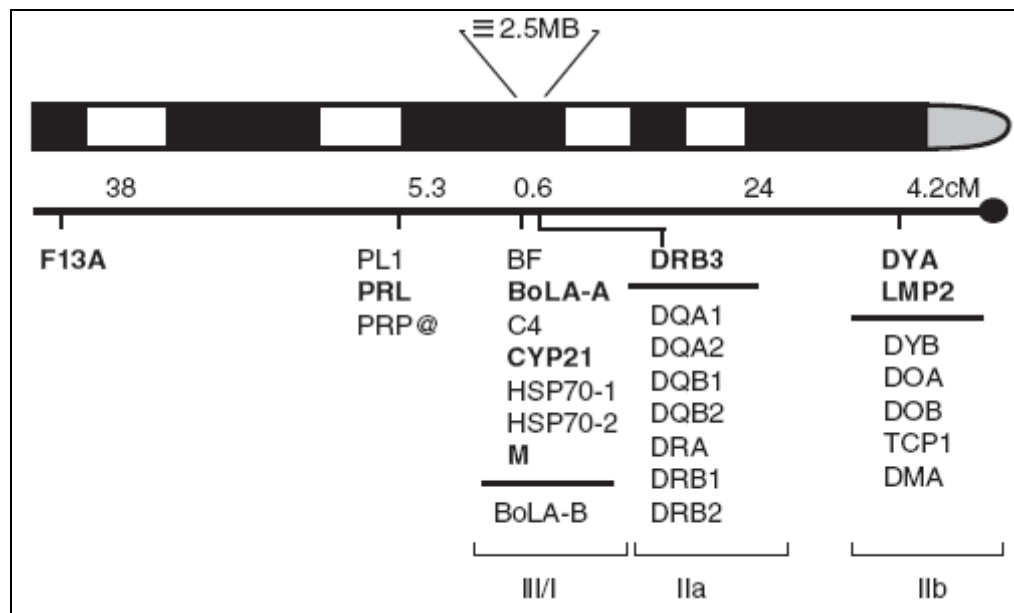
En ganado, la región clase I contiene por lo menos 10 genes y seudogenes (Bensaid *et al.*, 1991). Los análisis de la secuencia han mostrado al menos 4 loci clase I que pueden ser transcritos (Ellis *et al.*, 1999). Los genes clase I son polimórficos, con 28 secuencias identificadas; mientras que con los análisis sus moléculas (péptidos), usando SDS-PAGE y punto Isoeléctrico (IEF) que muestran una gran expresión de tres loci clase I (Al-Murrani *et al.*, 1994).



**Figura 1. Estructura molecular del BoLA I y II. Los círculos negros representan sitios de unión glicosídica. S-S indican enlaces disulfuro. Las cadenas clase I son codificadas por genes clase I. El círculo en blanco representa sitios de unión glicosídica conservada entre humanos y bovinos. Las molécula clase II constan de una cadena α codificada por genes A y una cadena β codificada por genes B (Takeshima & Aida, 2006).**

Los genes clase II están localizados en dos diferentes partes del cromosoma 23 del bovino, posee dos regiones llamadas clase IIa y clase IIb separadas por una distancia de 15cM. La clase IIa contiene los genes *DR* y *DQ* y la clase IIb los genes *DYA*, *DYB*, *DMA*, *DMB*, *DOB*, *DOA*, *TAP1*, *TAP2*, *LAPM2* y *LMP7* (Figura 2) (Takeshima & Aida, 2006). Estos genes producen proteínas implicadas en la comunicación intercelular entre las células B y T, procesos antígenos extracelulares con células T CD4+ y otras funciones inmunes (Tamarin, 1996).

Los genes y los productos de la región clase IIa son los más estudiados porque presentan altos niveles de polimorfismo. Catorce genes han sido identificados en esta región: *DRA*, *DRB* (*DRB1*, *DRB2*, *DRB3*), *DQA* (*DQA1*, *DQA2*, *DQA3*, *DQA4*, *DQA5*) y *DQB* (*DQB1*, *DQB2*, *DQB3*, *DQB4*, *DQB5*) (Takeshima & Aida, 2006).



**Figura 2.** Mapa genético del cromosoma 23 del bovino (Takeshima & Aida, 2006).



En bovinos, solo un alelo del *BoLA-DRA* ha sido identificado basado en datos de secuencia. El *BoLA-DRB1* es un pseudogen que presenta múltiples codones de parada y el gen *BoLA-DRB2* es mal expresado (Russell *et al.*, 1994) pero exhibe algo de polimorfismo (Muggli-Cockett & Stone, 1991). El gen *BoLA-DRB3* es altamente polimórfico puesto que Takeshima & Aida, 2006 han reportado 103 alelos y codifica elementos funcionales de restricción (proceso mediante el cual un linfocito puede reconocer un antígeno como propio o extraño) (Davies *et al.*, 1997).

Algunos individuos llevan una sola copia de *DQA* y *DQB*, mientras otros tienen haplotipos duplicados. La comparación de secuencias, southern blot y análisis filogenéticos indican la presencia de cinco genes *DQA*, de los cuales *DQA4* y *DQA5* son menos polimórficos que los *DQA1*, *DQA2* y *DQA3*, con aproximadamente 31 alelos para *DQA1*, 13 alelos para *DQA2* y dos alelos para *DQA3*. Los genes *DQB1*, *DQB2*, *DQB3*, *DQB4*, *DQB5* son altamente polimórficos y presentan aproximadamente 52 alelos cada uno (Takeshima & Aida, 2006).

En los genes clase IIb, los genes *DY* solo se encuentran en los rumiantes exhiben altos niveles de polimorfismo y son transcritos en células dendríticas. Los análisis de expresión demostraron la capacidad de los genes *DY* para trasladar diferentes cadenas polipepticas  $\alpha$  y  $\beta$  del BoLA clase II (Ballingall *et al.*, 2004).

Los genes *DM* y *DQ* solo pueden ser secuenciados usando cebadores derivados de humanos (Niimi *et al.*, 1995). Los genes *LMP2* y *LMP7* codifican subunidades del proteasoma, y los genes *TAP1* y *TAP2* codifican moléculas de envoltura y péptidos de transporte desde el citosol al lumen del retículo endoplasmático (Takeshima & Aida, 2006).

Los genes clase III codifican proteínas de complemento, implicadas en la destrucción de células extrañas (Tamarin, 1996).

## 2.4 GEN BOLA-DRB3

### 2.4.1 Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2\*

Diferentes autores han estudiado la variabilidad de este gen en distintas razas, tanto criollas como comerciales (Tabla 1). Kelly *et al*, (2003) estudiaron los polimorfismos de este gen en bovinos criollos de Uruguay (BCU) comparado con bovino criollo Argentino (BCA). Detectaron 22 alelos, doce de los cuales resultaron comunes. El índice de Heterocigosidad esperado (He), fue mayor para la población de BCU (He= 0.911) frente a BCA (He= 0.888).

En la raza colombiana Blanco orejinegro (BON) el alelo más frecuente fue el DRB3\*11 (Martínez *et al*, 2005). En bovinos de la raza Jersey (N = 172) se identificaron 24 alelos, nueve alelos que no habían reportado para la raza (Gilliespie *et al*, 1999). Miretti *et al*, (2001), en bovinos de Sur América (criollo Argentino, Caracu, Pantaneiro) identificaron 24 alelos. Dietz *et al*, (1997a) en bovinos Holstein, encontraron que el alelo más frecuente para esta raza fue el DRB3\*08 (0.21) y DRB3\*11 (0.18). En el ganado Japonés de cuerno corto Takeshima *et al*, (2002) identificaron 21 alelos con frecuencias entre 0.03 y 0.16, siendo el más frecuente el DRB3\*08 y los menos frecuentes DRB3\*16 y DRB3\*19. Ripoli *et al*, (2004b) utilizando la técnica PCR-SSCP, encontraron 7 alelos, con ayor valor de *he* para el ganado Brahman y menor para Jersey con 0.81 y 0.26 respectivamente.

**Tabla 1. Reportes de la variabilidad del gen DRB3.2 en ganados del mundo.**

Ganado	Tamaño de muestra	Numero de alelos	Heterocigocidad esperada	Alelos con frecuencia mayor a 0.05	Referencias
BON Criollo Colombiano	140	31		DRB3.2*11, *34, *1, *12	Martinez <i>et al.</i> , 2005
Saavedreño	125	22	0.91	DRB3.2*16, *36, *8, *11, *27, *37, *7	Ripoli <i>et al.</i> , 2004b
Criollo Argentino	194	21	0.87	DRB3.2*5, *15, *18, *20, *24, *27	Giovambattista <i>et al.</i> , 1996
Criollo Argentino	230	26		DRB3.2*24, *16, *22, *11, *8, *23	Juliarena <i>et al.</i> , 2008
Holando Argentino	81	17	0.89	DRB3.2*10, *8, *24 *15	Panei <i>et al.</i> , 2009
Criollo Uruguayo	51	22	0.91	DRB3.2*15, *3, *16 *18	Kelly <i>et al.</i> , 2003
Chihuahua Criollo Mexicano	47	18	0.83	DRB3.2*24, *19, *15, *ibb	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Tamaulipas Criollo Mexicano	51	34	0.92	DRB3.2*23, *24, *39	Fernández <i>et al.</i> , 2008
Sistani Irani	100	19		DRB3.2*8, *34, *15, *44	Tahmoorespur <i>et al.</i> , 2007
Sistani Irani	150	23		DRB3.2*34, *8, *15, *21, *11	Sadeghi <i>et al.</i> , 2008
Sistani Irani	65	32		DRB3.2*8, *10, *20, *34	Mohammadi <i>et al.</i> , 2009
Kankrej	50	21		DRB3.2*34, *15, *6, *20, *37, *46	Behl <i>et al.</i> , 2007
Aberdeen Angus	65	16	0.87	DRB3.2*36, *8, *4, *15, *22, *20, *10	Golijow, 1996
Gyr Brasileiro	1058	37		DRB3.2*19, *27, *16, *8, *35	Do Nascimento <i>et al.</i> , 2006
Gyr Brasileiro	28			DRB3.2*6, *35, *5, *31	Mota <i>et al.</i> , 2002
Gyr	490	27	ND	DRB3.2*20, *27, *16, *29, *35	Machado <i>et al.</i> , 2005
Gyr	344	20		DRB3.2*27, *16, *3, *23, *20	Martinez <i>et al.</i> , 2006
Jersey	172	24	0.895	DRB3.2*8, *10, *15, *17, *21, *36, *ibe	Gilliespie <i>et al.</i> , 1999

**Continuación Tabla 1. Reportes de la variabilidad del gen DRB3.2 en ganados del mundo.**

<b>Ganado</b>	<b>Tamaño de muestra</b>	<b>Numero de alelos</b>	<b>Heterocigocidad esperada</b>	<b>Alelos con frecuencia mayor a 0.05</b>	<b>Referencias</b>
Jersey	66	13	0.886	DRB3.2*7, *10, *17, *21, *28, *32	Sharif <i>et al.</i> , 1998
Holstein	1100	26	0.741	DRB3.2*3, *7, *8, *11, *16, *22, *23, *24	Dietz <i>et al.</i> , 1997a,b;
Holstein	60	14		DRB3.2*22, *7, *8, *11, *16, *22, *23, *25	Sharif <i>et al.</i> , 1998
Holstein	835	27	0.872	DRB3.2*23, *22, *8, *16, *7, *24	Saama <i>et al.</i> , 2004
Holstein Canadiense	328			DRB3.2*8, *22, *24, *11, *16, *3, *23	Rupp <i>et al.</i> , 2007
Holstein Irani	50	27		DRB3.2*24, *11, *22, *16, *8	Parnian <i>et al.</i> , 2006
Holstein Colombiano	66	27		DRB3.2*23, *22, *24, *16, *33, *8	Zambrano <i>et al.</i> , 2009a
Cruce BONxHolsterin	25			DRB3.2*23, *24, *20, *22, *37, *28	
Ayrshire	129	18	0.821	DRB3.2*8, *7, *28, *8, *10, *24	Udina <i>et al.</i> , 1998
Black Pied	127	21	0.904	DRB3.2*22, *24, *11, *16, *18, *23, *8, *27	Udina <i>et al.</i> , 1999
Norwegian Red	523	27		DRB3.2*7, *8, *26, *28, *24	Kulberg <i>et al.</i> , 2007
Shorthorn Japones	352	21		DRB3.2*8, *9, *21, *30, *33, *26, *24	Takeshima <i>et al.</i> , 2002
Brahman	568	37	0.843	ND	Maillard <i>et al.</i> , 1999
Cebu Brahman	22	11		DRB3.2*11, *34, *18, *23	Martinez <i>et al.</i> , 2005

#### **2.4.2 Asociación del BoLA-DRB3 con enfermedades y características productivas**

Los genes del CMH son muy interesantes para los criadores de animales y genetistas, porque están asociados con resistencia o susceptibilidad a una amplia serie de enfermedades. Los genes *BoLA* han sido asociados con enfermedades como la mastitis y la leucemia viral bovina inducida y con otras características como producción de leche, crecimiento y respuesta inmune (Takeshima & Aida, 2006).

Algunos polimorfismos en el gen *BoLA-DRB3* se han relacionado con el desarrollo de resistencia o susceptibilidad al VLB asociado con la LBE. Estudios previos con infección del VLB revelaron que la presencia de los aminoácidos Glu-Arg (ER) (en la posición 70-71 de la cadena BoLA-DR $\beta$ ) está asociada con resistencia a linfocitosis persistente, los alelos que codifican el motivo ER son DRB3\*11, DRB3\*23 y DRB3\*28 (Lewin *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1993).

Estudios posteriores confirmaron la asociación del alelo DRB3\*11 (Sulimova *et al.*, 1995; Zanotti *et al.*, 1996; Mirsky *et al.*, 1998), DRB3\*23 y DRB3\*28 (Sulimova *et al.*, 1995) con resistencia a LP, y de los alelos DRB3\*8 (Zanotti *et al.*, 1996; Sulimova *et al.*, 1995), DRB3\*16, DRB3\*22 y DRB3\*24 con susceptibilidad a LP (Sulimova *et al.*, 1995).

Los alelos del *BoLA-DRB3* que codifican Glu, Arg y Val (en las posiciones 74, 77 y 78 de la cadena BoLA-DR $\beta$ ) están asociados con resistencia al desarrollo de tumores (Aida, 2001). Otros estudios relacionados con rasgos de producción y enfermedades se consignan en la Tabla 2.

## 2.5 LAS RAZAS BOVINAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS

Las razas bovinas criollas son el producto de un largo proceso de selección natural a partir de los bovinos introducidos por Cristóbal Colón en el año de 1493. Los primeros bovinos que llegaron a América arribaron por la isla La Española (hoy conocida como Santo Domingo), luego a Santa Marta, donde formaron el primer núcleo ganadero que después fue distribuido a todo el país (Casas y Valderrama, 1998).

Colombia posee ocho razas criollas producto de más de 500 años de adaptación y dos razas colombianas o sintéticas, como resultado producto del cruce de razas criollas con razas comerciales.

La raza **Blanco Orejinegro** es reconocida por su capacidad de producción de carne y leche bajo condiciones desfavorables del trópico; su hábitat natural se encuentra en las estribaciones de la cordillera central y occidental, entre 800 y 1800 m.s.n.m., con temperaturas que oscilan entre 18 y 24°C. Cuenta con una población efectiva de 2866 animales puros que corresponde al 12% del ganado criollo del país (Martínez, 1999).

**Tabla 2. Asociación de los alelos BoLA-DRB3.2\* con enfermedades y características productivas en diferentes ganados.**

<b>Ganado</b>	<b>Tamaño de muestra</b>	<b>Enfermedad/carácter</b>	<b>Alelos Asociados positivamente (resistencia, aumento)</b>	<b>Alelos Asociados negativamente (susceptibilidad, disminución)</b>	<b>Referencias</b>
Holando Argentino	81	Linfocitosis persistente	DRB3.2*11, *23, *28	DRB3.2*22, *24	Panei <i>et al.</i> , 2009
Holstein	7	Linfocitosis persistente	DRB3.2*11		Mirskt <i>et al.</i> , 1998
Criollo Argentino	230	Carga proviral	DRB3.2*11, *12	DRB3.2*16	Juliarena <i>et al.</i> , 2008
BON Colombiano	140	Bruselosis	DRB3.2*23, *26, *31		Martinez <i>et al.</i> , 2005
Gyr	344	Resistencia a Garrapatas	DRB3.2*8, *16, *20, *27		Martinez <i>et al.</i> , 2006
Gyr	490	Producción de leche	DRB3.2*16, *29		Machado <i>et al.</i> , 2005
		Proteína en leche	DRB3.2*7	DRB3.2*6	
Gyr Brasileiro	1058	Grasa en leche		DRB3.2*54	Do Nascimento <i>et al.</i> , 2006
		Mastitis (SCC)	DRB3.2*3, *31		
		Mastitis (SCC)	DRB3.2*3, *11	DRB3.2*22, *23	
Holstein Canadiense	328	Respuesta inmune por anticuerpos	DRB3.2*2, *24	DRB3.2*22	Rupp <i>et al.</i> , 2007
		Respuesta inmune por células	DRB3.2*22	DRB3.2*2, *24	
		Mastitis subclínica	DRB3.2*33	DRB3.2*8	
Holstein Colombiano	66	Producción de leche		DRB3.2*36	Zambrano <i>et al.</i> , 2009bc
		Producción de grasa en leche	DRB3.2*8, *22, *36		
		Producción de proteína en leche		DRB3.2*33	
Norwegian Red	523	Mastitis clínica	DRB3.2*7, *11, *18, *24	DRB3.2*22, *26	Kulberg <i>et al.</i> , 2007

El ganado **Romosinuano**, está adaptado a las condiciones del Valle del Sinú, zona climatológica de Bosque Seco Tropical (BST), con temperatura media de 27.5°C y 83% de humedad relativa (Martínez, 1999). Según la FAO se encuentra clasificada como “vulnerable” desde el punto de vista de la conservación. El número de vientres es 1124 animales y 86 toros.

El **Costeño con Cuernos**, habita las llanuras costeras, está adaptado a temperaturas alrededor de 27.5 °C con 1233 mm de precipitación anual. Se clasifica de doble propósito y sus caracteres fenotípicos raciales están bien definidos (Sotolongo, 1999).

En el Valle de Lebrija (Santander) se encuentra la raza **Chino Santandereano** considerada en situación “crítica”, puesto que pasó de 606 animales en 1986 a 368 animales en 1999 (CORPOICA, 2006).

La Raza **Sanmartinero** está adaptada a las sub-regiones del Orinoco, zonas de Bosque Húmedo Tropical y Muy Húmedo Tropical, temperatura media de 26 °C, humedad relativa (HR) de 87% en época lluviosa y 55% en la época seca (Sotolongo, 1999). Existen 3.166 cabezas de ganado, distribuidas en los Bancos de Germoplasma de ICA-CORPOICA, en hatos de multiplicación de la Secretaría de Agricultura y de la Universidad de los Llanos y en poder de algunos particulares (ASOCRIOLLO, 2007).

En las sabanas inundables de los departamentos de Arauca y Casanare habita la raza **Casanareño** cuyo principal uso es la producción de carne en forma extractiva y extensiva tradicional (ASOCRIOLLO, 2007). Según el último censo está clasificada como “vulnerable”, con 5663 animales puros.



La raza **Caqueteño** habita en condiciones del Caquetá con temperatura media anual de 26 °C y HR de 88%. El estado de la población se clasifica como “crítico”, puesto que solo se conservan dos explotaciones con una población de tan solo 159 animales, de las cuales 72 son hembras en edad reproductiva (Martínez, 1999).

La raza **Hartón del Valle** se originó de bovinos introducidos por los españoles alrededor de 1539; se explota principalmente en sistemas de doble propósito (Casas y Valderrama, 1998). La población se estima cerca de 5500 animales y está ubicada en la categoría de “vulnerable” (Durán *et al.*, 1997).

La raza **Velásquez** es producto de la hibridación del ganado criollo Romosinuano (25%), el Cebú Rojo (25%) y el Red Poll (50%) que aportaron fertilidad y adaptación al medio tropical cálido Colombiano, rusticidad y resistencia a parasitosis y precocidad y producción de carne, respectivamente (CORPOICA, 2006). Se ha reportado un descenso en el número de efectivos y explotaciones puesto que de 16 fincas y 3083 animales en 1986 se redujo a 9 fincas y 755 animales puros en 1999 (Martínez, 1999).

El núcleo de la raza **Lucerna** se originó en la hacienda "Lucerna", en Bugalagrande, (Valle del Cauca), desde donde se ha promocionado y fomentado para diferentes regiones tropicales del país (ASOCRIOLLO, 2007). Es uno de los pocos esfuerzos genéticos de combinar razas del norte de Europa con ganados criollos, generando así la raza sintética, formada por Hartón del Valle (30%), Holstein (40%) y Shorthorn (30%) (CORPOICA, 2006).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 MUESTRAS DE ADN**

Se utilizaron 30 muestras de ADN tomadas aleatoriamente de cada raza de ganado criollo colombiano (GCC) Blanco orejinegro (BON), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Caqueteño (CQT), Hartón del Valle (HV), Lucerna (LUC), Romosinuano (RS), San Martinero (SM) y Velásquez (VEL) y de las razas controles Holstein (H) y Brahman (B), del banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (Tabla 3). Las extracciones habían sido realizadas mediante el protocolo de *Salting Out*.

### **3.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN**

La concentración del ADN se determinó utilizando ADN del bacteriófago lambda, utilizando concentraciones conocidas, visualizado mediante geles de agarosa al 0.8 % teñido con Bromuro de etidio (Hernández *et al.*, 2007). El ADN fue diluido a 20 ng/ $\mu$ l.

**Tabla 3. Origen de las muestras del Banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.**

<b>Raza</b>	<b>Municipio/Departamento</b>	<b>Finca</b>	<b>N</b>
BON	Popayan/Cauca	El Medio	30
CAS	Arauca/Arauca	Arrecifes	30
CCC	Campeche/Atlantico	Villa Soco	30
ChS	San Gil/Santander	Ojo de Agua y Los Pozos	11
	San Alberto/Santander	El Trofeo	19
CQT	Florencia/Caqueta	San Isidro	9
	Morelia/Caqueta	Villa Mery	21
HV	Bugalagrande/Valle del Cauca	San Rafael	2
	BugaValle del Cauca	Procampo	1
	Jamundí/Valle del Cauca	Capricho	4
	Palmira/Valle del Cauca	Granja Mario Gonzales Aranda	1
		Ondina	17
	Roldanillo/Valle del Cauca	Arenales	1
		Jamaica	1
	Tuluá/Valle del Cauca	Sanjon Hondo	3
RS	Sincerin/Bolivar	La Bonanza	30
SM	San Martin/Meta	Corinto	16
		Iraca	14
LUC	Bugalagrande/Valle del Cauca	Lucerna	30
VEL	Dorada/Caldas	Africa	30
		Palmira/Valle del Cauca	Corpoica
H	Yotoco/Valle del Cuca	El Castillo	6
		Chiquique	5
		Samanes	9
	Candelaria/Valle del Cauca	Gran Capricho	1
	Roldanillo/Valle del Cauca	Arenales	1
	B	Restrepo/Valle del Cauca	El Aguacate
Roldanillo/Valle del Cauca		Santa Ines	12
Jamundí/Valle del Cauca		Capricho	9
<b>Total</b>			<b>360</b>

### **3.3 DETECCIÓN DEL PROVIRUS DE LA LEUCOSIS VIRAL BOVINA**

#### **3.3.1 Extracción de ADN de los controles de PCR**

Se utilizaron controles positivos y negativos para las reacciones de PCR; el ADN se extrajo a partir de muestras de suero sanguíneo suministrados por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). Se tomaron 0,2ml de suero y se trataron con 0,5mg/ml de proteinasa K en presencia de 25mM de Tris HCl (pH 7,8), 2.5mM de EDTA y 0,5% de SDS durante 2 horas a 60°C; luego se hizo un lavado con Fenol:Cloroformo (25:24) y otro con Cloroformo, se precipitó con Etanol; el pellet de ADN se lavó con Etanol al 70% y se resuspendió con TE 1X (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM de EDTA) (Klein *et al.*, 1997).

#### **3.3.2 Amplificación**

Utilizando la técnica PCR-anidado se amplificó una región altamente conservada del gen *env* viral (Beier *et al.*, 2001).

La primera reacción se realizó a un volumen final de 30 µl que contenía 20-100 ng de ADN, 1,25 mM de cada oligonucleótido (F-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA y R-AACAACAACCTCTGGGGAGGGT), 0.2 mM de cada dNTP, 1X de tampón PCR, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1U de Taq DNA Polimerasa. En la segunda reacción se utilizó como ADN molde 3 µl del producto de PCR de la primera amplificación, las mismas concentraciones de los otros reactivos y los oligonucleótidos F-CCCACAAGGGCGGCGCCGTTT y R-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG. El perfil térmico incluye una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5

minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, para terminar con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

En la segunda reacción las condiciones de amplificación fueron las mismas, excepto que la temperatura de hibridación que se aumentó a 68°C (Beier *et al.*, 2001).

### **3.3.3 Electroforesis**

La identificación de los animales positivos a la presencia del provirus se hizo mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. La presencia de una banda de 444 pares de bases indica que el animal posee el virus.

## **3.4 POLIMORFISMOS DEL GEN BOLA-DRB3.2**

### **3.4.1 Amplificación del gen DRB3**

La amplificación del segundo exón del gen BoLA-DRB.3, se obtuvo por un protocolo de PCR de dos pasos (semi-anidado) (Van Eijk *et al.*, 1992). En las reacciones de PCR se utilizaron los oligonucleótidos: HLO30 (5'ATCCTC TCTCTGCAGCACATTTCC3'), HL 031 (5'TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'), HL032 (5'-TCGC CGCTCAGTGAAACTCTC-3'). En la primer reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos HL030 y HL031 (1.25mM), en 25µl de mezcla total, con 20 a 40ng de ADN, 0.2 mM de cada dNTP, 1X de tampón PCR, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1U de Taq DNA Polimerasa. El programa de amplificación

constó de una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 60°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C (Dietz *et al.*, 1997).

Para realizar la segunda reacción se tomaron 4µl de la primera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos HL030 y HL032 en un volumen total de 50µl, con las mismas concentraciones de dNTP's, tampón PCR, MgCl<sub>2</sub> y Taq DNA polimerasa. El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C y 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos 65°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de ambas reacciones es una banda de 282 pares de bases (Dietz *et al.*, 1997).

### **3.4.2 Restricción**

Los fragmentos de ADN amplificados en la segunda reacción fueron utilizados como sustrato para la digestión con las endonucleasas de restricción *Rsal*, *Bst*yl y *Hae*III. 10µl del producto de PCR fueron digeridos con 5 U de cada enzima a 37°C durante 4 horas (Dietz *et al.*, 1997).

### **3.4.3 Electroforesis**

La electroforesis se realizó en geles de agarosa SFR (Super Fine Resolution) al 3% y teñidos con bromuro de etidio. La lectura de los alelos se basó en la nomenclatura del 5th BoLA workshop (BoLA Nomenclature, International, Society for Animal Genetics) ([www2.ri.bbsrc.ac.uk/bola/drb3pcr.htm](http://www2.ri.bbsrc.ac.uk/bola/drb3pcr.htm).) Anexos 1 y 2.

### 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos se formaron los siguientes grupos: criollos (BON, CAS, CCC, ChS, CQT, HV, RS y SM), razas sintéticas colombianas (RSC) (LUC y VEL) y controles (H y B); según tipo: carne (CAS, CQT, RS, SM y VEL) y leche (BON, CCC, ChS, HV y LUC); según origen de muestreo: Norte (CCC, ChS y RS), Centro (VEL) Oriente (CAS y SM) y Sur Occidente (BON, CQT, HV y LUC).

Se determinó el porcentaje de presencia del virus para cada raza. Se realizaron pruebas de  $X^2$  para determinar dependencia entre el virus y la raza, la región de muestreo, tipo de ganado y sexo, utilizando el software SAS versión 9.1.

Para el gen *BoLA-DRB3.2\** se determinó el número de alelos, las frecuencias alélicas, la Heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), el equilibrio de Hardy – Weinberg (EHW) y la estructura genética, inferida a partir del AMOVA basado en las frecuencias génicas de las poblaciones o razas como un grupo, el coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) y el coeficiente de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) utilizando el programa ALERQUIN versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Para asociar la presencia del virus con los alelos del gen *BoLA-DRB3.2\** se determinó el Odds Ratio (OR), que indica la frecuencia relativa de la exposición entre los casos y los controles utilizando el software SAS versión 9.1. Los valores de OR mayores que 1 indican que estos animales corren bajo riesgo de presentar el virus y fueron considerados como resistentes a la presencia del virus (asociación positiva), valores de OR menores que 1 indican que estos animales corren alto riesgo de presentar el virus y fueron considerados susceptibles

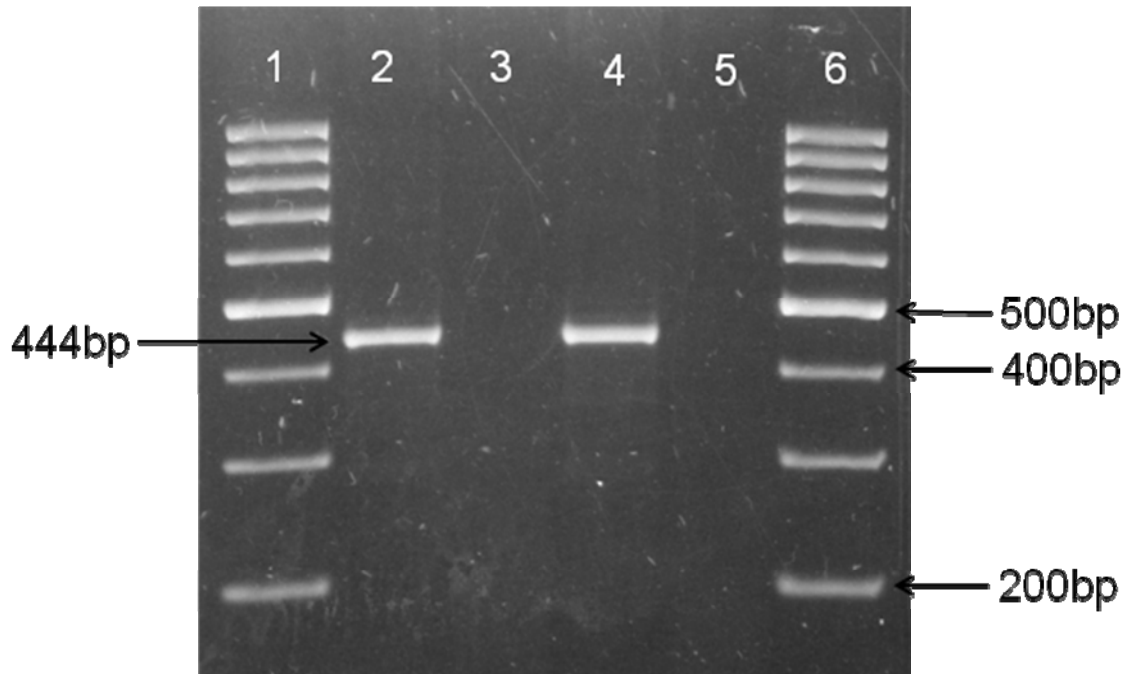
(asociación negativa), valores de OR cercanos a 1 fueron considerados como neutros. Se realizó un test exacto de Fischer para determinar la significancia estadística de los valores de OR usando el software SAS versión 9.1.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 PRESENCIA DEL VLB EN LAS RAZAS CRIOLLAS Y COLOMBIANAS.

La Figura 3 muestra el producto amplificado de PCR de 444 bp y los controles positivos y negativos y en la Tabla 4 el porcentaje de presencia del virus en los diferentes grupos genéticos.



**Figura 3. Producto de PCR amplificado Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular 100bp; carril 2: testigo positivo; carril 3: testigo negativo; carril 4: individuo positivo a la presencia del virus; carril 5: individuo negativo a la presencia del virus.**

La mayor presencia del virus lo presentaron las RSC (50%) seguido por los controles (45%) y por último los criollos (26.7%) (Tabla 4).

El porcentaje de presencia del VLB fue muy alto en las criollas HV y ChS (83.3% y 60%, respectivamente) mientras que en CAS, CCC y CQT fue menor (26.7%, 23.3% y 16.7% respectivamente); no se encontró presencia del virus en las razas BON, SM y RS. Las razas LUC y VEL presentaron el mismo porcentaje de presencia del virus (50%) y en los controles la presencia del virus fue mayor en H (83,3%) que en B (6,7%).

**Tabla 4. Porcentaje de presencia del VLB en el ganado Criollo, RSC y controles.**

<b>GANADOS</b>	<b>RAZAS</b>	<b>N</b>	<b>PRESENCIA,%</b>
<b>CRIOLLOS</b>	BON	30	0
	CAS	30	26.7
	CCC	30	26.7
	ChS	30	60
	CQT	30	16.7
	HV	30	83.3
	RS	30	0
	SM	30	0
<b>RSC</b>	LUC	30	50
	VEL	30	50
<b>CONTROLES</b>	B	30	6.7
	H	30	83.3
<b>PROMEDIOS</b>	<b>CRIOLLOS</b>		<b>26.7</b>
	<b>RSC</b>		<b>50</b>
	<b>CONTROLES</b>		<b>45.0</b>
	<b>TOTAL</b>		<b>38.2</b>

Los porcentajes de presencia del virus por finca, municipio y departamento se detallan en la Tabla 5. De acuerdo con la región de muestreo, los ganados de la zona Norte de Colombia (CCC, ChS y RS) mostraron un 25% de presencia del virus, el 13% en la región oriental (CAS y SM), el 50% en la región central (VEL) y 33% al sur occidente (BON, CQT, HV y LUC).

La presencia del virus fue mayor en las hembras que en los machos tanto en los criollos (21.7% y 4.6% respectivamente), como en RSC (40% y 10%, respectivamente) y en los controles (43.3% y 1.7%) (Tabla 6).

La prueba de independencia o asociación mediante chi-cuadrado ( $X^2$ ) dio como resultado que la presencia del virus depende del manejo de la raza dentro de cada hato ( $X^2c=209.62$  ( $P<0.001$ )). Igualmente se detectó asociación entre presencia del virus y el sistema de producción (carne o leche) ( $X^2c =27.98$  ( $P<0.001$ )) y con la región geográfica ( $X^2c =63.88$  ( $P<0.001$ )). Sin embargo, la presencia del virus no fue significativa con respecto al sexo ( $X^2c =0.0842$  ( $P<0.0771$ )).

**Tabla 5. Porcentaje de presencia del VLB por finca en el ganado Criollo, RSC y controles.**

GRUPO	RAZA	MUNICIPIO/DEPARTAMENTO	FINCA	N	PRESENCIA,%
<b>CRIOLLOS</b>	BON	Popayán/Cauca	EM	30	0,0
	CAS	Arauca/Arauca	ARR	30	26,7
	CCC	Campeche/Atlántico	VS	30	23,3
	ChS	San Gil/Santander	OA y LP	11	18,2
		San Alberto/Santander	ET	19	84,2
	CQT	Florencia/Caquetá	SI	9	11,1
		Morelia/Caquetá	VM	21	19,0
	HV	Bugalagrande/Valle del Cauca	SR	2	100,0
		Buga/Valle del Cauca	PPO	1	100,0
		Jamundí/Valle del Cauca	CAP	4	75,0
		Palmira/Valle del Cauca	MGAUN	1	100,0
		Roldanillo/Valle del Cauca	ON	17	82,4
			ARN	1	100,0
		JA	1	100,0	
	Tuluá/Valle del Cauca	SH	3	100,0	
	RS	Sincerin/Bolívar	LB	30	0,0
SM	San Martín/Meta	CO	16	0,0	
		IRA	14	0,0	
<b>RSC</b>	LUC	Bugalagrande/Valle del Cauca	LCN	30	50,0
	VEL	Dorada/Caldas	AF	30	50,0
<b>CONTROLES</b>	Candelaria/Valle del Cauca	EA	1	100,0	
		Roldanillo/Valle del Cauca	SIS	1	100,0
	B	Restrepo/Valle del Cauca	CAP	9	11,1
		Roldanillo/Valle del Cauca	SIS	12	8,3
	Jamundí/Valle del Cauca	CAP	9	0,0	
	Palmira/Valle del Cauca	CRP	8	100,0	
		EC	6	100,0	
	H	Yotoco/Valle del Cauca	CQQ	5	100,0
SAM			9	44,4	

**Tabla 6. Porcentaje de presencia del VLB por sexo en el ganado Criollo, RSC y controles.**

GANADO	RAZA	SEXO			
		MACHOS		HEMBRAS	
		N	PRESENCIA,%	N	PRESENCIA,%
CRIOLLOS	BON	8	0.0	22	0.0
	CAS	6	3.3	24	23.3
	CCC	3	3.3	27	20.0
	ChS	5	16.6	25	43.3
	CQT	5	0.0	25	16.7
	HV	4	13.3	26	70.0
	RS	7	0.0	23	0.0
	SM	3	0.0	27	0.0
RSC	LUC	0	0.0	30	50.0
	VEL	11	20.0	19	30.0
CONTROLES	B	1	3.3	29	3.3
	H	0	0.0	30	83.3
PROMEDIOS	<b>CRIOLLOS</b>	41.0	4.6	199.0	21.7
	<b>RSC</b>	11	10.0	49	40.0
	<b>CONTROLES</b>	1	1.7	59	43.3

#### 4.2 POLIMORFISMOS DEL GEN BOLA-DRB3.2

Se analizaron 360 animales, de los cuales 240 son criollos, 60 RSC y 60 a razas controles. El 58% de los alelos encontrados en el ganado criollo y el 36% de los controles tuvieron frecuencias menores a 5% (Tabla 8). Los alelos con frecuencias superiores a 5% en la población de GCC fueron: BoLA-DRB3.2 \*28 (0.15), \*37 (0.128), \*24 (0.089), \*23 (0.093) y \*20 (0.078) y en los ganados controles fueron

los BoLA-DRB3.2 \*13 (0.167), \*37 (0.15), \*36 (0.09), \*23 (0.079), \*28 (0.061) y el \*25 (0.052).

Se encontró un total de 41 alelos *BoLA-DRB3.2\**, de los cuales 20 también estuvieron presentes en las razas controles B y H. La distribución de los alelos de acuerdo con la raza se muestra en la Tabla 7. Los alelos *BoLA-DRB3.2* \*23, \*36 y \*37 se encontraron en todas razas; los alelos \*20 y \*28 en nueve poblaciones, los alelos \*15 y \*24 en ocho poblaciones, el alelo \*17 en siete poblaciones, el alelo \*16 en seis poblaciones, los alelos \*10 y \*26 en cinco poblaciones, los alelos \*25, \*42 y \*44 en cuatro poblaciones, los alelos \*2, \*3, \*6, \*13, \*21, \*34 y \*43 en tres poblaciones, los alelos \*8, \*12, \*14, \*18, \*21 y \*27 en dos poblaciones y los alelos \*7, \*9, \*11, \*19, \*32, \*33, \*35, \*39, \*41, \*45, \*46, \*48, \*50 y \*51 en solo una población.

El ganado CQT tuvo el mayor número de alelos (25 alelos) y el ChS el menor (10 alelos), mientras, que en RSC el mayor número de alelos lo presentó el LUC (13 alelos) y en las razas controles el B (16 alelos). El número de alelos promedio (NPA) para cada una de las razas se presenta en la Tabla 7. El NPA para la población total fue de  $14.6 \pm 3.8$ , valor similar al encontrado en las razas criollas ( $14.6 \pm 4.6$ ) y menor al de RSC ( $12.5 \pm 0.71$ ). En los controles el NPA fue mayor ( $15 \pm 1.41$ ).

La raza CQT presentó el mayor número de alelos únicos (8) entre ellos \*7, \*11, \*19, \*32, \*35, \*46, \*48 y \*51. La raza BON presentó un alelo único (\*9) al igual que SM (\*33), RS (\*39), CAS (\*45), LUC (\*41) y VEL (\*50). Las razas controles no mostraron alelos únicos.

**Tabla 7. Número promedio de alelos (NPA) y distribución en el ganado criollo, RSC y controles.**

Alelo BoLA- DRB3.2*	Razas												Total
	Criollos						RSC		Control				
	BON	CAS	CCC	ChS	CQT	HV	RS	SM	LUC	VEL	H	B	
*2	--	--	--	--	X	--	X	--	X	X	X	--	6
*3	--	--	--	--	--	--	X	X	--	--	X	X	4
*6	--	X	--	--	--	X	--	--	X	--	--	X	4
*7	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
*8	--	--	--	--	X	X	--	--	--	--	X	X	4
*9	X	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
*10	--	--	X	--	X	X	X	--	--	X	X	X	7
*11	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
*12	--	X	--	--	X	--	--	--	--	--	--	X	3
*13	X	X	--	--	--	--	--	X	--	--	--	X	4
*14	--	X	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--	2
*15	--	X	X	X	X	X	--	X	X	X	--	X	9
*16	--	X	X	X	X	--	X	--	--	X	X	X	8
*17	X	--	X	--	X	X	X	X	--	X	X	X	9
*18	X	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	2
*19	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
*20	--	X	X	X	X	X	X	X	X	X	--	X	10
*21	X	--	--	--	--	X	X	--	--	--	--	--	3
*22	--	X	--	X	--	--	--	--	--	--	--	--	2
*23	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
*24	X	X	X	X	--	X	--	X	X	X	X	--	9
*25	X	X	--	--	X	--	--	--	X	--	X	X	6
*26	X	--	X	--	X	--	X	--	X	--	X	--	6
*27	X	--	X	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2
*28	X	--	X	X	X	X	X	X	X	X	X	--	10
*32	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
*33	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--	1
*34	--	X	--	X	X	--	--	--	--	--	--	X	4
*35	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
*36	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
*37	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
*39	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	1
*41	--	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--	--	1
*42	--	--	--	--	X	X	X	--	X	--	--	--	4
*43	X	X	--	--	--	X	--	--	--	--	X	X	5
*44	X	X	--	--	X	--	X	--	--	--	--	--	4
*45	--	X	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1
*46	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
*48	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
*50	--	--	--	--	--	--	--	--	--	X	--	--	1
*51	--	--	--	--	X	--	--	--	--	--	--	--	1
NPA	15	17	12	10	25	14	16	12	13	12	14	16	14.6±3.8

Tabla 8. Frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3.2 en el GCC y razas control.

Alelo	Criollos						RSC			Controles		TOTAL GCC	TOTAL CONTROL	
	BON	CAS	CCC	ChS	CQT	HV	RS	SM	LUC	VEL	H			B
*2					0.051±0.03		0.02±0.01		0.02±0.01		0.02±0.01		0.008±0.003	0.009±0.008
*3							0.033±0.02	0.033±0.02		0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.008±0.003	0.017±0.012
*6		0.034±0.02				0.083±0.04			0.02±0.01			0.051±0.03	0.013±0.004	0.026±0.015
*7					0.02±0.01								0.001±0.001	
*8					0.051±0.03	0.083±0.04					0.035±0.03	0.051±0.03	0.013±0.004	0.043±0.019
*9	0.02±0.01												0.001±0.001	
*10			0.06±0.03		0.02±0.01	<b>0.1±0.04</b>	0.033±0.02			0.02±0.01	0.02±0.01	0.051±0.03	0.022±0.006	0.035±0.02
*11					0.051±0.03								0.005±0.002	
*12		0.02±0.01			0.051±0.03							0.034±0.02	0.007±0.003	0.018±0.012
*13	0.02±0.01	0.02±0.01						0.05±0.03				<b>0.327±0.06</b>	0.009±0.004	<b>0.167±0.035</b>
*14		0.02±0.01						0.05±0.03					0.007±0.003	
*15		0.034±0.02	0.02±0.01	0.125±0.04	<b>0.09±0.04</b>	0.02±0.01		0.02±0.01	0.034±0.02	0.02±0.01		0.02±0.01	0.034±0.007	0.009±0.008
*16		0.051±0.03	0.04±0.03	0.071±0.03	0.07±0.03		<b>0.133±0.04</b>			0.067±0.03	0.071±0.03	0.02±0.01	0.043±0.008	0.043±0.019
*17	0.02±0.01		0.02±0.01		0.051±0.03	0.05±0.03	0.083±0.04	0.02±0.01		0.067±0.03	0.035±0.03	0.02±0.01	0.031±0.007	0.026±0.015
*18	0.02±0.01						0.02±0.01						0.003±0.002	
*19					0.02±0.01								0.001±0.001	
*20		0.103±0.04	0.02±0.01	0.125±0.04	0.034±0.02	0.05±0.03	0.033±0.02	<b>0.083±0.04</b>	<b>0.19±0.05</b>	<b>0.133±0.04</b>		0.034±0.02	<b>0.078±0.011</b>	0.017±0.012
*21	0.071±0.03					0.02±0.01	<b>0.1±0.04</b>						0.02±0.005	
*22		0.02±0.01		0.035±0.03									0.005±0.002	
*23	0.071±0.03	<b>0.137±0.05</b>	0.040±0.03	<b>0.142±0.05</b>	<b>0.07±0.03</b>	<b>0.2±0.01</b>	0.067±0.03	0.033±0.02	0.07±0.03	0.1±0.04	0.0125±0.04	0.034±0.02	<b>0.093±0.012</b>	<b>0.079±0.025</b>
*24	0.053±0.03	0.07±0.03	<b>0.153±0.05</b>	0.071±0.03		0.05±0.03		<b>0.35±0.06</b>	0.051±0.03	0.083±0.04	0.053±0.03		<b>0.089±0.011</b>	0.026±0.015
*25	0.02±0.01	0.07±0.03			0.02±0.01				0.02±0.01		0.053±0.03	0.051±0.03	0.012±0.004	<b>0.052±0.021</b>
*26	0.036±0.03		0.06±0.03		0.034±0.02		0.05±0.03		0.02±0.01		0.02±0.01		0.019±0.005	0.009±0.008



Continuación Tabla 8. Frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3.2 en el GCC y razas control.

Alelo	Criollos							RSC			Controles		TOTAL GCC	TOTAL CONTROL
	BON	CAS	CCC	ChS	CQT	HV	RS	SM	LUC	VEL	H	B		
*27	<b>0.09±0.04</b>		0.08±0.04										0.015±0.0	
*28	<b>0.25±0.06</b>		<b>0.403±0.0</b>	0.053±0.0	0.07±0.03	0.033±0.0	0.05±0.03	<b>0.216±0.0</b>	<b>0.155±0.0</b>	<b>0.3±0.07</b>	<b>0.125±0.0</b>		<b>0.15±0.01</b>	<b>0.061±0.0</b>
*32					0.02±0.01								0.002±0.0	
*33								0.02±0.01					0.002±0.0	
*34		0.034±0.0		0.036±0.0	0.02±0.01							0.051±0.0	0.009±0.0	0.026±0.0
*35					0.02±0.01								0.002±0.0	
*36	0.035±0.0	0.051±0.0	<b>0.1±0.04</b>	<b>0.178±0.0</b>	0.051±0.0	0.05±0.03	0.02±0.02	0.033±0.0	0.034±0.0	0.033±0.0	<b>0.071±0.0</b>	<b>0.103±0.0</b>	<b>0.057±0.0</b>	0.09±0.02
*37	<b>0.25±0.06</b>	<b>0.103±0.0</b>	0.02±0.01	<b>0.16±0.05</b>	<b>0.103±0.0</b>	0.067±0.0	0.05±0.03	0.067±0.0	<b>0.33±0.06</b>	<b>0.133±0.0</b>	<b>0.196±0.0</b>	<b>0.103±0.0</b>	<b>0.128±0.0</b>	<b>0.150±0.0</b>
*39							0.066±0.0						0.007±0.0	
*41									0.02±0.01				0.002±0.0	
*42					0.034±0.0	<b>0.1±0.04</b>	0.02±0.01		0.034±0.0				0.020±0.0	
*43	0.02±0.01	<b>0.12±0.04</b>				0.033±0.0					0.071±0.0	0.02±0.01	0.017±0.0	0.043±0.0
*44	0.036±0.0	0.02±0.01			0.02±0.01		<b>0.15±0.05</b>						0.022±0.0	
*45		0.034±0.0											0.003±0.0	
*46					0.02±0.01								0.002±0.0	
*48					0.02±0.01								0.002±0.0	
*50										0.033±0.0			0.003±0.0	
*51					0.02±0.01								0.002±0.0	

En BON los alelos con mayor frecuencia fueron \*37 (0.25), \*28 (0.25) y \*27 (0.09); en CAS los alelos \*23, \*43 y \*37 (0.14, 0.12 y 0.10 respectivamente); en CCC los alelos \*28 (0.40), \*24 (0.15) y \*36 (0.10); los alelos \*36, \*37 y \*23 con frecuencias de 0.18, 0.16 y 0.14 respectivamente, en ChS; en CQT la frecuencia más alta la presentó el \*37 (0.10) seguido por \*15 y \*23 con 0.9 y 0.7 respectivamente; en HV los alelos \*23, \*10 y \*42 con 0.20 y 0.10 para los dos últimos; los alelos \*44, \*16 y \*21 en el ganado RS con frecuencias de 0.15, 0.13 y 0.10 respectivamente y en la raza SM los alelos \*24, \*28 y \*20 (0.35, 0.22 y 0.08 respectivamente).

En RSC los alelos BoLA-DRB3.2\* más frecuentes fueron 37, \*20 y \*28 (0.33, 0.19 y 0.16 respectivamente) en LUC y \*28, \*20 y \*37 (0.30 y 0.13 para los dos segundos) en VEL.

En los ganados controles el B tuvo alta frecuencia de los alelos BoLA-DRB3.2\*13, \*36 y \*37 (0.33 y 0.10 para los segundos); el H presentó mayores frecuencias de los alelos BoLA-DRB3.2\*37, \*28 y \*36 (0.20, 0.13 y 0.07 respectivamente) (Tabla 8).

El promedio de  $H_e$  fue de  $0.887 \pm 0.057$  para los ganados criollos, mientras que para RSC fue menor ( $0.844 \pm 0.022$ ), la  $H_e$  en el razas control tuvo un valor similar ( $0.883 \pm 0.003$ ) (Tabla 9).

En general la  $H_e$  fue mayor que la  $H_o$  para todas las razas de ganado criollo y controles (Tabla 9). La raza con mayor diversidad genética ( $H_e$ ) fue CQT (0.96) seguido por CAS y RS con 0.92, mientras que los valores más bajos de  $H_e$  los

presentaron CCC y SM (0.802 y 0.811, respectivamente). En las RSC el VEL mostró mayor valor de He (0.860) que LUC (He = 0.828). En las razas controles el mayor valor de He lo presentó el H con 0.904 y el B fue de 0.863.

**Tabla 9. Heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho), equilibrio Hardy-Weinberg y valores de Fis en GCC, RSC y controles (\* P ( $\alpha < 0.05$ ); \*\*P ( $\alpha < 0.01$ ))**

<b>Ganado</b>	<b>Raza</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>EHW</b>	<b>Fis</b>
<b>Criollos</b>	<b>BON</b>	0.864	0.679	**	0.282**
	<b>CAS</b>	0.929	0.880	*	0.073 ns
	<b>CCC</b>	0.802	0.462	**	0.525**
	<b>ChS</b>	0.891	0.750	**	0.226**
	<b>CQT</b>	0.961	0.862	*	0.136**
	<b>HV</b>	0.912	0.885	*	0.021 ns
	<b>RS</b>	0.924	0.600	**	0.287**
	<b>SM</b>	0.811	0.500	**	0.355**
<b>RSC</b>	<b>LUC</b>	0.828	0.536	**	0.371**
	<b>VEL</b>	0.860	0.633	*	0.266**
<b>Controles</b>	<b>H</b>	0.904	0.870	**	0.045 ns
	<b>B</b>	0.863	0.607	**	0.300**
<b>Promedio</b>	<b>Criollo</b>	0.887 ± 0.057	0.702 ± 0.170		0.249**
	<b>RSC</b>	0.844 ± 0.022	0.585 ± 0.07		
	<b>Controles</b>	0.883 ± 0.003	0.738 ± 0.186		

Todas las razas de ganado criollo se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg., aunque las razas criollas CAS y CQT y la RSC VEL no mostraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.05$ ).

El valor promedio de *Fis* fue 0.249 (Tabla 9). En el ganado criollo los mayores valores de endogamia lo presentaron CCC (0.525) y SM (0.355) y para RSC LUC (0.371) ( $P < 0.01$ ). Los valores de endogamia más bajos los tuvieron las razas CQT y ChS con 0,136 y 0,226 ( $P < 0,01$ ). En las razas CAS y HV el valor *Fis* no fue significativamente diferente de cero. Las demás razas tuvieron valores similares al promedio general.

La estructura genética con varios niveles jerárquicos se muestra en la Tabla 10. Los mayores valores de *Fst* lo mostraron las comparaciones entre criollos y controles con 0.051 para B y 0.052 para H ( $P < 0.01$ ), mientras que las comparaciones entre GCC y criollos con RSC tuvieron valores similares (0.044 y 0.043 respectivamente ( $P < 0,01$ )).

#### **4.3 ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DEL GEN BOLA-DRB3.2 CON EL VLB**

La prueba de independencia de chi-cuadrado ( $X^2$ ) entre la presencia del virus y los diferentes alelos dio como resultado que la presencia del virus está asociada con los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* ( $X^2c=345.99$  ( $P < 0.001$ )).

La relación entre los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* con resistencia o susceptibilidad a la presencia del virus, se estimó mediante el Odds Ratio (OR), medida que indica la frecuencia relativa de la exposición entre los casos y los controles y solo se tuvieron en cuenta alelos con datos de ausencia y presencia del virus (Tabla 11).

**Tabla 10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con diferentes niveles de estructura jerárquica en el GCC y controles (\*\*P  $\alpha$ <0.01).**

<b>Estructura</b>	<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Variación (%)</b>	<b>Fst</b>
Entre Criollos (GCC)	Entre poblaciones	9	4.48	0.044**
	Entre individuos dentro de poblaciones	290	23.83	
	Entre individuos	300	71.69	
	Total	599		
Criollos Vs RSC	Entre grupos	1	0.41	0.043**
	Entre poblaciones dentro de grupos	8	4.32	
	Entre individuos dentro de poblaciones	290	23.77	
	Entre individuos	300	71.50	
	Total	599		
GCC Vs B	Entre grupos	1	4.46	0.051**
	Entre poblaciones dentro de grupos	9	4.92	
	Entre individuos dentro de poblaciones	307	21.6	
	Entre individuos	318	69.02	
	Total	635		
GCC Vs H	Entre grupos	1	2.99	0.052**
	Entre poblaciones dentro de grupos	9	5.41	
	Entre individuos dentro de poblaciones	306	21.2	
	Entre individuos	317	76.38	
	Total	633		

En el GCC se encontraron asociaciones positivas entre los alelos BoLA.DRB3.2 \*21, \*24 y \*37 con ausencia del virus y asociaciones negativas entre los alelos BoLA.DRB3.2 \*6 y \*42 con la presencia del virus. En los controles el alelo BoLA.DRB3.2\*13 tuvo asociación positiva y los alelos BoLA.DRB3.2\*23 y \*28 asociación negativa.

Las frecuencias de los alelos con asociaciones positivas fueron mayores para los alelos \*24 y \*37 (0.089 y 0.128, respectivamente) y menor para el alelo \*21 (0.02). El alelo \*37 se encontró en todas las razas de GCC, el \*21 solo en tres razas y el \*24 no se encontró en el CQT. Los alelos \*6 y \*42 con asociaciones negativas tuvieron baja frecuencia (0.02 y 0.013, respectivamente). El alelo \*6 solo se encontró en 3 razas y el \*42 en 4 razas.

En los ganados controles, el alelo con asociación positiva \*13 presento alta frecuencia (0.16) y al igual que los alelos con asociación negativa \*23 y \*28 presentaron frecuencias mayores al 5% (0.07 y 0.06).

El GCC y los ganados controles no compartieron alelos con la misma clasificación.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el OR los alelos fueron asignados en tres categorías: *S* = susceptibles, *R* = resistente y *N* = neutral, por tanto en el GCC los alelos BoLA.DRB3.2\*21, \*24 y \*37 fueron considerados alelos de resistencia a la presencia virus y los alelos BoLA.DRB3.2 \*6 y \*42 fueron considerados como alelos susceptibles a la presencia del virus y de manera similar en los ganados controles.

Según la genotipificación del gen DRB3\*2 los individuos fueron clasificados como: *NN*, *NR*, *NS*, *RR*, *RS* y *SS*, los resultados de esta clasificación se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 11. Cálculo del OR para los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* en el GCC y controles (N = neutral, S = susceptible, R = resistente).**

GCC							
ALELO BoLA-DRB3.2*	PRESENCIA DEL VIRUS	AUSENCIA DEL VIRUS	OR	INTERVALO DE CONFIANZA		TEST EXACTO FISHER	CATEGORÍA
*3	1	4	0.52	0.053	4.653	1.00	N
*6	6	2	0.40	0.018	1.025	0.02	S
*8	5	3	3.53	0.834	14.930	0.12	N
*10	7	6	12.48	0.821	7.482	0.13	N
*14	1	3	0.69	0.071	6.682	1.00	N
*15	6	14	0.90	0.339	2.371	1.00	N
*16	6	18	0.70	0.272	1.788	0.51	N
*17	8	10	1.69	0.656	4.358	0.31	N
*20	22	19	2.10	1.374	4.359	0.005	N
*21	1	15	4.13	1.273	32.047	0.03	R
*23	20	34	1.26	0.701	2.248	0.45	N
*24	13	37	7.19	1.377	26.835	0.035	R
*25	2	4	1.06	0.192	5.817	1.00	N
*26	3	9	0.70	0.187	2.611	0.76	N
*27	2	6	0.67	0.135	3.372	1.00	N
*28	27	61	0.91	0.557	1.489	0.80	N
*34	1	4	0.52	0.057	4.704	1.00	N
*36	16	16	1.23	1.092	5.432	0.30	N
*37	16	60	7.51	1.678	25.654	0.02	R
*42	7	4	0.36	0.011	0.095	0.04	S
*43	4	6	1.40	0.390	5.023	0.73	N
*44	1	12	0.17	0.022	1.313	0.07	N

**Continuación Tabla 11. Cálculo del OR para los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* en el GCC y controles (N = neutral, S = susceptible, R = resistente).**

<b>CONTROLES</b>							
<b>ALELO BoLA- DRB3.2*</b>	<b>PRESENCIA DEL VIRUS</b>	<b>AUSENCIA DEL VIRUS</b>	<b>OR</b>	<b>INTERVALO DE CONFIANZA</b>		<b>TEST EXACTO FISHER</b>	<b>CATEGORÍA</b>
*3	1	1	1.30	0.079	21.413	0.81	<i>N</i>
*8	2	3	0.86	0.140	0.785	0.72	<i>N</i>
*10	2	2	1.31	0.178	9.669	0.78	<i>N</i>
*13	2	17	8.78	1.019	32.679	0.001	<i>R</i>
*16	3	2	2.01	0.322	12.556	0.65	<i>N</i>
*17	1	2	0.64	0.056	7.294	0.82	<i>N</i>
*23	7	2	0.11	0.025	0.527	0.035	<i>S</i>
*24	3	1	4.09	0.412	40.657	0.32	<i>N</i>
*25	2	3	0.86	0.140	0.785	0.72	<i>N</i>
*28	6	1	0.12	0.026	0.542	0.041	<i>S</i>
*36	2	8	0.29	0.060	1.458	0.18	<i>N</i>
*37	11	6	2.80	0.951	8.247	0.07	<i>N</i>
*43	3	2	2.01	0.322	12.556	0.65	<i>N</i>



Tabla 12. Clasificación de los genotipos del gen DRB3 de acuerdo a la Resistencia, Susceptibilidad o Neutralidad a la presencia del virus en el GCC y controles. *NN*, neutral/neutral; *NR*, neutral/resistente; *NS*, neutral/susceptible; *RR*, resistente/resistente; *RS*, resistente/susceptible; *SS*, susceptible/susceptible; *P*, presencia del virus; *A*, ausencia del virus.

GANADO	RAZA	<i>NN</i>		<i>NR</i>		<i>NS</i>		<i>RR</i>		<i>RS</i>		<i>SS</i>		TOTAL POR RAZA					
		<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>NN</i>	<i>NR</i>	<i>NS</i>	<i>RR</i>	<i>RS</i>	<i>SS</i>
CRIOLLO	BON		11		3				4				11	13	0	4	0	0	
	CAS	3	15	1	1		1	1	3				18	2	1	4	0	0	
	CCC	5	13	1	6				1				18	7	0	1	0	0	
	ChS	11	4	5	7				1				15	12	0	1	0	0	
	CQT	4	18	1	5							1	22	6	0	0	0	1	
	HDV	12	4	5	1					2		5	16	6	0	0	2	5	
	RS		18		4		1		2				18	4	1	2	0	0	
	SM		11		1	0			7				11	10	0	7	0	0	
RSC	LUC	6	4	5	5		1	2	4			1	10	10	1	6	0	1	
	VEL	12	8	2	5				1	2			20	7	0	3	0	0	
<b>SUB TOTAL</b>		53	106	2	5	0	3	6	2	2	0	6	1						
<b>TOTAL</b>		159		77		3		28		2		7		276					
<b>PORCENTAJE</b>		57.6		27.9		1.1		10.1		0.7		2.5							

Continuación Tabla 12. Clasificación de los genotipos del gen DRB3 de acuerdo a la Resistencia, Susceptibilidad o Neutralidad a la presencia del virus en el GCC y controles. *NN*, neutral/neutral; *NR*, neutral/resistente; *NS*, neutral/susceptible; *RR*, resistente/resistente; *RS*, resistente/susceptible; *SS*, susceptible/susceptible; *P*, presencia del virus; *A*, ausencia del virus.

GANADO	RAZA	<i>NN</i>		<i>NR</i>		<i>NS</i>		<i>RR</i>		<i>RS</i>		<i>SS</i>		TOTAL POR RAZA					
		<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>NN</i>	<i>NR</i>	<i>NS</i>	<i>RR</i>	<i>RS</i>	<i>SS</i>
CONTROL	B	1	18		1			1	9					19	1	0	10	0	0
	H	15	4	1		4	1					5		19	1	5	0	0	5
<b>SUB TOTAL</b>		16	22	1	1	4	1	1	9	0	0	5	0						
<b>TOTAL</b>		38		2		5		10		0		5		60					
<b>PORCENTAJE</b>		63.3		3.3		8.3		16.6		0		8.3							

En el ganado criollo colombiano solo el 2.5% de los individuos fue categorizado como *SS*, mientras que el 10.1% fue *RR*. De igual forma las categorías *NN* y *NR* tuvieron el mayor número de individuos (57.6% y 27.9% respectivamente), en la categoría *NS* solo se encontraron el 1.1% y los individuos *RS* fueron el 0.7%.

En los ganados controles el mayor porcentaje de individuos estuvo en la categoría *NN* (63.3%), seguido por los *RR* (16.6%), en *NS* y *SS* (8.3%), en *NR* (3.3%) y 0% en *RS*. Ambas razas controles tuvieron el mismo porcentaje de individuos categorizados como *NN*, *NR* y *RS*, aunque el B presento el 33% de sus individuos *RR* mientras que H no tuvo ninguno y el H mostro el 16% de sus individuos como *SS* contra ninguno en el B.

En el ganado BON que no tuvo presencia del VLB, ningún animal fue genotipificado como *SS*. Presentó alta frecuencia del alelo \*37 (0.25) relacionado como resistente y los alelos \*21 y \*24 también clasificados como resistentes tuvieron frecuencias de 0.071 y 0.053, respectivamente. En esta raza no se encontraron alelos relacionados con susceptibilidad.

En el ganado CAS (presencia del VLB de 26.7%) no se clasificaron individuos como *SS* y el 16% fueron *RR*. Los alelos de altas frecuencias fueron el \*23 (0.137), \*37 (0.103) y \*43 (0.12) de los cuales el primero y el último fueron categorizados como alelos neutrales y segundo relacionado con resistencia con frecuencia de 0.103. Por otro lado las frecuencias de los alelos asociados con susceptibilidad a la presencia del virus el alelo \*42 no se encontró y la frecuencia del alelo \*6 fue 0.034.

El CCC que presentó el virus en 26.7% de sus animales el 69% de ellos fueron categorizados como *NN* y solo el 3.8% como *RR*. Los alelos de alta frecuencia en esta raza fueron \*36, \*24 y \*28 (0.10, 0.15 y 0.40 respectivamente) de los cuales solo el \*24 es categoría *R* y los demás considerados *N*. Los alelos \*21 y \*37 considerados como *R* el primero no se encontró y el segundo con frecuencia baja (0.02). Los alelos relacionados con susceptibilidad no se encontraron en la raza CCC.

El ChS a pesar que presentó alta presencia del VLB (60%) no tuvo individuos genotipificados como *SS*. Los alelos relacionados con presencia del virus (\*6 y \*42) no se encontraron en esta raza, solo el 3.5% fueron *RR*, representado en el alelo \*37 con 0.16 de frecuencia.

El CQT con presencia del VLB en 16.7% de sus individuos solo presentó un 3.4% de individuos genotipificados como *SS* y ninguno como *NS*, *RR* y *RS*. Los alelos relacionados con resistencia a la presencia del VLB solo el \*37 tuvo alta frecuencia (0.10), los alelos \*21 y \*24 no se encontraron. Los alelos relacionados con susceptibilidad a la presencia del VLB el alelo \*42 presentó baja frecuencia (0.034) y el alelo \*6 no se encontró.

El ganado HV que presentó el mayor porcentaje de presencia del virus de todo el GCC (83,3%) presentó el 17% de los individuos genotipificados como *SS* y ninguno como *RR*. Además, fue la única raza que presentó individuos clasificados como *RS* (7%). Esta raza no presentó alta frecuencia en ninguno de los alelos relacionados resistencia a la presencia del VLB, mientras, que los alelos de alta

frecuencia fueron el \*10 y \*42 (0.10 cada uno) y \*23 (0.2) de los cuales el \*42 fue relacionado con susceptibilidad a la presencia del virus.

El RS no presentó el virus y tampoco presento individuos genotipificados como SS. Los alelos \*6 y \*42 relacionados con susceptibilidad a la presencia del virus, sus frecuencias fueron de 0.02 para el segundo y el primero no se encontró, mientras que, los alelos relacionados con resistencia a la presencia del virus tuvieron diferentes frecuencias el \*21 (0.10), el alelos \*24 no se encontró y el alelo \*37 (0.05).

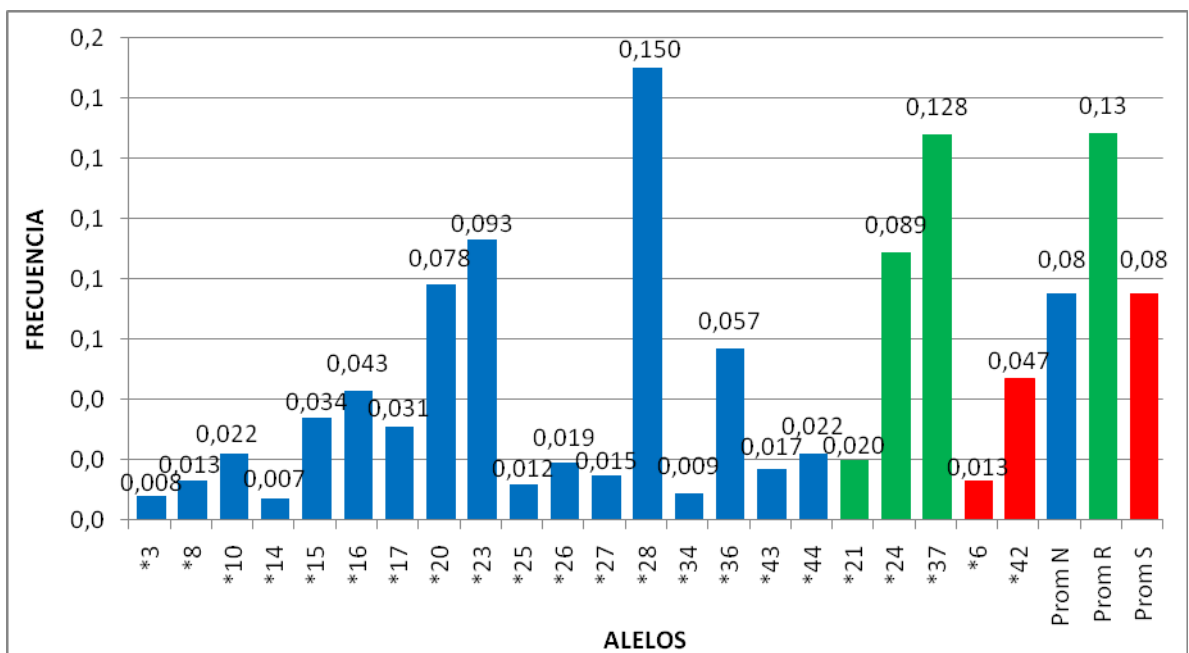
El ganado SM que no tuvo presencia del VLB, fueron genotipificados como *RR* el 25% y los alelos relacionados con susceptibilidad a la presencia del virus no se encontraron. Los tres alelos con mayor frecuencia fueron el \*20, \*24 y \*28 (0.08, 0.35 y 0.21 respectivamente) de los cuales el primero y el último son neutrales y el segundo asociado con resistencia a la presencia del virus..

El ganado LUC tuvo un porcentaje medio de presencia del virus (50%) y genotipos NN, NR, NS, RR y SS en el 36%, 36%, 3.6%, 21% y 3.6% de sus individuos respectivamente. Aunque el alelo con mayor frecuencia en la raza LUC fue el \*37 (0.33) y está relacionado con resistencia es una de las dos razas que presenta los dos alelos asociados con la presencia del virus (\*6 y \*42 con frecuencias de 0.02 y 0.03 respectivamente)..

En el ganado sintético VEL con 50% de presencia del VLB el 10% fueron *RR* sin mostrar genotipos *NS*, *RS* y *SS*. El VEL no presentó los alelos relacionados con susceptibilidad a la presencia del VLB.

En el GCC la frecuencia de los alelos relacionados con resistencia fue mayor que la frecuencia de los alelos asociados con susceptibilidad a la presencia del VLB (figura 4).

El alelo \*37 (clasificado *R*) presentó la mayor frecuencia (0.128) y comparado con los alelos clasificados como *S* mostró diferencias significativas en su frecuencia ( $P < 0.05$ ), además, este alelo se encontró con alta frecuencia en 6 de las 10 razas que conforman el GCC. Comparando los demás alelos *R* y *S* no se presentaron diferencias significativas en su frecuencia.



**Figura 4.** Frecuencia de los alelos utilizados para el cálculo del OR (en color azul alelos categoría N, en color verde categoría R y en color rojo categoría S).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 PRESENCIA DEL VLB EN LAS RAZAS CRIOLLAS Y SINTÉTICAS COLOMBIANAS.

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) entre 1996 y 2004 en Colombia se presentaron 198 focos de la enfermedad, 1083 casos y 39 muertes debida a la leucosis bovina. Griffiths *et al.*, (1982) encontraron prevalencias en ganado de leche de 24.9 % para la región Andina, las razas BON y VEL son originarias de la zona centro de Colombia se encuentran en las estribaciones de la cordillera central y occidental, entre 800 y 1800 m.s.n.m., con temperaturas que oscilan entre 18 y 24°C correspondiente a zona cafetera de nuestro país. En el presente estudio la presencia del virus en estas razas fue 0% y 50% respectivamente, aunque la raza BON fue muestreada en un hato al sur occidente del país.

En otros estudios realizados en Antioquia, Aguilar *et al.*, (1989) reportan la prevalencia serológica de LBE en hatos lecheros del Municipio de San Pedro de los Milagros, por medio de la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) encontrando un 12.07% de prevalencia; la presencia más alta de la enfermedad se encontró en el grupo etario de 5 a 9 años. Ruiz, (1995) encontró un 3.9% de seropositividad a LBE, mediante la técnica de IDGA. Trujillo, (1989) estudió la prevalencia de títulos de anticuerpos a LBE en el hato Paysandú, hallando 14.65% de infección en la población en estudio. De las razas de la región centro, VEL tuvo

mayor valor de presencia (50%). En tres fincas Ramírez *et al*, (2002), utilizando la técnica ELISA, no encontraron presencia de LBE en los terneros, las novillas fueron 37.5% seropositivas a la infección, 54% negativos y 8.3% sospechosos. También reporta que el 71.9% de las vacas fueron seropositivas, 19.5% negativos y 8.6% sospechosos. En este trabajo, en la raza VEL se encontró 50% de presencia del virus, valor mucho menor comparado con los animales adultos.

Con relación a los ganados muestreados en el oriente colombiano, en SM no se encontró presencia del virus pero en CQT se encontró un porcentaje de presencia del 16.7%, valor similar al reportado por Griffiths *et al.*, (1982) quienes encontraron prevalencias en ganado de leche de 15.3 % en el piedemonte Llanero u Oriente Colombiano. En CAS el porcentaje de presencia fue mayor (26.7%) mayor al reportado para esta región geográfica.

En los ganados de la región norte de Colombia se encontraron presencias de 0% en el RS, 23.3% en el CCC y 60% en ChS. Orjuela, (2000) en esta misma región, utilizando la técnica de inmunodifusión, detectó la presencia del VLB en el 1.5% animales examinados. El porcentaje de positivos aumentó gradualmente con la edad, de 0,2% en animales menores de 7 meses, 0.6% de 7 a 12 meses, y 4.7% en animales mayores de un año. El 9.4% y el 1.4% de los *Bos taurus* y los *Bos indicus* respectivamente fueron positivos, mientras que ninguno de los animales cruzados fueron positivos. En el departamento de Córdoba se encontró un 21.5% de positivos utilizando la técnica de ELISA (Betancour & Rodas, 2008) y el porcentaje de positivos aumentó significativamente con la edad ( $X^2 = 5.83$ ,  $p = 0.054$ ,  $p \geq 0.05$ ). Griffiths *et al.*, (1982) reportan prevalencias en ganado de 14.4 % para la región Caribe. Con excepción del Romosinuano los valores de presencia



del virus reportados por diferentes autores fueron menores que los reportados en el presente trabajo.

En HV y LUC, el porcentaje de presencia del virus fue del 83.3% y de 50% de las muestras respectivamente. Utilizando PCR anidado, Muñoz *et al*, (2008) reportan 25% de presencia del virus en muestras tomadas en el Valle del Cauca, valor más bajo que el reportado en el presente trabajo. En el Valle del Cauca no existen reportes utilizando pruebas serológicas para la determinación de la enfermedad.

La prueba de independencia o asociación utilizando chi-cuadrado ( $X^2$ ) dio como resultado que la presencia del virus depende de la raza  $X^2c = 209.62$  ( $P < 0.001$ ), contrario a Betancour & Rodas, (2008) quienes no encontraron asociación entre la raza (cebuínas, europeas y cruzados) y enfermedad ( $X^2 = 5.59$ ,  $p = 0.061$ ); de acuerdo con Chamizo, (2005) la prevalencia de la enfermedad dentro del hato está influenciada por tres factores: la prevalencia inicial dentro del hato, la incidencia de la infección y la tasa de la segregación de los animales sero-positivos respecto de los sero-negativos.

Se detectó asociación entre presencia del virus y el sistema de producción (carne o leche) ( $X^2c = 27.98$  ( $P < 0.001$ )); de acuerdo con Chamizo, (2005) la presencia de la enfermedad es mayor en las razas de ganado lechero que en ganados de ceba, debido a que los animales están más expuestos a factores de riesgo en la transmisión del virus como: agujas de vacunas, material quirúrgico, guantes de palpación entre otros.

En promedio, la presencia del virus fue mayor en las hembras que en los machos criollos (25,3% y 5,7% respectivamente) al igual que en los comerciales (43,3% y 1,7% respectivamente), sin embargo, no fue significativa ( $\chi^2_c = 0.0842$  ( $P < 0.7717$ )). Betancour & Rodas, (2008) reportan que el 68,6% hembras y el 31,4% de los machos son positivos a la enfermedad. Las condiciones y factores de manejo las hembras las hacen más propensas a contagiarse Chamizo, (2005).

## **5.2 POLIMORFISMOS DEL GEN BoLA-DRB3.2**

El presente trabajo reporta un mayor número de alelos en el gen BoLA-DRB3.2\* que en otras razas criollas de América y comerciales de todo el mundo (Tabla 1).

El alelo \*28 que tiene alta frecuencia en el GCC, no es frecuente en otras razas criollas como las Argentinas, Bolivianas, Mexicanas y Uruguayas. Igualmente, estas últimas tienen alta frecuencia en el alelo \*18 que en el GCC solo es del 3%.

Las razas sintéticas colombinas (RSC) compartieron en promedio el 33% de sus alelos con las razas que la conforman, así, la composición genética que en el ganado LUC y VEL es 1/3 ganado HV y RS respectivamente, compartieron un 33% y 32% de sus alelos respectivamente.

En BON se hallaron 15 alelos, valor mucho más bajo que el reportado por Martínez *et al*, (2005) quienes encontraron 31 alelos en 140 animales. También hallaron que alelo más frecuente era el \*11; sin embargo, en el presente estudio la frecuencia fue de 0.05.

Para los mismos autores en Brahman (n = 22) los alelos más frecuentes fueron \*18 y el \*23 pero en este estudio no halló el alelo \*18 y el \*23 presentó una frecuencia de 0.10. Igualmente en B se encontraron cinco alelos más que Martínez *et al*, (2005).

Para Ripoli *et al*, (2004) en Saavedreño (n = 125) los alelos más frecuentes fueron \*16, \*36, \*8, \*11, \*27, \*37, \*7. En GCC solo el alelo \*37 tuvo una frecuencia mayor al 5%; El valor de He (0.91) fue mayor al encontrado en el presente estudio.

En el ganado criollo argentino Giovambattista *et al*, (1996) y Juliarena *et al*, 2008, encontraron 21 y 26 alelos respectivamente y un valor de He similar al aquí reportado (0.87) y compartiendo los alelos \*8, \*20, \*24 y \*27 como los más frecuentes. Panei *et al*, (2009) en ganado Holando Argentino (n = 81) reporta solo la presencia de 17 alelos pero un valor de He más alto (0.89) y coincide con Giovambattista *et al*, (1996) en que los alelos más frecuentes son el \*15 y el \*24.

Kelly *et al*, (2003) en ganado criollo uruguayo (n = 51) reportan 22 alelos y una He de 0.91 junto con el ganado Saavedreño las razas de Suramérica con mayor valor de He. Solo el alelo \*16 se encuentra con frecuencia alta en las poblaciones de ganado criollo uruguayo y colombiano.

En el ganado criollo mexicano Chihuahua y Tamaulipas Fernández *et al*, (2008) con tamaños de muestra de 47 y 51 respectivamente reportan 18 y 34 alelos y valores de He de 0.83 y 0.92 respectivamente, compartiendo los alelos \*23, \*24 y \*39 como los más frecuentes entre el ganado criollo mexicano y colombiano.

En el ganado Iraní Tahmoorespur *et al*, (2007), Sadeghi *et al*, (2008) y Mohammadi *et al*, (2009) reportan 19, 23 y 32 alelos BoLA-DRB3.2\* respectivamente y coinciden en que los más frecuentes son el \*8 y el \*34 los cuales presentaron bajas frecuencias en el GCC y mayores valores en las razas controles, puede ser debido a que el ganado Sistani y el B son *Bos indicus* y el GCC es *Bos taurus*. Resultados similares reportan Behl *et al*, (2007) en el ganado Kankrej con 50 animales reporta 21 alelos, compartiendo con el ganado criollo colombiano el alelo \*20 con alta frecuencia.

Golijow, (1996) en el ganado Aberdeen Angus (n = 65) reporta 22 alelos y 0.87 de He y solo el alelo \*8 lo reporta con frecuencia mayor a 5%.

En el ganado Gyr Brasileiro Do Nascimento *et al*, (2006) reportan 37 alelos en 1058 animales y los alelos \*8, \*16 y \*27 con frecuencias mayor al 5% también están presentes en el GCC y Mota *et al*, (2002) en la misma raza no comparte alelos de alta frecuencia junto con el GCC. Sin embargo, Machado *et al*, (2005) y Martínez *et al*, (2006) en ganado Gyr reportan 20 y 27 alelos respectivamente y comparte los alelos \*16 y \*27 como los con alta frecuencia, que también coinciden con los resultados de Do Nascimento *et al*, (2006).

En bovinos de la raza Jersey (Gilliespie *et al.*, 1999) (n = 172) identificaron 24 alelos, 19 de los cuales ya habían sido reportados anteriormente para la raza y nueve alelos que no se habían sido reportados para la raza entre los cuales el \*8, \*10, \*15 y \*5, al igual que un nuevo patrón de corte (\*ibe) que no había sido reportado para la raza, también reportan una He de 0.895 valor mayor que el aquí

reportado. Sharif *et al*, (1998) en 66 animales Jersey reportan solo 13 alelos y una He de 0.886.

Los alelos encontrados aquí en el ganado H con alta frecuencia también lo fue en los reportes para esta raza en el mundo (Tabla1).

Dietz *et al*, (1997) en bovinos Holstein, encontraron 26 alelos de los cuales los más frecuentes fueron el \*08 (0.21) y el \*11 (0.18), y una He de 0.741, el valor de He más bajo reportado para este locus. Sharif *et al*, (1998) en 60 animales, encontraron 14 alelos; Saama *et al*, (2004) en 835 animales encontraron 27 alelos y coinciden en que el más frecuente es el alelo \*8, pero reporta un valor He mayor de 0.872. En el Holstein canadiense (Rupp *et al.*, 2007) reportan que los alelos más frecuentes son el \*8 y el \*11 que concuerda con lo reportado por Parnian *et al*, (2006) en el Holstein iraní.

En el Holstein colombiano y el cruce BON x Holstein (hato Paysandú, Universidad Nacional de Colombia) con 66 y 25 animales respectivamente se encontraron 27 alelos. Dos alelos de Holstein se encontraron también con alta frecuencia en el presente estudio (\*23 y \*24), mientras que todos los alelos encontrados en el BON x Holstein con alta frecuencia también lo fueron en el GCC (\*23, \*24, \*20, \*22, \*37 y \*28) (Zambrano *et al.*, 2009).

En el ganado Ayrshire (n = 129) se reportaron 18 alelos y una He de 0.821 y comparte con el ganado criollo colombiano los alelos \*8, \*24 y \*28 entre los más frecuentes (Udina *et al.*, 1998).

En el ganado Black Pied, Udina *et al*, (1999) reportan 21 alelos y una He de 0.904 mayor valor que el aquí reportado y los alelos más frecuentes fueron el \*8, \*24 y \*27.

Kulberg *et al*, (2007) en ganado de raza Norwegian Red (n =523) reporta 27 alelos siendo los más frecuentes el 8, \*24 y \*28 de los cuales los dos últimos también tuvieron alta frecuencia en el GCC.

En el ganado Shorthorn Japonés Takeshima *et al*, (2002) identificaron 21 alelos con frecuencias entre 0.03 y 0.16, siendo el más frecuente el \*8 y los menos frecuente los \*16 y \*19, todos ellos en baja frecuencia en el GCC.

En el B se reportan alelos \*13, \*36 y \*37 como de alta frecuencia lo que no ocurre con los demás reportes (Tabla 1).

En ganado Brahman Maillard *et al*, (1999) reportan 37 alelos y una He de 0.843 menor valor que el aquí reportado, mientras que Martínez *et al*, (2005) solo encontraron 22 alelos siendo el más frecuente el alelo \*11. En el presente estudio las mayores frecuencias en esta raza fueron para los alelos \*13, \*36 y \*37 (0.33, 0.10 y 0.10 respectivamente).

Ripoli *et al*, (2004a) determinaron los polimorfismos del locus utilizando la técnica PCR-SSCP, encontrando 7 alelos, con mayor valor de He para el ganado Brahaman y menor para Jersey con 0.81 y 0.26 respectivamente.

### 5.3 ASOCIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DEL GEN *BoLA-DRB3.2* CON EL VLB

Los genes del CMH son muy interesantes para los criadores de animales y genetistas, porque están asociados con resistencia o susceptibilidad a una amplia serie de enfermedades. Los genes *BoLA* han sido asociados con enfermedades como la mastitis y la leucemia viral bovina inducida y con otras características como producción de leche, crecimiento y respuesta inmune (Takeshima & Aida, 2006).

Algunos polimorfismos en el gen *BoLA-DRB3* se han relacionado con el desarrollo de resistencia o susceptibilidad al VLB asociado con la LBE. Estudios previos con infección del VLB revelaron que la presencia de los aminoácidos Glu-Arg (ER) (en la posición 70-71 de la cadena *BoLA-DRβ*) está asociada con resistencia a LP, los alelos que codifican el motivo ER son \*11, \*23 y \*28 (Lewin *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1993) de los cuales los alelos \*23 y \*28 fueron considerados neutrales a la presencia del VLB y tuvieron la mayor frecuencia (0.09 y 0.15 respectivamente) (figura 4), el alelo \*11 solo se encontró en la raza CQT (Tabla 7), el alelo \*23 se encontró en todas las razas teniendo mayor frecuencia en la raza HV (Tablas 8) esto muestra que a pesar de que el ganado HV presentó el mayor porcentaje de presencia del virus (Tabla 4) puede ser resistente a la enfermedad ya que posee alelos relacionados con resistencia a la LP ocasionada por infección inducida con el VLB, mientras que el alelo \*28 no se encontró en la raza CAS y presentó su mayor frecuencia en el ganado CCC.

Estudios posteriores confirmaron la asociación del alelo DRB3\*11 (Sulimova *et al.*, 1995; Zanotti *et al.*, 1996; Mirsky *et al.*, 1998), DRB3\*23 y DRB3\*28 (Sulimova *et al.*, 1995) con resistencia a LP, y de los alelos \*8 (Zanotti *et al.*, 1996; Sulimova *et al.*, 1995), \*16, \*22 y \*24 con susceptibilidad a LP (Sulimova *et al.*, 1995). Estos reportes son diferentes con lo aquí mostrado, pues el alelo y \*24 fue considerado como resistentes a la presencia del virus. El \*24 no se encontró en los ganados CQT y RS pero presentó la mayor frecuencia en la raza SM (Tabla 8) la cual no tuvo presencia del virus. Los demás alelos relacionados con susceptibilidad en la GCC mostraron frecuencias menores al 5%.

Los alelos del *BoLA-DRB3* que codifican Glu, Arg y Val (en las posiciones 74, 77 y 78 de la cadena *BoLA-DRβ*) están asociados con resistencia al desarrollo de tumores (Aida, 2001).

Dietz *et al.*, (1997) encontraron una asociación entre los alelos \*3, \*11, \*12, \*24 y \*28 con altos niveles de seroglobulinas IgG2 y el alelo \*26 con bajos niveles de la misma seroglobulina. El alelo \*24 se mostró con alta frecuencia en los ganados CCC y SM además fue un alelo considerado como *R*, mientras que el alelo \*28 tuvo alta frecuencia en las razas BON, CCC, LUC, SM y VEL (Tabla 8) y es considerado como alelo *N*. Además Dietz *et al.*, (1997) encontraron que los alelos \*8, \*16 y \*22 se relacionaban con altos contenidos IgM, el alelo \*8 con alta frecuencia en la raza HV (Tabla 8; el alelo \*26 con incremento en el número de eosinófilos (alelo considerado *N*) y el alelo \*24 con el número de neutrófilos (alelo considerado *R*), lo anterior muestra la influencia de los genes *BoLA-DRB3* sobre importantes parámetros inmunológicos.



Panei *et al*, (2009) en el ganado Holando Argentino encontraron que los alelos \*11, \*23 y \*28 se asociaban a una baja presencia de LP, de los cuales solo el alelo \*11 se encontró en el ganado CQT, el alelo \*23 en todas las razas con alta frecuencia en el HV (Tabla 8) y el alelo \*28 con alta frecuencia en el 5 de las 10 razas de GCC (Tabla 8). Por otro lado ellos reportan que los alelos \*22 y \*24 se asociaban a un aumento de presencia de LP, lo cual no concuerda con lo aquí reportado, pues el alelo \*22 se consideró como neutral y el alelo \*24 es considerado como resistente a la presencia del virus. Estos datos los concuerdan con lo reportado por Mirskt *et al*, (1998) que muestran que el \*11 se asocia con baja presencia de LP.

En el ganado criollo argentino Juliarena *et al*, (2008) observaron la carga de provirus de los animales, encontrado que los alelos \*11 y \*12 se asociaban a una baja carga proviral y que el alelo \*16 se asociaba a una alta carga proviral. Los alelos \*11 y \*12 solo se encontraron en la raza CQT con frecuencia de 0.05 y ambos alelos no tuvieron presencia del virus y el alelo \*16 presento un 25% de presencia del virus en el ganado criollo colombiano y un 60% de presencia en el ganado control comercial (H y B).

En otros trabajos asociando este locus con otras enfermedades y características productivas Martínez *et al*, (2005) en el ganado BON los alelos \*23, \*26, \*31 están relacionados con resistencia a Brucelosis, las frecuencias de estos alelos en el presente estudio fueron de 0.7, 0.04 y 0 respectivamente para este mismo grupo racial. La raza que presentó mayor frecuencia del alelo \*23 fue el HV y del alelo

\*26 el CCC (Tabla 8). El alelos \*31 no se encontró en ninguna de las razas. Ellos no reportan alelos asociados con susceptibilidad a la Brucelosis.

Martínez *et al*, (2006) encontraron que los alelos \*8, \*16, \*20 y \*27 se relacionaban con resistencia a la presencia de garrapatas en el ganado Gyr. De los cuales el alelo \*8 se encontró en los ganados CQT y HV con mayor frecuencia en el último, el alelo \*16 presento alta frecuencia en el RS, el \*20 en el LUC y el \*27 solo se encontró en el BON y el CCC con mayor frecuencia en el primero (Tabla 8).

Do Nascimento *et al*, (2006) reportan que el alelo \*7 se asocia con alta producción de proteína en leche, este alelo solo se encontró en el ganado CQT, mientras que el alelo \*6 asociado con baja producción de proteína en leche se encontró en las razas CAS, HV y LUC con frecuencia en las dos primeras (Tabla 8), ellos reportan que los alelos \*3 y \*31 están asociados con resistencia a mastitis, en el presente estudio no se encontró el alelo \*31, mientras que el alelo \*3 se encontró en las razas RS, SM y VEL con bajas frecuencias (Tabla 8).

En el Holstein canadiense se encontró que los alelos \*3 y \*11 se relacionaban con resistencia mastitis y que los alelos susceptibles eran el \*22 y \*23, este último asociado a susceptibilidad a la presencia del VLB. Además que la respuesta inmune mediada por anticuerpos fue mayor en el alelo \*24 y menor en el alelo \*22, y que ocurre lo contrario con la respuesta inmune mediada por células (Rupp *et al.*, 2007). En el presente estudio el alelo \*23 se encontró en todas las razas con diferentes frecuencias (Tabla 8). Mientras que en el Holstein colombiano (Zambrano *et al.*, 2009) reportan que el alelo \*33 estaba relacionado con resistencia a la presencia de mastitis subclínica y lo contrario para el alelo \*8, de los cuales el alelo \*33 solo se encontró en la raza SM y el alelo \*8 en el CQT y HV

además, que este alelo se relacionaba con baja producción de proteína en la leche. Zambrano *et al*, (2009) también reporta que el alelo \*36 está relacionado con baja producción de leche pero con alta producción de grasa en la leche, este alelo se encontró en todas las razas de ganado tanto criollas como controles.

Entre tanto los resultados obtenidos por Kulberg *et al*, (2007) en el ganado Norwegian Red concuerdan con los otros reportes en que el alelo más comúnmente asociado a resistencia en la presencia del mastitis es el \*11 y con susceptibilidad el alelo \*22.

## 6. CONCLUSIONES

Se encontró un menor porcentaje de presencia del virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano que en el ganado control comercial.

El ganado criollo colombiano posee alto polimorfismo del gen BoLA-DRB3.2\* y los valores de diversidad génica y número de alelos son similares a los encontrados en otros ganados de Suramérica.

Se encontraron asociaciones positivas y negativas entre alelos del gen BoLA-DRB3.2\* con la presencia del virus de la leucosis bovina en las razas de ganado criollo y colombiano, siendo mayor el porcentaje de individuos genotificados como resistentes/resistentes que susceptibles/susceptibles.

Todas las razas de ganado criollo y colombiano mostraron alta y media frecuencia de al menos uno de los alelos relacionados con resistencia a la presencia del virus. Las razas que tuvieron baja presencia del virus, también presentaron baja frecuencia de los alelos relacionados con susceptibilidad a la presencia del virus de la leucosis bovina y viceversa.

## BIBLIOGRAFÍA

AIDA, Y. 2001. Influence of host genetic differences on leukemogenesis induced bovine leukemia virus. *AIDS Res Human Retroviruses*, 17, S12.

AGUILAR, L; GIRALDO, C; VELEZ, R. 1989. Prevalencia serológica de Leucosis Enzootica Bovina en hatos lecheros del Municipio de San Pedro – Antioquia. Trabajo de grado (Médico Veterinario). Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Medellín, 61 p.

AGRESI, A; WILMA, P; MARA, R; ANNA, M; DANIELA, C; PERI, E; POLI, G; GINELLI, E. 1993. Use polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res*, 54:373-378.

AL-MURRANI, S.W; GLASS, E.J; HOPKINS, J. 1994. BoLA class I charge heterogeneity reflects the expression of more than two loci. *Anim Genetics*, n 25: 165–172.

ALFONSO, R; ALMANSA, J.E; BARRERA, C. 1998. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de la leucosis bovina enzootica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. *Rev Sic Tech Off Int Epi.*, 17:(3) 723-732.

ÁLVARES, L.A. 2009. Diversidad genética del ganado hartón del valle y sus relaciones con Holstein y Brahman, mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Valle. Colombia.

AMORENA, B; STONE, W. 1978. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science*, 201: 159–160.

ASOCRIOLLO, 2007. Asociación de razas criollas y colombianas – AsoCriollo. UNION NACIONAL DE ASOCIACIONES GANADERAS COLOMBIANAS <http://www.unaga.org.co/index.htm>. acceso : 10-07-2008.

BALLINGALL, K.T; ELLIS, S.A; MACHUGH, N.D; ARCHIBALD, S.D; MCKEEVER, D.J. 2004. The DY genes of the cattle MHC: expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. *Immunogenetics*, 55: 748–755.

BARRERA, G.P; MARTÍNEZ, R; PÉREZ, J.E; POLANCO, N; ARIZA, F. 2006. Evaluación de la variabilidad genética en ganado Criollo Colombiano mediante 12 marcadores microsatélites. En: AGRI, 38: 35-45.

BEDOYA, G; CARVAJAL, L.G; BERMÚDEZ, N.R; MORENO, F.L. 2001. Estructura molecular y poblacional del ganado criollo colombiano (GCC). *Rev Col Cienc Pec*, 14: 107-118.

BEHL, J. D; VERMA, N. K; BEHL, R; MUKESH, M; AHLAWAT, S. P. S. 2007. Characterization of Genetic Polymorphism of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Locus in Kankrej Cattle (*Bos indicus*) *J. Dairy Sci.* 90:2997–3001.

BEIER, D; BLANKENSTEIN, P; MARQUARDT, O; KUZMAK, J. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 114, 252-256.

BENSAID, A; KAUSHAL, A; BALDWI, C.L; CLEVERS, H; YOUNG, J.R; KEMP, S.J; MACHUGH, N.D; TOYE, P.G; TEALE, A.J. 1991. Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. *Immunogenetics*, 33: 247–254.

BETANCOUR, H; RODAS, G. 2008. Seroprevalencia de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev MVZ Córdoba*, 13(1):1197-1204.

BEYER, J; KOLLNER, B; TEIFKE, J.P; ESTARICK, E; BEIER, D; REIMAN, L;GRUNDWALD, U; ZILLER, M. Cattle infected with Bovine Leukemia Vireus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis, but also persistent B-cell lymphopenia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49(6):270-277.

BoLA NOMENCLATURE, International, Society for Animal Genetics [www2.ri.bbsrc.ac.uk /bola/dr3pcr.htm](http://www2.ri.bbsrc.ac.uk/bola/dr3pcr.htm). Fecha de ingreso: 20-07-2008.

CASAS, I; VALDERRAMA, M. 1998 El bovino Criollo Hartón del Valle. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. ASOHARTON. Palmira. 54 p.

CASTRO, G.S; TRUJILLO, E.B; DURAN, C.V. 2006. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Rev Col Cienc Pec.* Vol. 19:3: 270-279.

CHAMIZO, E.G. 1995. Leucosis Bovina Enzootica en: Patología especial y diagnóstico de enfermedades de los animales deomésticos. Edit: UABC. Mexicali, pp 78-81.

CHAMIZO, E.G. 1997. Leucosis Bovina Enzootica en: Patología orgánica y diagnóstico de enfermedades de los animales deomésticos. Edit: Felix Varela. La Habana, pp 209.

CHAMIZO, E.G. 2000. Leucosis Bovina Enzootica como causa de eficiencia reproductiva en el ganado lechero. *ARA.* (2): 40-42.

CHAMIZO, E.G. 2005. Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. *REJET*, Vol 6 No 7

COCKEREL, G.L; JENSEN, W.A; ROVNAK, J; ENNIS, W.H; GONDA, M.A. 1992. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a diary cattle herd. *Vet Microbiol*, 1:109-116.

CORPOICA, 2006. Razas criollas colombianas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria y ASOCRIOLLO. 33 PP.

DAVIES, C.J; ANDERSSON, L; ELLIS, S.A; HENSEN, E.J; LEWIN, H.A; MIKKO, S; MUGGLI-COCKETT, N.E; Van der POEL, J.J; RUSSELL, G.C. 1997. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim Genetics* 28: 159–168.

DEES, C; GODFREY, V.L; SCHULTZ, R.D; TRAVIS, C.C. 1996. Wild type p53 reduces the size of tumors caused by Bovine Leukemia Virus infected cell. *Cancer Lett*, 101:115-122.

DeGIUSEPPE, A; FELIZIANI, F. RUTILI, D; MIA, G. M. 2004. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculavirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(1): 147-151.

DEQUIEDT, E.F; CANTOR, G.H; HAMILTON, V.T; PRITCHARD, S.M; DAVIS, W.C; KIRKHOF, P; BURNY, A; KETTMANN, R; WILLIAMS, I. Bovine Leukemia Virus induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with in vivo survival of B-lymphocytes. *J Virol*, 73(2) 1127-1137.

DIETZ, A. B., COHEN, N. D., TIMMS, L., AND KEHRLI, M. E., JR. 1997a. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:406-412.

DIETZ, A.B; DETILLEUX, J.C; FREEMAN, A.E; KELLEY, D.H; STABEL, J.R; KEHRLI, M.E. 1997b. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J Dairy Sci*, 80:400-4005.

DiGIACOMO, R.F. 1992a. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Vet Med*, 87:248-257.

DiGIACOMO, R.F. 1992b. Vertical transmission of bovine leukemia virus infection. *Vet Med*, 87:258-262.

DiGIACOMO, R.F. 1992c. Horizontal transmission of bovine leukemia virus infection. *Vet Med*, 87:262; 263-271.

DO NASCIMENTO, C.S; MACHADO, M.A; MARTINEZ, M.L; BARBOSA DA SILVA, M.V.G; MARTINS, M.F.G; CAMPOS, A.L; SOUSA, A.L.A, TEODORO, R.L. DA SILVA, R.V; FACIONI, S.E.G; ANDRADE, D.A.O. 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4, 641-647.



DURAN, C.V. *et al.*, 1997. Proyecto: Conservación, mejoramiento y utilización del ganado criollo Hartón del Valle: Tipificación de los sistemas de producción del ganado Hartón del Valle. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 18 pp.

ELLIS, S.A; HOLMES, E.C; STAINES, K.A; SMITH, K.B; STEAR, M.J; MCKEEVER, D.J; MACHUGH, N.D; MORRISON, W.I. 1999. Variation in the number of expressed MHC genes in different cattle class I haplotypes. *Immunogenetics* 50: 319–328.

EVERMANN, J. 1992. Understanding BLV infection. How far we have come in a decade. *Vet Med*, 87:246.

EXCOFFIER, L. G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

FECHNER, H; KURG, A; GEUE, L; BLANKENSTEIN, P; MEWES, G; EBNER, D; BEIER, D. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 10, 621-30.

FECHNER, H; BLANKENSTEIN, P; LOOMAN, A; ELWERT, J; GEUE, L; ALBRECHT, C; KURG, A; BEIER, D; MARQUARDT, O; EBNER, D. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237, 261-9.

FECHNER, H; ZUÍGA, Z; RECABAL, M. 2006. Estudio comparativo entre un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis en muestras de sanfre, suero y leche. *Arch Med Vet* 38:2 137-141.

FERNÁNDEZ, I, G; RÍOS, J, G, R; GAYOSSO, A, V; ULLOA, R, A; MORALES, R, A, A. 2008. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico *Genetics and Molecular Biology*, 31, 4, 880-886.

GILLIESPIE, B. E., JAYARAO, B. M., DOWLEN, H. H., AND OLIVER, S. P. 1999. Analysis and frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 82:2049–2053.

GIOVAMBATTISTA, G., GOLIJOW, C. D., DULOUT, F. N., AND LOJO, M. M. 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim. Genet.* 27:55–56.

GRIFFITHS, I; GALLEGO, M; VILLAMIL, L. 1982. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. Colombia: División de Disciplinas Pecuarias, ICA; 982.

GOLIJOW, C. D. 1996. *Estudio de la reducción de la variabilidad genética por acción de la selección artificial en poblaciones de Bos taurus*, PhD Tesis, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

GONZÁLES, E.T; OLIVA, G.A; VARELA, A; BONZO, E; LICURSI, M; ETCHEVERRIGARAY, M.E. 2001. Leucosis enzootica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria*, 21,2:12-20.

GUERRA, M.T; TRUJILLO, B.E; CERÓN-MUÑOZ, M. 2005 Estimación de polimorfismos del gen de leptina bovino en poblaciones de las razas criollas Hartón del Valle, Blanco Orejinegro (BON) y en la raza Brahman. *Rev Col Cienc Pec*, 18:3.

HAVE, P; HOFF, J.R. 1991. Demonstration of antibodies against bovine leukemia virus (BLV) by blocking ELISA virus bovine polyclonal anti-BLV immunoglobulin. *Met Microbiol*, 27:220-229.

HERNANDEZ, D; MUÑOZ, D; POSSO, A; VALENCIA, N; MUÑOZ, J. 2007. Caracterización molecular del pato criollo Colombiano. *Acta Agronómica* 56(3): 141-145.

HEUVEL, van den M; PORTETELLE, D; JEFFEERSON, B; JACOBS, R.M. 2003. Adaptation of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay to determine the concentration of bovine leukemia virus p24 and optimal condition for p24 expression in short term cultures of peripheral blood mononuclear cell. *J Virol Methods*, 111(1): 61-67.

HUGH-JONES, M.E. 1992. Serological study on the incidence and prevalence of antibodies to bovine leukemia virus in agar sera. *Can J Comp Med*, 48:422-424.

JACOBS, R.M; HEENEY, J,L; GODKIN, M.A; LESLIE, K,E; TAYKLOR, J.A; DAVIES, C; VALII, V.E. 1991. Production and related variables in bovine leukemia virus infected coes. *Res Vet Commun*, 15:463-474.

JIMENEZ, C; BONILLA, J.A; DOLZ, G; RODRÍGUEZ, L.R; HERRERO, L; BOLAÑOS, E; CORTEZ, M.R; MORENO, E. 1995. Bovine leukemia virus infections in Costa Rica. *Zentralbl Veterinarmed*, (B) 42:385-390.

JULIARENA, M.A; POLI, M; SALA, L; CERIANI, C; GUTIERREZ, S; DOLCINI, G; RODRIGUEZ, E.M; MARIÑO, B; RODRIGUEZ-DUBRA, C; ESTEBAN, E.N. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gen. *Animal Genetics*, 39:432-438.

KELLY, J,E. 1993. Early detection of bovine leukemia bovine virus in cattle by use of the polymerase chain reactions. *Am J Vet Res*, 54:205-209.

KELLY, L; NICOLINI, M; D'ANGELO, A; NIMO, G; RINCON, J; PIAGGIO, J; POSTIGLIONI, A. 2003. Polimorfismos del gen DBR3.2 en bovinos criollos del Uruguay. *Arch Zootec*, 52: 77-80.

KLEIN, A; BARSUK, R; DAGAN, S; NUSBAUM, U; SHOUVAL, D; GALUN, E. 1997. Comparisi3n of methods for extraction of the nucleic acid from emolytic serum for PCR amplification of Hepatitis B virus DNA sequences. *Journal of clinical Microbiology*. 35:7, 1897-1899.

KNAPEN, K; KERKHOF, P; THIRY, E; MAMMERICKX, M. 1994. Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting antibodies against bovine leukemia virus in serum pools. *Epidemiol Infec*, 113: 563-569.

KULBERG, S; HERINGSTAD, B; GUTTERSUD, O.A; OLSAKER, I. 2007. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *J. Anim. Breed. Genet*. 124: 201-207.

- LEWIN, H.A; WU, M.C; STEWART, J.A; NOLAN, T.J. 1988. Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetic* 27: 338–344.
- MAILLARD, J. C., RENARD, C., CHARDON, P., CHANTAL, Y., AND BENSAID, A. 1999. Characterization of 18 new *BoLA-DRB3* alleles. *Anim. Genet.* 30:200–203.
- MACHADO, M.A; NASCIMENTO, C.S; MARTINEZ, M.L; SILVA, M.V.G.B; CAMPOS, A.L; TEODORO, R, L; VERNEQUE, R.S; GUIMARÃES, S.E.F. 2005 Associação do loco *BoLA-DRB3.2* com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.3, p.380-389.
- MAILLARD, JC; BERTHIER, D; CHANTAL, I; THEVENON ,S; SIDIBE, I; STACHURSKI, F; BELEMSAGA, D; RAZAFINDRAIBE, H; ELSEN, JM. 2003. Selection assisted by a *BoLA-DR/DQ* haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genetics, Selection, Evolution* 35 (Suppl. 1), S193–S200.
- MALATESTINIC, A. 2003. Bilateral exophthalmus in a Holstein cow with lymphosarcoma. *Can Vet J*, 44 (8):664-666.
- MARSOLAIS, G; DUBUC, R; BERGERON, J; MORREY, J; KELLY, E; JACKSON, M. 1994. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J Vet Diagn Invest* 6, 297-301.
- MARTÍNEZ, C.G. 1992. El ganado criollo colombiano blanco orejinegro (BON) Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Villavicencio, Meta, COLOMBIA. En animal genetic resources información. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) Y Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP).
- MARTÍNEZ, C.G. 1999. Seminario: Censo y Caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. FEDEGAN, ICA, PRONATTA y ASOBON. 158 pág.
- MARTÍNEZ, R; TORO, R; MONTOYA, F; BURBANO, M; TOBON, J; GALLEGO, J; ARIZA, F. 2005. Caracterización del *locus BoLA-DRB3* en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch ZootecK*, 54: 349-356.

- MARTINEZ, M.L; MACHADO, M.A; NASCIMENTO, C.S; SILVA, M.V.G.B; TEODORO, R.L; FURLONG, J; PRATA, M.C.A; CAMPOS, A.L; GUIMARÃES, M.F.M; AZEVEDO, A.L.S; PIRES, M.F.A; VERNEQUE, R.S. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genetics and Molecular Research* 5 (3): 513-524
- MIRETTI, M.M; FERRO, J.A; LARA, L.A; CONTEL, E.P.E. 2001. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA gene in South American Cattle. *Biochemical Genetics*, 39: 311-324.
- MIRSKY, M.L; OLMSTEAD, C; DA, Y; LEWIN, H.A. 1998. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Animal Genetics*, 29(4):245-252.
- NIIMI, M; NAKAI, Y; AIDA Y. 1995. Nucleotide sequences and the molecular evolution of the DMA and DMB genes of the bovine major histocompatibility complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217, 522–528.
- MOHAMMADI, A; NASSIRY, M. R; MOSAFER, A.J; MOHAMMADABADI, M. R; SULIMOVA G. E. 2009 Distribution of *BoLA-DRB3* Allelic Frequencies and Identification of a New Allele in the Iranian Cattle Breed Sistani (*Bos indicus*) *Russian Journal of Genetics*, , Vol. 45, No. 2, pp. 198–202.
- MORENO, F; BEDOYA, G; DER., J; CARVAJAL, L; BERMÚDEZ, N; ZULUAGA, F; OSSA, J; VERDUGO, J; ESTRADA, L; BARRERA, J; SCOTH, D; TOBON, C; RUIZ, L. (2001). Diversidad y relaciones filogenéticas del Ganado Criollo Colombiano. *Revista Corpoica* 3 (2):17-23.
- MOTA, A. F; GABRIEL, J. E; MARTINEZ, M. L; COUTINHO., L.L. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*) *European Journal of Immunogenetics* 29, 223–227.
- MUGGLI-COCKETT, N.E; STONE R.T. 1991. Restriction fragment length polymorphisms in bovine major histocompatibility complex class II beta-chain genes using bovine exoncontaining hybridization probes. *Anim Genetics* 22: 123–136.

NGUYEN, V.K; MAES, R.F. 1993. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *J Clin Microbiol*, 31:979-981.

NICHOLAS, F.W. 1990. Genética veterinaria. Editorial: Zaragoza. España. 618p.  
NIIMI, M; NAKAI, Y; AIDA Y. 1995. Nucleotide sequences and the molecular evolution of the DMA and DMB genes of the bovine major histocompatibility complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217: 522–528.

ORJUELA, J; NAVARRETE, A; BETANCOURT, L; ROQUEME, E; MORRISON, M.E. 2000. Salud y productividad en bovinos de la Costa Norte de Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 10p

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE) pagina wed fecha de consulta 13-07-2009.

PARNIAN, M; GHORASHI, S.A; SALEHI, A.; PASHMI, M; MOLLASALEHI, M. R. 2006. Polymorphism of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Holstein bulls of Iran using PCR-RFLP. *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol. 4, No. 3 197-200.

PANACCIO, M & LEW, A. 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res* 19, 1151.

PANEI, C.J; SUZUKI, K; ECHEVERRIA, M,G; SERENA, M,S; METZ, G,E; GONZALES, E,T. 2009. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *International of Journal of Dairy Science*. 2009.

PIEDRAHÍTA, H. A; POSSO, A.M; MUÑOZ, J. E; ALVAREZ, L. A. 2008. Variabilidad genética de Harton del Valle mediante RAMs. *Acta Agron*, 57(1):71 -76.

RAMIREZ, N.C; GAVIRIA, G; RESTREPO, L; GOMEZ, C. 2002. Diagnostico epidemiológico referente a varias patologías de bovinos en tres haciendas de la universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. 36 p.

- RIPOLI, M.V; PERAL-GARCIA, P; DULOUT, F. N; GIOVAMBATTISTA, G. 2004a. Polymorphism in the bovine BoLA-DRB3 upstream regulatory regions detected through PCR-SSCP and DNA sequencing. *Gene*, 339: 71-78.
- RIPOLI, M. V; LIR'ON, J. P; DE LUCA, J. C; ROJAS, F; DULOUT, F. N AND GIOVAMBATTISTA, G. 2004b. Gene Frequency Distribution of the *BoLA-DRB3* Locus in Saavedreño Creole Dairy Cattle *Biochemical Genetics*. 42:231-240.
- RUIZ, I. 1995. Avance de resultados municipio de San José de la Montaña. Estudio de infertilidad bovina en las zonas lecheras de Antioquia. Universidad de Antioquia y otras. 29 p.
- RUPP, R; HERNANDEZ, A; MALLARD, B. A. 2007. Association of Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) DRB3.2 with Immune Response, Mastitis, and Production and Type Traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 90:1029–1038
- RUSSELL, G.C; MARELLO, K.L; GALLAGHER, A; MCKEEVER, D.J; SPOONER, R.L. 1994. Amplification and sequencing of expressed DRB second exons from *Bos indicus*. *Immunogenetics*, 39: 432–436.
- SAAMA, P. M; JACOB, J. B; KEHRLI, M. E; JR, FREEMAN, A. E; KELM, S. C; KUCK, A. L; TEMPELMAN, R. J; BURTON, J. L. 2004. Genetic Variation in Bovine Mononuclear Leukocyte Responses to Dexamethasone. *J. Dairy Sci.* 87:3928–3937.
- SADEGHI, B; NASSITY, M.R; HEYDARPOUR, M; SHAHROUDI, F.E; MOSAFER, J; MOTLAGH, A.S. 2008. Characterization of Genetic Polymorphism of the Bovinelymphocyte Antigen DRB3.2 Locus in Sistani Cattle of Irian (*Bos indicus*). *Biotechnology* 7 (2): 333-337.
- SALMAN, M.D; HERNÁNDEZ, de A; BRAUN, Y. 1990. A seroepidemiological study of five bovine diseases in dairy farms of coastal region of Baja California, Mexico. *Pret Vet Med*, 143-153.
- SCHUWARD, Y; LEVY, D. 1994. Pathobiology of Bovine Leukemia Virus. *Vet Res*, 25:521-536.

SHARIF, S., MALLARD, B. A., WILKIE, B. N., SARDEANT, J. M., SCOTT, H. M., DEKKERS, J. C. M., AND LESLIE, K. E. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 29:185–193.

SHELL; HECKERT, H,P; MULLER, K.E. 2004. Case report: lymphosarcoma in a cow. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 111(1):38-41.

SOTOLONGO, P.J. 1999. Ganado Criollo Colombiano Importancia estratégica de su recuperación genética. Diciembre de 1999. *Biodiversidad* 22 / 11.

SPOONER, R.L; LEVEZIEL, H; GROSCLAUDE, F; OLIVER, R.A; VAIMAN, M. 1978. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *Journal of Immunogenetics.* 5: 325– 346.

SPRECHER, D.J; PELZER, K.D; LESSARD, P. 1991. Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. *J Am Vet Med Assoc*, 199:584-588.

STONE, D; HOF, A.J; DAVIS, W.C. 1995. Up-regulation of IL-2 receptor alpha and HMC class II expression on lymphocyte subpopulations from Bovine Leukemia Virus infected lymphocutotic cows. *Vet Immunol Immunopathol*, 48:65-76.

SULIMOVA, G.E; UDINA, I.G; SHAĬKHAEV, G.O; ZAKHAROV, I.A. 1995. DNA polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in cattle in connection with resistance and susceptibility to leukemia. *Genetika*, 31(9):1294-9.

TAHMOOERSPUR, M; NASSIRY, M,R; NAJAFI, M.F; GHOVVATI, S. 2007. Genetic polymorphism at the candidate Gene in Iranian Sistani Cattle (*Bos indicus*). *Pakistan Journal of Biological Sciences.*10(19):3368-3373.

TAKESHIMA, S.N & AIDA, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J*, 77: 138-150.



- TAKESHIMA, S.N; NAKAI, Y; OHTA, M; AIDA, Y. 2002. Short communication: Characterization of DRB3 alleles in the MCH of Japanese Shorthorn cattle by Polymerase chain reaction-Sequence-Based-Typing. *J Dairy Sci*, 85:1630-1632.
- TAMARIN, R. 1996. Principios de genética. Editorial: Reverté S.A. Barcelona, España. 607 p.
- TOMA, B; ELOIT, M; SEVEY, M. 1990. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzootica, anemia infecciosa de los equinos, artritis/encefalitis caprina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, (4):983-1119.
- TRUJILLO, L. 1989. Estudio serológico de la Leucosis Bovina en el hato Paysandú. Trabajo de investigación. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín, 1989. 50p.
- TRUJILLO, B, E; VALDERRAMA, LL. Y. 2006. . Genotipificación de la región 3'UTR del gen Nramp1, en ganado Holstein y en criollo Hartón del Valle. *Rev Colom Cienc Pec*, 19 : 4.
- UDINA, I. G., HARAMYSHERA, E. E., SULIMOVA, G. E., PAVLENKO, S. P., TURKOVA, S. O., ORLOVA, A. R., AND ERNST, L. K. 1998. Comparative analysis of Ayrshire and Black Pied cattle breeds by histocompatibility markers. *Genetika* 34(12):1668–1674.
- UDINA, IG; KARAMYSHEVA, EE; TURKOVA, SO; ORLOVA, AR; SULIMOVA, GE. 2008. Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire and black pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene Bola-DRB3. [\*Asian-Australasian Journal of Animal Sciences\*](#). 21 (4) : 465-470.
- UNGAR-WARON, H; BRENNER, J; PAZ, R; TRAININ, Z. 1992. Circulating immune complex in bovine leukemia virus (BLV) infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 34:173-179.
- van EIJK ,M.J; RUSS, I; LEWIN, H.A. 1993. Order of bovine DRB3, DYA, and PRL determined by sperm typing. *Mammalian Genome* 4: 113–118.

VASQUEZ, A.H.J. 2005. Conservación y utilización de las razas bovinas criollas y colombianas para el desarrollo rural sostenible. *Arch Zootec* 54: (206) 141-144.

WANG, C.T. 1991. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. *J Vet Met Sci*, 53: 395-398.

XU, A; van EIJK, M.J; PARK, C; LEWIN, H.A. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *Journal of Immunology* 151: 6977-6985.

ZAMBRANO, J.C; ECHEVERRI, J.Z; LÓPEZ, A.H. 2009a. Análisis y frecuencias de los alelos del antígeno leucocitario bovino BoLA DRB3.2 en vacas del ható Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* Vol 22. No. 3.

ZAMBRANO, J.C; ECHEVERRI, J.Z; LÓPEZ, A.H. 2009b. Asociación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 con características productivas en vacas del ható Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* Vol 22. No. 3.

ZAMBRANO, J.C; ECHEVERRI, J.Z; LÓPEZ, A.H. 2009c. Asociación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 con mastitis clínica y mastitis subclínica en vacas del ható Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia<sup>1</sup>. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* Vol 22. No. 3.

ZANOTTI, M; POLI, G; PONTI, W; POLLI, M; ROCCHI, M; BOLZANI, E; LONGERI, M; RUSSO, S; LEWIN, H A; van EIJK, M.J. 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genetics*. 27(5):337-341.



## ANEXO

### **Anexo 1. Patrones de restricción de las enzimas RsaI, BstYI y HaeIII en el gen BoLA-DRB3.2\***

RsaI						
<b>a</b>	78	54	50	39	33	30
<b>b</b>	111	54	50	39	30	
<b>c</b>	111	93	50	30		
<b>d</b>	143	111	30			
<b>e</b>	141	51	50	39		
<b>f</b>	141	54	50	39		
<b>g</b>	141	104	39			
<b>h</b>	111	69	54	50		
<b>i</b>	180	54	50			
<b>j</b>	93	78	63	50		
<b>k</b>	156	78	50			
<b>l</b>	234	50				
<b>m</b>	111	104	69			
<b>n</b>	180	104				
<b>o</b>	284					
<b>p</b>	111	51	50	39	30	
<b>q</b>	141	90	50			
<b>r</b>	111	90	50	30		
<b>s</b>	141	93	50			
<b>t</b>	143	141				
<b>u</b>	123	111	50			
<b>v</b>	102	78	54	50		
<b>w</b>	78	69	54	33		
<b>x</b>	104	78	69	33		
<b>y</b>	78	63	54	50	39	

BstYI		
<b>a</b>	199	85
<b>b</b>	284	
<b>c</b>	196	85
<b>d</b>	197	87
<b>e</b>	112	87

HaeIII			
<b>a</b>	167	65	52
<b>b</b>	219	65	
<b>c</b>	167	65	49
<b>d</b>	190	65	29
<b>e</b>	167	117	
<b>f</b>	167	65	48
<b>g</b>	164	65	55
<b>h</b>	167	65	46
<b>i</b>	167	113	4

**Anexo 2. Determinación de los alelos del gen *BoLA-DRB3.2\** mediante PCR-RFLP**

Alelo	DRB3 PCR-RFLP	Rsal, BstYI, HaeIII	Alelo	DRB3 PCR-RFLP	Rsal, BstYI, HaeIII	Alelo	DRB3 PCR-RFLP	Rsal, BstYI, HaeIII
DRB3*0501	1	aaa	DRB3*1501	16	jbd	DRB3*2704	33	nbf
DRB3*0503	1	aaa	DRB3*1502	16	jbd	DRB3*3001	34	lab
DRB3*1301	2	bba	N S	17	kbb	DRB3*3002	34	lab
DRB3*1001	3	bbb	DRB3*1801	18	lbf	DRB3*2101	35	cbb
DRB3*1002	3	bbb	DRB3*1802	18	lbf	DRB05	36	lba
N S	4	caa	DRB3*2601	19	sbb	DRB07	37	oba
DRB3*3301	5	rcc	DRB3*2301	20	lbb	DRB18	38	bda
DRB3*2201	6	daa	DRB3*2901	20	lbb	N S	39	tba
DRB3*2202	6	daa	DRB3*3601	20	lbb	N S	40	uba
DRB3*0201	7	ecc	DRB3*0801	21	lbe	DRB3*0502	41	aba
DRB3*1201	8	faa	DRB3*1101	22	mba	DRB3*1901	41	aba
DRB3*0301	9	fda	DRB3*2701	23	nba	DRB3*3801	41	aba
DRB3*0302	9	fda	DRB3*2702	23	nba	DRB3*2802	42	hbf
DRB3*1601	10	fba	DRB3*2703	23	nba	DRB3*25012	43	kbf
DRB3*1602	10	fba	DRB3*2705	23	nba	DRB3*25011	44	kbi
DRB3*0901	11	gea	DRB3*2706	23	nba	DRB3*3401	45	sdb
DRB3*0902	11	gea	DRB3*2707	23	nba	DRB3*3402	45	sdb
DRB3*1202	11	gea	DRB3*0101	24	nbb	DRB3*3501	46	vba
DRB3*1701	12	haa	DRB3*0102	24	nbb	DRB3*1703	47	waa
DRB3*1702	12	haa	N S	25	oaa	DRB3*3901	48	wba
DRB3*3201	12	haa	DRB3*0601	26	oab	DRB3*3701	49	wbe
DRB3*3202	12	haa	DRB3*14011	27	obf	DRB3*4001	50	xba
DRB3*3203	12	haa	DRB3*14012	27	obf	DRB3*4201	51	gaa
DRB3*0401	13	hba	DRB3*3101	27	obf	DRB3*0303	52	sda
N S	14	hbb	DRB3*0701	28	obb	DRB3*1902	53	yba
DRB3*20011	15	iba	DRB3*4101	29	pcc	DRB3*4301	54	jdb
DRB3*20012	15	iba	G E	30	qcc			
DRB3*2002	15	iba	DRB3*2801	31	ibf			
DRB3*2003	15	iba	DRB3*2401	32	maa			

