

ASOCIACIÓN DEL LOCUS *BOLA-DRB3.2* CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN EL GANADO CRIOLLO COLOMBIANO

ASSOCIATION BETWEEN THE LOCUS *BOLA-DRB3.2* AND BOVINE LEUKEMIA VIRUS IN CREOLE COLOMBIAN BREEDS

HERNÁNDEZ, H. DARWIN YOVANNY¹ PhD*, MUÑOZ, F. JAIME EDUARDO² PhD., ÁLVAREZ, F. LUZ ANGELA PhD.

¹Grupo de Investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre, Sede Puerta Verde, Sucre, Colombia.

²Grupo de investigación en Recursos Zootenéticos, Laboratorio de Genética Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

Palavras Chave:

Bovinos criollos,
Complejo mayor de Histocompatibilidad,
Marcadores moleculares,
Resistencia a enfermedades

Resumo

En 330 muestras de ADN de ocho razas bovinas criollas (Blanco Orejinegro, Caqueteño, Casanareño, Costeño con Cuernos, Chino Santandereano, Hartón del Valle, Romosinuano y Sanmartinero), dos razas sintéticas colombianas (Lucerna y Velásquez) y dos foráneas (Brahmán y Holstein) 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 estimaron asociaciones entre la ausencia (resistentes) del VLB y los alelos *21, *24 y *37 y la presencia (susceptibles) del VLB y los alelos *6 y *42 en los ganados criollos. La frecuencia acumulada de los alelos resistentes fue de 23.7% contra 6% de los susceptibles. El 10% de los individuos fue genotipificado como *Resistente/Resistente*, el 2.5% como *Susceptible/Susceptible* y el 57% fue de genotipo homocigoto neutral (*N/N*) en el ganado criollo colombiano. En los ganados controles el 16% fueron *Resistente/Resistente* y el 8.3% *Susceptible/Susceptible*. Los resultados indican que el ganado criollo colombiano posee genes de resistencia al VLB.

Key words:

Creole bovines,
Major histocompatibility complex,
Molecular markers,
Disease resistance.

Abstract

The presence of the bovine leukemia virus (BLV) (pro-virus detection – Nested PCR), *BoLA-DRB3.2** gen polymorphisms detection (Semi-nested PCR-RFLP) and the association between them (OR) were carried out in 330 DNA samples from eight creole breeds (Blanco Orejinegro, Caqueteño, Casanareño, Costeño con Cuernos, Chino Santandereano, Hartón del Valle, Romosinuano and Sanmartinero), two Colombian synthetic breeds (Lucerna y Velásquez) and two introduced ones (Brahmán y Holstein). A positive association was found between absence of BLV (resistant individuals) with alleles *21, *24 and *37; and the presence of BLV (susceptible individuals) with alleles *6 and *42. The cumulated allele frequency was 23.7% and 6% for the resistant and susceptible alleles respectively. For the Colombian creole cattle, 10% of genotyped individuals were classified as *Resistant/Resistant* (RR), 2.5% as *Susceptible/Susceptible* (SS) and 57% as neutral homozygous (*N/N*). For the introduced breeds, 16% were RR and 8.3% SS. The results indicate that the Colombian creole cattle has VLB resistance genes.

INFORMACIÓN

Recibido: 10-09-2014;

Aceptado: 25-11-2014.

Correspondencia autor:

darwin.hernandez@unisucre.edu.co

Introducción

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad de los bovinos es conocido como Antígenos de los Leucocitos Bovinos (BoLA) y se localiza en el cromosoma 23. El sistema BoLA es un conjunto de glicoproteínas que se ubican en la superficie celular y su función principal es la presentación de péptidos (TAKESHIMA y AIDA, 2006).

Existen tres clases de genes BoLA. Los BoLA clase I codifican proteínas implicadas en el reconocimiento de las células del hospedero que han sido infectadas y en la presentación de péptidos endógenos a las células citotóxicas T o T CD8⁺ (LEWIN, 2009; TAKESHIMA y AIDA, 2006).

Los genes BoLA clase II están localizados en dos partes diferentes del cromosoma 23, posee dos regiones llamadas clase IIa y clase IIb separadas por 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. Estos genes producen glicoproteínas, implicadas en la comunicación entre las células B y T, al igual, que procesos de presentación de antígenos extracelulares por las células presentadoras a las células T CD4⁺ y otras funciones inmunes (TAKESHIMA y AIDA, 2006).

Mientras que, los genes clase III codifican proteínas del sistema de complemento, moléculas relacionadas con la inflamación y proteínas de choque térmico (LEWIN, 2009).

Los genes y los productos de la región clase IIa son los más estudiados porque presentan altos niveles de polimorfismo. Se han identificados 14 genes en esta región: DR, DRB (DRB1, DRB2, DRB3), DQA (DQA1, DQA2, DQA3, DQA4, DQA5) y DQB (DQB1, DQB2, DQB3, DQB4, DQB5) (TAKESHIMA y AIDA, 2006), donde el gen DRB3 es el más estudiado, este tiene una longitud de 11,4 Kbp con cinco intrones y seis exones, de los cuales el más polimórfico es el exón dos (BoLA-DRB3.2) de un tamaño aproximado de 270 bp (RUSSELL *et al.*, 2004).

El gen DRB3.2 ha sido asociado con caracteres productivos (NASCIMENTO *et al.*, 2006; ZAMBRANO *et al.*, 2009a) y con enfermedades (GÓMEZ *et al.*, 2006; JULIARENA *et al.*, 2008; PANI *et al.*, 2009).

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 linfocítica, esta se caracteriza por el aumento bilateral más o menos simétrico de los ganglios linfáticos explorables (linfosarcoma, LS; linfoma maligno, LM) (SCHELL *et al.*, 2004), masas tumorales subcutáneas en diferentes localizaciones (linfadenopatías), la exoftalmia puede

considerarse como una manifestación específica de la enfermedad (CHAMIZO, 2005) al igual que, un incremento sostenido del número absoluto de linfocitos en la corriente sanguínea (linfocitosis persistente, LP) (MALATESTINIC, 2003).

El VLB pertenece al grupo de los *Retroviridae*, posee una transcriptasa-reversa responsable de la síntesis de una copia de ADN a partir de ARN viral. El ADN formado llamado *provirus*, puede conservarse en el núcleo de las células infectadas del hospedero. El virus se transmite de forma horizontal o por vía iatrogénica. La manifestación clínica de LBE comienza generalmente dos años después de la infección, con síntomas como: anemia, emaciación e infertilidad (BEYER *et al.*, 2002).

El diagnóstico se realiza comúnmente por radioinmunoensayo (RIA), inmunodifusión en gel de agar (IGDA) y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Estas técnicas presentan la desventaja de no poder detectar la infección en animales jóvenes o en estadíos tempranos de infección. La PCR ha sido utilizada para la detección temprana del VLB en animales menores de seis meses evitando así reacciones falso positivas, otra ventaja radica en la capacidad para detectar el virus en animales inmunotolerantes (CHAMIZO, 2005).

Los estudios sobre la presencia de la LBE 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) (RUIZ, 1995). También se reportan una presencia de 37.5% en novillas y un 71.9% en vacas en el departamento de Antioquia (RAMÍREZ *et al.*, 2002). En el departamento de Córdoba se encontró un 21.5% de positivos utilizando la técnica de ELISA (BETANCUR y RODAS, 2008), mientras que en la Sabana de Bogotá se reportó un 45.28% presencia (ALFONSO *et al.*, 1998). Se 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 (GRIFFITHS *et al.*, 1995). Utilizando métodos moleculares (PCR-anidado) se reportan 25% de presencia del virus en ganados del Valle del Cauca (MUÑOZ *et al.*, 2008).

El objetivo del presente trabajo fue asociar los alelos del gen BoLA-DRB3.2 con la infección por el Virus de la Leucosis Bovina en las razas criollas y colombianas.

Materiales y métodos

Del banco de ADN del Laboratorio de Genética Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, se tomaron 30 muestras de ADN de cada una de las

razas utilizadas, así: criollo ((Blanco orejinegro (BON), Casanareño (CAS), Costeño con cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Caqueteño (CQT), Sanmartinero (SM), Romosinuano (RS) y Hartón del Valle (HV)), de cada raza sintética colombiana (RSC) (Velásquez (VEL) y Lucerna (LUC)) y de las razas foráneas Holstein (H) y Brahmán (B), teniendo en cuenta que no fueran animales emparentados, para un total de 360 muestras.

La detección de los animales infectados con el virus de la leucosis bovina se realizó mediante la detección del *provirus*, amplificando una región altamente conservada del gen *env* viral utilizando la técnica PCR-anidada, descrita en artículo previo (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). En resumen: la primera reacción de PCR se realizó a un volumen final de 30 μ l conteniendo 100ng de ADN, 1,25mM de cada oligonucleótido (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3' y 5'-AACAAACCTCTGGGGAGGGT-3'), 0,2mM de cada dNTP, 1X de tampón PCR, 2,5mM $MgCl_2$ y 1U de Taq DNA Polimerasa (Fermentas®). En la segunda reacción se utilizó como ADN molde 3 μ l del producto de PCR de la primera amplificación con las mismas concentraciones de los otros reactivos y los oligonucleótidos 5'-CCCACAAGGGCGGGCGCCGGTTT-3' y 5'-GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG-3'. Los perfiles térmicos incluyeron una etapa de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, para terminar con una extensión final a 72°C por 5 minutos. En la segunda reacción las condiciones fueron las mismas, excepto que la temperatura de hibridación se aumentó a 68°C. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100® Teltier Thermal Cyler, BIO-RAD. Para la visualización de los productos amplificados se realizaron geles de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio en una cámara SUB-CELL® GT, BIO-RAD. La presencia de una banda de 444bp indicó que el animal estaba infectado con el VLB.

Los alelos del gen BoLA-DRB3.2 se determinaron utilizando la metodología PCR-RFLP descrita en detalle por HERNÁNDEZ *et al.* (2013). Rápidamente: se amplificó el segundo exón del gen BoLA-DRB.3, por un protocolo de PCR de dos pasos (semi-anidado); con los cebadores: HL030 (5'-ATCCTC TCTCTGCAGCACATTTCC-3'), HL031 (5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'), HL032 (5'-TCGC CGCTCAGTGAACCTCTC-3'); en la primer reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos HL030 y HL031 (1.25mM), en 25 μ l de mezcla total, con 20ng de ADN, 0.2mM de cada dNTP, 1X de tampón PCR, 2.5mM $MgCl_2$ y 1U de Taq DNA Polimerasa (Fermentas®). 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. Para la segunda reacción se tomaron 4 μ l de la primera reacción de PCR como molde y los oligonucleótidos HL030 y HL032 en un volumen total de 50 μ l, con las mismas concentraciones de los otros reactivos. 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 (7). Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca PTC-100® (Peltier Thermal Cyler BIO-RAD). El producto de ambas reacciones fue una banda de 282 pares de bases. 10 μ l del producto de PCR de la segunda reacción se utilizaron como sustrato para la digestión con 5U de las enzimas *Rsal*, *Bst* y *Hae*III (Fermentas®) a 37°C durante 4 horas. La electroforesis se realizó en geles de agarosa SFR™ (Super Fine Resolution, AMRESCO®) al 3% y teñidos con bromuro de etidio en una cámara SUB-CELL® GT (BIO-RAD). La lectura de los alelos se basó en la nomenclatura del 5th BoLA workshop (ISAG, 2010).

Para el análisis estadístico se formaron los siguientes grupos: criollos (BON, CAS, CCC, ChS, CQT, HV, RS y SM. n = 240), sintéticas (LUC y VEL. n = 60) y foráneas (B y H. n = 60). El ganado criollo colombiano (GCC) está formado por las razas criollos y las razas sintéticas (n = 300). Se determinó el porcentaje de presencia del VLB, el número de alelos y sus frecuencias para cada raza usando el programa ALERQUIN versión 3.5 (EXCOFFIER y LISCHER, 2010). Se realizó una prueba de chi-cuadrado (X^2) para determinar la dependencia entre la presencia del VLB y los alelos DRB3.2*, la asociación entre la presencia del virus y los alelos del gen DRB3.2* se determinó con el estadístico Odds Ratio (OR) (JULIARENA *et al.*, 2008) seguido de un test exacto de Fischer para determinar la significancia estadística del valor de OR utilizando el software SAS versión 9.1. Los alelos se categorizaron según el grado asociación en: positiva (OR>1, p<0.05) y se consideraron como resistentes (R) a la presencia del VLB, negativa (OR<1, p<0.05) y se consideraron susceptibles (S) a la presencia del VLB y los demás alelos como neutrales (N) (OR = 1, p>0.05). Los individuos fueron clasificados según la categoría de sus alelos, resultando las categorías: neutral/neutral (NN), neutral/resistente (NR), neutral/susceptible (NS), resistente/resistente (RR), resistente/susceptible (RS) y susceptible/susceptible (SS).

Resultados

El porcentaje de presencia del VLB fue mayor en las razas HV y ChS (83.3% y 60% respectivamente); las razas VEL y LUC tuvieron el mismo porcentaje de presencia (50%); en las razas CAS, CCC y CQT la presencia del virus fue de 26,7%, 23.3% y 16.7% respectivamente; no se encontró presencia del virus en

las razas BON, SM y RS. En las razas foráneas el VLB se encontró en 83.3% en H y 6.7% en B. El promedio de presencia del VLB en el GCC (31%) fue menor que el promedio en las razas foráneas (45%). Resultados en detalle se muestran en HERNÁNDEZ *et al.* (2011).

Se encontraron 41 alelos BoLA-DRB3.2*, de los cuales 20 también estuvieron presentes en las razas foráneas. El número promedio de alelos para el GCC 14.6±3.8 y para las foráneas de 15±1.41. El CQT presentó el mayor número de alelos (25 alelos) y el ChS el menor (10 alelos), mientras que en las razas sintéticas el mayor número de alelos lo presentó LUC (13 alelos) y en las razas foráneas B (16 alelos). El 58% de los alelos encontrados en el ganado GCC y el 36% en las foráneas tuvieron frecuencias menores a 5%. Los alelos con frecuencias superiores a 5% en el GCC fueron: DRB3.2 *28 (0.150±0.014), *37 (0.128±0.013), *24 (0.089±0.011), *23 (0.093±0.012) y *20 (0.078±0.011). En las razas foráneas los alelos con frecuencia mayor al 5% fueron los BoLA-DRB3.2 *13 (0.167±0.035), *37 (0.150±0.033), *36 (0.090±0.026), *23 (0.079±0.025), *28 (0.061±0.022) y el *25 (0.052±0.021). Los resultados en detalle se muestran en HERNÁNDEZ *et al.* (2013).

La prueba de independencia de chi-cuadrado (X^2) entre la presencia del virus y los alelos DRB3.2* mostró dependencia altamente significativa entre ambos ($X^2c=345.99$, $p<0.01$).

En el GCC, el OR determinó asociaciones positivas entre los alelos DRB3.2 *21, *24 y *37 con ausencia del virus y asociaciones negativas entre los alelos *6 y *42 con la presencia del virus ($p<0.05$), el resto de los alelos se consideraron neutrales a la infección. En las razas foráneas el alelo *13 tuvo asociación positiva y los alelos *23 y *28 asociación negativa ($p<0.05$). El GCC y los ganados foráneos no compartieron alelos con la misma clasificación (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Valores de OR, intervalo de confianza (95%), significancia y categoría de los alelos asociados con la presencia del VLB.

Alelo	Presencia del VLB	Ausencia del VLB	OR	GCC			Categoría
				Intervalo de confianza (95%)	Test de Fischer		
*6	6	2	0,4	0,018	0,905	0,02	S'
*21	1	15	4,13	1,273	15,23	0,03	R ²
*24	13	37	7,19	1,377	11,560	0,035	R
*37	16	60	7,51	1,678	10,870	0,02	R
*42	7	4	0,36	0,011	0,095	0,04	S
Foráneas							
*13	2	17	8,78	1,019	16,74	0,001	R
*23	7	2	0,11	0,025	0,527	0,035	S
*28	6	1	0,12	0,026	0,542	0,041	S

¹S = Susceptible, ²R = Resistente.

Tabla 2. Frecuencia de los alelos DRB3.2* asociados con la presencia del virus, número de alelos (NA) y presencia del VLB en el GCC.

Grupo	Raza	Alelos/Categoría					NA ³	Presencia del VLB (%)
		*21/R ¹	*24/R	*37/R	*6/S ²	*42/S		
Criollos	BON	0.071 ±0.03	0.053 ±0.03	0.250 ±0.06			15	0
	CAS		0.070 ±0.03	0.103 ±0.04	0.034 ±0.02		17	26,7
	CCC		0.153 ±0.05	0.020 ±0.01			12	23,3
	ChS		0.071 ±0.03	0.160 ±0.05			10	60
	CQT			0.103 ±0.04		0.034 ±0.02	25	16,7
	HV	0.020 ±0.01	0.050 ±0.03	0.067 ±0.03	0.083 ±0.04	0.100 ±0.04	14	83,3
	RS	0.100 ±0.04		0.050 ±0.03		0.020 ±0.01	16	0
	SM		0.350 ±0.06	0.067 ±0.03			12	0
	LUC		0.051 ±0.03	0.33 ±0.06	0.020 ±0.01	0.034 ±0.02	13	50
	VEL			0.133 ±0.04			12	50
Frecuencia/Promedio		0.020 ±0.005	0.089 ±0.011	0.128 ±0.013	0.013 ±0.004	0.020 ±0.005	14.6 ±3.8	31

¹R = Resistentes, ²S = Susceptibles, ³NA = Número de alelos

Los alelos *21, *24 y *37 considerados como R presentaron una frecuencia acumulada de 23.7%, mientras que, los alelos S (*6 y *42) su frecuencia acumulada fue de 6%, y la frecuencia acumulada de los alelos N (36 alelos) fue del 70.3%.

El alelo *21 solo se encontró en las razas BON, HV y RS. El alelo *24 no se encontró en las razas CQT, RS y VEL. El alelo *37 se encontró en todas las razas. En contraste, los alelos con asociación negativa, el *6 solo estuvo presente en tres razas (CAS, HV y LUC) y el *42 se encontró en CQT, HV, RS y LUC. Todas las razas que conforman el GCC presentaron al menos un alelo de R con frecuencia mayor al 5% (Tabla 1).

En los ganados foráneos solo el alelo *13 presentó asociación positiva, este solo se encontró la raza B con alta frecuencia (0.327±0.06). De otro lado, los alelos con asociación negativa fueron el *23 y el *28. El alelo *28 solo se encontró en el H (0.125±0.04) y el *23 en las dos razas foráneas (0.012±0.04 en H y 0.034±0.02 en B).

Los animales fueron clasificados según la categoría dada a cada uno de los alelos (N, R o S), así: neutral/neutral (NN), neutral/resistente (NR), neutral/susceptible (NS), resistente/resistente (RR), resistente/susceptible (RS) y susceptible/susceptible (SS).

En el GCC el 10.2% de los animales fue RR y solo el 2.5% SS (Tabla 3). Las categorías con mayor porcentaje de individuos fueron NN y NR con 57.9% y

27.6% respectivamente. Los porcentajes más bajos se presentaron en las categorías NS (1.2%) y RS (0.7%). En los ganados foráneos 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 (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de animales en cada categoría según la resistencia y susceptibilidad al VLB en el GCC y las razas foráneas.

Grupo	Raza	Genotipos (%)*					
		NN	NR	NS	RR	RS	SS
Criollos	BON	39,4	46,4	0	14,2	0	0
	CAS	72	8	4	16	0	0
	CCC	69,1	27	0	3,9	0	0
	ChS	53,5	42,8	0	3,7	0	0
	CQT	75,8	20,7	0	0	0	3,5
	HV	55,3	20,2	0	0	7	17,5
	RS	72	16	4	8	0	0
	SM	39,3	35,7	0	25	0	0
Sintéticas	LUC	35,7	35,7	3,6	21,4	0	3,6
	VEL	66,7	23,3	0	10	0	0
Promedio		57,9	27,6	1,2	10,2	0,7	2,5
Foráneas	B	63,3	3,4	0	33,3	0	0
	H	63,3	3,3	16,7	0	0	16,7
Promedio		63,3	3,4	8,4	16,7	0	8,4

En todas las razas del presente estudio la mayoría de los individuos se clasificó como NN. Individuos RR no se encontraron en CQT y HV, igualmente solo individuos SS se encontraron en estas razas además de en el LUC y en el H, mientras que, el RS solo se encontró en HV. De 148 animales que tuvieron categoría NN el 27.7% estuvieron infectados por el VLB y el 72.3% no tuvieron infección. En contraste, los animales RS que presentaron el VLB fueron el 71.4% y los que no el 28.6%.

La combinación de dos alelos R (R/R) y la combinación de un alelo R con otro de alelo de cualquier categoría (R/Otro), hizo que los genotipos se comportaran como resistentes ($p < 0.01$), con un valor de OR más alto para el genotipo R/Otro. El genotipo Otro/Otro se comportó de manera neutral a la infección al VLB (Tabla 4).

En la categoría de susceptibles, el genotipo S/Otro presentó un valor de OR de 1.05 ($p < 0.01$) lo que hace que el genotipo tienda a ser neutral a la infección, el S/S fue muy susceptible a la infección (OR = 0.13,

$p < 0.01$) y el genotipo Otro/Otro presentó un valor de OR alto. (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de OR, intervalo de confianza (95%) y significancia de los genotipos formados de acuerdo a la categoría asignada a los alelos.

Categoría	Genotipo	Ausencia, %	Presencia, %	OR	Intervalo de confianza (95%)		Test de Fischer
Resistentes	R/R	78,5	21,5	2,77	1,86	4,97	0,004
	R/otro	74	26	6,55	5,47	9,53	0,005
	Otro/Otro	66,7	33,3	1,22	1,01	2,54	0,125
Susceptibles	S/S	20	80	0,13	0,09	0,25	0,006
	S/otro	37,5	62,5	1,05	1,01	1,99	0,001
	Otro/Otro	72,5	27,5	4,38	3,98	6,25	0,001

Discusión

En el presente trabajo se determinó la asociación entre la infección con el VLB y los polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2*. Los porcentajes de presencia del VLB son mayores a los porcentajes de presencia del LBE (ALFONSO *et al.*, 1998, BETANCUR y RODAS, 2008, GRIFFITHS *et al.*, 1995, RAMÍREZ *et al.*, 2002, RUIZ, 1995), lo que está directamente relacionado con el método de diagnóstico utilizado (PCR-anidado), pues los métodos diagnósticos basados en serología requieren además de la infección un tiempo de incubación en el animal para desarrollar anticuerpos contra el virus (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

El número de alelos y sus frecuencias son similares a los reportados en otros ganados criollos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; GIOVAMBATTISTA *et al.*, 1996; KELLY *et al.*, 2003; RIPOLI *et al.*, 2004) y en razas foráneas presentes en América (JULIARENA *et al.*, 2008; MARTÍNEZ *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2006; PANEL *et al.*, 2009; ZAMBRANO *et al.*, 2009b). Otros estadísticos relacionados con la diversidad genética del locus BoLA-DRB3.2* en estas mismas muestras se presentan en artículo previo (HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Algunos polimorfismos en el gen BoLA-DRB3 se han relacionado con el desarrollo de resistencia o susceptibilidad a la Leucosis Bovina producida por VLB. Los primeros estudios revelaron que la presencia de los aminoácidos Glu-Arg (motivo ER) en la posición 70-71 de la cadena BoLA-DR β estaba asociado con resistencia a la linfocitosis persistente (LP) producida por la infección con VLB, los alelos que codifican el motivo ER son *11, *23 y *28 (XU *et al.*, 1993). Estudios posteriores confirmaron la asociación de los alelos *11, *23 y *28 con resistencia a LP y de los alelos *8, *16, *22 y *24 con susceptibilidad a la LP (PANEL *et al.*, 2009;

SULIMOVA *et al.*, 1995; ZANOTTI *et al.*, 1996). De los alelos de resistencia a la LP, solo el *11 se encontró en el CQT, mientras que, los alelos *23 y *28 están en todas las razas criollas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Los alelos de resistencia a la infección del VLB que aquí mostramos y los de resistencia al desarrollo de LP (PANEI *et al.*, 2009; SULIMOVA *et al.*, 1995; ZANOTTI *et al.*, 1996) fueron diferentes, sin embargo, el alelo *24 relacionado como susceptible al desarrollo de LP, aquí fue relacionado con resistencia a la infección por VLB, lo anterior puede indicar que animales con este alelo una vez infectados desarrollan rápidamente LP, esto sugiere que el control del desarrollo y/o progresión de la LBE está influenciada por otros alelos de este gen.

El motivo ERV en las posiciones 74, 77 y 78 (Glu-Arg-Val) de la cadena DR β ha sido asociado con resistencia al desarrollo de tumores (GILLET *et al.*, 2003). Algunos alelos que tienen este motivo son el *11 y el *23, en el presente estudio estos alelos presentaron una asociación neutral, es importante destacar que el alelo *23 se encontró en todas las razas del GCC y el *11 solo en la raza QCT.

Por otro lado se ha relacionado positivamente los alelos *11 y *12 con baja carga proviral y el alelo *16 con alta carga (JULIARENA *et al.*, 2008). Estos alelos resistentes solo se encontraron en las razas CQT y CAS, mientras que, el *16 presentó alta frecuencia en el RS (0.133 \pm 0.04). Los alelos de resistencia/susceptibilidad a la carga proviral mostrados por JULIARENA *et al.* (2008) son diferentes a los presentados en este trabajo, como resistentes a la infección por VLB determinada molecularmente, esto apunta a que la infección con el VLB y la subsecuente multiplicación viral está controlada por diferentes alelos del gen DRB3.

Todas las razas de GCC presentaron alto porcentaje de individuos con genotipo NN y NR y no se encontraron individuos RR en el HV lo que se reflejó en los porcentajes de presencia del VLB.

La asociación entre el desarrollo de la leucosis bovina y el genotipo DRB3, mostró un fuerte efecto protector en los animales heterocigotos (R/Otro y S/Otro). Estos resultados sugieren una ventaja del heterocigoto. Se ha propuesto que los individuos heterocigotos para el CMH son capaces de reconocer un amplio espectro de antígenos, aumentando así la eficiencia de estos individuos en comparación con individuos homocigotos (HEDRICK *et al.*, 1991; HUGHES y NEI, 1989). Varios estudios han demostrado que la heterocigocidad confiere ventajas selectivas contra enfermedades infecciosas, por ejemplo, humanos heterocigotos en locus HLA clase II mostraron tener resistencia contra el virus de la hepatitis B y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (CARRINGTON *et al.*, 1999; HRABER *et al.*, 2007). En bovinos Holstein con mastitis causada por *Escherichia* o *Streptococcus* se encontró que en los animales heterocigotos en el locus clase II DQA1, la progresión de la enfermedad era más lenta (BAXTER *et al.*, 2008; TAKESHIMA *et al.*, 2008). Un resultado similar de ventaja del heterocigoto sobre el control de la carga proviral del VLB también es demostrado y propuesto por MIYASAKA *et al.* (2013).

Estos resultados sugieren que el desarrollo de leucosis bovina es una característica cuantitativa, con dominancia de los alelos de resistencia, igualmente, la alta frecuencia acumulada de los genes de resistencia a la infección en el GCC pueden ser utilizados en programas de mejoramiento genético con el fin de aumentar la resistencia genética al virus.

Finalmente, los datos indican que posiblemente el proceso de infección con VLB y el desarrollo de síntomas propios de la LBE tales como la LP, aumento/disminución carga proviral y el desarrollo de tumores están bajo el control de diferentes alelos del complejo BoLA-DRB3.2*, es necesario evaluar esta hipótesis, más aun, en las razas criollas Colombianas donde varios señalan que estas son resistentes a diferentes enfermedades.

Agradecimientos: A la Dirección Nacional de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto.

Referencias

- ALFONSO, R.; ALMANSA, J.; DEL C BARRERA, J. 1998. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de la leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. *Revue scientifique et technique - Office international des épizooties* 17:723-732.
- BAXTER, R.; HASTINGS, N.; LAW, A.; GLASS, E. A. 2008. A rapid and robust sequence-based genotyping method for BoLA-DRB3 alleles in large numbers of heterozygous cattle. *Anim Genet.* 39:561-563.
- BETANCUR, C.; RODAS, J. 2008. Seroprevalencia de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Revista MVZ Córdoba* 13:1197-1204.

- BEYER, J.; KÖLLNER, B.; TEIFKE, J.; STARICK, E.; BEIER, D.; REIMANN, I. 2002. Cattle Infected with Bovine Leukaemia Virus may not only Develop Persistent B-cell Lymphocytosis but also Persistent B-cell Lymphopenia. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 49:270-277.
- CARRINGTON, M.; NELSON, G.; MARTIN, M.; KISSNER, T.; VLAHOV, D.; GOEDERT, J. 1999. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283:1748-1752.
- CHAMIZO, E. 2005. Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. *REDVET-Revista electrónica de veterinaria* 6:1-25.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. 2010 Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- FERNÁNDEZ, I.; RIOS, J.; GAYOSSO, A.; ULLOA, R.; ALONSO, R. 2008. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico. *Genetics and molecular biology* 31:880-886.
- GIOVAMBATTISTA, G.; GOLIJOW, C.; DULOUT, F.; LOJO, M. 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics* 27:55-56.
- GÓMEZ, S.; TRUJILLO, E.; DURÁN, C. 2006. Polimorfismos de BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19:270-279.
- GRIFFITHS, I.; GALLEGO, M.; VILLAMIL, L. 1995. *Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia*. División de Disciplinas Pecuarias. ICA pp. 82.
- HEDRICK, P.; WHITTAM, T.; PARHAM, P. 1991. Heterozygosity at individual amino acid sites: extremely high levels for HLA-A and -B genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:5897-5901.
- HERNÁNDEZ, D.; POSSO, A.; BENAVIDES, J.; MUÑOZ, J.; GIOVAMBATTISTA, G.; ALVAREZ, L. 2011. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agronómica* 60:312-318.
- HERNÁNDEZ, D.; POSSO, A.; MUÑOZ, J.; GIOVAMBATTISTA, G.; ALVAREZ, L. 2013. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2* en ganado criollo Colombiano. *Revista MVZ Córdoba* 18(Supl): 3665-3671.
- HRABER, P.; KUIKEN, C.; YUSIM, K. 2007. Evidence for human leukocyte antigen heterozygote advantage against hepatitis C virus infection. *Hepatology* 46:1713-1721.
- HUGHES, A.; NEI, M. 1989. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:958-962.
- INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL GENETICS. [en línea] [Fecha de acceso 20 de Julio de 2010]. URL disponible en <http://www.projects.roslin.ac.uk/bola/bolahome.html>
- JULIARENA, M.; POLI, M.; SALA, L.; CERIANI, C.; GUTIERREZ, S.; DOLCINI, G. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Animal Genetics* 39:432-438.
- KELLY, L.; D'ANGELO, M.; NIMO, A.; PIAGGIO, J.; POSTIGLIONI, A.; NICOLINI, P. 2003. Polimorfismo del gen DRB3.2 en bovinos criollos del Uruguay. *Archivos de zootecnia* 52:77-80.
- LEWIN B. 2009. *Genes IX*. Mc Graw Hill. 9 ed. pp 203.
- MALATESTINIC, A. 2003. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. *Canadian Veterinary Journal* 44:664-666.
- MARTÍNEZ, R.; TORO, T.; MONTOYA, F.; BURBANO, M.; TOBÓN, J.; ARIZA, F. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Archivos de Zootecnia* 54:349-356.
- MIYASAKA, T.; TAKESHIMA, S.; JIMBA, M.; MATSUMOTO, Y.; KOBAYASHI, T.; MATSUHASHI, T.; SENTSU, H.; AIDA.

- Y. 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens* 81:72-82.
- MUÑOZ, D.; POSSO, A.; MUÑOZ, J. 2008. Detección de la leucosis bovina utilizando reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 21:153-161.
- NASCIMENTO, C.; MACHADO, M.; MARTINEZ, M.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M.; OLIVEIRA, D. 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* 29:641-647.
- GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A.; DEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4:18-26.
- PANEI, C.; SUZUKI, K.; ECHEVERRIA, M.; SERENA, M.; METZ, G.; GONZALES, E. 2009. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *International Dairy Journal* 4:123-128.
- RAMÍREZ, N.; GAVIRIA, G.; RESTREPO, L.; GÓMEZ, 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, Medellín. pp. 36.
- RIPOLI, M.; LIRÓN, J.; DE LUCA, J.; ROJAS, F.; DULOUT, F.; GIOVAMBATTISTA, G. 2004. 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*. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. Medellín. pp. 29.
- RUSSELL, G.; SMITH, J.; OLIVER, R. 2004. Structure of the BoLA-DRB3 gene and promoter. *European Journal of Immunogenetics* 31:145-151.
- SHELL, M.; HECKERT, H.; MÜLLER, K. 2004. Case report: lymphosarcoma in a cow. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 111:38-41.
- SULIMOVA, G.; UDINA, I.; SHAIKHAEV, G. 1995. DNA polymorphism at the BoLA-DRB3 gene of cattle in relation to resistance and susceptibility to leukemia. *Journal Name: Russian Journal of Genetics* 31(9):1105-1109.
- TAKESHIMA, S.; AIDA, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*. 77:138-150.
- TAKESHIMA, S.; MATSUMOTO, Y.; CHEN, J.; YOSHIDA, T.; MUKOYAMA, H.; AIDA, Y. 2008. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by *Streptococci* and *Escherichia* species. *Tissue Antigens* 72:525-531.
- XU, A.; VAN EIJK, M.; PARK, C.; LEWIN, H. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *The Journal of Immunology* 151:6977-85.
- ZAMBRANO, J.; ECHEVERRI, J.; LOPEZ, A. 2009a. Asociación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 con características productivas en vacas del ható Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 22:448-449.
- ZAMBRANO, J.; ECHEVERRI, J.; LOPEZ, A. 2009b. Análisis y frecuencias de los alelos del antígeno leucocitario bovino BoLA DRB3.2 en vacas del ható Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 22:448-449.
- ZANOTTI, M.; POLI, G.; PONTI, W.; ROCCHI, M.; LEWIN, H.; VAN EIJK, M. 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet*. 27:337 - 341.