

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**PROPUESTA PARA MEJORAR LA SANIDAD ANIMAL Y LA CALIDAD DE LA
LECHE EN BOVINOS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

POR:

ANGEL ALEJANDRO CORRALES VILLANUEVA

TESIS

**PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2011

**PROPUESTA PARA MEJORAR LA SANIDAD ANIMAL Y LA CALIDAD DE LA
LECHE EN BOVINOS UTILIZANDO MARCADORES**

POR:

ANGEL ALEJANDRO CORRALES VILLANUEVA

HECTOR A. DÍAZ ANTÚNEZ, M. Sc.
Asesor Principal en Honduras

JAIME EDUARDO MUÑOZ, PhD.
Asesor Principal en Colombia

TESIS

**PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

DICIEMBRE, 2011

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO porque sin la ayuda de él nada es posible, por darme las fuerzas necesarias para salir adelante y poder cumplir mis metas, brindándome la sabiduría y paciencia para enfrentar todos los obstáculos y sobre todo darme la salud y contar con el amor de mi familia.

A mis padres Deysi Eliud Villanueva Gámez y Hernan Corrales Molina y mis hermanas Diana Jasmin, Andy Nohelia y Perla Violeta Corrales Villanueva quienes me brindaron un apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida y sobre todo a mis hijos Dayana Alejandra Corrales Euceda, Angel Carlos Daniel Corrales Zelaya y a mi querida y amada esposa Mirna Cristina Zelaya Duarte.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso por iluminarme en cada momento de mi vida y por darme salud, fuerza, sabiduría de esta manera guiándome por el camino correcto guardándome en cada uno de mis pasos y así guiándome por el sendero del bien.

A mis Queridos Padres Deysi Eliud Villanueva Gámez y Hernán Corrales Molina, a mis hermanos y todos mis amigos, por su apoyo incondicional, dándome fuerzas para poder seguir preparándome en mis estudios.

A la **Universidad Nacional de Agricultura** por darme la oportunidad de formarme profesionalmente y como persona digna de una sociedad.

A mis Compañeros de la Clase Zeus 2010 y clase Armagedón 2011, Gracias a cada uno, por las bromas de nuestra vida estudiantil, a mis amigos, Wilson Padilla, Esdras Vásquez, Ariel Mendoza, Teddy García, Bairon Sarmientos dado que compartimos momentos de alegrías, tristezas, y desvelos parámetros que los cuales siempre están presentes en la vida de cada uno de nosotros.

CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
CONTENIDO.....	iv
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	3
III REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Las Proteínas de la Leche	4
3.1.1 K-Caseína (κ -CN).....	4
3.5 Leucosis Bovina	8
3.6 Diarrea Viral Bovina (DVB)	15
3.7 EL complejo mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA).....	18
3.8 GEN BOLA-DRB3	22
IV MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Localización.....	29
4.3 Materiales y equipo	29
4.2 Metodología.....	29
4.4 Método.....	29
4.4.1 consideraciones para la propuesta	30
4.5 Componentes de la propuesta	30
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1 El problema de investigación	32
5.2 Opinión de expertos.....	34

5.3 Técnicas moleculares de la propuesta de mejoramiento	35
5.4. PROPUESTA PARA MEJORAR LA SANIDAD ANIMAL Y LA CALIDAD DE LA LECHE EN BOVINOS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES	38
VI CONCLUSIONES	58
VII RECOMENDACIONES	59
VII BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	67

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Frecuencia genética de la variante A y B de k-CN y B-Lg.....	6
Tabla 2. Contenido de la proteína total, caseína y N ^o de caseína para distintos fenotipos de k-CN y B-Lg.....	7
Tabla 3. Reportes de la variabilidad del gen DRB3.2 en ganados del mundo	23
Tabla 4. Asociación de los alelos BoLA-DBR3.2* con enfermedades y características productivas en diferentes ganados.	26
Tabla 5. Recepción de muestras	38
Tabla 6. Cebadores para amplificar el fragmento 290 pb	41
Tabla 7. Componentes de la reacción de un paso RT-PCR	43
Tabla 8. Componentes del Termociclador	44
Tabla 9. Resultados de los análisis realizados para Diarrea viral	45
Tabla 10. Resultados del análisis del Virus de Leucosis Bovina	46
Tabla 11. Resultados obtenidos para el gen BoLA y para k-caseína	49
Tabla 12. Composición de la solución de PCR para κ-CN	51
Tabla 13. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 453 de κ-CN	53
Tabla 14. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 551 de κ-CN	53
Tabla 15. Resultados finales en donde se muestran los animales sanos de DVB y VLB, alelos del gen BoLA y alelos de la K- caseína	54

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructura molecular del BoLA I y II	19
Figura 2. Mapa genético del cromosoma 23 del bovino.....	20

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Patrones de restricción de las enzimas RsaI, BstYI y HaeIII en el gen BoLA-DRB3.2*	65
Anexo 2. Determinación de los alelos del gen BoLA-DRB3.2* mediante PCR-RFLP	66
Anexo 3. Esquema ilustrativo para realizar la selección de animales sanos	67
Anexo 4. Esquema ilustrativo la selección de animales para mejorar la calidad de la leche	67
Anexo 5. Esquema ilustrativo para la selección de los animales que poseen alelos relacionados con calidad de la leche, respuesta inmune (BoLA)	68

Corrales, A A. 2011. Propuesta de mejoramiento en bovinos para la sanidad animal y aumentar la calidad de la leche utilizando marcadores moleculares. Tesis Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional De Agricultura. Catacamas, Honduras.

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en La Universidad Nacional de Colombia sede Palmira con el grupo de investigación recursos zoogenéticos y el programa de investigación en diversidad biológica, teniendo como objetivo elaborar una propuesta de mejoramiento asistido por marcadores moleculares para mejorar la sanidad animal y la calidad de la leche en bovinos. La investigación consistió en describir y conocer las técnicas moleculares utilizadas para la identificación de la Leucosis Bovina, Diarrea Viral Bovina, el complejo mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA), y k-caseína asociada con la calidad de la leche. Utilizando como base estas técnicas moleculares se propone realizar cada uno de los análisis descritos a todos los animales de un hato específico para identificar y seleccionar de todos los animales a los que están sanos y libres de las enfermedades mencionadas; habiendo realizado esto se procede a una segunda selección en la que se incluyen los animales que presentan los alelos deseados respecto a K- caseína para calidad de la leche y el gen Bol-A relacionado con resistencia a leucosis bovina, estos animales serán los utilizados al momento de hacer los cruces en el programa de mejoramiento genético bovino en la zona de influencia de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

Palabras claves: Diarrea viral Bovina, Leucosis, BoLA y k-caseína.

I INTRODUCCIÓN

El estudio de las razas de ganado bovino lechero reviste importancia por el hecho de que en su abundante variedad, ofrecen alternativas cada una de ellas para diversos modelos de unidades ganaderas dada la capacidad específica de adaptación de estos diferentes grupos genéticos (Uffo *et al.* 2006).

Los avances producidos acerca del estudio de la importancia de algunos genes sobre caracteres productivos, permite en este momento priorizar lo que podríamos llamar “caracteres cualitativos” relacionados especialmente con la calidad. Por otra parte, determinados marcadores se consideran herramientas fundamentales para conocer genes de interés económico como los denominados QTLs de aplicación directa en los programas de mejora a través de la Selección asistida por Marcadores (Uffo *et al.* 2006).

Las proteínas de la leche han sido muy investigadas en países del continente Americano, por su gran potencial de uso en este tipo de Selección Asistida por Marcadores, así como para la caracterización y diferenciación de poblaciones (Uffo *et al.* 2006).

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 ocasionar linfocitosis persistente (LP) en un 30 % de los animales portadores del virus. La entidad clínica se denomina Leucosis Bovina Enzootica (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 linfosarcomas (LS) (0,1 – 5 %) (González *et al.* 2001).

Numerosos trabajos de investigación reportan el uso de marcadores moleculares para el conocimiento del polimorfismo de genes relacionados con calidad de la leche y a enfermedades. La genotificación de esos genes en el ganado bovino a través de técnicas moleculares con ADN, constituye una herramienta valiosa en programas de mejora genética bovina. Por ello, el fin de esta investigación es elaborar una propuesta de mejoramiento para la sanidad animal y para aumentar la calidad de la leche utilizando como base los marcadores moleculares, que pueda implementarse en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, para dar asistencia a ganaderos colombianos.

II OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Elaborar una propuesta asistida por marcadores moleculares para mejorar la sanidad animal y la calidad de la leche en bovinos.

2.2 ESPECIFICOS

Determinar el enfoque y las técnicas laboratoriales útiles para asistir un programa genético.

Identificar y proponer las técnicas y protocolos moleculares para el mejoramiento sanitario.

Identificar y proponer las técnicas y protocolos moleculares a implementar en el mejoramiento de la calidad de la leche.

III REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Las Proteínas de la Leche

3.1.1 K-Caseína (κ -CN)

Las caseínas representan el 80 % de la proteína de la leche en los bovinos y otras especies productoras de leche para consumo. El gen de κ -CN ha sido extensamente estudiado en bovinos por su papel en la estabilización de las caseínas, su interacción con β -LG y por su efecto positivo desde el punto de vista del procesamiento de la leche, principalmente por la determinación de la estabilidad física de algunos productos lácteos durante el tratamiento térmico y concentración sobre todo en las primeras etapas en la fabricación de queso. Los reportes indican que la proporción de κ -CN es inversamente proporcional al tamaño de las micelas, además la κ -CN es el sustrato específico de la quimosina (cuajo) durante la primera fase de coagulación (Bleck y Bremel citados por Roselo 2009).

Las variantes A y B de κ -CN son las más comunes y están presentes en todas las razas con frecuencias variables. La estructura primaria de la κ -CN posee 169 aminoácidos. Las dos formas comunes, κ -CN A y κ -CN B difieren en los codones 136 y 138. La variante κ -CN B ha sido favorecida en programas de mejoramiento por su alta asociación con el contenido de proteína en la leche y el efecto positivo sobre las propiedades de coagulación y producción de queso, comparada con κ -CN A; la frecuencia del alelo κ -CN B, en diversas razas bovinas fluctúa entre 0.15 a 0.81 (Bleck y Bremel citados por Roselo 2009).

La leche posee sobre las otras caseínas, un poder estabilizante frente al calcio. Tiene el papel de “coloide protector”; permite la formación de las micelas estables en presencia de

calcio y así, es responsable de que la leche sea líquida. La κ -CN contiene dos restos de cisteína que pueden formar enlaces disulfuros, además contiene glúcidos (Alais 2005).

3.2 El polimorfismo genético de las proteínas de la leche

Según Puhán y Jakob (1993) el estudio del polimorfismo genético de las proteínas permite obtener nuevas explicaciones en las variaciones de las propiedades de la leche de vacas individuales. Las variantes genéticas difieren una de la otra por solamente unas pocas sustituciones de aminoácidos. La existencia de estas variantes para una misma proteína, dentro de una misma población se conoce como polimorfismo (Lehninger y Nelson 2005).

Las variantes genéticas se indican por letras como A, B, C, D, pudiendo existir individuos homocigotos y heterocigotos, los que pueden presentar una variante AA, BB o una mezcla de ellas es decir AB, AC, BC (Alais 2005).

Las variantes genéticas no aparecen aleatoriamente ni con igual frecuencia, aun cuando algunas son variantes universales, otras son exclusivas de ciertas razas (González 2005).

La variante A κ -CN difiere de la B por sustitución de la treonina por isoleucina en la posición 136 y en ácido aspártico por alanina en la posición 148. La variante A de la β -Lg difiere de la B en que la posición 64 que corresponde al ácido aspártico es sustituido por glicina y la valina por alanina en la posición 118. La identificación del polimorfismo de la proteína de la leche ha sido obtenida mayormente por electroforesis de isoenfoque en geles de almidón, de poliacrilamida o geles de agarosa. Las variantes genéticas de las proteínas lácteas tienen importantes efectos en la composición de la leche y sus derivados (Grosclaude 1997).

En la Tabla 1 se pueden observar las frecuencias génicas más comunes (A y B) de la κ -CN y β -Lg en distintas razas.

Tabla 1. Frecuencia génica de la variante A y B de κ -CN y β -Lg.

Raza	Frecuencia génica			
	κ -CN		β -Lg	
	A	B	A	B
Frison (US)	0,850 ¹	0,150 ¹	0,500 ¹	0,500 ¹
Holstein-Friesian (US) ²	0,750 ²	0,250 ²	-	-
Friesian (NZ) ³	0,826 ³	0,174 ³	0,487 ³	0,513 ³
Holstein (USA)	0,890 ⁴	0,110 ⁴	0,500 ²	0,500 ²
Frisón negro chileno ⁴	0,820	0,180	-	-

Fuente: ¹ Aschaffenburg citado por Leiva 2005.

Winkelman y Wickman (1997) estudiaron las variantes genéticas de las proteínas lácteas en ganado lechero Neozelandés y determinaron que la variante A de κ -CN predomina sobre el alelo B, y este es encontrado con mayor frecuencia en la raza Friesian. Además, encontraron que la variante B de la β -Lg predominaba sobre la variante A, presentándose con mayor frecuencia en la raza Ayrshire. Barany et al. (1997) trabajaron con ganado lechero húngaro y reportaron que existía predominancia de la variante A para κ -CN y la variante B para β -Lg en la mayoría de las razas estudiadas. La excepción fue la raza Friesian en la que se encontró un ligero predominio de la variante B de κ -CN.

3.3 Polimorfismo genético y contenido de proteínas de la leche.

La leche de vacas con κ -CN fenotipo BB, tienen 0,07 % y 0,10 % más de proteína y caseína respectivamente, que leche con fenotipo AA, además el número de caseína también se ve favorecido por este fenotipo. En estudios de 174 vacas Fleckvieh españolas, se encontró que la leche de fenotipo AB para κ -CN tiene un contenido más alto de proteína que leches con fenotipo AA (Amigo *et al.* 2001 citado por Leiva 2005).

Jakob (1994), señala que las mejores propiedades de coagulación en leche con κ -CN BB se deben principalmente a un alto contenido de κ -CN y en general de todas las caseínas. Ramos y Amigo (1996), asocia a la variante B de κ -CN con un mayor contenido de

proteínas. Van den Berg y Reichardt citados por NG-Kwai Hang (1997), señalan que contenidos más elevados de caseína se encuentran en leches de vacas con β -Lg BB (Leiva 2005).

Según Perez et al. (1998) la combinación de las variantes A de κ -CN y β -Lg mejora la producción de leche, mientras que la variante B de las mismas proteínas sería favorable para el contenido de caseínas, propiedades de coagulación y rendimientos en quesos. Autores como Delacroix et al. (1993) y Mariani et al. (1995) determinaron contenidos más altos de caseínas en leches provenientes de vacas con fenotipo BB de κ -CN y β -Lg. La combinación de la variante B de las proteínas κ -CN y β -Lg mejoran el contenido de caseína de la leche, las propiedades de coagulación y el rendimiento en la elaboración de queso (Van Eenennaam y Medrano 2005).

En la tabla 2 se presentan valores promedios de proteína, caseína y N° de caseína de los fenotipos AA, AB y BB de κ -CN y β -Lg en vacas Holstein- Friesian.

Tabla 2. Contenido de proteína total, caseína y N° de caseína para distintos fenotipos de κ -CN y β -Lg.

Fenotipo	% Proteína total		% Caseína		N° Caseína	
	κ -CN ¹	β -Lg ²	κ -CN ¹	β -Lg ²	κ -CN ¹	β -Lg ²
AA	3,37	3,41	2,65	2,66	78,91	77,95
AB	3,37	3,41	2,67	2,71	79,32	79,46
BB	3,44	3,37	2,75	2,72	80,06	80,86

FUENTE: (Ng Kwai Hang y Jakob 2005).

En esta tabla se observa que la presencia del fenotipo BB en ambas Proteínas (κ -CN y β -Lg) indica un aumento en el porcentaje de caseína y en el N° de caseína (Ng Kwai Hang y Jakob citado por Leiva 2005).

3.4 PCR

PCR son las siglas en ingles de Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria Thermus aquaticus que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: taq polimerasa.

Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar –donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleotidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa). Esta técnica tan ingeniosa tiene muchísimas aplicaciones distintas y se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular; sus aplicaciones van desde la genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense (Asuar 2003).

3.5 Leucosis Bovina

Definición

La definición primaria de Leucosis se refiere a una proliferación maligna del tejido linfoide o productor de leucocitos. La Leucosis Enzootica Bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, predominando mayoritariamente en los rodeos lecheros de distintas regiones del globo (Gatti 2007).

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 22 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).

Etiología

El virus de la leucemia bovina pertenece a la familia retroviridae, es un retrovirus y como tal posee una reverso-transcriptasa responsable de la síntesis de una copia de ADN a partir de ARN viral. El ADN así formado (provirus) puede conservarse en el núcleo de ciertas células del hospedador y esta propiedad original es la causa de las características particulares de las diferentes infecciones debidas a retrovirus (Elpidio 2005).

Las infecciones por retrovirus son persistentes, se prolongan durante toda la vida del organismo hospedador y corresponden a la presencia de “información” de origen viral integrada en las células del mismo. Bajo la forma integrada del agente patógeno (retrovirus) está al abrigo de las defensas inmunitarias de su hospedador. Los retrovirus se presentan en los organismos infectados bajo la forma proviral mucho más que bajo la forma de viriones completos, circulantes en los líquidos del organismo. Las células “B” infectadas con VLB, expresan citoquinas mRNA específicas “in vivo” (Elpidio 2005).

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).

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 anormalidades en el cariotipo como: aneuploidias con cromosomas adicionales, son pruebas claras del carácter neoplásico de estas células. Las anormalidades 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).

Lesiones

Se cree que es constante la localización de los tumores en los ganglios linfáticos, siendo los ganglios iliacos los más comúnmente afectados, luego los torácicos, mesentéricos y los superficiales son los menos frecuentemente afectados (Gatti 2007).

La consistencia puede variar de blandos edematosos a turgentes firmes y friables. Al corte se pierden las estructuras anatómicas por la infiltración, de color blanco gris o blanco amarillento. La medula ósea se puede encontrar infiltrada, aunque no todos los veterinarios tienen de rutina la examinación de huesos en la necropsia. Aquí se puede observar la sustitución de típico color rojo de medula por un tejido de color blanco o gris. La afectación de medula ósea implica la presencia de células tumorales en sangre. El abomaso puede presentar infiltración de sus paredes con un engrosamiento de las mismas y hasta se pueden ver úlceras (Gatti 2007).

El bazo presenta un aumento moderado de tamaño o esplenomegalia tumoral, con nódulos blanquecinos distribuidos por el parénquima. El corazón es bastante común que se vea afectado, con nódulos de tamaño variado, áreas infiltrativas de color blanquecino de forma difusa y límites no definidos en miocardio. El útero se afecta también con relativa alta frecuencia, con infiltración y engrosamiento de sus paredes, pero las estructuras fetales rara vez se ven afectadas (Gatti 2007).

En los riñones se ven lesiones infiltrativas con hemorragias visibles, nódulos y atrofia del parénquima renal. La vejiga puede presentar la pared engrosada y la mucosa ulcerada dada la infiltración tumoral. El tejido retro ocular también se ve afectado comúnmente y provoca una protrusión del globo ocular o Exoftalmia. Puede llegar a verse infiltración también en cornea o cámara anterior del ojo (Gatti 2007).

Transmisión

El contagio puede ser horizontal (de animal a animal) o vertical (de madre a hijo). Los animales portadores asintomáticos son las grandes fuentes de contagio en los rodeos, siendo ellos, en la forma horizontal, el contagio más importante y la que produce mayor número de nuevos infectados. Esta transmisión se da por traspaso de glóbulos blancos (linfocitos) infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano. En las secreciones y fluidos biológicos como: leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen y orina se pueden llegar a encontrar linfocitos infectados transformando a estos fluidos en una fuente de contagio. No obstante la mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran obviamente en la sangre, por lo tanto cualquier medida de manejo o practica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, castración, descorne, aplicación de inyectables, cirugías, palpación rectal, tatuaje, etc. que se practican sin tomar las medidas higiénicas correspondientes son una importante forma de diseminación de la enfermedad (iatrogénica). Los artrópodos hematófagos como tábanos, moscas podrían ser otra vía de transmisión (Gatti 2007).

En los rodeos con gran número de animales infectados y alta carga de animales por superficie se ve muy favorecida la transmisión horizontal por que se acentúa el contacto físico entre animales y la transmisión del virus. Por otro lado, la transmisión vertical es de notoria menor importancia ya que menos del 10% de los animales nacidos de madres portadoras están infectados por el virus (Gatti 2007).

Diagnóstico

El diagnóstico de los animales con Linfosarcoma es relativamente fácil para los Veterinarios clínicos, pero el diagnostico de los animales con Linfocitosis Persistente y de aquellos infectados asintomático, se requiere de pruebas de laboratorio. Las pruebas utilizadas son tanto de detección de anticuerpos (IDGA y ELISA) o detección del virus PCR. La inmuno difusión en gel agar (IDGA), tiene las limitaciones que solo detecta

anticuerpos después de varias semanas después de la infección (como mínimo 6 semanas), No puede ser utilizada próxima al parto, si es usada antes de los 6 meses de edad puede revelar anticuerpos que son maternos, o sea que no discrimina anticuerpos maternos de los propios y se requiere de 48 para su lectura.

El test de ELISA tiene similares limitantes en cuanto al uso en terneros, pero con la ventaja que detecta anticuerpos antes que el IDGA. Se puede leer los resultados 24 hrs después de realizada y es más sencilla para procesar muchas muestras en forma automatizada. La prueba de PCR es la única que evidencia la presencia del virus directamente. Esto lo realiza porque la enzima polimerasa actúa con el ARN viral como objetivo y de esta forma evidencia el virus antes que exista presencia de anticuerpos.

Es una prueba costosa y un tanto más compleja. Pruebas comparadas entre estos test de diagnóstico hablan de que el PCR más allá de su costo y complejidad muestra algunas ventajas sobre ELISA y IDGA. El PCR en sangre detecta unos 25 % más animales que el IDGA. (Felmer y col 2006). Además presenta la ventaja de que se puede utilizar en terneros infectados que reciben calostro de vacas seropositivas sin dar resultados falsos, se pueden determinar infecciones recientes y puede ser utilizada en animales inmunotolerantes que no desarrollan respuesta inmune al virus (Gatti 2007).

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en Colombia

Según Hernández (2010) en 330 muestras de ADN de ocho razas bovinas criollas, dos razas sintéticas colombianas y dos controles, 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 los 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 (Hernández 2010)

3.6 Diarrea Viral Bovina (DVB)

Definición

Según Jensen y Mackey (1973), la DVB es una enfermedad aguda, sub aguda o poco manifiesta, contagiosa, que se caracteriza por fiebre y diarrea, y el examen anatomopatológico por erosiones de la boca, esófago, estómagos anteriores, abomaso e intestinos. Es causada por un virus. La DVB es una enfermedad de distribución mundial y endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. Es responsable de ocasionar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones, siendo los trastornos reproductivos los de mayor impacto económico. Las estrategias de erradicación dependen de la situación epidemiológica regional; básicamente consisten en la identificación y eliminación de bovinos persistentemente infectados, principal fuente de infección y reservorio del virus (Lértora 2003).

Etiología

El virus de la diarrea viral bovina pertenece al género Pestivirus de la familia Flaviviridae (Donis 1995). Son virus envueltos, esféricos y miden 40 a 60 nm de diámetro. Se componen de una cadena simple de ARN compactado por una cápside proteica, rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella (Nettleton y Entrican 1995).

Síntomas

Cuando una hembra preñada se infecta con DVB puede ocurrir aborto, parto de terneros con alteraciones congénitas (ceguera, defectos en piel, problemas de equilibrio y locomoción, etc.) o nacimiento de terneros de aspecto "normal" pero portadores de la infección. Estos animales persistentemente infectados (PI) con el virus son susceptibles de padecer enfermedad de las mucosas si, en algún momento de sus vidas, se infectan nuevamente con una cepa virulenta de DVB (Odeón 2006).

El estado de portador persistente también implica que las secreciones (oculares, nasales, saliva, semen, etc.) siempre están contaminadas con virus resultando dichos animales fuente de contagio y diseminación de la infección. Se estima que del 1 al 3 % de los bovinos de un establecimiento ganadero con DVB presentan tal condición. Asimismo, si el animal portador PI es una hembra, ésta puede contagiar a su feto dando una cría infectada y cerrando el ciclo de la enfermedad (Odeón 2006).

Clasificación

La clasificación del virus DVB es difícil, debido a su variabilidad genética y antigénica y a su estrecha relación con otros miembros del género Pestivirus (virus de la peste porcina clásica y virus de la enfermedad de la frontera del ovino). Los hospedadores en que eran aislados los Pestivirus fueron las bases iniciales para su subdivisión. Así, los Pestivirus que

eran aislados del cerdo, ovino y bovino se los clasificaba como virus de la peste porcina clásica, virus de la enfermedad de la frontera y vDVB, respectivamente. Sin embargo, este criterio de clasificación es poco fiable debido a que los Pestivirus cruzan fácilmente la barrera de especie (Nettleton *et al.* 1995, Paton 1995).

Según sus efectos en los cultivos celulares, los Pestivirus se dividen en biotipos citopáticos (CP) y no citopáticos (NCP). Los virus CP ocasionan vacuolización y muerte celular, los virus NCP no ocasionan cambios visibles en el cultivo celular y la célula infectada parece normal. Esto no implica que los biotipos NCP sean no patogénicos. Por el contrario, es el biotipo predominante en la naturaleza, aislado de la mayoría de las formas clínicas y el único capaz de originar infección persistente. El biotipo CP se aísla únicamente de animales con enfermedad mucosa y se originan por mutación a partir del biotipo NCP; ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción de fragmentos de ARN celular o duplicación y reordenamiento del ARN viral (Meyers 2005).

Transmisión

La diarrea viral bovina se transmite por dos vías, en forma vertical y horizontal. Transmisión vertical, la infección ocurre en vacas susceptibles que se infectan durante la preñez, pasando el virus de una generación a otra; en muchos casos la transmisión vertical es precedida por una horizontal a la madre, y durante esta infección aguda de la madre, el virus atraviesa la placenta e infecta el feto. Los animales recién nacidos que no hayan recibido leche materna, y resulten con importantes concentraciones de inmuno-globulinas son indicativos de estímulo antigénico intrauterino. Además, puede ocurrir transmisión vertical, después de la transferencia de embriones, si la receptora o el donante son persistentemente infectados (Bracamonte 2006).

La transmisión horizontal se realiza por contacto directo de los animales susceptibles con animales persistentemente infectados, es la forma más importante de transmisión en condiciones naturales y la más eficiente es el contacto directo nariz-nariz. En los toros

persistentemente infectados, con infección aguda, el semen también resulta una fuente importante de transmisión (Bracamonte 2006).

Diagnóstico

La presencia del virus de BVD en un rodeo, se detecta en un muestreo de los sueros de los animales sospechosos por técnicas de medición de Anticuerpos específicos por técnica de seroneutralización, ELISA y FITC. La seroconversión (aumento significativo del título de Anticuerpos entre dos muestra consecutivas) cuando hay sospechas clínicas de esta enfermedad pueden confirmar su actividad y responsabilidad del caso. La confirmación definitiva del diagnóstico del caso se realiza por aislamiento del virus en cultivo celular (MDBK) específico, en animales afectados (Brownlie 1997.).

3.7 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).

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⁺ (Takeshima y Aida 2006, Tamarin 1996).

En ganado, la región clase I contiene por lo menos 10 genes y pseudogenes (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).

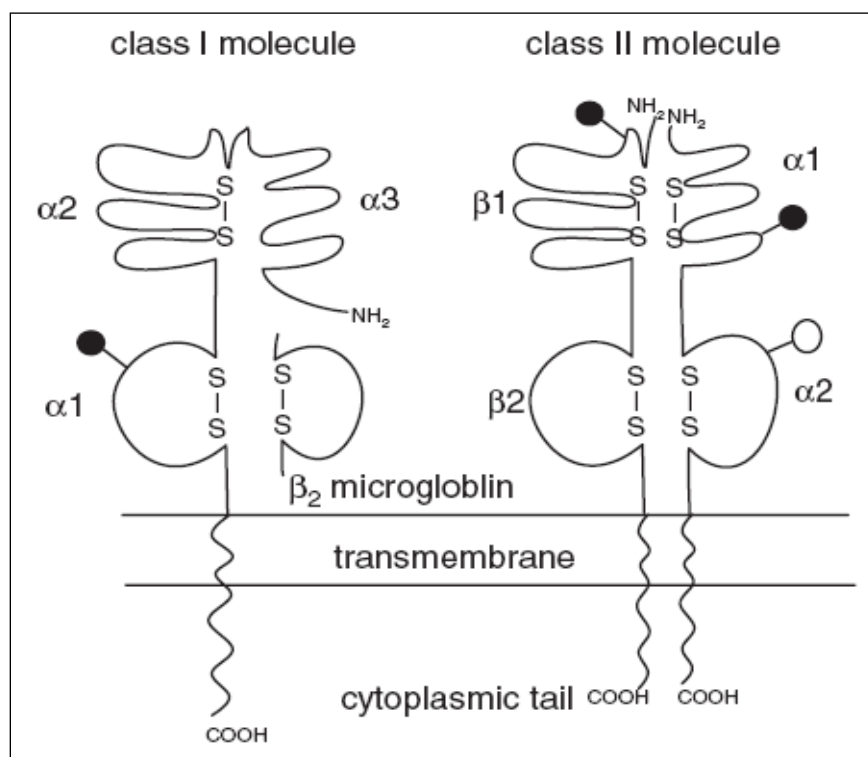


Figura 1. Estructura molecular del BoLA I y II. Los círculos negros representan sitios de unión glicosídica. S-S indican enlaces disulfuro. Las cadenas clase I son codificadas por genes clase I. El círculo en blanco representa sitios de unión glicosídica conservada entre humanos y bovinos. Las moléculas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

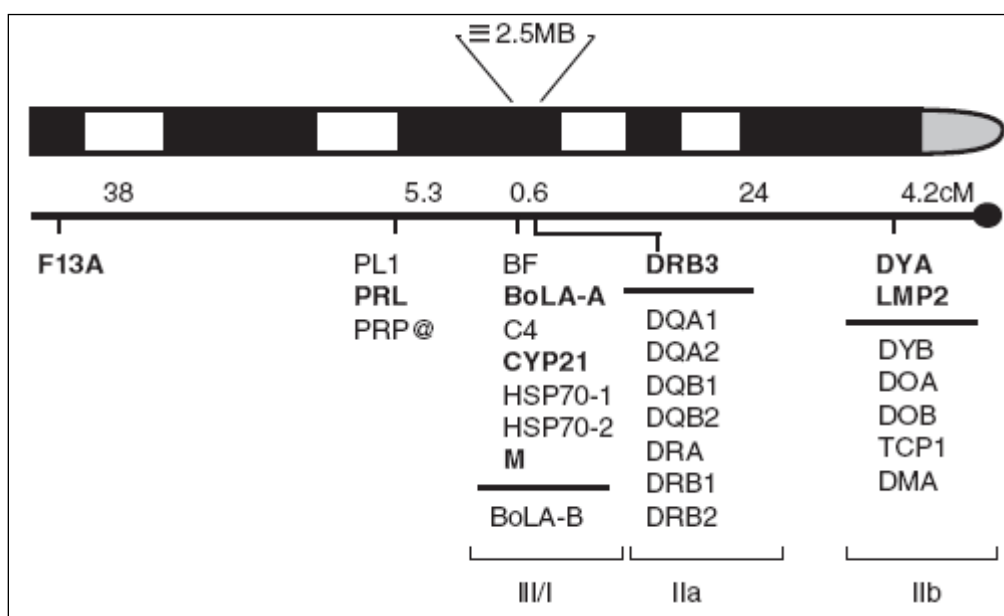


Figura 2. Mapa genético del cromosoma 23 del bovino (Takeshima y Aida 2006).

En bovinos, solo un alelo del BoLA-DRA ha sido identificado basado en datos de secuencia. El BoLA-DRB1 es un seudogen 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 y Stone 1991). El gen BoLA-DRB3 es altamente polimórfico puesto que Takeshima y 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 y 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 α y β 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 y Aida 2006).

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

3.8 GEN BOLA-DRB3

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 mayor valor de h_e para el ganado Brahman y menor para Jersey con 0.81 y 0.26 respectivamente.

Tabla 3. Reportes de la variabilidad del gen DRB3.2 en ganados del mundo.

Ganado	Tamaño de muestra	Número de alelos	Heterocigidad 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 et al. 2004b Giovambattista <i>et al.</i> 1996
Criollo Argentino	194	21	0.87	DRB3.2*5, *15, *18, *20, *24, *27	Juliarena <i>et al.</i> 2008
Criollo Argentino	230	26		DRB3.2*24, *16, *22, *11, *8, *23	Panei <i>et al.</i> 2009
Holando Argentino	81	17	0.89	DRB3.2*10, *8, *24 *15	Kelly <i>et al.</i> 2003
Criollo Uruguayo	51	22	0.91	DRB3.2*15, *3, *16 *18	
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 Tahmoorespur <i>et al.</i> 2007
Sistani Irani	100	19		DRB3.2*8, *34, *15, *44	Sadeghi <i>et al.</i> 2008
Sistani Irani	150	23		DRB3.2*34, *8, *15, *21, *11	Mohammadi <i>et al.</i> 2009
Sistani Irani	65	32		DRB3.2*8, *10, *20, *34	Behl et al. 2007
Kankrej	50	21		DRB3.2*34, *15, *6, *20, *37, *46	
Aberdeen Angus	65	16	0.87	DRB3.2*36, *8, *4, *15, *22, *20, *10	Golijow 1996 Do Nascimento <i>et al.</i> 2006
Gyr Brasileiro	1058	37		DRB3.2*19, *27, *16, *8, *35	Mota <i>et al.</i> 2002
Gyr Brasileiro	28			DRB3.2*6, *35, *5, *31	Machado <i>et al.</i> 2005
Gyr	490	27	ND	DRB3.2*20, *27, *16, *29, *35	Martinez <i>et al.</i> 2006
Gyr	344	20		DRB3.2*27, *16, *3, *23, *20	
Jersey	172	24	0.895	DRB3.2*8, *10, *15, *17, *21, *36, *ibe	Gilliespie <i>et al.</i> 1999

Continuación Tabla 3. Reportes de la variabilidad del gen DRB3.2 en ganados del mundo.

Ganado	Tamaño de muestra	Número de alelos	Heterocigocidad esperada	Alelos con frecuencia mayor a 0.05	Referencias
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			DRB3.2*23, *22, *24, *16, *33, * 8	Zambrano <i>et al.</i> 2009a
Cruce		27			
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
				DRB3.2*22, *24, *11, *16, *18, *23, *8, *27	Udina <i>et al.</i> 1999
Black Pied	127	21	0.904		
Norwegian Red	523	27		DRB3.2*7, *8, *26, *28, *24	Kulberg <i>et al.</i> 2007
					Takeshima <i>et al.</i> 2002
Shorthorn Japonés	352	21		DRB3.2*8, *9, *21, *30, *33, *26, *24	
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

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 y 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 β) 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 β) están asociados con resistencia al desarrollo de tumores (Aida 2001). Otros estudios relacionados con rasgos de producción y enfermedades se consignan en la Tabla 4.

Tabla 4. Asociación de los alelos BoLA-DRB3.2* con enfermedades y características productivas en diferentes ganados.

Ganado	Tamaño de muestra	Enfermedad/carácter	Alelos Asociados positivamente (resistencia, aumento)	Alelos Asociados negativamente (susceptibilidad, disminución)	Referencias
Criollo colombiano	300	Presencia del virus	DRB3.2*21, *24, *37	DRB3.2*6, *42	Hernández, 2010
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
Holstein Argentino	230	Carga proviral	DRB3.2*11, *12	DRB3.2*16	Juliarena <i>et al.</i> 2008
BON Colombiano	140	Brucelosis	DRB3.2*23, *26, *31		Martínez <i>et al.</i> 2005
Gyr	344	Resistencia a Garrapatas	DRB3.2*8, *16, *20, *27		Martínez <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	Do
Gyr Brasileiro	1058	Grasa en leche		DRB3.2*54	Nacimiento
		Mastitis (SCC)	DRB3.2*3, *31		<i>et al.</i> 2006

		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

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización

El trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular junto con el grupo de recursos zoogenéticos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede ubicada en la ciudad de Palmira, Calle 32 No. 12-00 vía Candelaria, Palmira Valle del Cauca, Sur América.

4.3 Materiales y equipo

Computadora, lápiz, calculadora, grabadora digital, agenda.

4.2 Metodología

El trabajo consistió en elaborar una propuesta a nivel laboratorial que permitiera brindar a productores ganaderos el apoyo para la mejora genética asistida por marcadores moleculares, para características relacionadas con calidad de leche, además poner a disposición las técnicas moleculares para el manejo sanitario del hato ganadero.

4.4 Método

En el diseño de la propuesta de mejoramiento genético y manejo sanitario se realizaron entrevistas a expertos del área de ciencia animal, una amplia revisión bibliográfica respecto al tema y participación en la aplicación de los protocolos existentes.

Se participó en los procesos de extracción de ADN y genotipificación de bovinos para tener un criterio amplio sobre las técnicas moleculares.

4.4.1 consideraciones para la propuesta

Se procuró generar los elementos con que contaría la propuesta con algunas entrevistas de opiniones abiertas y revisiones bibliográficas; se plantearon las siguientes interrogantes:

- ¿Cuál es el mejor animal?
- ¿Cómo se mejora una población animal?
- ¿Cuál es la importancia de utilizar los marcadores moleculares?
- ¿Qué elementos debe considerar una propuesta de mejoramiento?
- ¿Cuáles son los pasos que debe contemplar una propuesta?
- ¿Dentro de que línea de investigación o programa se ubica la propuesta?
- ¿Qué técnicas moleculares existen para el mejoramiento asistido por marcadores?

En la definición del contenido de la propuesta laboratorial se realizó una revisión de literatura de los principales protocolos que existen para asistir el mejoramiento genético en calidad de la leche y para el manejo sanitario.

4.5 Componentes de la propuesta

Definición del método de recolección de muestras

Se elaboró una tabla para la recolección de las muestras que contiene dos elementos el primero incluye datos de la finca como ser nombre del dueño o de la finca, el lugar y la fecha, el segundo contempla el número o el nombre del animal, raza, edad, sexo, y algunas observaciones importantes.

Técnicas moleculares. Paso a paso se describen todos los protocolos en forma de guía laboratorial desde toma de muestras, análisis de laboratorio e interpretación de resultados.

Presentación de resultados

En esta sección se elaboró un formato para la presentación de resultados a los ganaderos.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira el grupo de recursos genéticos y el programa de investigación en diversidad biológica han propuesto un proyecto de mejoramiento que consista en identificar con técnicas moleculares animales enfermos que estén provocando pérdidas, animales sanos y con genes de interés en leche.

5.1 El problema de investigación

Hace mucho tiempo se ha venido haciendo énfasis en la alimentación como primer punto para tener una buena producción de los animales bovinos; sin embargo es de importancia trabajar en la sanidad y en el mejoramiento genético con los genes asociados a calidad de la leche para la cría de animales su aprovechamiento en la producción animal.

Esta propuesta está enfocada hacia el mejoramiento sanitario, genético y productivo de los bovinos en un hato ganadero, es necesario pensar en la importancia de una buena genética y optima sanidad animal para determinar así una buena producción de leche o de carne según sea la finalidad de la finca, en este caso es la calidad de la leche.

En las diferentes fincas ganaderas de Colombia se reporta una alta presencia de VLB (83%) y se presume que no desarrollan los síntomas ocasionados por la enfermedad (Leucosis bovina). Hernández (2010), cuantifico que en el ganado criollo de Colombia (HV) hay un estimado de 31.3%, siendo mayor en los ganados de la región Andina con un 38.2% 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 y se determinó que la presencia del virus depende de la raza.

Según Sorensen (1979), en Colombia las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad de leucosis no han sido cuantificadas, pero la industria ganadera de Norte América estima en 7 millones de dólares por el decomiso de animales con algún tipo de tumor y de 525 millones de dólares por pérdidas en la disminución de la producción de leche (Ott *et al.* 2003).

Según Rhodes *et al.* (2003), en un rebaño con 50% de prevalencia de la infección (leucosis), los costos por tratamiento de la enfermedad se estimaron en 412 dólares/caso/año por la eliminación prematura de animales y en 6,406 dólares/caso/año por tratamiento subclínico de la enfermedad. Encuestas serológicas han confirmado la existencia de la infección por el virus de BVD en seis países (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Perú y Uruguay) con una tasa de incidencia oscilando entre 37 y 77% del ganado de las áreas encuestadas. Diarrea en terneros entre 3 y 18 meses de edad, frecuentemente asociada a erosiones de las mucosas, han sido el síndrome más comúnmente observado.

En algunos casos, un involucramiento del tracto respiratorio superior ha sido reportado. En un brote registrado en la Sabana de Bogotá en Colombia, deficiencias reproductivas asociadas a abortos o nacimientos de terneros débiles, constituyeron el síndrome clínico principal. El primer brote en Colombia ha sido diagnosticado en un grupo de terneras Friesian importadas de Holanda, que presentaron un cuadro de diarrea con alta tasa de mortalidad. El virus de BVD fue aislado por la primera vez en 1981 de una ternera muerta por complicaciones respiratorias y parasitismo (Rhodes *et al.* 2003).

En 1983 se hicieron numerosos reportes sobre problemas reproductivos en la región de la Sabana de Bogotá: abortos en diferentes etapas de la gestación, nacimiento de animales débiles y mamitis en las hembras. Un estudio serológico reveló que todas las vacas (100%) seronegativas para BVD antes del aborto, desarrollaron altos títulos ($>1:2048$) después del aborto. No han podido ser observadas otras causas, infecciosas o no infecciosas que

pudieran ser relacionadas con los episodios de aborto en la Sabana de Bogotá (Rhodes *et al.* 2003).

Así, se ha considerado la infección por el virus de BVD como la causa primaria de las deficiencias reproductivas observadas.

Es necesario que hayan alternativas que ayuden a mejorar las poblaciones bovinas evitando que enfermedades como la Leucosis, la diarrea viral bovina y otras, sigan afectando en grandes magnitudes las poblaciones ganaderas y para eso se ha elaborado la siguiente propuesta.

5.2 Opinión de expertos

Expertos entrevistados del área de ciencia animal de Colombia dicen lo siguiente:

- 1) Uno de los expertos en el área dice que el mejor animal es aquel que se adapta a las condiciones ambientales en las que se encuentra, en otras palabras que su potencial genético se expresa de manera óptima en el medio al que está expuesto (conversación personal con Cuetilla 2011).
- 2) Existen 2 elementos importantes para mejorar una población la selección y los cruces o montas, en este caso la selección se hace de los animales que se consideran son los mejores del hato y estos animales son los que se convierten en los futuros padres de las generaciones futuras (conversación personal con Álvarez 2011).
- 3) Los marcadores moleculares han sido una útil herramienta en la identificación de enfermedades, proteínas lácticas, proteínas de la carne, para valorar la genética de un hato, ya que con estas técnicas moleculares podemos ver la diversidad genética de un hato y así

tener una idea de hacia dónde queremos llevar la producción (conversación personal con Coronado 2011).

- 4) El fenotipo depende de: $F = G + A$; cuando se considera solo la alimentación se está incluyendo solo un elemento del efecto ambiental, al tener en cuenta la sanidad se considera otro elemento importante, al seleccionar animales con genes que mejoran la calidad se tiene mayor cubrimiento de los efectos que afectan al genotipo y se tiene la ventaja que se transmite a las generaciones futuras (conversación personal con Muñoz 2011).
- 5) Para que exista buena calidad de leche primero es necesario tener animales sanos por ejemplo la Leucosis bovina enfermedad que afecta principalmente ganado lechero y que no tiene en el país campaña oficial de control (conversaciones personales con Hernández 2011).

5.3 Técnicas moleculares de la propuesta de mejoramiento

Identificación del virus de Diarrea viral bovina

La presencia del virus de BVD en un rodeo, se detecta en un muestreo de los sueros de los animales sospechosos por técnicas de medición de Anticuerpos específicos por técnica de seroneutralización, ELISA y FITC. La seroconversión (aumento significativo del título de Anticuerpos entre dos muestra consecutivas) cuando hay sospechas clínicas de esta enfermedad pueden confirmar su actividad y responsabilidad del caso. La confirmación definitiva del diagnóstico del caso se realiza por aislamiento del virus en cultivo celular (MDBK) específico, en animales afectados (Brownlie 1997).

La identificación del virus de DVB consiste en realizar la extracción del RNA utilizando el Mini Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN) siguiendo los protocolos de manufactura,

procedimiento de extracción de ARN (Protocolo de giro), selección de los Cebadores, estandarización de la RT-PCR, electroforesis, análisis porcentual por Hato.

5.3.2 Identificación del virus de Leucosis bovina

La leucosis se refiere a una proliferación maligna del tejido linfoide o productor de leucocitos (Gatti, 2007). La forma tumoral o linfosarcoma aparece con más frecuencia en animales entre cinco y ocho años, esta forma de la enfermedad se desarrolla y evoluciona rápidamente hacia la muerte (Toma *et al.* 1990).

Las pruebas utilizadas son tanto de detección de anticuerpos (IDGA y ELISA) o detección del virus PCR. La inmuno difusión en gel agar (IDGA), tiene las limitaciones que solo detecta anticuerpos después de varias semanas después de la infección (como mínimo 6 semanas), No puede ser utilizada próxima al parto, si es usada antes de los 6 meses de edad puede revelar anticuerpos que son maternos, o sea que no discrimina anticuerpos maternos de los propios y se requiere de 48 para su lectura. La prueba de PCR es la única que evidencia la presencia del virus directamente. Esto lo realiza porque la enzima polimerasa actúa con el ARN viral como objetivo y de esta forma evidencia el virus antes que exista presencia de anticuerpos (Gatti 2007).

Es una prueba costosa y un tanto más compleja. Pruebas comparadas entre estos test de diagnóstico hablan de que el PCR más allá de su costo y complejidad muestra algunas ventajas sobre ELISA e IDGA. El PCR en sangre detecto unos 25 % más animales que el IDGA. (R. Felmer y col 2006). Además presenta la ventaja de que se puede utilizar en terneros infectados que reciben calostro de vacas seropositivas sin dar resultados falsos, se pueden determinar infecciones recientes y puede ser utilizada en animales inmunotolerantes que no desarrollan respuesta inmune al virus (Gatti 2007).

El análisis del virus consiste en realizar toma de muestras de sangre, extracción de ADN, amplificación, electroforesis, detección del Provirus de la Leucosis viral bovina.

5.3.3 Polimorfismos del gen BOLA-DRB3.2

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 y Aida 2006).

El análisis del gen consiste en realizar amplificación del gen DRB3, restricción, electroforesis.

Identificación de la proteína k-caseína

Se ha mencionado en la literatura que esta es una de las proteínas de la leche que más relevancia tiene en cuanto a la calidad, las caseínas representan el 80% de la proteína de la leche en los bovinos. El gen k-CN cumple un papel de estabilización de las caseínas, su interacción con B-LG y su efecto positivo desde el punto de vista del procesamiento de leche, principalmente por la determinación de la estabilidad física de algunos productos lácteos durante el tratamiento térmico y concentración sobre todo de las primeras etapas en la fabricación de queso (Roselo 2009).

Según Bleck y Bremel (2009), las variantes A y B de κ -CN son las más comunes y están presentes en todas las razas con frecuencias variables. La estructura primaria de la κ -CN posee 169 aminoácidos. Las dos formas comunes, κ -CN A y κ -CN B difieren en los codones 136 y 148. La variante κ -CN B ha sido favorecida en programas de mejoramiento por su alta asociación con el contenido de proteína en la leche y el efecto positivo sobre las propiedades de coagulación y producción de queso, comparada con κ -CN A; la frecuencia del alelo κ -CN B, en diversas razas bovinas fluctúa entre 0.15 a 0.81.

El análisis del gen para esta proteína consiste en realizar toma de muestras de sangre, extracción de ADN, amplificación del gen de interés de k-caseína mediante PCR y discriminación de las variantes alélicas SSCP o RFLP.

5.4. PROPUESTA PARA MEJORAR LA SANIDAD ANIMAL Y LA CALIDAD DE LA LECHE EN BOVINOS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES

Al considerar las opiniones de los expertos y trabajos de investigación existentes en el área de biología molecular y mejoramiento asistido por marcadores, una propuesta para mejorar la calidad de la leche y el manejo sanitario en los sistemas de producción ganadera de Colombia debería contener al menos los siguientes tópicos:

1 Objetivos específicos de la Propuesta

Identificar los animales y las fincas que presenten los genes de interés para el programa de mejoramiento

Obtención de las muestras de sangre.

Detallar el proceso de análisis para el manejo sanitario

Detallar el proceso de análisis para k-caseína.

Seleccionar y cruzar animales sanos y con buenas características genéticas.

2 Identificación a nivel de finca

El trabajo comienza con la identificación de las fincas a las que les serán aplicados los distintos análisis, se debe programar una visita previa a las fincas para pedir su colaboración y si están de acuerdo se debe tomar muestras de su ganado.

3 Recolección de muestras y envío al laboratorio

Se seleccionan animales en los cuales la extracción de la muestra de sangre se realiza mediante punción en la vena coccígea utilizando “vacutainer” de 5 ml con anticoagulante EDTA, que luego son puestos en hielo para su transporte al laboratorio donde se refrigera a 4 °C por 24 horas.

Tabla 5. Recepción de muestras

Dueño:				
Lugar:			Fecha:	
No. Animal	Raza	Edad	Sexo	Observaciones

4 Técnicas moleculares y protocolos para la obtención de los resultados.

PASO 1. Discriminación por problemas sanitarios. En esta etapa se realiza el examen de Diarrea Viral Bovina. Los animales cuyo diagnóstico sea positivo se descartan en el plan de mejoramiento y solo aquellos cuyo diagnóstico resulte negativo, serán sometidos a la prueba de Leucosis Bovina. De la misma manera, los animales con resultado positivo a Leucosis se eliminan del plan de mejoramiento; Aquellos con diagnóstico negativo continúan para su análisis de resistencia a enfermedades (BoLA).

4.1 Identificación del virus de Diarrea Viral Bovina

Procedimiento de extracción de ARN (Protocolo de giro)

1-Se pipetea 560 µl del buffer AVL preparado que contiene el RNA portador en un tubo de 1.5ml de la microcentrífuga.

Si el volumen de la muestra es más grande que 140µl, se aumenta la cantidad de buffer AVL-RNA portador proporcionalmente (por ejemplo, 280µl muestra requerirá ARN a 1120µl buffer AVL- RNA portador).

2-Se agrega 140µl de suero a él buffer AVL-ARN portador en el tubo de la microcentrífuga. Se mezcla usando vortex por 15 segundos.

Para asegurar una eficiente lisis, es esencial que la muestra esté completamente mezclada con el buffer AVL para producir una solución homogénea. También pueden usarse muestras congeladas que sólo se han descongelado una vez.

3-Se incuba a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 min.

La lisis de la partícula viral está completa después de la lisis por 10 min a temperatura ambiente. Largos tiempos de incubación no tienen el efecto en el rendimiento o calidad del ARN purificado. Agentes potencialmente infecciosos y RNasas son inactivados por el buffer AVL.

4-Brevemente se centrifuga el tubo para quitar las gotas dentro de la tapa.

5-Se agrega 560µl de etanol (96-100%) a la muestra, y se mezcla usando el vortex por 15s. Después de mezclar, brevemente se centrifuga el tubo para quitar las gotas de dentro de la tapa.

Sólo debe usarse el etanol pues otros alcoholes pueden producir rendimiento y pureza de ARN reducido. No se usa alcohol desnaturalizado que contiene otras sustancias como metanol o metiletilquetona. Si el volumen de la muestra es mayor que 140µl, se aumenta la cantidad de etanol proporcionalmente (por ejemplo, 280µl muestra requerirá 1120µl de etanol). Para asegurar el ataje eficaz, es esencial que la muestra esté completamente mezclada con el etanol para producir una solución homogénea.

6-Cuidadosamente se aplica 630 µl de la solución del paso 5 al QIAamp Mini column (en un tubo de colección de 2ml) sin mojar el margen. Se cierra la tapa, y se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Se pone el QIAamp Mini column en un tubo de colección de 2ml limpio, y se desecha el tubo que contiene el filtrado.

Se sierra cada columna del giro para evitar la contaminación cruzada durante la centrifugación. La centrifugación se realiza a 6000 x g (8000 rpm) para limitar el ruido de la microcentrífuga. La centrifugación a toda velocidad no afecta el rendimiento o pureza del ARN viral. Si la solución no ha atravesado la membrana completamente, se centrifuga de nuevo a una velocidad más alta hasta que toda la solución haya atravesado.

7-Cuidadosamente se abre la mini columna, y se repite el paso 6.

Si el volumen de la muestra es mayor que 140µl, se repite este paso hasta que todo el lisado haya estado cargado hacia la columna del giro.

8-Cuidadosamente se abre la mini columna y se agrega 500µl del buffer AW1. Se cierra la tapa, y se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Se puso QIAamp Mini column en un tubo de colección de 2ml limpio (proveído por el kit), y se desecha el tubo que contiene el

filtrado. No es necesario aumentar el volumen de buffer AW1 aun cuando el volumen de la muestra original es mayor que 140µl.

9-Cuidadosamente se abre la mini columna y se agrega 500µl de buffer AW2. Se cierra la tapa y centrifuga a toda velocidad (20,000 x g; 14,000 rpm) por 3 min.

10-Recomendado: poner la mini columna en un nuevo tubo de colección de 2ml (no proveído por el kit), y se desecha el tubo de colección viejo con el filtrado. Se centrifuga a toda velocidad por 1 min.

11-Se pone la mini columna en un tubo limpio de 1.5ml de la microcentrífuga (no proveído). Se desecha el tubo de colección viejo que contiene el filtrado. Cuidadosamente se abre la mini columna y se agrega 60µl de buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. Se cierra la tapa, e se incuba a temperatura ambiente por 1 min. Se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min.

Un solo eludido con 60µl de buffer AVE es suficiente para eludir el 90% del ARN viral del QIAamp Mini column. Realizando una elución doble que usa 2 x 40µl de buffer AVE aumentarán el rendimiento por encima del 10%. Eludidos con volúmenes de menos de 30µl llevará a reducir el rendimiento y no incrementará la concentración final del RNA en el eludido.

El ARN viral es estable por encima de un año cuando se almacena a -20°C a -70°C.

Selección de los Cebadores

Los cebadores, se diseñaron de acuerdo a la región conservada del genoma de VDVB, dentro de la región 5' UTR del genoma viral, ésta muestra la máxima homología compartida entre los genotipos de BVDV 1 y 2 (Trevor et al., 1999; Hamel et al. 1995, Weinstock et al. 2001, Ridpath et al. 1994, Burbano 2002). Estos cebadores amplifican un

fragmento aproximado de 290pb de la región 5'UTR no codificante de todos los pestivirus. Los cebadores son los siguientes:

Tabla 6. Cebadores para amplificar el fragmento 290 pb

DIRECCIÓN	SECUENCIA	INICIA-TERMINA
Forward	ATG CCC (A/T)TA GTA GGA CTA GCA	110-130
Reverse	CAA CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA G	378-402

Estandarización de la RT-PCR

Para obtener el cDNA, se procede a utilizar el kit OneStep RT-PCR de QIAGEN siguiendo los protocolos de manufactura. Utilizando los cebadores anteriormente descritos (concentración final 0.6µM). Las siguientes modificaciones son realizadas: se utiliza un volumen final de 25µl y no de 50 µl como recomienda el kit. Se usa un volumen de 5µl de muestra de ARN.

Antes de colocar las muestras en el termociclador, este es precalentado a 50°C. El programa del termociclador es el siguiente: Paso 1 (RT) 30 min a 50°C, paso 2 (activación HotStarTaq ADN polimerasa), 15 min a 95°C, tres pasos de ciclado: 45seg a 94°C; 45 seg a 50°C; 1 min a 72°C; en total son 35 ciclos y una extensión final por 10 min a 72°C.

Procedimiento del OneStep RT-PCR de Qiagen

1-Se descongela la plantilla de ARN, las soluciones de primer, dNTP Mix, buffer 5x de QIAGEN OneStep RT-PCR, y el agua libre de RNasa, y se colocan en hielo.

Es importante mezclar las soluciones completamente antes de usarlos para evitar las diferencias localizadas en la concentración de sal.

2-Preparar una mezcla maestra de acuerdo a la Tabla 6.

La mezcla maestra normalmente contiene todos los componentes necesarios para la RT-PCR excepto plantilla de ARN. Se prepara un volumen de mezcla principal un 10% mayor que el requerido para el número total de reacciones a realizar. Un control negativo (sin ARN plantilla) se incluye en cada experimento.

3-Se mezcla la mezcla principal hasta el fondo, y se prescinde de los volúmenes adecuados en los tubos de PCR.

Se mezcla suavemente, por ejemplo, pipetee la mezcla principal arriba y abajo varias veces.

Tabla 7. Componentes de la reacción de un paso RT-PCR

Componente	Volumen reacción	/	Volumen Total μ l	Concentración final
Mix Máster agua libre de RNasa (proveído)	5 μ l		35 μ l	-
5x buffer OneStep RT-PCR de QIAGEN	5 μ l		35 μ l	1x
dNTP Mix (que contiene 10 mM para cada dNTP)	1 μ l		7 μ l	400 μ M de cada dNTP
5X solución Q	5 μ l		35 μ l	1X
Primer A	1.5 μ l		10.5 μ l	0,6 μ M
Primer B	1.5 μ l		10.5 μ l	0,6 μ M
OneStep RT-PCR Enzima Mix	1 μ l		73 μ l	--
ARN PLANTILLA				
Plantilla de ARN, adicionada en el paso 4	5 μ l		5	1 pg - 2 μ g / reacción
volumen total	25 μ l			--

4-Añadir la plantilla de ARN ($\leq 2 \mu$ g/reacción) a los tubos de PCR individuales.

El kit OneStep RT-PCR puede utilizarse con el ARN total, el ARN mensajero, o ARN viral.

5-Cuando se utiliza un Termociclador con una tapa caliente, no se usa aceite mineral. Proceda directamente al paso 6. De lo contrario, se recubre con aproximadamente 50 μ l aceite mineral.

6-Programa del Termociclador de acuerdo con el programa descrito en la Tabla 8.

Tabla 8 describe un típico programa de Termociclador. El programa incluye medidas para tanto la transcripción reversa y PCR. El segmento de la amplificación por PCR debe comenzar con una etapa de calentamiento inicial a 95 °C durante 15 minutos para activar HotStarTaq ADN polimerasa. El máximo rendimiento y especificidad, las temperaturas y tiempos de ciclado puede perfeccionarse más allá para cada nuevo blanco y par de cebadores. Sin embargo, el protocolo da los resultados satisfactorios en la mayoría de los casos.

El programa de RT-PCR, mientras que los tubos de PCR se encuentran aún en el hielo. Se espera hasta que el Termociclador llegó a 50°C. A continuación, se colocan los tubos de PCR en el Termociclador.

Nota: Después de la amplificación, las muestras pueden ser almacenadas durante la noche a 2-8°C o para almacenamiento a largo plazo a -20°C.

Tabla 8. Condiciones del Termociclador

	Tiempo	Temperatura	Comentarios adicionales
La transcriptasa inversa:	30 min	50°C	Recomienda una reacción de transcripción inversa a temperatura de 50°C. Sin embargo, si no se obtienen resultados satisfactorios a 50°C, la temperatura de reacción puede aumentarse hasta 60 °C.
Paso inicial activación de PCR:	15 min	95°C	HotStarTaq ADN polimerasa es activada por este paso de calefacción. Omniscript y Sensiscript Transcriptasas inversas se inactivan y la plantilla de cDNA es desnaturalizada.
3 pasos de ciclado			
Desnaturalización:	45 seg	94°C	
Alineamiento:	1 min	60°C	Aproximadamente 5°C por debajo

Extensión:	1 min	72°C	de T _m de Primers. Para los productos de RT-PCR de 1.2 Kb, aumentar el tiempo de la extensión por 30-60 s.
Número de ciclos:	33		El número de ciclos depende de de la cantidad de ARN plantilla y la abundancia del blanco de transcripción.
Extensión final:	10 min	72°C	

5 Selección

Con los resultados de Diarrea Viral Bovina de cada animal tendremos una base según la tabla de datos la que incluirá la siguiente información:

Tabla 9. Resultados del análisis de Diarrea viral bovina.

No.	Raza	Sexo	Diarrea viral	Observaciones
100	Holstein			
101	Jersey			
102	Pardo			

Los resultados estarán expresados con un signo (+) si es positivo al virus correspondiente y un signo (-) si es negativo.

Para el llenado de la Tabla 9, se procede a determinar los animales sanos y enfermos de Diarrea Viral Bovina como se muestra en la figura del anexo 3; Una vez hecha esa selección, se procede a el segundo análisis, que como se mencionó anteriormente, solo se le aplicará a aquellos animales que estén sanos de DVB.

4.2 Detección del virus de la Leucosis Bovina

Extracción de ADN de los controles de PCR

Se utilizan controles positivos y negativos para las reacciones de PCR; el ADN se extrae a partir de muestras de suero sanguíneo suministrados por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). Se toman 0,2ml de suero y se tratan 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 hace un lavado con Fenol: Cloroformo (25:24) y otro con Cloroformo, se precipita con Etanol; el pellet de ADN se lava con Etanol al 70% y se resuspende con TE 1X (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM de EDTA) (Klein et al. 1997).

Amplificación del fragmento de los controles de PCR

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

La primera reacción se realiza a un volumen final de 30 µl que contiene 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 MgCl₂ y 1U de Taq DNA Polimerasa. En la segunda reacción se utiliza como ADN molde 3 µl del producto de PCR de la primera amplificación, las mismas concentraciones de los otros reactivos y los oligonucleótidos F-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT 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 son las mismas, excepto que la temperatura de hibridación que se aumenta a 68°C (Beier *et al.* 2001).

Electroforesis

La identificación de los animales positivos a la presencia del provirus se hace 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.

Tabla 10. Resultados del análisis del Virus de Leucosis Bovina.

No.	Raza	Sexo	Leucosis Bovina	Observaciones
100	Holstein			
101	Jersey			
102	Pardo			

Como se muestra en el anexo 3 los animales que poseen el virus de Leucosis son descartados seleccionando solamente los animales que están potencialmente sanos, lo que se pretende es tener animales libres de enfermedades para que sean utilizados para fines reproductivos y así tener descendientes libres de enfermedades.

El primer objetivo de la propuesta es identificar primordialmente los animales sanos para poder mejorar la sanidad de los descendientes de la población bovina analizada, se debe proceder a la aplicación de un tratamiento para evitar que los demás bovinos que posean cualquiera de los virus afecten otros animales sanos.

Con la lista de Animales negativos para Leucosis descritos en la tabla 10 se procede a realizar el análisis para el gen BoLA a los animales sanos de VLB para identificar aquellos animales que poseen cualquiera de los alelos relacionados con características como producción de leche, crecimiento y respuesta inmune.

4.3 Polimorfismos del gen BoL-A-DRB3.2

Amplificación del gen DRB3

La amplificación del segundo exón del gen BoLA-DRB.3, se obtiene por un protocolo de PCR de dos pasos (semi-anidado) (Van Eijk et al., 1992). En las reacciones de PCR se utilizan los oligonucleótidos: HLO30 (5'ATCCTC TCTCTGCAGCACATTTCC3'), HL031 (5'TTTAAATTGCGCTCACCTCGCCGCT-3'), HL032 (5'-TCGCCGCTCAGTGAAACTCTC-3').

En la primer reacción de amplificación se utilizan 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 MgCl₂ y 1U de Taq DNA Polimerasa. El programa de amplificación consta 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 toman 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, MgCl₂ y Taq DNA polimerasa. El programa de amplificación consta 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).

Restricción

Los fragmentos de ADN amplificados en la segunda reacción son utilizados como sustrato para la digestión con las endonucleasas de restricción RsaI, BstYI y HaeIII. 10µl del

producto de PCR son digeridos con 5 U de cada enzima a 37°C durante 4 horas (Dietz *et al.* 1997).

Electroforesis

La electroforesis se realiza en geles de agarosa SFR (Super Fine Resolution) al 3% y teñidos con bromuro de etidio. La lectura de los alelos se basa en la nomenclatura del 5th BoLA workshop (BoLA Nomenclature, International, Society for Animal Genetics) Anexos 1 y 2.

Análisis estadístico

Se determina el porcentaje de presencia del virus para cada raza. Se realizan 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 asociar la presencia del virus con los alelos del gen BoLA-DRB3.2* se determina 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 son 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 son considerados susceptibles (asociación negativa), valores de OR cercanos a 1 son considerados como neutros. Se realiza un test exacto de Fischer para determinar la significancia estadística de los valores de OR usando el software SAS versión 9.1.

Tabla 11. Resultados obtenidos para el gen BoLA y para k-caseína.

No.	Raza	Genes BoLA	Observaciones
100	Holstein		
101	Jersey		
102	Pardo		

En la Tabla 11 se enlistan los resultados para BoLA, expresados en números que nos indican los alelos que posee cada animal. Aquellos animales con los mejores alelos continuarán en el proceso de análisis para k-caseína.

De los animales analizados, los que poseen las características deseadas serán seleccionadas como los de mayor importancia o dicho de otra manera serán la selección de reemplazo para fines reproductivos y utilizados para hacer los cruces que irán mejorando la progenie de los animales, por ende la calidad de sus productos, como lo dice Guevara, R. (2011), un animal no se puede mejorar, lo que si puede mejorar es la progenie de una o varias poblaciones.

PASO 2 Identificación de genes de calidad de leche. En esta etapa, se realizan pruebas de variantes alélicas de k-caseína solo a los animales que aprobaron las pruebas de análisis sanitario y respuesta inmunológica a enfermedades. Esta última a criterio del mejorador.

4.4 Identificación de la calidad de la leche (k-caseína)

Extracción del ADN

A cada animal se le extrae una muestra de sangre en tubos “vacutainers” de 5 ml con anticoagulante EDTA, mediante punción en la vena coccígea, luego deben ser puestas en hielo para su transporte al laboratorio donde serán refrigeradas a 4 °C por 24 horas para posteriormente proceder a la extracción del ADN mediante el protocolo de extracción “Salting out”.

Condiciones de PCR

Protocolo Pκ453 adaptado de Barroso et al., (1998)

Este protocolo de identificación de κ-Caseína ha sido adaptado por Diaz, H (2005) de la metodología descrita por Barroso et al. (1998) en la cual se amplifica un fragmento de 453 pb localizado en el cromosoma 6 del ganado bovino. Para amplificar dicho fragmento se toman entre 100 y 300 ng de ADN y se mezclan en una solución buffer de PCR (Tabla 6; Protocolo Pκ453.) que contiene los “primers”: sentido- 5´ -TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3´; antisentido, 5´-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3. Las muestras son sometidas a un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94oC y luego a 35 ciclos a 94oC por un minuto, 65oC por un minuto y 72oC por dos minutos con una extensión final de 72oC por 5 minutos.

Las condiciones que se requieren, para identificar mediante electroforesis los fragmentos amplificados, son las siguientes: geles de 12x8 cm² de una cámara Biometra® que requieren un volumen de 9 ml de una solución gelificante que contienen 12% de poliacrilamida (proporción Acrilamida:N,N´-metilene-bis-acrilamida de 100:1), TBE concentrado a 0,5X y 5% de glicerol. Estos geles se someten a 160 V (Voltios) durante 12 horas a 12 °C. Este protocolo, difiere en las condiciones de corrida a aquellas descritas por Barroso et al. (1998) y Naranjo (2004; 200 V, 14 h, 10 °C; 200 V, 8 h, 15 °C, respectivamente) (citado por Diaz 2005), también puede utilizarse el siguiente:

Protocolo Pκ551 adaptado de Prinzenberg et al. (1999)

Este protocolo adaptado por Díaz (2005) de Prinzenberg *et al.* (1999) también utilizado para identificar las variantes de κ-CN y difiere del protocolo pk 453 en que se amplifica un fragmento de 551 pb localizado en el cromosoma 6 que corresponde al 90% de la secuencia codificante de la proteína κ-Caseína. Para ello, se tomarán de 50 a 200 ng de ADN y se mezclaron en una solución buffer de PCR (Tabla 5) la cual contenía los “primers” ExIV#1

5'AGA AAT AAT ACC ATT CTG CAT 3' y 551#2 5' GTT GAA TTC TTT GAT GTC TCC TTA GAG T 3'.

El programa de PCR al cual se someten las muestras consiste en un primer paso de desnaturalización a 93 °C por 60 segundos, seguido de 35 ciclos que comprenden 30//93 °C, 30//54 °C, 30//70 °C y una elongación final de 180 segundos a 70 °C.

Solamente las condiciones de corrida difieren a las descritas por Prinzenberg et al. (1999) y son muy similares a las del protocolo Pk453 descrito anteriormente excepto porque la concentración de glicerol en los geles es de 6,67% y el tiempo de corrida va desde 12 a 16 horas.

Tabla 12. Composición de la solución de PCR para κ-CN

Reactivos	κ-CN PK453 ¹ /PK551 ²	
	[Inicial]	Volumen µl
Buffer Taq	10/10 X	5,0/5,0
DNTPs	1,25/1,25 mM	8,0/8,0
Primer F	100/20 pmol/µl	0,2/1,0
Primer R	100/20 pmol/µl	0,2/1,0
MgCl ₂	25/25 mM	4,0/3,0
Enzima Taq	5/5 U	0,4/0,2
DNA	50-300 ng/µl	2,0/2,0
Agua	*	30,2/33,8
Total		50 µl

1. Adaptado de Barroso *et al.* (1998) por Diaz (2005);
2. Adaptado de Prinzenberg *et al.* (1999) por Diaz (2005).

Una vez obtenidos los fragmentos de interés mediante PCR se procede a la identificación de las variantes alélicas. Esto puede hacerse mediante enzimas de restricción (FRLP), sin embargo el costo de las enzimas suele ser muy elevado por lo tanto se propone el uso del método de SSCP.

Un protocolo de SSCP fue desarrollado para reducir el alto costo de genotipificación en PCR-RFLP debido al uso de la enzima MnlI. Una muestra de 20 individuos evaluada para identificar individuos con las variantes A y B mediante la técnica PCR-RFLP, adaptada de los protocolos de Mao (1993) y del Laboratorio de Medrano (adaptado por Poli, 1997). Una vez identificadas las muestras para una variante específica (Figura 6), se ensayaron mediante SSCP. La discriminación en SSCP de ambas variantes fue posible en las siguientes condiciones: un gel con dimensiones 12x8 cm² que requiere un volumen de 9 ml de solución gelificante, con 16% de poliacrilamida (Proporción Acrilamida: N, N'-metilene- bis-acrilamida de 100:1), 0,25X de TBE y 3,75% de glicerol, sometidos a 180 Voltios durante 4 horas. Las condiciones obtenidas e SSCP resultaron más apropiadas que RFLP (Díaz 2005).

Análisis de RFLP

Una muestra de 5 µl del producto de PCR fue digerida con 3 a 5 U de cada enzima de restricción utilizada por proteína. Las muestras cortadas con enzimas de κ-Caseína se corrieron en geles de agarosa al 1,8% (Prinzenberg y Erdhart, 1996) mientras que las muestras de las proteínas del suero se corrieron en geles de poliacrilamida al 8% (proporción Acrilamida: N, N'-metilene-bis-acrilamida de 37:1) (Díaz 2005).

En la Tabla 12 se describen los patrones de corte de cada enzima de restricción correspondientes a las variantes de κ-CN; cuando se usa el método de Barroso et al. (1998) citado por Díaz (2005).

Tabla 13. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 453 de κ -CN.

Alelo	<i>Hinfl</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MaeII</i>
A	326+100+27	230+223	254+199
B	426+27	230+223	254+199
C	426+27	230+223	453
E	326+100+27	230+145+78	254+199

Adaptado de Barroso et al. (1998) por Díaz (2005).

Análisis de SSCP

Para el análisis de SSCP, 2 a 3 μ l de los productos de la reacción de PCR, se mezclaron con 7 a 8 μ l de buffer desnaturalizante (que contiene: 0.05% de Xilene-Cianoli, 0.05% de azul bromofenol, 5.5mM de EDTA pH 8.0) y se sometieron a 95°C por 5 minutos y luego se enfriaron en hielo; después de dos minutos 5 μ l de la muestra fueron cargadas en geles de poliacrilamida. Después de la electroforesis las bandas se tiñeron con plata de acuerdo a la metodología descrita por (Bassam et al. 1991 citado por Barroso *et al.* 1998).

En la Tabla 14 se describen los patrones de corte de cada enzima de restricción correspondientes a genotipos específicos de κ -CN; esos patrones se utilizaron de referencia en este trabajo y aplican para el fragmento de 551pd amplificado en el protocolo Pk551 adaptado de la metodología descrita por Prinzenberg y Erdhart (1996).

Tabla 14. Cortes resultantes de la digestión con enzimas de restricción del fragmento 551 de κ -CN.

Alelo	HindIII	Hinfl	HaeIII	HhaI	MaeII	MspI
AA	551	58+69+98 +326	221+330	40+511	299+252	551
BB	100 + 451	58+69+424	221+330	40+511	299+252	551

AC	100+451+5 51	58+69+98 +326+424	221+330	40+511	299+252+5 51	551
AE	551	58+69+98 +326	75+146+22 1+330	40+511	299+252	551
AF	551	58+69+98 +326	221+330	40+511+55 1	299+252	551
EF	551	58+69+98 +326	75+146+22 1+330	40+511+55 1	299+252	551
AG	551	58+69+98 +326	221+330	40+511	299+252+5 51	551
BG	100+451+5 51	58+69+98 +326+424	221+330	40+511	299+252	551
A1--	551	58+69+98 +326	221+330	40+511	299+252	551+460+9 1

Adaptado de Prinzenberg *et al.* (1996) por Diaz (2005).

Cuantificación del ADN

La concentración del ADN se determina 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/μl.

Presentación de resultados para programa de mejoramiento

Tabla 15. Resultados finales en donde se muestran los animales sanos de DVB y VLB, alelos del gen BoLA y alelos de la K- caseína.

No.	Raza	Sexo	DVB	VLB	Gen BoLA	k-caseína
100						
112						

6 Mejoramiento del hato

Las decisiones reproductivas que se hagan ahora, afectarán el rendimiento del hato por muchos años.

Para realizar los cruces serán utilizadas aquellas vacas y aquellos toros seleccionados que están sanos y que presentaron las mejores características como se muestra en la Tabla 15 y segundo se propone utilizar la inseminación como método de reproducción pudiendo elegir el reproductor que brinde las características más convenientes para mejorar la genética de su ganado.

La producción promedio de una vaca lechera se ha triplicado con un marcado énfasis en el contenido de grasa y proteína. Gran parte de este incremento se puede atribuir al uso de la I.A., y ahora acompañada del uso de los marcadores moleculares que nos brindan información valiosa con la que podemos elegir aquellos reproductores que posean las mejores condiciones de salud y calidad láctea darán origen a descendientes con mejores características que las de sus padres.

7 Recursos

La propuesta descrita está diseñada para ser aplicada en La Universidad Nacional de Colombia sede Palmira junto con el grupo de recursos zoogenéticos y el programa de investigación en diversidad biológica, teniendo como objetivo fines de aprendizaje de sus estudiantes y como un medio de proyección hacia la población ganadera de la zona.

La universidad cuenta con los laboratorios el personal capacitado, los instrumentos y equipo necesario para realizar cada uno de los análisis propuestos.

VI CONCLUSIONES

Las técnicas moleculares para la identificación de genes de la K-casina ya habían sido implementadas de manera exitosa en laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Palmira.

El análisis de los genes relacionados con enfermedades, contempla técnicas de fácil implementación a nivel del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Palmira.

Las técnicas moleculares son una buena herramienta para la mejora genética cuando su uso es complementado por el trabajo a nivel de campo en la selección de los individuos.

A pesar de que existen muchos artículos relacionados con las herramientas moleculares para la genotipificación de genes de calidad de leche y enfermedades en el ganado bovino, no existía una guía metodológica en la región que abordase de manera integral calidad de leche y problemas sanitarios.

VII RECOMENDACIONES

Implementar esta propuesta para fines académicos y en beneficio de los productores involucrados.

Elaborar otras propuestas relacionadas con calidad de carne.

Implementar esta propuesta en la Universidad Nacional de Agricultura para enriquecer el conocimiento y en beneficio de los ganaderos de nuestro país Honduras.

.

VII BIBLIOGRAFÍA

Agudelo, D; Bedoya, O. 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno (en línea). Ed. Rev.; Antioquia, Colombia. Revista Lasallista de investigación. Consultado 5 de mayo de 2011. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/695/69520107.pdf>.

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

Al-Murrani, SW. Glass EJ. Hopkins, J. 1994. BoLA class I charge heterogeneity reflects the expression of more than two loci. *Anim Genetics* , n 25: 165–172.

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

AsoJersey 2008. Jersey. Bogotá, Colombia (en línea). Consultado 18 de mayo de 2011. Disponible en <http://www.unaga.org.co/asociados/jersey.htm>.

Asuar, L. 2003. Guía práctica sobre la Técnica de PCR. Las herramientas Moleculares (en línea). México D F.; consultado 19 de mayo de 2011. Disponible en <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>.

Ávila, S. Gasque, R. Grupos genéticos de ganado bovino destinados a la producción de leche (en línea).disponible en:

<http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Material%20II/A%20archivos%20internet/Razas%20lecheras/cap3.pdf>.

Ballingall KT; Ellis, SA; Machugh, ND; Archibald, SD; McKeever, DJ. 2004. The DY genes of the cattle MHC: expression and comparative analysis of an unusual class II MHC gene pair. *Immunogenetics*, 55: 748–755.

Baró, L; Jiménez, J; Martínez-Férez, A; Bouza, J. 2001; Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales (en línea). Granada, España; Puleva Biotech S.A. Consultado 13 de mayo de 2011; disponible en <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/222.pdf>.

Bavera, GA. 2007. Cursos de Producción Bovina de Carne (en línea). Jersey. Ed rev. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina Criadores de Jersey. Consultado 18 de mayo de 2011 Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/razas_bovinas/36-jersey.pdf.

Bensaid, A; Kaushal, A; Baldwi, CL; Clevers, H; Young, JR; Kemp, SJ; Machugh, ND; Toye, PG; Teale, AJ. 1991. Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. *Immunogenetics*, 33: 247–254.

Chamizo, EG. 1995. Leucosis Bovina Enzoótica en: Patología especial y diagnóstico de enfermedades de los animales deomésticos. Edit: UABC. Mexicali, pp 78-81.

Chamizo, EG. 1997. Leucosis Bovina Enzoótica en: Patología orgánica y diagnóstico de enfermedades de los animales deomésticos. Edit: Felix Varela. La Habana, pp 209.

Chamizo, EG. 2000. Leucosis Bovina Enzoótica como causa de eficiencia reproductiva en el ganado lechero (2): 40-42.

Chamizo, EG. 2005. Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. REVET, Vol 6 No 7

Davies, CJ; Andersson, L; Ellis, SA; Hensen, EJ; Lewin, HA; Mikko, S; Muggli-Cockett, N.E; Van der Poel, JJ; Russell, G.C. 1997. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim Genetics* 28: 159–168.

Degiuseppe, A; Feliziani, F. Rutili, D; Mia, GM. 2004. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculavirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1): 147-151.

Dietz, AB; Dettloux, JC; Freeman, AE; Kelley, DH; Stabel, J.R; Kehrli, ME. 1997b. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J Dairy Sci*, 80:400-4005.

Echeverri, J. s.f. Programas de control lechero. Evaluaciones genéticas y su importancia en Colombia (en línea). Congreso. Ed. Rev. Medellín, Colombia. UNC sede Medellín; consultado 12 de mayo del 2011. Disponible en <http://reprogeneticscolombia.com/descargas/CONTROL%20LECHERO.pdf>.

Ellis, SA; Holmes, EC; Staines, KA; Smith, KB; Stear, MJ; McKeever, DJ; Machugh, ND; Morrison, W.I. 1999. Variation in the number of expressed MHC genes in different cattle class I haplotypes. *Immunogenetics* 50: 319–328.

Gilliespie, BE., Jayarao, BM., Dowlen, HH; Oliver, SP. 1999. Analysis and frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *J. Dairy Sci*. 82:2049–2053.

Hazard, S. y Christen, M. 2006. Composición y calidad de la leche (en línea); Vilcún, Chile; Tierra Adentro. Consultado 13 de mayo de 2011. Disponible en <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR33262.pdf>

Jimenez, C; Bonilla, JA; Dolz, G; Rodríguez, LR; Herrero, L; Bolaños, E; Cortez, MR; Moreno, E. 1995. Bovine leukemia virus infections in Costa Rica. *Zentralbl Veterinarmed*, (B) 42:385-390.

Kelly, JE. 1993. Early detection of bovine leukemia 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.

Knapen, K; Kerkhofs, 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.

Leiva, B. 2005. Influencia de las Variantes Genéticas A y B de β -Lactoglobulina sobre el Contenido de Caseína y Pruebas de Aptitud Tecnológica de la Leche. Época de Invierno. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile; p. 17-23.

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.

Malatestinic, A. 2003. Bilateral exophthalmus in a Holstein cow with lymphosarcoma. *Can Vet J*, 44 (8):664-666.

Miretti, MM; Ferro, JA; Lara, LA; Contel, EPE. 2001. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA gene in South American Cattle. *Biochemical Genetics*, 39: 311-324.

Mirsky, ML; Olmstead, C; DA, Y; Lewin, HA. 1998. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Animal Genetics*, 29(4):245-252.

Muggli-Cockett, NE; Stone RT. 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.

Nicholas, FW. 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.

O. Uffo, I; Martín-Burriel, S; Martínez, R; Ronda, R; Osta, C; Rodellar; Zaragoza 2006. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. Ed. al.. Zaragoza, España; Agri;14 de mayo de 2011;p 15-16;disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0806t/a0806t02.pdf>

Raunhardt, O. y Bowley, A. 1996. Fortification basics. Leche (en línea). Ed. Rev;s.l.. USAID; consultado 13 de mayo de 2011. Disponible en http://www.mostproject.org/Updates_Feb05/Leche.pdf.

Rhodes, JK; Pelzer, KD; Johnson, YJ. 2003. Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid Atlantic dairy herds. *J Am Vet Med Ass.* 223(3):346-352.

Ripoli, MV; Peral-Garcia, P; Dulout, F. N; Giovambattista, G. 2004. Polymorphism in the bovine BoLA-DRB3 upstream regulatory regions detected through PCR-SSCP and DNA sequencing. *Gene*, 339: 71-78.

Rosero, J. 2009; Polimorfismo de los genes k-caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbumina en razas bovinas criollas Colombianas. Las proteínas de la leche (en línea). Tesis de grado. Palmira, Colombia; Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira; pág. 28-33. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/1694/1/7407002.2009.pdf>.

Russell, GC; Marelllo, KL; Gallagher, A; McKeever, DJ; Spooner, R.L. 1994. Amplification and sequencing of expressed DRB second exons from *Bos indicus*. *Immunogenetics*, 39: 432–436.

Shell; Heckert, HP; Muller, KE. 2004. Case report: lymphosarcoma in a cow. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 111(1):38-41.

Sorensen, O.K. 1979. Prevalence of economics of bovine;Leucosis in the United States. Procc bovine Leukosis Symposium College Park MD (USDA) 33 – 50.

Spooner, RL; Leveziel, H; Grosclaude, F; Oliver, RA; Vaiman, M. 1978. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *Journal of Immunogenetics*. 5: 325– 346.

Stone, D; Hof, AJ; Davis, WC. 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, GE; Udina, IG; Shaikhaev, GO; Zakharov, IA. 1995; DNA polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in cattle in connection with resistance and susceptibility to leukemia. *Genetika*, 31(9):1294-9.

Takeshima, SN y Aida, Y. 2006; Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J*, 77: 138-150.

Tamarin, R. 1996. Principios de genética. Editorial: Reverté S.A. Barcelona, España. 607 p.

Wattiaux M. s.f. Composición de la leche y valor nutricional (en línea). Wisconsin, Madison, USA; Universidad de Wisconsin-Madison. Consultado 13 de mayo de 2011. Disponible en http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_19.es.pdf.

Xu A; Eijk, MJ; Park C; Lewin HA. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *Journal of Immunology* 151: 6977–6985.

Zanotti M; Poli, G; Ponti, W; Polli, M; Rocchi, M; Bolzani, E; Longeri, M; Russo, S; Lewin, HA; 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.

ANEXOS

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

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

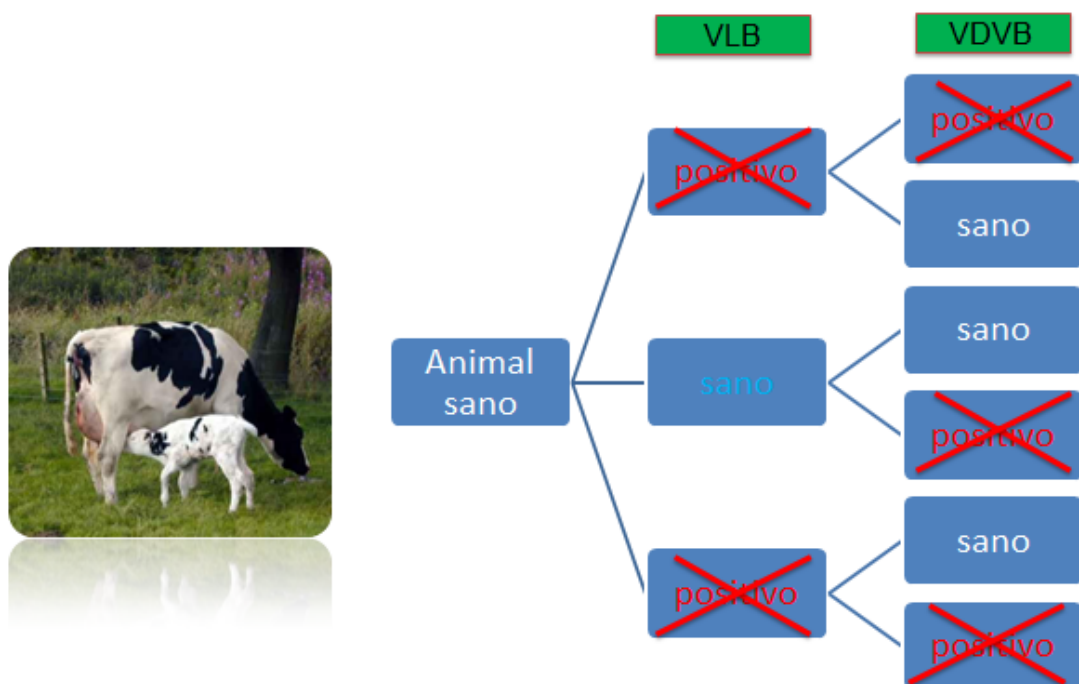
BstYI			
a	199	85	
b	284		
c	196	85	
d	197	87	
e	112	87	85

HaeIII				
a	167	65	52	
b	219	65		
c	167	65	49	
d	190	65	29	
e	167	117		
f	167	65	48	4
g	164	65	55	
h	167	65	46	6
i	167	113	4	

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

Alelo	DRB 3	RsaI, BstYI,	Alelo	DRB 3	RsaI, BstYI,	Alelo	DRB 3	RsaI, BstYI,
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*2501	43	kbf
DRB3*1602	10	fba	DRB3*2705	23	nba	DRB3*2501	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*1401	27	obf	DRB3*4001	50	xba
DRB3*3203	12	haa	DRB3*1401	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*2001	15	iba	DRB3*4101	29	pcc	DRB3*4301	54	jdb
DRB3*2001	15	iba	G E	30	qcc			
DRB3*2002	15	iba	DRB3*2801	31	ibf			
DRB3*2003	15	iba	DRB3*2401	32	maa			

Anexo 3. Esquema ilustrativo para realizar la selección de animales sanos.



Anexo 4. Esquema ilustrativo la selección de animales para mejorar la calidad de la leche.



Anexo 5. Esquema ilustrativo para la selección de los animales que poseen alelos relacionados con calidad de la leche, respuesta inmune (BoLA).



Animales
resistentes

$2*21$

$2*8$

$2*7$

$2*6$