

# EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA GENÉTICA DEL GANADO CRIOLLO HARTÓN DEL VALLE AL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA

## EVALUATION OF HARTÓN DEL VALLE CREOLE BREED GENETICS RESISTANCE TO BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Asociación del Locus BoLA-DRB3.2 con el VLB en ganado criollo Hartón del Valle

Darwin Y Hernández Herrera<sup>1</sup>, Andrés M Posso Terranova<sup>1</sup>, Jaime E Muñoz Flórez<sup>1</sup>, Guillermo Giovambattista<sup>2</sup>, Luz A Álvarez Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gupo de Recursos Zoogenéticos, Laboratorio de Genética Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, A.A 237, Colombia.

<sup>2</sup>Instituto de Genética Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, AA 296, Buenos Aires, Argentina.

### Palabras clave:

Antígeno  
leucocitario  
PCR-RFLP  
PCR-SBT  
Resistencia a  
leucosis

### Keywords:

Leukocyte  
antigen  
PCR-RFLP  
PCR-SBT  
Resistance to  
leucosis

### Abstract

DRB3.2\* gene has been linked with productive traits and diseases. The bovine leukemia virus (BLV) has a high prevalence in Colombia. The main objective of this work was to associate different alleles of DRB3.2\* gen with the presence of BLV in Hartón del Valle Creole Colombian breed, using molecular techniques. 23% of the animals had the BLV. We found 37 alleles BoLA-DRB3.2\*, the most frequent were \*1101, \*20012, \*2006, \*2801. Positive association was found (resistance, R) in three alleles (\*1101, \*2709 and \*20012), neutral (N) and negative in 31 alleles (susceptibility, S) alleles \*1002, \*25011, and \*R-146. Resistant alleles showed a higher frequency than susceptible alleles. Resistance data are consistent with both methodologies. Genotyping showed a higher number of individuals with genotype RR (19%) than SS (1%), while the NN were 43% and 32% NR. Genotype RS was not found in the test animals.

### Resumen

El gen DRB3.2\* ha sido relacionado con características productivas y con enfermedades. El virus de la Leucosis Bovina (VLB) tiene alta prevalencia en Colombia. El objetivo del presente trabajo fue asociar los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* con la presencia del VLB en el ganado criollo Hartón del Valle, mediante técnicas moleculares. El 23% de los animales presentaron el VLB. Se encontraron 37 alelos BoLA-DRB3.2\*, siendo los más frecuentes \*1101, \*20012, \*2006, \*2801. Se encontró asociación positiva (resistencia, R) en tres alelos (\*1101, \*2709 y \*20012), neutral (N) en 31 alelos y negativa (susceptibilidad, S) en los alelos \*1002, \*25011 y \*R-146. Los alelos resistentes tuvieron mayor frecuencia que los alelos susceptibles. Los datos de resistencia concuerdan con ambas metodologías. La genotipificación mostró mayor número de individuos con genotipo RR (19%) que SS (1%), mientras que, los NN fueron 43% y los NR 32%. No se encontraron genotipos RS en los animales analizados.

### Introducción

El virus de la Leucosis Bovina (VLB) es un virus linfotrópico que produce linfocitosis persistente y tumores. Los estudios sobre la presencia del VLB en Colombia son variables (Orjuela, 2000; Hernández, 2010). Diversos autores señalan que los ganados criollos presentan resistencia a algunas enfermedades. La raza Hartón del Valle (HV) se encuentra clasificada según la FAO como vulnerable. Recientemente reportamos 83% de presencia del VLB y algunos alelos asociados con la resistencia a la presencia del virus y otros con la susceptibilidad (Hernández, 2010).

El complejo mayor de histocompatibilidad de los bovinos conocido como BoLA (*Bovine Lymphocyte Antigen*), está formado por tres clases de genes. Los clase II están distribuidos en dos regiones IIa y IIb, codifican

glicoproteínas que se unen a péptidos exógenos y son expresadas por células del sistema inmune. En la región IIa se encuentra el locus DRB con tres *loci*: DRB1, DRB2 y DRB3; el exón 2 del DRB3 (DRB3.2) es el más polimórfico y se ha asociado con características productivas y con enfermedades relacionadas con el VLB tales como linfocitosis persistente, desarrollo de tumores, carga proviral y presencia del virus (Takeshima y Aida, 2006).

El objetivo del presente trabajo fue relacionar los alelos del gen BoLA-DRB3.2\* con la presencia del virus de la leucosis bovina (VLB) en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle utilizando métodos moleculares.

### Material y métodos

Se utilizaron 100 muestras de ADN de ganado criollo Hartón del Valle. Se determinó la presencia del VLB siguiendo la metodología descrita por Beier *et al.* (2001). Se genotipificó el gen DRB3.2\* utilizando la metodología PCR-SBT (*Sequence Based Typings*) descrita por Takeshima *et al.* (2009) y se comparó con la metodología comúnmente usada para genotipificar este gen descrita por Dietz *et al.* (1997) (PCR-RFLP).

Se halló el porcentaje de presencia del VLB. Para el gen BoLA-DRB3.2\* se determinó el número de alelos, las frecuencias alélicas, la Heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho) utilizando el programa ARLEQUIN versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Se estimó el Odds Ratio (OR) para asociar la presencia del VLB y el alelo DRB3.2 seguido de un test de Fischer para determinar la significancia del OR, usando el software SAS versión 9.1. Se clasificaron los animales de acuerdo a su genotipo como Neutral/Neutral (NN), Neutral/Resistente (NR), Neutral/Susceptible (NS), Resistente/Resistente (RR), Resistente/Susceptible (RS) y Susceptible/Susceptible (SS).

### Resultados y discusión

Se encontró 23% de presencia del VLB, porcentaje menor que el reportado por Hernández, (2010) para el conjunto del ganado criollo colombiano (26,7 %) y para el mismo grupo racial (83,3 %). Muñoz *et al.* (2008) reportan 25 % de presencia en muestras tomadas en el Valle del Cauca.

Se encontraron 37 alelos BoLA-DRB3.2\* con PCR-SBT y 27 con PCR-RFLP, similar a los reportados para ganados criollos de América (Hernández, 2010; Fernández *et al.* 2008; Ripoli *et al.* 2004; Kelly *et al.* 2003; Giovambattista *et al.* 1996).

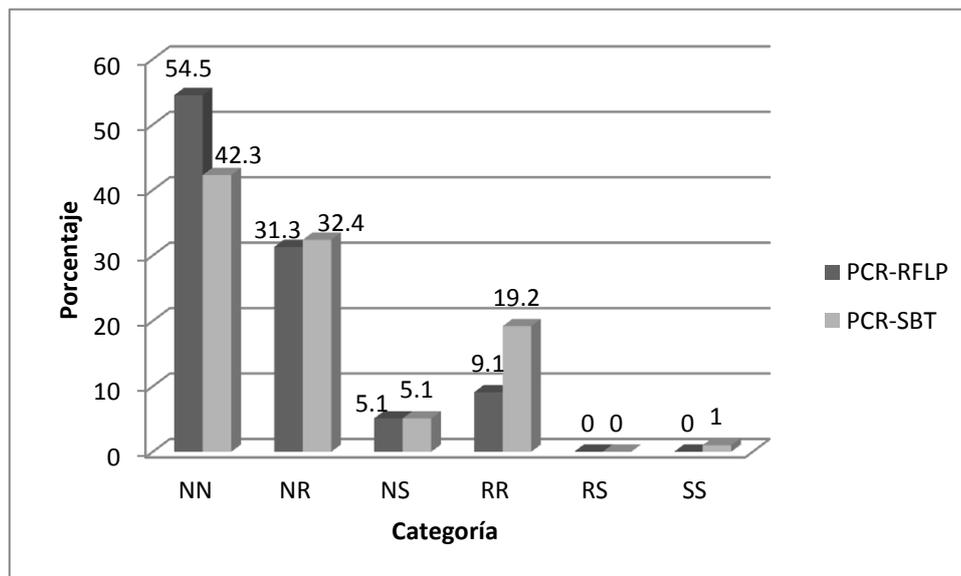
Los alelos más frecuentes por PCR-SBT fueron \*1101 ( $0.2041 \pm 0.0289$ ); \*20012 ( $0.1224 \pm 0.0235$ ) y \*2006, \*2801 ( $0.0714 \pm 0.0184$ ) y mediante PCR-RFLP fueron \*20 y \*23 ( $0.1173 \pm 0.023$ ); \*34 ( $0.102 \pm 0.0217$ ); \*16 ( $0.0867 \pm 0.0202$ ) y \*6, \*15 y \*22 ( $0.0561 \pm 0.0165$ ). Estos datos concuerdan con lo reportado por Hernández, (2010) en HV.

Los valores de He fueron mayor que los valores de Ho con ambos métodos, la He por PCR-RFLP (0,93) fue ligeramente mayor que con PCR-SBT (0,92), valores un poco más altos que para otros ganados criollos de América genotipificados por PCR-RFLP (Hernández, 2010; Fernández *et al.* 2008; Juliarena *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2005; Ripoli *et al.* 2004; Kelly *et al.* 2003; Giovambattista *et al.* 1996).

Mediante PCR-RFLP se encontraron asociaciones positivas entre la ausencia del VLB y los alelos \*8, \*15, \*22 y \*23 asociaciones negativas con los alelos \*18 y \*44. Usando análisis de secuencias (PCR-SBT) se hallaron asociaciones positivas entre la ausencia del VLB y los alelos \*1101, \*2709 y \*20012; en contraste, se encontraron asociaciones entre la presencia del VLB y los alelos \*1002, \*25011 y \*R-146. El alelo \*22 determinado mediante PCR-RFLP corresponde al alelo \*1101 por secuencia, el \*23 corresponde al \*2709 y el alelo \*15 al \*20012; en el alelo \*8 no se encontró su correspondiente por PCR-SBT. Lo que indica correspondencia entre los métodos de genotipaje.

El alelo \*44 (PCR-RFLP) correspondiente al \*25011 (PCR-SBT) presentó asociación negativa con ambas metodologías (susceptibles a la presencia del VLB). El alelo \*18 corresponde al \*1801 tuvo asociación negativa por PCR-RFLP y asociación neutral por PCR-SBT, mientras que, el alelo \*1002 tuvo asociación negativa por PCR-SBT y correspondiente por PCR-RFLP (\*3) presentó asociación neutral. El alelo \*R-146 no presentó correspondencia por PCR-RFLP.

La genotipificación mostró mayor número de individuos con genotipo RR (19%) que SS (1%), mientras que, los NN fueron 43%, los NR 32% y los NS 5%. No se encontraron genotipo RS. Los alelos \*1101 y \*20012, asociados con resistencia al VLB, representan el 32% de las frecuencias alélicas del HV, la comparación entre metodologías se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Clasificación de los genotipos del gen DRB3.2 por PCR-RFLP y PCR-SBT de acuerdo a la Resistencia, Susceptibilidad o Neutralidad a la presencia del virus en HV (*Classification of genotypes for DRB3.2 gene by PCR-RFLP and PCR-SBT according to resistance, susceptibility or neutrality to virus presence in HV*)

### Conclusiones

El ganado criollo Hartón del Valle tiene baja presencia del VLB. Se encontró alta diversidad del gen BoLA-DRB3.2 medido por PCR-RFLP y PCR-SBT. Se encontraron asociaciones positivas y negativas entre alelos DRB3.2 y la presencia del VLB. Existió correspondencia entre las metodologías de genotipificación usadas. Los alelos de resistencia presentaron mayor frecuencia que los de susceptibilidad.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a los integrantes de los laboratorios de biología molecular, genética animal de la Universidad Nacional de Colombia, a los integrantes del Instituto de Genética Veterinaria (IGEDET) de la Universidad Nacional de La Plata y a la Hacienda Sanjon Hondo.

### Financiación

El presente trabajo fue financiado por la Dirección Nacional de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia.

### Bibliografía

- Beier, D., Blankenstein, P., Marquardt, O. & Uzmak, J. (2001) Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 114, 252-256.
- Dietz, A.B., Detilleux, J.C., Freeman, A.E., Kelley, D.H., Stabel, J.R. & Kehrl, M.E. (1997) Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *Journal Dairy Science* 80, 400-4005.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567
- Fernández, I.G., Ríos, J.G.R., Gayosso, A.V., Ulloa, R.A. & Morales, R.A.A. (2008) Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico. *Genetics and Molecular Biology* 31, 880-886.
- Giovambattista, G., Golijow, C.D., Dulout, F.N. & Lojo, M.M. (1996) Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics* 27, 55-56.
- Hernández, D.Y. 2010. Asociación Del Locus BoLA-DRB3.2 Con El Virus De La Leucosis Bovina En Razas Criollas Y Colombianas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira.
- 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. *Archivos de Zootecnia* 52, 77-80.

- Martínez, R., Toro, R., Montoya, F., Burbano, M., Tobon, J., Gallego, J & Ariza, F. (2005) Caracterización del locus *BoLA-DRB3* en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Archivos de Zootecnia* 54, 349-356.
- Muñoz, D., Posso, A. & Muñoz, J. (2008) Detección de la leucosis bovina utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 21, 153-161.
- Juliarena, M.A., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Rodríguez, E.M., Mariño, B., Rodriguez-Dubra, C. & Esteban, E.N.(2008) Association of BLV infection profiles with alleles of the *BoLA-DRB3.2* gen. *Animal Genetics* 39, 432-438
- Orjuela, J., Navarrete, A., Betancourt, L., Roqueme, E. & Morrison, M.E. (2000) Salud y productividad en bovinos de la Costa Norte de Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 10p
- Ripoli, M.V., Liron, J.P., De Luca, J.C., Rojas, F., Dulout, F.N. & Giovambattista, G. (2004) Gene Frequency Distribution of the *BoLA-DRB3* Locus in Saavedreño Creole Dairy Cattle *Biochemical Genetics* 42, 231-240.
- Takehima, S.N. & Aida, Y. (2006) Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal* 77, 138-150.
- Takehima, S.N., Matsumoto, Y. & Aida, Y. (2009) Short communication: establishment of a new polymerase chain reaction–sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex class II DRB3. *Journal Dairy Science* 92, No.6 2965-2970.