

SECUENCIAS DEL GEN BOLA-DRB3.2 DE BOVINOS GUAYMÍ Y GUABALÁ DE PANAMÁ¹

Axel Villalobos-Cortés²; Rita González³

RESUMEN

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ha sido asociado con caracteres de importancia económica tales como producción de leche, proteína y grasa en leche y con resistencia o susceptibilidad a enfermedades tales como brucelosis, infestación por garrapatas, hemoparásitos y mastitis. El segundo exón del gen BoLA-DRB3 del CMH, es altamente polimórfico y se han reportado 136 alelos que codifican elementos funcionales de restricción, proceso mediante el cual un linfocito puede reconocer un antígeno como propio o extraño. El objetivo de este trabajo fue validar un protocolo de amplificación y secuenciación del segundo exón del gen BoLA-DRB3 en poblaciones bovinas Guaymí y Guabalá para realizar estudios de caracterización en Panamá. Las secuencias obtenidas presentaron identidad con el segundo exón del gen BoLA-DRB3.2 que oscilaron entre 87% y 98%, en cuanto al número de pares de bases (bp), estas oscilaron entre 148 a 239 y valores máximos (MAX SCORE) de entre 165 a 339. Los alelos con mayor frecuencia en la raza Guabalá fueron, *R-73 (21%) y el *1801(14%) y en la raza Guaymí fue el *0101 (38%). En cuanto a los alelos compartidos, se observó que ambas razas comparten los alelos, *0101 y *R-73. Desde el punto de vista de la conservación y uso de la biodiversidad, las razas Guaymí y Guabalá representan una potencial reserva de genes que deben ser estudiados y fomentar su uso dentro de programas donde se requiera mínimo uso de insumos o, dentro de esquemas de cruzamientos donde se requieran animales de alta rusticidad de tipo *Bos taurus* x *Bos taurus*.

PALABRAS CLAVES: Bovino criollo, biodiversidad, conservación, caracterización, gen BoLA.

¹ Recepción: 16 de mayo de 2018. Aceptación: 13 de junio de 2018.

² Ph.D. en Conservación y mejora animal. IDIAP. Laboratorio Análisis y Biología Molecular Aplicada, Clayton Cd del Saber Edificio 221. e-mail: villalobos.axel@gmail.com

³ Licda. en Biotecnología. IDIAP. Laboratorio Análisis y Biología Molecular Aplicada, Clayton, Cd. del Saber Edificio 221. e-mail: ritacarolinagonzalez@gmail.com

SEQUENCES OF GENE BOLA-DRB3.2 FROM THE GUAYMI AND GUABALA CREOLE CATTLE OF PANAMA

ABSTRACT

The major histocompatibility complex (MHC) has been associated with economically important traits such as milk production, protein and fat in milk and with resistance or susceptibility to diseases such as brucellosis, tick infestation, hemoparasites and mastitis. The second exon of the BOLA-DRB3 gene of CMH is highly polymorphic and 136 alleles that encode functional restriction elements have been reported, through which a lymphocyte can recognize an antigen as its own or foreign. The objective of this work was to validate a protocol for the amplification and sequencing of the second exon of the BoLA-DRB3 gene in Guaymi and Guabala bovine populations to carry out characterization studies in Panama. The obtained sequences showed identity with the second exon of the BoLA-DRB3.2 gene that oscillated between 87% and 98%, in terms of the number of base pairs (bp), these ranged between 148 and 239 and maximum score (MAX SCORE) between 165 to 339. The most frequent alleles in the Guabala breed were, *R-73 (21%) and *1801 (14%) and in the Guaymi breed it was *0101 (38%). Regarding shared alleles, it was observed that both breeds share the alleles, *0101 and *R-73. From the point of view of the conservation and use of biodiversity, the Guaymi and Guabala breeds represent a potential reserve of genes that must be studied and promote their use within programs that require minimum use of inputs or, within crossbreeding schemes where highly rustic animals of the *Bos taurus* x *Bos taurus* type are required.

KEY WORDS: Creole cattle, biodiversity, conservation, characterization, gen BoLA.

INTRODUCCIÓN

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ha sido asociado con caracteres de importancia económica tales como la producción de leche (Machado *et al.* 2005), proteína y grasa en leche (Do Nascimento *et al.* 2006) y con enfermedades tales como brucellosis (Martínez *et al.* 2005), infestación por garrapatas (Martínez *et al.* 2006), hemoparásitos (Hernández *et al.* 2011), mastitis (Zambrano *et al.* 2009) y

leucosis enzoótica bovina (Juliarena *et al.* 2008, Panei *et al.* 2009).

Se han reportado trabajos sobre caracterización del gen BOLA-DRB3.2 en razas criollas colombianas como el Blanco Orejinegro, Romosinuano y Costeño con Cuernos, cuyos resultados indican que el ganado criollo colombiano posee genes de resistencia a enfermedades (Martínez *et al.* 2005, Castro *et al.* 2006, Darwin 2010).

También se ha detectado en ganado criollo mexicano (Portillo 2006), en ganado cebú (De y Singh 2006) y en razas sintéticas como la raza Senepol (Mariasegaram 2007). Algunos polimorfismos en el gen BOLA-DRB3.2 se han relacionado con el desarrollo de resistencia o susceptibilidad al Virus de la Leucosis Bovina (VLB). Estudios realizados por Lewin *et al.* (1988) y Xu *et al.* (1993) revelaron que la presencia de los aminoácidos Glu-Arg (en la posición 70-71) y Glu, Arg y Val (en las posiciones 74, 77 y 78) de la cadena BOLA-DR β estaban asociados con ausencia de linfocitosis persistente y desarrollo de tumores, respectivamente (Aida 2001).

El gen BOLA-DRB3.2 es altamente polimórfico, Takeshima y Aida (2006) han reportado 136 alelos que codifican elementos funcionales de restricción, proceso mediante el cual un linfocito puede reconocer un antígeno como propio o extraño (Davies *et al.* 1997, Maccari *et al.* 2017).

En Panamá se han desarrollado trabajos de caracterización genética de las razas criollas Guaymí y Guabalá (Villalobos-Cortés *et al.* 2010) por lo que la posibilidad de encontrar alelos del gen BOLA-DRB3.2 y su utilización en programas de conservación y

mejoramiento genético son de importancia estratégica. Por otro lado, existen otras razas localmente adaptadas de interés en la producción animal, que también podrían presentar alelos asociados a resistencia y susceptibilidad de enfermedades, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue validar un protocolo de amplificación y secuenciación del segundo exón del gen BoLA-DRB3 en poblaciones bovinas Guaymí y Guabalá para realizar estudios de caracterización en Panamá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo aleatorio de pelo de 22 bovinos criollos panameños. 11 animales de las poblaciones Guaymí (GY); 11 animales de la población Guabalá (GUA). Las muestras de los animales GY se obtuvieron del núcleo de conservación del IDIAP ubicado en la Finca Calabacito, provincia de Veraguas; las muestras de las poblaciones GUA se obtuvieron del núcleo de conservación en el Subcentro Ollas Arriba, Panamá Oeste y de la Finca Agroturística, La Isleta ubicada en Guabalá, provincia de Chiriquí.

El protocolo de extracción consistió en un método modificado para mini preparaciones en tubos de 250ul (Villalobos y González 2017). Se

colocaron 10 muestras de pelos de bovino obtenidas de la borla; en cada tubo se agregaron 150ul del reactivo; se aplicó vórtex por 15 segundos; luego se incubaron a 65° C por 6 minutos, nuevamente se aplicó vórtex por 15 segundos e incubaron a 98° C por 2 minutos. Las muestras se guardaron a -20° C para su uso en el experimento.

El rendimiento ADN obtenido fue de 2.2 ng/ul por cada muestra de ADN extraída. La amplificación del segundo exón del gen BoLA-DRB3, se realizó en un equipo de PCR, mediante un protocolo semi-anidado. En las reacciones de PCR se utilizaron los oligonucleótidos: HLO30: 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3'; HL031: 5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'; HL032: 5'-TCGC CGCTCAGTGAACTCTC-3' (Groenen *et al.* 1990; Siguardardorttir *et al.* 1991).

En la primera reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos HL030 y HL031 (0,5mM), en 25µl de mezcla total, con 70 a 100 ng de ADN, 0,2 mM de cada DNTP, 1x de tampón PCR, 1,5 mM MgCl₂ y 1U de Taq ADN polimerasa. El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94° C, 10 ciclos de 25 segundos a 94° C, 30 segundos a 60° C y 30 segundos a

72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72° C (Dietz *et al.* 1997).

Para realizar la segunda reacción se tomaron 5µl de la primera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos HL030 y HL032 en un volumen total de 25µl, con las mismas concentraciones de DNTP, tampón PCR, MgCl₂ y Taq ADN polimerasa y constó de una desnaturalización inicial de 94° C a 4 minutos seguida de 25 ciclos de desnaturalización 94° C a un minuto; anillamiento de 67° C a 2 minutos y elongación de 72° C a un minuto y una extensión final de 72° C por 5 minutos (Takeshima *et al.* 2006).

Los productos de PCR fueron resueltos en un analizador de fragmentos digital. Una vez verificado el tamaño de los fragmentos, fueron sometidos a un proceso de purificación mediante columnas con filtro Microcon de Merck millipore. Se realizó la cuantificación y validación de la calidad de amplicones en un analizador de fragmentos mediante el Kit DNF-915 dsDNA.

De los 22 animales muestreados se tomaron 15 con mejor calidad para realizar la secuenciación de los fragmentos amplificados, los cuales se llevaron a cabo mediante el kit

BigDye® Terminator v1.1 utilizando un equipo de secuenciación Sanger, ABI 3500 de Applied Biosystems. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon en los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) y MEGA 7 (Kumar *et al.* 2015) y posteriormente analizadas utilizando el programa BLASTn del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI). Como secuencia de referencia se utilizó el gen del segundo exón del Antígeno Leucocitario Bovino BoLA-

DRB3.2 del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II), depositado en Genbank, número de accesión, JN887487.1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los fragmentos de 296bp correspondientes al segundo exón del gen BoLA-DRB3 de las poblaciones Guaymí (24, 25 y 27) y Guabalá (37, 38 y 41); a la extrema derecha se presenta el marcador de pares de bases (M) ver Figura.

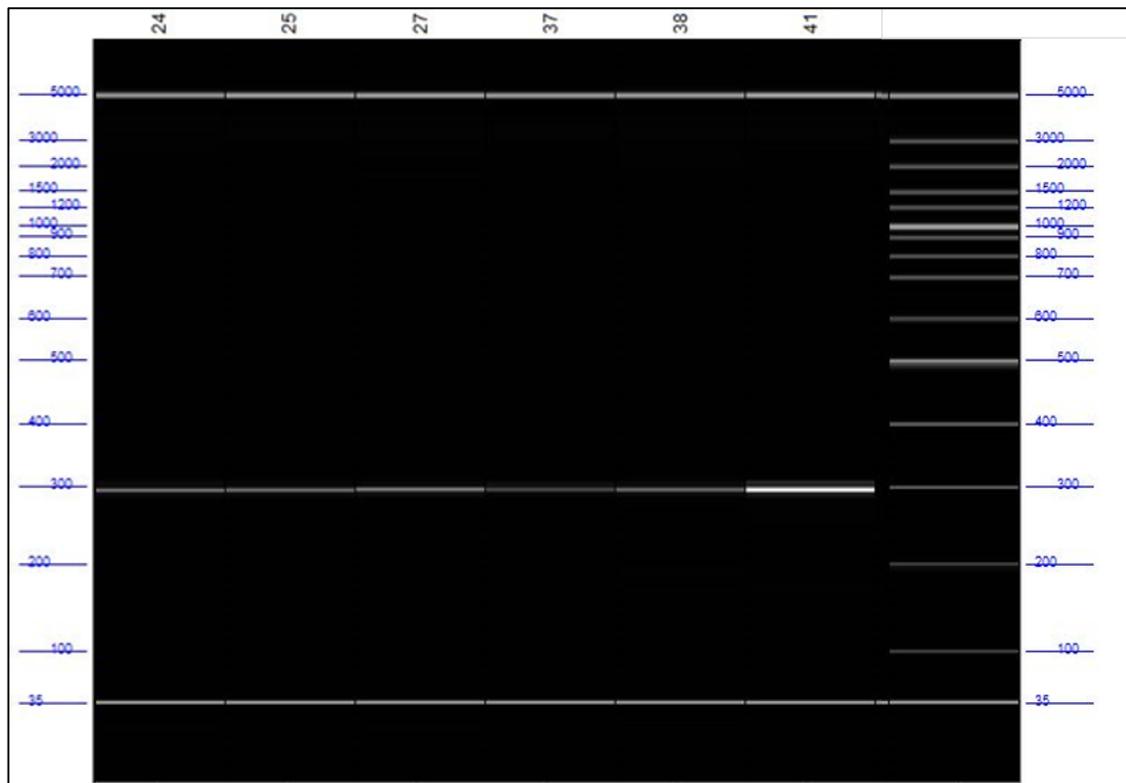


Figura. Electroforesis de amplicones de PCR de 296bp correspondiente al segundo exón del gen BoLA-DRB3; 24, 25 y 27: Bovino Guaymí; 37, 38 y 41 Bovino Guabalá y M marcador de pares de bases, mediante analizador de fragmentos.

El tamaño de fragmento reportado en el presente trabajo (296bp) es menor a los reportados por Maillard *et al.* (1999) y Maillard *et al.* (2003) quienes obtuvieron tamaños de fragmentos de 304bp en estudios similares de razas Cebú de la isla de Martinica; Behl *et al.* (2007) y Behl *et al.* (2009) también reportan tamaños de fragmentos en el gen BoLA-DRB3.2 de 304bp en ganado Kankrej y Sahiwal respectivamente, sin embargo las diferencias en los tamaños son atribuidas a diversos factores particularmente al uso de distintos cebadores a los utilizados en el presente trabajo, por ejemplo, cebadores como Bod1, Bod2 y PASA en el caso de los estudios realizados por Maillard *et al.* (1999) y Maillard *et al.* (2003); LA31 y LA32 en el caso de Behl *et al.* (2007) y Behl *et al.* (2009). Por otro lado, fragmentos con diferencia de 12bp respecto a los resultantes en el presente trabajo reportan otros autores tales como Paswan *et al.* (2005) trabajando con bovinos y búfalos en Izatnagar, India; Parnian *et al.* (2006) en ganado Holstein; Portillo *et al.* (2006) con ganado criollo en México, Pashmi *et al.* (2007) con ganado Holstein, Tamoospur *et al.* (2007) y Sadeghi *et al.* (2008) en ganado Sistani de Irán, Oprzadek *et al.* (2012) en ganado Holstein de Polonia y Mosafer *et al.* (2012) en el búfalo Mazandarani de Irán. Cabe destacar que

en los trabajos arriba citados se utilizaron los mismos juegos de cebadores que en el presente trabajo (HLO30, HLO31 y HLO32).

Una vez lograda la amplificación de los fragmentos del gen BoLA-DRB3 con su correspondiente tamaño de pares de bases, se tomaron 22 amplificados de las muestras con mejor calidad para realizar la secuenciación. Los resultados obtenidos en BLASTn presentaron identidad con el segundo exón del gen BoLA-DRB3 que oscilaron entre 87% y 98%, en cuanto al número de pares de bases (bp), estas oscilaron entre 148 y 239 y valores máximos (MAX SCORE) de entre 165 y 339. Del total de amplificados se obtuvieron 17 diferentes alelos secuenciados. Los más frecuentes fueron *0101 (18%), *R-73 (18%) y *1801 (9%) ver Cuadro.

Los valores para cada población obtenidos en BLASTn donde se observó que la raza Guabalá presentó la mayor diversidad de alelos (11) en relación con la Guaymí (6) ver Cuadro. Los alelos más abundantes en la raza Guabalá fueron, *R-73 (21%) y el *1801(14%) y en la raza Guaymí fue el *0101 (38%). En cuanto a los alelos compartidos, se observó que ambas razas comparten los alelos, *0101 y *R-73. El porcentaje de identidad, en la Guabalá osciló entre 91% y 96%, el bp

CUADRO. VALORES DE FRECUENCIA (FREC), PORCENTAJE DE FRECUENCIA (%FREC), TAMAÑO DE PARES DE BASES (BP), VALOR MÁXIMO, VALOR DE PROBABILIDAD (E-VALUE) Y PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%) DE ALELOS DE SECUENCIAS OBTENIDAS DEL GEN BOLA-DRB3.2 DE LAS RAZAS GUAYMÍ Y GUABALÁ.

RAZA GUABALÁ	FREC	%FREC	bp	Valor Máximo	e-value	% Identidad
*0101	1	7	181	276	1,0E-70	95
*0201	1	7	176	224	5,0E-55	91
*1801	2	14	196	302	2,0E-76	96
*3001	1	7	206	300	1,0E-77	96
*R-08	1	7	197	278	4,0E-71	93
*R-121	1	7	211	302	3,0E-78	93
*R-142	1	7	208	329	1,0E-86	95
*R-177	1	7	209	311	5,0E-81	94
*R-194	1	7	205	309	2,0E-80	95
*R-21	1	7	210	324	6,0E-85	95
*R-73	3	21	212	302	3,3E-67	93
RAZA GUAYMÍ						
*0101	3	38	208	321	6,7E-81	95
*1101	1	13	219	294	5,0E-76	93
*1104	1	13	148	165	3,0E-37	87
*3601	1	13	215	285	3,0E-73	93
*R-09	1	13	224	278	5,0E-71	91
*R-73	1	13	195	281	3,0E-72	95

entre 176 y 212 y el Max Score entre 224 y 324, respectivamente. En ese mismo orden, la raza Guaymí obtuvo porcentajes de identidad entre 87% y 95%, valores de bp entre 148 y 224 y Max Score entre 165 y 321. A diferencia de otros trabajos donde se utilizan el método de PCR-

RFLP (Martínez *et al.* 2005, Hayashi *et al.* 2017), en el presente trabajo se seleccionó el método de secuenciación de amplicones mediante el método Sanger ya que el mismo presenta un mejor poder resolutivo (Baltian *et al.* 2012). Los alelos observados en el

presente trabajo han sido reportados por Martínez *et al.* (2005), como el alelo *0101, *1801, *3001, *1101, en el ganado criollo en Colombia, quienes realizaron estudios de asociación a resistencia a enfermedades como infestación de garrapatas y brucelosis. Por otro lado, De y Singh (2006) reportaron el alelo *0201 y *1801 en razas *Bos indicus* (Gaolao, Sahiwal, Haryana, Red Sindhi and Tarparkar) de la India. Trabajos realizados por da Mota *et al.* (2002) en raza Gyr de Brasil mostraron la presencia de los alelos *0201, *3001, *3601 y *1801 siendo el alelo de mayor frecuencia el *3601.

En un estudio de asociación de alelos con la infección natural de *Babesia* spp. en ganado Hartón del Valle realizado por Bolaños *et al.* (2017) se reportaron los alelos *0101, *1801, *3001, *1101, *1104, *3601 siendo el alelo *1101 identificado como asociado a resistencia a la infección por *Babesia bigemina*. Este mismo alelo ha sido asociado a resistencia a Leucosis bovina en la misma raza (Hernández *et al.* 2011), mastitis subclínica en Holstein (Yoshida *et al.* 2012). Estudios de asociación del gen BoLA-DRB3.2 con perfiles de infección de leucosis enzoótica bovina realizados por Nikbakth *et al.* (2016) en Irán con raza Holstein Iraní, mostraron que el alelo *0101 y *1101

están correlacionados a la susceptibilidad a linfocitosis persistente y el alelo *1802 con susceptibilidad a linfosarcoma. Por otro lado, estos mismos alelos *1101 y *0101 mostraron asociación con la resistencia a linfosarcoma. Por lo que no se descarta la probabilidad que los alelos reportados en el presente trabajo tengan el mismo potencial de expresar este rasgo.

De los alelos DRB3*R obtenidos, las variantes *R-73, *R-142 y el *R-177 fueron reportadas por Posso *et al.* (2012) como alelos nuevos en Hartón del Valle. Igualmente, Wang *et al.* (2008) reportaron el *R-21, *R-73, *R-121 y *R-08, *R-09 *R-142, *R-177, *R-194, en un estudio realizado en bovino amarillo de China realizado en el Colegio de Ciencia Animal y Tecnología de la Universidad Agrícola de China. La relevancia que durante los últimos años han tenido las investigaciones sobre el gen BoLA-DRB3 y otros genes en producción animal desarrolladas por distintos investigadores, es su inclusión en la selección de marcadores de resistencia en el control de enfermedades. Animales con un juego favorable de alelos tienen la capacidad de responder mejor a tratamientos médicos y vacunas a diferencia de individuos susceptibles. Un ejemplo es el caso de los alelos del gen

*BoLA-DRB3*0901*, *0902** y **1701*, asociados a resistencia a la linfocitosis persistente en leucosis enzoótica bovina y una baja incidencia de linfocitos infectados por el virus (Xu *et al.* 1993, Juliarena *et al.* 2017). Además, bajo condiciones naturales, animales con el alelo **0902*, no transmiten la infección en el hato y este último y el alelo **1701*, están asociados a resistencia a infecciones intramamarias de animales de alta producción (Esteban *et al.* 2009). Con los resultados obtenidos sobre *BoLA-DRB3*, Esteban *et al.* (2009) han propuesto un método alternativo de control y erradicación del virus de la leucosis enzoótica bovina utilizando los alelos previamente mencionados creando un perfil de los animales y sus genotipos y variando la frecuencia alélica del hato hacia un mayor porcentaje de animales resistentes, por lo que con el tiempo se podría eliminar la enfermedad.

CONCLUSIONES

Se amplificaron y secuenciaron fragmentos del gen *BoLA-DRB3.2* similares a las obtenidas en razas criollas y cebuinas de otras regiones del mundo y que se encuentran asociadas a la resistencia/susceptibilidad a enfermedades de importancia económica. Desde el punto de vista de la conservación y uso de la biodiversidad,

las razas Guaymí y Guabalá representan un potencial banco de genes que debe ser estudiado y fomentar su uso dentro de programas donde se requiera mínimo uso de insumos o bajo esquemas de cruzamientos donde se requieran animales de alta rusticidad de tipo *Bos taurus x Bos taurus*. Igualmente se abre la posibilidad de desarrollar programas de control y erradicación de enfermedades virales como la leucosis enzoótica bovina mediante la selección asistida por marcadores particularmente del gen *BoLA-DRB3*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aida, Y. 2001. Influence of host genetic differences on leukemogenesis induced bovine leukemia virus. *AIDS Res Human Retroviruses*, 17, S12.
- Baltian, L; Ripoli, MV; Sanfilipo, S; Takeshima, S; Aida, Y; Giovambatista, G. 2012. Association between *BoLA-DRB3* and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. *Mol Biol Rep* 39:7215-7220.
- Behl, J; Verma, NK; Behl, R; Mukesh, M; Ahlawat, SPS. 2007. Characterization of Genetic Polymorphism of the Bovine Lymphocyte Antigen *DRB3.2* Locus

- in Kankrej Cattle (*Bos indicus*) (en línea). J. Dairy Sci. 90:2997–3001. Consultado 13 ene. 2013. Disponible en <https://doi.org/10.3168/jds.2006-547>.
- Behl, J; Kumar Verma, N; Behl, R; Sodhi, M. 2009. Genetic Variation of the Major Histocompatibility Complex DRB3.2 Locus in the Native *Bos indicus* Cattle Breeds. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 22(11):1487-1494.
- Bolaños, I; Hernández, D; Álvarez, D. 2017. Asociación de los alelos del gen BoLA-DRB3 con la infección natural de *Babesia spp.* en el ganado criollo Hartón del Valle. Arch. Zootec. 66 (253):113-120.
- Castro, GS; Trujillo, EB; Duran, CV. 2006. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. Rev Col Cienc Pec. 19:3:270-279.
- Da Mota, AF; Gabriel, JE; Martínez, ML; Coutinho, LL. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). European Journal of Immunogenetics 29:223–227.
- Darwin, Y. 2010. Asociación del locus BOLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis Bovina en razas criollas y colombianas. Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias Coordinación General De Posgrados Palmira. Tesis de Maestría. p. 101.
- Davies, CJ; Andersson, L; Ellis, SA; Hensen, EJ; Lewin, HA; Mikko, S; Muggli-Cockett, NE; Van der Poel, JJ; Russell, GC. 1997. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. Anim Genetics 28:159-168.
- De, S; Singh, RK. 2006. Identification of new MHC-DRB3 alleles from Indian (*Bos indicus*) cattle. Animal Genetics 37:595-607.
- Dietz, AB; Cohen, ND; Timms, L; Kehrlí Junior, ME. 1997. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 80:406-412.
- Do Nascimento, CS; Machado, MA; Martínez, ML; Barbosa Da Silva, MVG; Martins, MFG; Campos, AL;

- Sousa, ALA, Teodoro, RL; Da Silva, RV; Facioni, SEG; Andrade, DAO. 2006. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology* 29(4):641-647.
- Esteban, EN; Poli, M; Poiesz, B; Ceriani, C; Dube, S; Gutierrez, S; Dolcini, G; Gagliardi, R; Perex, S; Lützelshwab, C; Fetdman, L; Juliarena, MA. 2009. Bovine leukemia virus (BLV), proposed control and eradication programs by marker assisted breeding of genetically resistant cattle. *In* Rechi LJ, editor. *Animal Genetics*. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc., p. 107-130.
- Groenen, M; Van Der Poel, J; R. Dijkhof, R; Giphart, M. 1990. The nucleotide sequence of bovine MHC class II DQB and DRB genes. *Immunogenetics* 31:37-44.
- Hall, TA. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hayashi, T; Mekata, H; Sekigushi, S; Kirino, Y; Mitoma, S; Homkawa, K; Horii, Y; Noerimine, J. 2017. Cattle with the BoLA class II *DRB3*0902* allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads. *J. Vet. Med. Sci.* 79(9):1552-1555.
- Hernández, D; Posso, A; Muñoz, J; Giovambattista, G; Álvarez, L. 2011. Evaluación de la resistencia genética del ganado criollo Hartón del Valle al virus de la leucosis bovina. *AICA* 1:169-172.
- Juliarena, MA; Poli, M; Sala, L; Ceriani, C; Gutiérrez, S., Dolcini, G., Rodríguez, EM; Mariño, B; Rodríguez-Dubra, C; Esteban, EN. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gen. *Animal Genetics* 39:432-438.
- Juliarena, MA; Barrios, CA; Lützelshwab, CA; Esteban, EE; Gutiérrez, SE. 2017. Bovine leukemia virus: current perspectives. *Virus Adaptation and Treatment* 9:13-26.
- Kumar, S; Stecher, G; Tamura, K. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary

- Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution.
- Lewin, HA; Wu, MC; Stewart, JA; Nolan, TJ. 1988. Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetic* 27:338-344.
- Maccari, G; Robinson, J; Ballingall, K; Guethlein, LA; Grimholt, U; Kaufman, J; Ho, CS; De Groot, NG; Flicek, P; Bontrop, RE; Hammond, JA; Marsh, SGE. 2017. IPD-MHC 2.0: an improved inter-species database for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res.* 45:D860-D864.
- Maillard, JC; Renard, C; Chardon, P; Chantal, Y; Bensaid, A. 1999. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Anim. Genet.* 30:200-203.
- Maillard, JC; Berthier, D; Chantall, I; Thevenon, S; Sidibé, I; Stachurski, F; Belemsaga, D; Razafindraibe, H; Elsen, JM. 2003. Selection assisted by a *BoLA-DR/DQ* haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genet. Sel. Evol.* 35(Suppl. 1):S193-S200.
- Machado, MA; Nascimento, CS; Martínez, ML; Silva, MVGB; Campos, AL; Teodoro, RL; Verneque, RS; Guimarães, SEF. 2005. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57(3):380-389.
- Mariasegaram, M; Chase Junior; CC; Chaparro, JX; Olson, TA; Brenneman, RA; Niedz, RP. 2007. The slick hair coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. *Animal Genetics* 38(1):54-59.
- Martínez, R; Toro, R; Montoya, F; Burbano, M; Tobón, J; Gallego, J; Ariza, F. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch Zootec.* 54:349-356.
- Martínez, ML; Machado, MA; Nascimento, CS; Silva, MVGB; Teodoro, RL; Furlong, J; Prata, MCA; Campos, AL; Guimarães, MFM; Azevedo, ALS; Pires, MFA; Verneque, RS. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in

- cattle. *Genetics and Molecular Research* 5(3):513-524.
- Mosafer, J; Heydarpour, M; Manshad, E; Russell, G; G. E. Sulimova, GE. 2012. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed (en línea). *The ScientificWorld Journal* Volume 2012, Article ID 863024, 6 pages. Consultado 13 ene. 2013. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1100/2012/863024>.
- Oprządek, J; Urtnowski, P; Sender, G; Pawlik, A; Łukaszewicz, M. 2012. Frequency of BoLA-DRB3 alleles in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* 30(2):91-101. *Biochem Genet* (2016) 54:194-207.
- Nikbakht, G; Ghorbanpour R, A; Esmailnejad, A. 2016. Association of BoLA-DRB3.2 Alleles with BLV Infection Profiles (Persistent Lymphocytosis/Lymphosarcoma) and Lymphocyte Subsets in Iranian Holstein Cattle.
- Panei, CJ; Suzuki, K; Echeverría, MG; Serena, MS; Metz, GE; Gonzales, ET. 2009. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *International of Journal of Dairy Science*.
- Parnian, M; Ali Ghorashi, S; Salehi, A; Pashmi, M; Reza Mollasalehi, M. 2006. Polymorphism of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Holstein bulls of Iran using PCR-RFLP. *IRANIAN Journal of Biotechnology* 4(3).
- Pashmi, M; Qanbari, S; Ghorashi, SA; Salehi, A. 2007. PCR based RFLP genotyping of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Iranian Holstein population. *Pakistan Journal of Biological Science* 10(3):383-387.
- Paswan, C; Bhushan, B; Patra, BN; Kumar, P; Sharma, A; Dandapat, S; Tomar, AKS; Dutt, T. 2005. Characterization of MHC DRB3.2 Alleles of Crossbred Cattle by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18(9):1226-1230.
- Portillo, M; Ríos Ramírez, JG; Erosa, G; Rodríguez, F. 2006. Secuenciación de nuevos alelos BoLA-DRB3.2

- detectados en ganado Criollo mexicano. *Téc Pecu Méx.* 44(1):15-25.
- Posso, AM; Muñoz, J; Giovambattista, G; Álvarez, LA; Hernández, D. 2012. Asociación del gen BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina (VLB) en ganado criollo hartón del Valle. *Acta Agron.* 61(5):22-23.
- Sadeghi, B; Nassiry, M; Heydarpour, M; Shahroudi, F; Mosafer, J; Motlagh, AS. 2008. Characterization of genetic polymorphism of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Locus in Sistani Cattle of Iran (*Bos indicus*). *Biotechnology* 7(2):333-337.
- Sigurdardottir, S; Brosch, C; Gustafsson, K; Andersson, L. 1991. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Animal Genetics* 22:199-209.
- Takeshima, SN; Aida, Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J.* 77:138-150.
- Tahmoorespur, M; Nassiry, MR; Najafi, M; Ghovvati, S. 2007. Genetic Polymorphism at the Candidate Gene in Iranian Sistani Cattle (*Bos indicus*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10:3368-3373.
- Villalobos-Cortés, AI; Martínez, AM; Escobar, C; Vega-Pla, JL; Delgado, JV. 2010. Study of genetic diversity of the Guaymí and Guabalá bovine populations by means of microsatellites. *Livestock Science* 131:45-51.
- Villalobos-Cortés, AI; González-Herrera, RC. 2017. Rendimiento de protocolo de extracción de ADN de bovinos criollos. *Ciencia Agropecuaria* no. 25:108-117.
- Wang, K; Sung, D; Zhang, Y. 2008. Sequencing of 15 new *BoLA-DRB3* alleles. *Int J Immunogenet.* 35(4-5):331-2.
- Wang K; Zhang Y; Sun Dong-Xiao. 2008. Analysis of Sequences of BoLA-DRB3 Genes in Chinese Yellow Cattle[J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica* 39(7):853-857.
- Xu, A; Van 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.

Yoshida, T; Furuta, H; Kondo, Y; Mukoyama, H. 2012. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Anim Sci J*, 83:359-366.

Zambrano, JC; Echeverri, JZ; López, AH. 2009. Asociación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 con mastitis clínica y mastitis subclínica en vacas del hato Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia1. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* 22(3).

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) y Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del presente trabajo.