

01694



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Evaluación de la participación del Complejo Principal de
Histocompatibilidad (MHC) de bovinos (BoLA) en la resistencia y
susceptibilidad hacia la garrapata (*Boophilus microplus*).**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MARIA REBECA ACOSTA RODRÍGUEZ

Tutor : Rogelio Alonso Morales

**Comité tutorial: Clara Gorodezky Lauferman
Zeferino García Vázquez**

México, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico este trabajo con todo cariño a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional durante la realización del mismo, mil gracias!

A Victor por todo tu esfuerzo en estar conmigo.

A la estimada Dra Clara Gorodezky quien siempre me apoyó incondicionalmente tanto para la capacitación de las técnicas de laboratorio como en la dirección y apoyo de la tesis y artículo.

Al querido Dr Zeferino García que sin sus consejos no hubiera terminado este trabajo.

Al Dr Rogelio Alonso por su apoyo en la inscripción a este doctorado y la dirección de este trabajo.

Mi mas grande reconocimiento a los miembros del jurado Dr Juan Antonio Montaraz, Dr Alfredo Zahagun, Dr Sergio Rodriguez Camarillo y Dr Hugo Montaldo por su pronto apoyo en la revision de la tesis y sus amables comentarios.

A la Dra Sandra Balladares por su paciencia, amistad y enseñanza en el uso del secuenciador automático y el analisis de los microsátélites.

A las responsables de los laboratorios, la Biol Amanda Gayoso y la M en C Carmen Alaez por mi capacitación incondicional en las técnicas del laboratorio.

Agradezco el apoyo brindado por mi gran amigo el MC Carlos Maitret propietario del rancho El Porvenir, San Rafael Ver., por el prestamo de animales para el trabajo durante los años 2000 y 2001.

A los MVZ Antonio Figueroa, Felicitas Vazquez, Espiridion Ramos y Octavio Baez asi como a los técnicos Jorge Becerra y Juan Jimenez por su apoyo en el manejo de animales y la recolección de garrapatas en la infestación experimental.

Al Personal de laboratorio de Inmunogenética del InDRE por su buena disposición siempre en mi capacitación.

Un especial gracias al Dr. Epigmenio Castillo G. por sus observaciones y disponibilidad incondicional siempre.

A mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM!!

Resumen

Uno de los principales problemas de salud animal es la infestación por garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades que transmiten. La resistencia del hospedero es el método más efectivo para su control asociado con la vacunación o baños estratégicos. La resistencia y/o susceptibilidad a la garrapata han sido comentadas mediante estudios que demuestran la participación del genes de clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad. El objetivo de este trabajo fue investigar el papel de algunas regiones del BoLA en la resistencia/susceptibilidad a la infestación por garrapatas en dos genotipos de bovinos mantenidos en condiciones naturales y experimentales. La infestación natural fue de junio a agosto del 2001 en 33 machos $\frac{3}{4}$ europeo y la experimental en 59 vacas F1 (Holstein x Cebú) en noviembre del 2001 y 2002. Los animales pertenecían al CEIEGT de Martínez de la Torre, Veracruz. Se contaron todas las garrapatas ≥ 4 mm. Se amplificaron por PCR los microsatelites DRBP1, DRB3, BM1815 y RM185 y se analizaron en un secuenciador automático. Los resultados se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher con el programa SPSS. En los animales infestados naturalmente, se encontraron asociados a la susceptibilidad a la garrapata DRB3-184 ($P=0.02$; $P_c=NS$; $OR=5$; $EF=28\%$) y DRBP1-128 ($P=0.03$; $P_c=NS$; $OR=6$; $EF=42\%$). En los animales infestados experimentalmente, también se encontraron dos loci asociados a la susceptibilidad, BM1815-152 ($P=0.01$; $OR=15$; $EF=74\%$) y DRBP1-130 ($P=0.05$; $P_c=NS$; $OR=4$; $EF=77\%$). Este es el primer estudio que muestra la asociación de los genes del MHC asociados a la infestación a la garrapata, basado en el polimorfismo de microsatelites de clase II. Sin embargo es importante realizar otros estudios y aumentar el tamaño de muestra para confirmar la susceptibilidad y determinar la segregación de los haplotipos en las familias.

Keywords: Resistencia/susceptibilidad bovina, microsatelites, BoLA clase II, *Boophilus microplus*, MHC bovino.

Abstract

Host resistance approach is the most economic and best method of non chemical control of cattle ticks (*Boophilus microplus*). Tick control is most probably multifactorial and genetics may play some role in susceptibility and/or resistance. Genes within the Major Histocompatibility Complex, BoLA class I antigens have been claimed to be associated with tick resistance. The aim of this study was to investigate the role of certain BoLA regions in resistance/susceptibility to tick infestation in two different breeds of cattle, that were maintained, in natural and experimental conditions. The study took place in: June to August 2001 (natural infestation) in 33 $\frac{3}{4}$ European steers and November 2001/2002 (experimental infestation) in 59 F1 (Holstein x Zebu) females of the Research station in Veracruz, Mexico. All ticks over four mm long were counted. DRB3, DRBP1, RM185 and BM1815 microsatellites loci were amplified by PCR method and analysed in an ABI sequencer. The Fisher exact test and SPSS statistical programs were used to assess the comparisons. In the naturally infested animals, DRB3-184 was found positively associated with tick infestation ($P=0.02$ $P_c=NS$; $OR=5$; $EF=28\%$). DRBP1-128 was also found increased ($P=0.03$; $P_c=NS$; $OR=6$; $EF=42\%$). In the experimental infested animals, two more loci were found associated, BM1815-152 ($P=0.01$; $OR=15$; $EF=74\%$) and DRBP1-130 ($P=0.05$; $P_c=NS$; $OR=4$; $EF=77\%$). This is the first study showing MHC genes associated with tick infestation based on class II microsatellite polymorphisms. Further studies are needed to confirm the susceptibility traits and to determine haplotype segregation in families.

Keywords: Bovine resistance/susceptibility, microsatellites, BoLA class II, *Boophilus microplus*, Bovine MHC.

Contenido	Página
Resumen	II
Abstract	III
Introducción	1
Hipotesis y objetivos	6
Revisión de literatura	7
Material y métodos	32
Resultados	39
Discusión	54
Conclusiones	58
Literatura citada	59
Anexos	77

Lista de cuadros	Página
1/ Número de animales utilizados en el estudio preliminar	32
2/ Número de animales utilizados en este estudio	33
3/ Condiciones de amplificación de los microsátélites	36
4/ Distribución de garrapatas por mes de infestación natural durante el año 2000	39
5/ Frecuencias alélicas de los loci DRBP1, DRB3, BM1815 encontradas en las diferentes razas utilizadas en el estudio previo	47
6/ Polimorfismo encontrado para los loci DRBP1, DRB3, BM1815 y RM185 en las infestaciones experimental y natural	49
7/ Distribución y frecuencias alélicas de los loci DRBP1, DRB3, BM1815 y RM185 en la infestación experimental (F1) con <i>Boophilus microplus</i>	51
8/ Distribución y frecuencias alélicas de los loci DRBP1, DRB3, BM1815 y RM185 en la infestación natural (3/4 europeo) con <i>Boophilus microplus</i>	52
9/ Alelos de BoLA asociados a la infestación natural y experimental con la garrapata <i>Boophilus microplus</i>	53

Lista de figuras	Página
1/ Mapas del BoLA	4
2/ Función de II-4 e II-5 en la inducción de reacciones de IgE	16
3/ Estructura de la molécula de MHC clase I	20
4/ Estructura de la molécula de MHC clase II	21
5/ Mapa del cromosoma 23	23
6/ Distribución de garrapatas por individuo en la infestación natural (3/4 europeo)	41
7/ Variabilidad encontrada en una muestra de la infestación natural (3/4 europeo)	41
8/ Distribución de garrapatas por individuo en la infestación experimental (F1)	43
9/ Variabilidad encontrada en una muestra de la infestación experimental (F1)	43
10/ Amplificación de los loci DRBP1 y BM1815	44
11/ Amplificación del locus DRB3	44
12/ Amplificación del locus RM185	45

Lista de Anexos	Página
1/ Loci del cromosoma 23	77
2/ Genes del BoLA	79
3/ Secuencias de ADN en BoLA clase I	80
4/ Haplotipos del BoLA clase II	81
5/ Microsatélites de la región del BoLA	84
6/ Extracción de ADN a partir de sangre	85
7/ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	87
8/ Lectura en el secuenciador automático	88
9/ Electroferograma de los loci DRBP1 y BM1815	89
10/ Electroferograma del locus RM185	90
11/ Electroferograma del locus DRB3 homocigoto	91
12/ Electroferograma del locus DRB3 heterocigoto	92
13/ Distribución de garrapatas por mes de muestreo y por individuo en la población $\frac{3}{4}$ europeo (infestación natural)	93
14/ Distribución de garrapatas por día de muestreo y por individuo en la población F1 (infestación experimental) para los años 2001 y 2002	94

INTRODUCCION

Uno de los principales problemas de salud animal en el ganado bovino es la infestación por garrapatas y las enfermedades que transmiten (babesiosis y anaplasmosis). A través de su acción directa o indirecta sobre la producción animal, causan una de las mayores pérdidas económicas en la ganadería. Las costas del país así como las regiones trópico húmedas son las zonas más afectadas (Quiroz, 1991; Barriga *et al.*, 1995; Beugnet y Chardonnet, 1995; Solomon y Kaaya, 1998).

Las garrapatas son parásitos hematófagos y causan daños neurotóxicos sobre sus hospederos (Quiroz, 1990), por lo que es necesario el control de las garrapatas 1) para eliminar el efecto *per sé* sobre la producción de leche (donde las pérdidas fluctúan entre 12 y 20% según el grado de infestación) o la carne, (según la FAO la infestación en un año equivale a la pérdida de 1 kg/1400 garrapatas); 2) para reducir las pérdidas económicas ya sea por muerte o decaimiento (Quiroz, 1993). Algunas investigaciones informan sobre la reducción de ganancia de peso de 0.6-1 g en ganado de carne por cada garrapata hembra ingurgitada, de lo cual el 65% ha sido atribuido a inapetencia inducida por la infestación (Jonsson, 1997; Jonsson *et al.*, 2000) y de 8.9 ml leche por cada garrapata hembra ingurgitada (Jonsson *et al.*, 2000). Actualmente el control de la garrapata se ha centrado en el uso de acaricidas y el empleo de razas de bovino que tienen algún grado de resistencia a la infestación de garrapata (Frisch, 1999).

La raza de ganado bovino ha sido un factor muy importante en la resistencia a la infestación con garrapatas. Por ejemplo existe una alta resistencia (93%) a las garrapatas (*Boophilus* spp) en el ganado Cebú puro (Africano, Asiático), siguiendo las razas criollas latinoamericanas y la Jersey. Las razas europeas son mas susceptibles a infestaciones con *Boophilus* spp, *Amblyomma* spp y *Hyalomma* spp, que las anteriores (Wambura *et al.*, 1998).

La herencia de la resistencia es alta, en un 40% en animales con baja proporción de sangre *Bos indicus*, y de hasta un 80% en animales con más del 50% de sangre

Cebú. Esta resistencia ha sido determinada por exposición de los animales a zonas endémicas de garrapatas (Maldini, 1992; Tawah, 1992; Jonsson, 1997).

En estudios donde se evaluó la infestación con garrapatas *Amblyomma variegatum* y la dermatofilosis en las razas Cebú y Holstein, se encontró que las lesiones en Holstein no solo se confinaban al lugar de la mordida, sino que se generalizó en todo el cuerpo, mientras que para el Cebú las lesiones se encontraron en el lugar de la mordida de la garrapata. Esto sugirió que el Cebú es capaz de contener el efecto de la garrapata a la región de la mordida, mientras que la Holstein no (Morrow et al., 1996). Por otro lado, Jonsson et al., (2000b) sugieren que la raza Holstein puede ser seleccionada para la resistencia a la garrapata *Boophilus microplus*, sin comprometer el nivel de producción de leche.

La raza también interviene en el desarrollo de larvas, ninfas y adultas, y en la producción de huevos. Solomon y Kaaya (1998) utilizando tres tipos de razas, Arssi (resistente), Boran (medianamente susceptible) y cruza de Boran con Holstein (susceptible) en Etiopía, encontraron que en los animales resistentes, el peso de las garrapatas adultas y el número de huevecillos se reducía en comparación con los animales susceptibles donde el número era mucho mayor (10,578 contra 5,038 promedio de huevos/garrapata).

Desde hace mucho tiempo se han efectuado trabajos para controlar a la garrapata a través de la modificación de su hábitat, del uso de bioacaricidas, del manejo de pastizales y de la utilización de productos químicos (Turner y Short, 1972; Beugnet y Chardonnet, 1995; Rijo, 1995; Dossa et al., 1996; Jonsson, 1997). El mal uso de los acaricidas ha favorecido a la aparición de la resistencia en los parásitos (Sangster, 2001) y el aumento en la prevalencia de la babesiosis en las zonas implicadas, así como la acumulación de residuos en leche, carne y la contaminación del medio ambiente (Dossa et al., 1996). Las vacunas que se han desarrollado contra la garrapata, tienen efecto sobre la reducción de la fecundidad de las mismas que sobreviven en el animal. Sin embargo, en México existen problemas involucrados en su distribución masiva y manejo en su aplicación (Barger, 1989; Garcia-Vazquez, 1991; Solis, 1991; Vega, 1991).

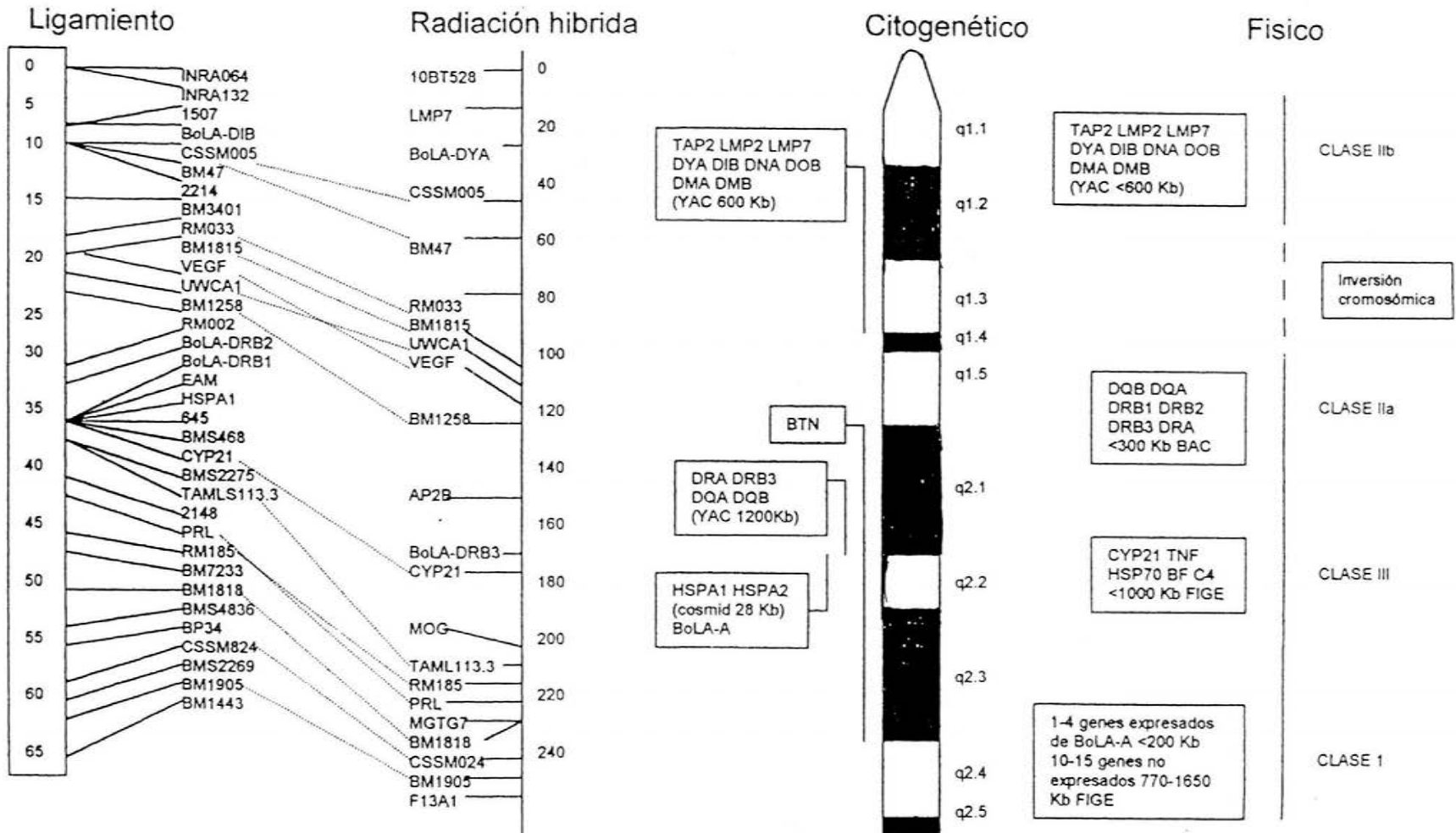
El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es un sistema de genes altamente polimórfico, que se expresan principalmente en todas las células presentadoras de antígeno como macrófagos, dendríticas y linfocitos B. La mayor densidad de antígenos se halla sobre células del aparato inmunocompetente y sobre células presentadoras de antígeno, que son centrales en la respuesta inmunológica. Este polimorfismo tanto en el ganado, como en el ratón y en el hombre influye en la variación de la respuesta inmunológica (Teale *et al.*, 1986). Se conocía poco sobre la respuesta inmunológica celular en el ganado y no existían informes de análisis a nivel clonal de los componentes involucrados en las respuestas inmunológicas de las células mediadoras en bovinos. (Caldwell *et al.*, 1979).

A partir de los 70's el estudio del BoLA (Bovine Lymphocyte Antigens) ha aumentado gracias a los diferentes métodos de serología, y biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los primeros trabajos se hicieron utilizando métodos serológicos semejantes a los utilizados en el humano. En los últimos años, la aplicación de las técnicas modernas inmunológicas y de biología molecular han tenido un considerable progreso para entender la estructura y función del BoLA. Actualmente se conocen los alelos de genes de clase I, así como los alelos de genes de clase II, su organización genética y su localización en el cromosoma (Lunney y Grimm, 1994) como lo muestran las diferentes reuniones internacionales para la definición y estandarización de loci (Russell, 1997; Davies *et al.*, 1997; Barendse *et al.*, 1997; Beever *et al.*, 1996; Eggen y Fries, 1995; Davies *et al.*, 1992) (Anexo 1).

Los mapas de ligamiento del genoma bovino también se han desarrollado exitosamente y hasta 1994 se conocía cerca del 90% del genoma (Barendse *et al.*, 1994), Eggen y Fries (1995) publicaron un mapa integrado citogenética y meioticamente del cromosoma 23 del bovino (Figura 1).

Los estudios de asociación del MHC en la susceptibilidad a enfermedades en ganado bovino se encaminaron a desarrollar mejores métodos para el control de

Figura 1. Mapas del BoLA en el cromosoma 23 (BoLA web site)



las mismas y a entender su influencia en la respuesta inmunológica ante los patógenos (Ellis *et al.*, 1999a). El conocimiento de la participación de algunos antígenos del MHC bovino relacionados a la resistencia a parasitosis ha estimulado el avance en estas investigaciones (Ellis *et al.*, 1999a).

Como son los resultados alentadores con *Tripanosoma* y *Theileria sp* en ganado que implican al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Teale *et al.*, 1994; Spooner, 1997) por asociación de las células que participan en la presentación de antígenos a las células T de bovino restringidas por clase I. *Theileria parva* es un protozooario parásito del ganado capaz de infestar a los leucocitos del hospedero y generar una respuesta de las células T. En el caso de *Tripanosoma*, su asociación con antígenos de clase I no es contundente (Teale *et al.*, 1994), sin embargo los cruzamientos F1 y F2 entre ganado resistente (N'Dama) y susceptible (Boran) junto con los experimentales en ratón cruzando cepas resistentes a *Tripanosoma sp* durante 6 generaciones, podrán arrojar mejores resultados sobre la localización del gen de la resistencia contra *Tripanosoma* (Spooner, 1997).

Los avances en las asociaciones de parásitos tanto externos como internos permitirán manejar más apropiadamente las explotaciones productivas, ampliar el rango de utilización de predios y disminuir la dependencia de drogas para el control de los parásitos. La identificación de genes de resistencia podría ser costoso, pero a largo plazo reduciría costos en tratamientos curativos y profilácticos, y evitaría pérdidas en el rendimiento de los animales (Alonso y Ulloa, 1997).

El objetivo de este estudio fue determinar la participación del BoLA en la resistencia o susceptibilidad a la infestación con garrapatas *Boophilus microplus* en poblaciones de bovinos con diferentes constituciones genéticas en el trópico. Para determinar la variación en el MHC-I y II se evaluaron los alelos presentes en 4 microsatélites, que se localizan en el MHC. Debido a que existe una correlación muy alta entre los haplotipos de algunos microsatelites del MHC y los alelos de los genes del MHC, el ensayo de los microsatelites es una forma indirecta de tipificarlos. Este enfoque es más rápido, económico y práctico.

HIPOTESIS

Existen alelos del BoLA que están relacionados a la susceptibilidad a la infestación de garrapatas *Boophilus microplus* en el ganado bovino.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del BoLA en la susceptibilidad a la garrapata en el trópico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar en el trópico poblaciones de bovinos resistentes o susceptibles a la infestación de la garrapata *Boophilus microplus*.
2. Tipificar los microsatélites asociados a genes de clase I y II del BoLA en individuos susceptibles y resistentes a la garrapata.
3. Determinar si existe alguna asociación entre la susceptibilidad a la garrapata *Boophilus microplus* y los loci de microsatélites del BoLA en poblaciones F1 y $\frac{3}{4}$ europeo de ganado bovino.

REVISION DE LITERATURA

Factores que intervienen en la resistencia a la garrapata

Infestaciones:

Todos los trabajos realizados para el control de la garrapata *Boophilus microplus* estuvieron basados en los 60's en infestaciones naturales y experimentales para identificar a los bovinos resistentes debido a la respuesta inmunológica del hospedero (Roberts, 1968a; 1968b; 1968c; Seifert, 1971; Utech *et al.*, 1978; Sutherst *et al.*, 1979; Mellor *et al.*, 1983;).

Así el grado de resistencia de un animal contra la garrapata se definió como heredable y determinante del número de garrapatas hembras ingurgitadas en un animal por cada día, e indicaba la capacidad del animal a rechazar las garrapatas (Roberts, 1968a; 1968b).

Otros autores calcularon la resistencia del ganado como el promedio en porcentaje de mortalidad de garrapatas en una infestación experimental; cuando la mortalidad era > 95% se definió como alta resistencia (Utech *et al.*, 1978). Así, la resistencia se definió como la capacidad de un animal a limitar el número de garrapatas que maduran en él (Sutherst *et al.*, 1979).

Para Jonsson *et al.* (1997; 1998) la resistencia puede ser tanto innata como adquirida, y se han evaluado otros efectos asociados con la presencia de garrapatas como la raza, la edad, el sexo, la época del año, la lactancia y el periodo de la gestación.

En cuanto a las razas, la composición genética de *Bos indicus* y su cruce se consideraron más resistentes contra *B. microplus* que *Bos taurus* (Teale *et al.*, 1994; Frisch *et al.*, 2000; Wharton *et al.*, 1970; Seifert, 1971; Utech *et al.*, 1978; Guglielmone, 1995).

Por otro lado, los estudios sobre densidad de mastocitos, migración de eosinófilos, histamina total en piel y correlaciones entre sensibilidad de la piel a los alérgenos específicos de la garrapata y la resistencia adquirida, sugieren que el principal mecanismo de esta resistencia es alérgico (Willadsen, 1997). La reacción de hipersensibilidad inmediata en el sitio de mordedura de la garrapata varía entre

los individuos y estimula el acicalamiento para eliminarlas. Así los animales previenen el número de garrapatas eliminando de un 9 a un 54% de larvas dentro de las primeras 24 h de infestación (Roberts, 1968b, Stear et al., 1988; Miranpuri, 1989; Wambura et al., 1998).

En estudios con el modelo murino se encontró que el sexo tiene influencia debido a la presencia de testosterona en los machos adultos. Los animales con altos niveles de testosterona, son más susceptibles a la garrapata y a las enfermedades que transmiten como *Babesia microti*, con un incremento en la virulencia y duración de la infección (Hughes et Randolph, 2001).

Además en trabajos donde se ha medido la pérdida de producción de leche y carne con respecto a la infestación de garrapata (Jonsson et al., 1998) en ganado Holstein se encontró una pérdida de 2.86l/día en vacas infestadas comparadas con el control, y de 10.6 kg. de peso menos, atribuyendo que la pérdida en ambas producciones también se debe al bajo consumo de alimento de los animales infestados.

Con respecto a la resistencia de los becerros al pie (lactantes), la resistencia es mayor que la de sus propias madres en infestaciones naturales y esto puede estar relacionado al tamaño del animal, el área de contacto físico a que sea menor que en la vaca y a su patrón de comportamiento distinto (menos pastoreo a causa del amamantamiento y menor traslado ya que el becerro descansa y duerme más que un adulto). El acicalamiento materno puede ser también un factor muy importante a esta edad (Utech et al., 1978).

Por otro lado, la resistencia también se puede expresar en: a) reducción del número de garrapatas ingurgitadas; b) reducción de la toma de sangre; c) reducción del número y viabilidad de huevecillos; d) prolongación del periodo de ingurgitamiento y e) muerte de la garrapata en el hospedero (Dossa et al., 1996).

En cuanto al método de infestación, se ha demostrado que existe una alta correlación entre las infestaciones naturales y las experimentales, es decir que los animales con altas cuentas de garrapatas en campo presentaban en promedio números altos de garrapatas maduras en desafío experimental (Botstein et al.,

1980), así como se ha visto que las continuas infestaciones incrementan la resistencia del ganado hacia la garrapata (Roberts, 1968a).

Para Oberem (1984), los factores ambientales afectan el nivel de resistencia: 1) estrés, particularmente la nutrición que puede reducir seriamente el nivel de resistencia, 2) fotoperiodicidades cortas, 3) estatus reproductivo, 4) drogas inmunosupresivas y antihistaminicas y 5) la infección debida a la transmisión de *Babesia bovis*, *Trypanosoma congolense*, y la infestación con *D. andersoni* y *R. appendiculatus*.

Otros trabajos mencionan la jerarquía del hato y la capacidad del ganado para detectar sitios infestados con larvas lo cual juega un papel importante en la infestación (Guglielmone *et al.*, 1992). También se ha tratado de relacionar la talla del animal con la resistencia a *Amblyomma hebraeum* (Meltzer, 1996).

Hoy se sabe que la resistencia es multifactorial y se ha calculado su heredabilidad (h^2). La resistencia es tan heredable como la producción de leche o carne y en ganado tropical, puede ser incrementada a altos niveles por selección (Frisch, 1999). En el trabajo de Wharton *et al* (1970), la heredabilidad por regresión de madres a hijos fue de 39% y de 49% en hermanos completos, con una repetibilidad de 60% en ganado Australian Illawara Shorthorn, 48% en ganado europeo y de hasta 82% en cruces F2 y F3 de Brahman con Hereford o Shorthorn (Seifert, 1971). En una recopilación que hicieron Minjauw y de Castro (2000) de varios trabajos encontraron en promedio una heredabilidad del 38%. En Australia en el cruce de Hereford x Shorthorn se ha encontrado una $h^2 = 0.48 \pm 0.08$ (Frisch *et al.*, 2000).

Estos resultados son alentadores para la selección del ganado resistente en los programas de mejoramiento (Jonsson *et al.*, 1998) de producción de leche o carne genéticamente asociados (Mackinnon *et al.*, 1991). La selección basada en un índice que combine el valor genético estimado de la resistencia y la producción en ganado con resistencia moderada a alta, alcanzaría el resultado deseado (Frisch, 1999).

Por último la evidencia de un gen principal asociado a la resistencia a la garrapata, se informó por Kerr et al (1994), utilizando un modelo matemático llamado Findgene para demostrar que el gen existe en el cruce Hereford x Shorthorn. Se ha demostrado que la progenie hereda la resistencia a la garrapata en un alto porcentaje (98%), sugiriendo que esta resistencia es innata. Sin embargo el mecanismo del gen de la resistencia no esta todavía bien entendido pero parece que opera de forma diferente al de la respuesta alérgica. Los análisis preliminares indican que el efecto se debe a un gen principal o a genes multiples identificados en animales homocigotos y heterocigotos por retrocruzas (Willadsen, 1997). Sin embargo, la identificación de este o estos genes deberá hacerse por tecnicas de ADN que ahorraran tiempo y son más precisos (Frisch, 1999).

Métodos de control:

Las vacunas son un método de control no quimico de gran importancia contra las enfermedades (Willadsen, 1997b). En Australia se ha trabajado con estrategias de control biológico contra la garrapata como son: hibridos de *B microplus* x *B. decoloratus* que son estériles, hormigas como la especie *Pheidole megacephala* y termitas como *Anystis baccharion* que son predadores de garrapatas, los pollos que son predadores muy efectivos, parásitos del género *Himenopteran* como *Ixodiphagus hookeri* que parasita a *Amblyomma* e *Ixodes dammini* y hongos como *Beauveria bassiana* en la garrapata de la oreja *Rhipicephalus appendiculatus*, así como pastos como *Stylosanthes scabra* (Jonsson, 1997).

A partir de los años 30's se estudiaron extractos de garrapata completa (*D. variabilis* y *D. andersoni*), mas tarde (60's a 80's) glándulas salivales (*Hyalomma anatolicum*, *R. sanguineus*, *B. microplus* y *D. andersoni*) y hemolinfa, así como de intestino y órganos reproductores (*D. Andersoni*) en los 70's (Oberem, 1984).

En Australia la vacuna TickGARD apareció en el mercado en 1993 y la vacuna GavacTM (Bm86) en Cuba y en Latinoamérica (1994-1997) con la misma cepa (De la Fuente et al., 1999). La vacuna de Bm86 se probó en Cuba, Argentina, Colombia, Brasil y México y su efecto después de la primera inyección con Gavac

fue de 22 semanas en promedio y el tiempo entre los baños acaricidas antes y después de la vacunación fue de 15 y 47 días respectivamente (De la Fuente et al., 1999).

En Cuba se utilizó la vacuna GavacTM en ganado Holstein y sus cruces en 5 provincias con 260 000 animales, obteniendo resultados alentadores. Sin embargo los cambios en la composición de las poblaciones de garrapatas a través de la selección de cepas que evadían la respuesta inmunológica llevaron a buscar otro tipo de vacuna para proteger al ganado (De la Fuente et al., 1997). Estos autores demostraron que se reducía en un 60% el número de tratamientos acaricidas requeridos utilizando la vacuna, que por el costo es una alternativa muy atractiva para los ganaderos. En vacas Holstein lactantes se usó una nueva vacuna Bm86 TickGARD^{PLUS} (Jonsson et al., 2000a) y se encontró una reducción en el número de garrapatas del 56% en los animales vacunados.

La vacuna se basa en el antígeno Bm86 que está localizado en la superficie de las células epiteliales digestivas que cubren el intestino de la garrapata en baja abundancia, la cual está estimada entre 10^5 y 10^6 moléculas por célula intestinal (Gough and Kemp, 1993). Aunque su función biológica se desconoce, se ha asociado con endocitosis (García-García et al., 1999). La garrapata ingiere anticuerpos en contra del Bm86 de ganado previamente inmunizado y los anticuerpos identifican las proteínas en su intestino, ocasionando la lisis de las células intestinales, del mismo modo el número de garrapatas ingurgitadas en el ganado vacunado es reducido (no completan el ciclo) y las que sobreviven tienen pesos inferiores y una reducción en la puesta de huevos (Willadsen, 1997a y b ; García-García et al., 2000).

Otra vacuna utilizada es la Bm91, el antígeno Bm91 se expresa como una proteína recombinante en *E. coli* y puede aumentar significativamente la eficiencia de Bm86. Este antígeno se encuentra tanto en el intestino como en glándulas salivales de la garrapata (Willadsen, 1997). Se han utilizado otros vehículos para expresar las proteínas vacunales como Baculovirus y *Aspergillus spp* pero sus niveles de expresión de la proteína fueron muy bajos. También se ha empleado la

levadura *Pichia pastoris* donde se obtuvieron niveles muy altos de expresión y se le utilizó para una nueva vacuna Bm95 la cual se comparó con la Bm86 siendo mucho mas efectiva que esta ultima (García-García et al., 2000).

Sin embargo, las vacunas ofrecen un control parcial solamente contra una especie, *Boophilus microplus*. Por ejemplo, las diferentes especies de garrapatas *Boophilus annulatus* han mostrado varios grados de susceptibilidad a las vacunas asociadas a Bm86 debido a los cambios evolutivos en la adaptación de las especies de garrapata a diferentes medios ambientes (De la Fuente et al., 2000). Además la vacuna utilizada en animales de baja resistencia (<85%) o expuestos a alto riesgo de infestación, no controla satisfactoriamente a la garrapata, por lo que se recomienda utilizar acaricidas estratégicamente junto con la vacunación del ganado. Además, si el mejoramiento de la vacuna es técnicamente posible utilizando múltiples antígenos, sería importante integrar la utilización de la vacunación y el hospedero altamente resistente lo cual tendrá un mejor costo efectivo en el control de la garrapata que la utilización de la vacuna sola, sobre todo en sistemas de pastoreo extensivo (Frisch, 1999).

Sitte et al (2002) mostraron que una eliminación en el codon 65 del exon 2 del DRB3 altera la especificidad del sitio de respuesta al antígeno (ARS) pudiendo tener un impacto en la respuesta inmunológica en la vacuna TickGard. El componente inmunogénico de TickGard es la glicoproteína Bm86 derivada del intestino de la garrapata, en ella se identificó un posible epitope que según el modelo es capaz de ligar con alelos donde el codon 65 se ha borrado, por lo que los homocigotos mostraron una alta respuesta a la vacuna, a diferencia de los heterocigotos. Por ello las vacunas pueden no ser muy efectivas.

La vacuna TickGard también se ha utilizado contra otras especies como *Hyalomma* spp, *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma variegatum*, y funciona mejor contra *Hyalomma* spp que en *B. microplus* y sin respuesta significativa en las otras dos especies. Los factores involucrados en esto son, el grado inmunológico de reacción cruzada entre los antígenos Bm86 homologos de diferentes especies, diferencias en la biología de Bm86 de cada especie

(concentración y localización) y susceptibilidad de cada especie de garrapata a la vacunación (De Vos et al., 2001).

Existen otras proteínas que actúan contra *B. microplus* como son: BMA7 (Mucin-like protein), pro-Cathepsin, β -N-acetyl hexosaminidasa (hidrólisis oligosacáridos), vitelina, antígeno B, Aff-HNAg y p29, de las cuales existe evidencia como probables antígenos vacunales, pero la solidez de esta evidencia varía. Un segundo grupo de proteínas como son: Ig ligada a proteína (*R. appendiculatus*), Cathepsina-like proteinasa (*H. longicornis*), Inhibidor del factor Xa (*O. savignyi*) y α -macroglobulina-like (*O. moubata*), las cuales se han caracterizado a nivel molecular y podrían ser antígenos potenciales para futuras vacunas (Willadsen, 2001).

Otra alternativa interesante, son los péptidos sintéticos a partir de Bm86 como vacunas contra *B. microplus*, como: SRm4912, SBm7462 y SBm19733, obteniéndose buena respuesta inmunológica de los dos primeros. Los autores sugieren que las vacunas sintéticas pueden reemplazar a las existentes debido a su menor costo, no necesitan cultivos fermentados y no están contaminadas (Patarroyo et al., 2002).

Ciclo biológico de la garrapata *Boophilus microplus*

Boophilus microplus es una garrapata de un solo hospedero. El hospedero principal es el ganado bovino aunque ocasionalmente se encuentra en caballos, venados y perros (Quiroz, 1990). En el bovino las garrapatas adultas se localizan en la papada, axila, entrepierna, abdomen, región anocaudal y genitales. Las larvas y ninfas algunas veces se encuentran en las orejas. La garrapata se encuentra todo el año en zonas tropicales y en forma estacional en zonas subtropicales de México. La mayor abundancia es durante la época de lluvia cuando la humedad relativa es del 80% y la temperatura es de 28°C que son apropiadas para el desarrollo completo del ciclo biológico.

Boophilus microplus pasa a través de tres fases en su ciclo de vida: a) fase de vida libre; b) fase de búsqueda del hospedero y c) fase parasitaria donde se realiza la alimentación y apareamiento de la garrapata. El tiempo que dura la fase

parasitaria es relativamente constante de 18 a 22 días y la tasa de mortalidad durante esta fase esta determinada por la resistencia del hospedero (Jonsson NN, 1997).

El desarrollo y sobrevivencia de la fase de vida libre esta determinada por el clima, la topografía y el tipo y cantidad de vegetación. La temperatura del suelo inferior a 17.5°C inhibe la ovoposición y la eclosión de huevos. La duración del desarrollo de los huevos depende de temperaturas mayores a 16°C y varía de 22 a 116 días. La sobrevivencia de las larvas en pasto es muy variable, de 28 a 245 días, a temperaturas mayores de 25°C la sobrevivencia disminuye. La mayoría de la hembras ingurgitadas caen del hospedero entre las 6 y 9 h del día (Jonsson, 1997). La temperatura y la humedad relativa son factores claves que gobiernan los principales aspectos del ciclo de vida de la garrapata. Además, la mortalidad de la garrapata es el resultado de complejas interacciones entre temperatura, humedad relativa, lluvia y/o evaporación (Estrada-Peña, 2001).

Las características del ciclo biológico son:

- La hembra ovoposita más de 4000 huevos
- Periodo de preovoposición es de 2-39 días
- Periodo de ovoposición promedio de 4-44 días
- Periodo de incubación de huevos de 14-146 días
- Larva alimentada y muda (cambio de caparazón) de 7 a 12 días
- Cambio de larva a ninfa un promedio de 10 días
- Ninfa alimentada y muda de 7 días
- Alimentación (repleción) de hembra de 7-9 días

Evasión de la respuesta inmunológica

La respuesta del hospedero a la saliva puede neutralizar las moléculas esenciales para la alimentación de la garrapata (inhibidoras de la via de coagulación y de formación de plaquetas, vasodilatadoras, etc), sin embargo tanto a corto como a largo termino, los artrópodos han desarrollado contramedidas para ambas respuestas, la innata y la adquirida. La garrapata evade la respuesta

inmunológica para sobrevivir, pero existen consecuencias secundarias importantes como la modulación de la inmunidad del hospedero, que es clave en la transmisión de patógenos (Wikel et al., 2001).

Los efectos de inmunosupresión de la saliva de la garrapata incluye tanto la inmunidad innata como la adaptativa. La saliva contiene sustancias que bloquean la respuesta inmunológica del hospedero, inmunosupresivas, antihemostáticas y vasoactivas. La saliva o extractos de glándulas salivales inhiben la activación de la vía alterna del complemento, inactiva las anafilotoxinas y previene la fagocitosis y la producción de superóxido por los neutrófilos y la producción de óxido nítrico por los macrófagos, del mismo modo que la inhibición del efecto de las células NK (Kopecky et al., 1999). Estudios con linfocitos periféricos sanguíneos *in vitro* mostraron la inhibición de su crecimiento frente a saliva y proteínas de glándulas salivales (Inokuma et al., 1993).

Existe también la acción de la Cinasa de la saliva que corta a la bradicinina, que es un mediador de la respuesta comezón/dolor que puede inducir frotamiento (Wikel et al., 2001). Por otro lado se ha encontrado en la saliva de *Dermacentor andersoni*, una proteína (Da-p36) por el método de amplificación rápida de terminaciones de cDNA (RACE) que suprime la proliferación de linfocitos T del hospedero y que se encuentra en la saliva hasta los últimos seis días de alimentación de la garrapata, disminuyendo después cuando la garrapata ya está repleta (Bergman et al., 2000).

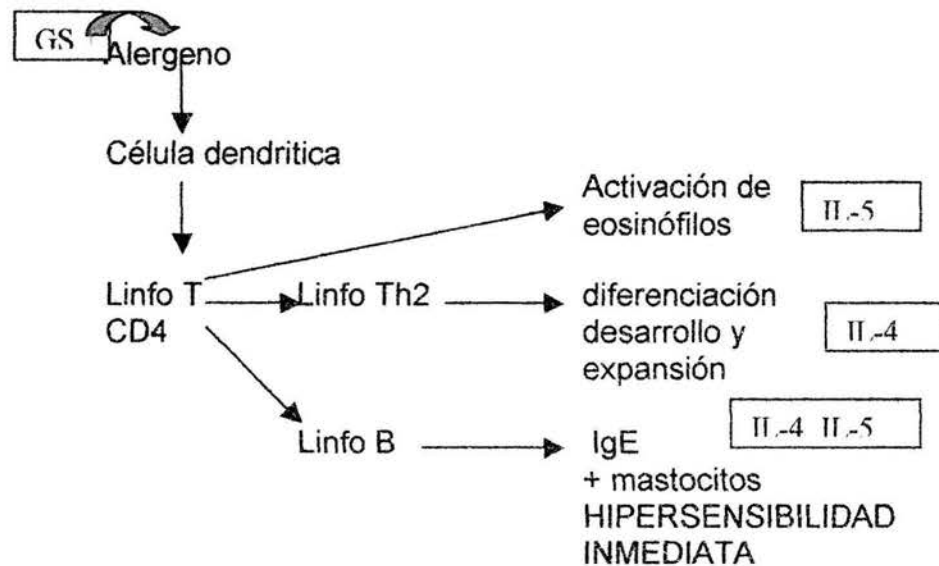
Trabajos posteriores identificaron y sintetizaron prostaglandinas en la saliva de *Amblyomma americanum* por medio de RIA y gas cromatografía/espectrometría de masa, específicamente PGE₂ y PGF_{2α} en glándulas salivales, saliva y hemolinfa (Aljamali et al., 2002). Las prostaglandinas son metabolitos oxigenados de ácidos grasos poliinsaturados, notablemente ácido araquidónico, que ayudan al parásito a modular la inflamación y respuesta inmunológica (Bowman et al., 1996). Del mismo modo la presencia de trombina y los inhibidores Fxa parecen ser una estrategia exitosa evolutivamente desarrollada por la garrapata para alimentarse, porque

ambas moléculas intervienen en el mantenimiento de la cascada de coagulación (Francischetti et al., 2002).

Referente a las citocinas, la saliva disminuye la síntesis de citocinas reguladoras como la IL-1 y TNF- α de los macrófagos y de IL-12 y IFN- γ de los linfocitos Th1. Kopecky et al (1999) demostraron que mientras la saliva disminuye la regulación de estas, existe una sobre regulación de IL-10 que actúa suprimiendo la función del IFN- γ . Suprimiendo la IL-12 por los macrófagos, es probable que la garrapata desvie la respuesta hacia Th2, que es responsable del desarrollo de la inmunidad humoral (Kopecky et al., 1999).

Los linfocitos Th1 y las citocinas IL-12 e IFN- γ están involucrados en la respuesta inflamatoria, mientras que los linfocitos Th2 y las citocinas IL-4 e IL-5 intervienen en la activación de eosinófilos y la síntesis de anticuerpos especialmente IgE (Fig 2).

Fig.2. Función de IL-4 e IL-5 en la inducción de reacciones de IgE



GS = glándulas salivales de garrapata.

Tomado de Abbas y Lichtman (2003)

La IL-4 promueve el desarrollo de los linfocitos Th2 que actúan como fuentes principales de esta citocina y favorecen las respuestas de IgE. La desgranulación

de las células cebadas o mastocitos también libera IL-4, lo cual promueve aún más esta reacción (Tizard, 2000).

Respuesta inmunológica del hospedero

Existen tres grupos de genes que afectan la resistencia:

1. Los responsables de la inmunidad innata
2. Los que determinan la especificidad de la respuesta adquirida
3. Los que afectan la calidad de la respuesta adquirida (Doenhoff, 2000).

Entre la inmunidad innata y la adquirida existe una interacción en sus funciones, la respuesta adquirida primaria es iniciada solamente después de que los mecanismos innatos han operado.

Así las barreras de protección de la inmunidad innata son: el pelo, la piel, el moco, las secreciones ácidas, la actividad ciliar en el tracto respiratorio, la lisozima en el sudor, la lágrima y la expropiación de nichos habitables por bacterias normales del intestino y piel.

Desde el punto de vista histológico en la piel donde se adhiere la garrapata, la lesión básica que se forma es un absceso inflamatorio estéril en la dermis dominada por la infiltración de neutrófilos y células mononucleares y más tarde por linfocitos y macrófagos. Una pustulación intra-epidérmica reduce la adhesión de la garrapata, aunado a esto hay una infiltración en la dermis de números extra de células de todo tipo lo que reduce el ingurgitamiento de las garrapatas. Esta presentación varía según la especie de garrapata (Latif et al, 1991).

Dentro de las características que distinguen la respuesta adquirida son: la especificidad de interacción con el antígeno, su capacidad para distinguir lo propio de lo ajeno y su memoria.

La especificidad de la respuesta adquirida está gobernada por la presentación del antígeno y el reconocimiento de moléculas mediada por células y/o por anticuerpos donde están involucradas tres tipos de células: a) células presentadoras de antígeno que expresan MHC clase I y II y CD1; b) células T con su receptor TCR y c) células B que producen inmunoglobulinas (Doenhoff, 2000).

En estudios de resistencia en *Bos indicus* bajo infestaciones repetidas se ha encontrado que en la primera infestación el hospedero desarrolla un fuerte mecanismo de defensa pero como la garrapata continua inyectando sustancias inmunosupresivas para evitar su completa eliminación, la respuesta inmune declina después de la cuarta infestación y la resistencia decae tanto para ninfas como adultas (Dossa et al., 1996). Este fenómeno de debilitamiento en la resistencia después de sucesivas infestaciones puede explicar porque las razas de ganado Africano pueden cargar grandes cantidades de garrapatas aunque estén expuestos a la garrapata por largos periodos. Esta idea necesita ser estudiada a fondo para conocer los mecanismos y factores bioquímicos involucrados (Dossa et al., 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que una amplia variedad de respuestas inmunológicas están implicadas en el rechazo y/o destrucción de diferentes parásitos en la relación hospedero-parásito (Baron and Weintraub, 1987). Entre las cuales se encuentran la reacción de hipersensibilidad inmediata, la respuesta humoral y la respuesta celular (Oberem, 1984; Tizard, 2000; Abbas, 1998; Abbas y Lichtman 2003). La expresión de estas respuestas varía dependiendo del hospedero y la especie de garrapata involucrada.

En el estudio de Miranpuri (1989) se ha observado que el ganado resistente a *B. microplus* tiene niveles significativamente elevados de histamina comparado con los controles susceptibles. Los antígenos involucrados en las dos especies diferentes de garrapatas (*B. microplus* y *H. anatolicum*) son específicos y los individuos tienen diferentes niveles de respuesta hacia los antígenos diferentes de las garrapatas.

La primera respuesta del hospedero hacia la saliva de la garrapata es de tipo de hipersensibilidad inmediata.

Primero, las células dendríticas capturan la saliva como antígeno y en ganglios linfáticos lo presentan a los linfocitos Th2, el cual tiene dos tipos de respuesta al mismo tiempo: produce IL-5 para la activación de eosinófilos y producir alergia, y produce IL4 que interviene en la expansión, desarrollo y diferenciación de Th2.

Ambas interleucinas intervienen en la activación de los linfocitos B para la producción de IgE (Fig 2).

La hipersensibilidad inmediata tipo I o alergia, es la reacción inflamatoria aguda mediada por IgE unidas a células cebadas (mastocitos) y a basófilos, éstos liberan factores vasoactivos que producen exudación vascular, contracción del músculo liso e infiltración por eosinófilos (Tizard, 2000; Abbas y Lichtman., 2003).

Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex MHC)

La investigación en el campo de la histocompatibilidad se conoce desde los primeros trasplantes y rechazo de injertos hechos en ratón (H-2) por George Snell y por Jean Dausset en el hombre (HLA) (Abbas, 1998).

Estos complejos que son los mas conocidos dieron la definición general al Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) como un segmento cromosómico que porta un conjunto de genes, funcionalmente y topograficamente ligados, que codifican para los antígenos presentes sobre las células nucleadas del individuo, interviniendo entre otros en los diversos mecanismos inmunológicos (Maillard et al., 1989).

Los cromosomas portadores del MHC varían según la especie (siendo el 6 en humanos, el 17 en el ratón, el 23 en bovinos, entre otros). Existen dos clases de genes que codifican diferentes antígenos linfocitarios, cada clase tiene especificidad, estructura molecular y un papel inmunológico diferente. (Maillard et al, 1989) (Fig 3 y 4). Cualquier célula T (CD4 o CD8) es capaz de reconocer antígenos extraños unidos a una molécula de clase I o clase II del MHC, y en cada individuo, el receptor antigénico de las células T maduras es específico para el complejo formado por un antígeno proteico extraño y una molécula propia del MHC (Abbas and Lichtam, 2003).

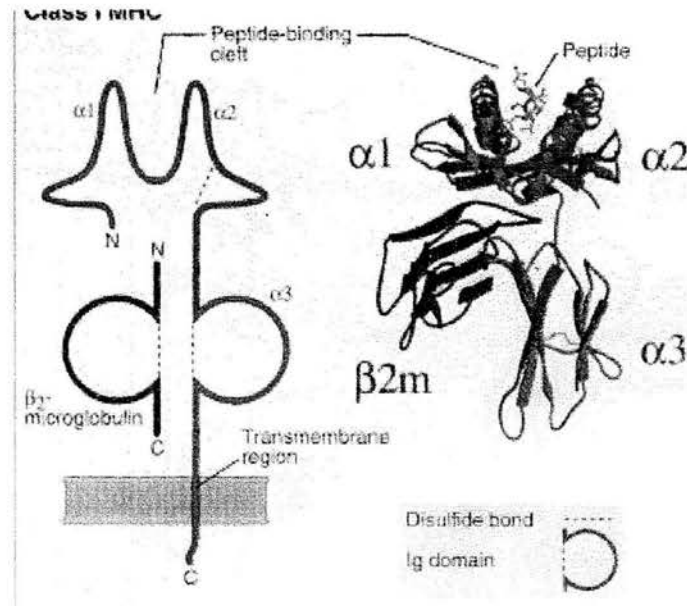


Fig 3. Estructura de la molécula de MHC clase I. El esquema de la izquierda muestra las regiones de la molécula MHC. Cadenas α polimórficas asociadas en forma no covalente a $\beta 2$ microglobulina. La parte derecha muestra la cristalografía (Abbas y Litchman, 2003).

Antígenos de linfocitos bovinos (Bovine Lymphocyte Antigens) BoLA

Los genes que componen el MHC bovino se conocen como BoLA (Bovine Lymphocyte Antigens).

El BoLA se encuentra en el brazo corto del cromosoma 23 y contiene tres regiones llamadas clase: I, II y III. En la banda 22 se encuentran las clases I y III y parte de la II (DQ y DR), el resto de la clase II se encuentra en la banda 12-13 cerca del centrómero (Rothschild et al., 2000). La estructura actual del cromosoma 23 se muestra en el anexo 1.

Los productos de las clases I y II son moléculas que se expresan sobre las células y están involucradas en la inducción y regulación de la respuesta inmunológica. Los productos de la clase III tienen un amplio rango de actividades que van desde su participación en la citotoxicidad (TNF: tumor necrosis factor) hasta actividades metabólicas como la de la 21β hidroxilasa y del complemento (Sharif et al., 1998).

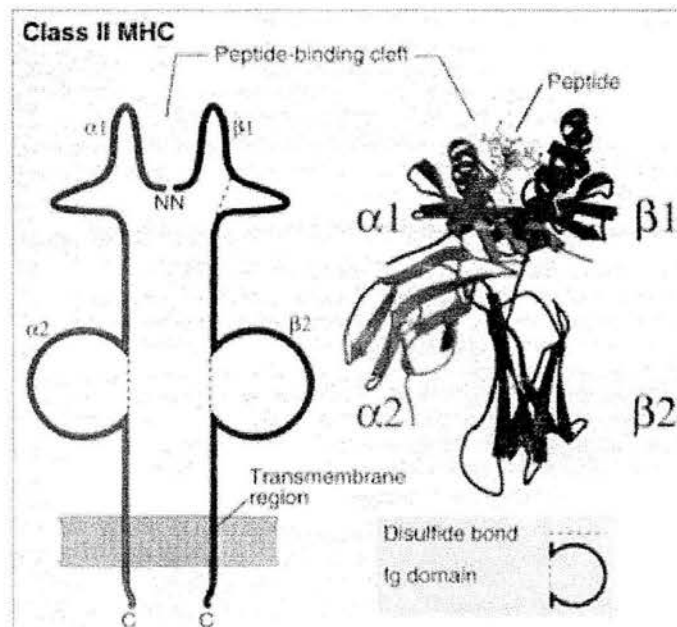


Fig 4.. Estructura de la molecula de MHC clase II. El esquema de la izquierda muestra las regiones de la molecula MHC. Cadenas α y β polimorficas. La parte derecha muestra la cristalografía (Abbas y Litchman, 2003).

Los genes de clase I y III se encuentran estrechamente ligados en la banda 22 del cromosoma 23 (McShane et al., 2001). Los genes de la clase II están distribuidos en dos distintas regiones IIa y IIb separados por 17cM con una frecuencia de recombinación aproximada de 17%, conforme a estudios realizados con mapas de análisis de ligamiento, de radiación híbrida y cromosomal FISH (Fluorescent in situ hybridization). Esta interrupción probablemente fue causada por una simple gran inversión cromosomal (McShane et al., 2001).

Los genes DRA, DRB, DQA y DQB están localizados en la región IIa, mientras que los genes DOB, DYA, DYB y DIB están en la region IIb. Existen al menos tres genes parecidos DRB, de los cuales el DRB1 es un pseudogene, el DRB2 se expresa en niveles bajos y solo el DRB3 esta expresado considerablemente en un polimorfismo elevado (Burke et al., 1991; van Eijk et al., 1992). (Fig 5).

Los primeros trabajos en el BoLA fueron con las pruebas de linfotoxicidad en el locus A de la clase I (Caldwell *et al.*, 1979) y clase II (Teale *et al.*, 1986), así como de comparación de linfocitos (Stear *et al.*, 1985), enzimas de restricción para clase II (Andersson *et al.*, 1986a, Sigurdardottir *et al.*, 1988), polimorfismo en clase II (Andersson *et al.*, 1986b; Sigurdardottir *et al.*, 1991b), clonación de clase I (Ennis *et al.*, 1988), clonación de clase II (Muggli-Cockett and Stone, 1988, Muggli-Cockett and Stone, 1989, Groenen *et al.*, 1989), utilización de monoclonales en clase I (Bensaid *et al.*, 1989a), en clase II (Bensaid *et al.*, 1989b, Dutia *et al.*, 1995) y relaciones del BoLA con el grupo sanguíneo M (Hines and Ross, 1987).

Los primeros antígenos en el BoLA clase I fueron definidos en el primero y segundo Taller internacional del BoLA con la letra "W", "Eu" por el taller europeo y "CA" por los antígenos definidos en Cambera en los años 80's (Stear *et al.*, 1990). En 1997 se publicó la secuencia de los nucleótidos de BoLA clase II en el informe del Comité de nomenclatura del BoLA, ISAG (Russel *et al.*, 1997).

BoLA clase I expresa una variación en el número y composición de genes expresados en haplotipos del MHC. Ellis *et al.*, (1999b) mostraron en ganado Holstein (*Bos taurus*) y Boran (*Bos indicus*) una diferencia entre razas, pues existen cuatro o mas loci expresados de clase I pero con dificultad para asignarles un locus por secuenciación, y 10 posibles detectados por southern blot y analisis genómico de los cuales algunos son pseudogenes. Algunas de estas variaciones pueden deberse a un "crossing-over" desigual debidas a la cercanía de los genes (<500 pb) lo que conlleva a una variación en la configuración de los genes. Mas tarde en los trabajos de Sawhney *et al.* (2001) la región polimórfica del exon-2 exon-3 amplificada por PCR-RFLP solo pudo amplificarse en familias como haplotipos debido a su segregación en parejas. Se informaron 10 haplotipos.

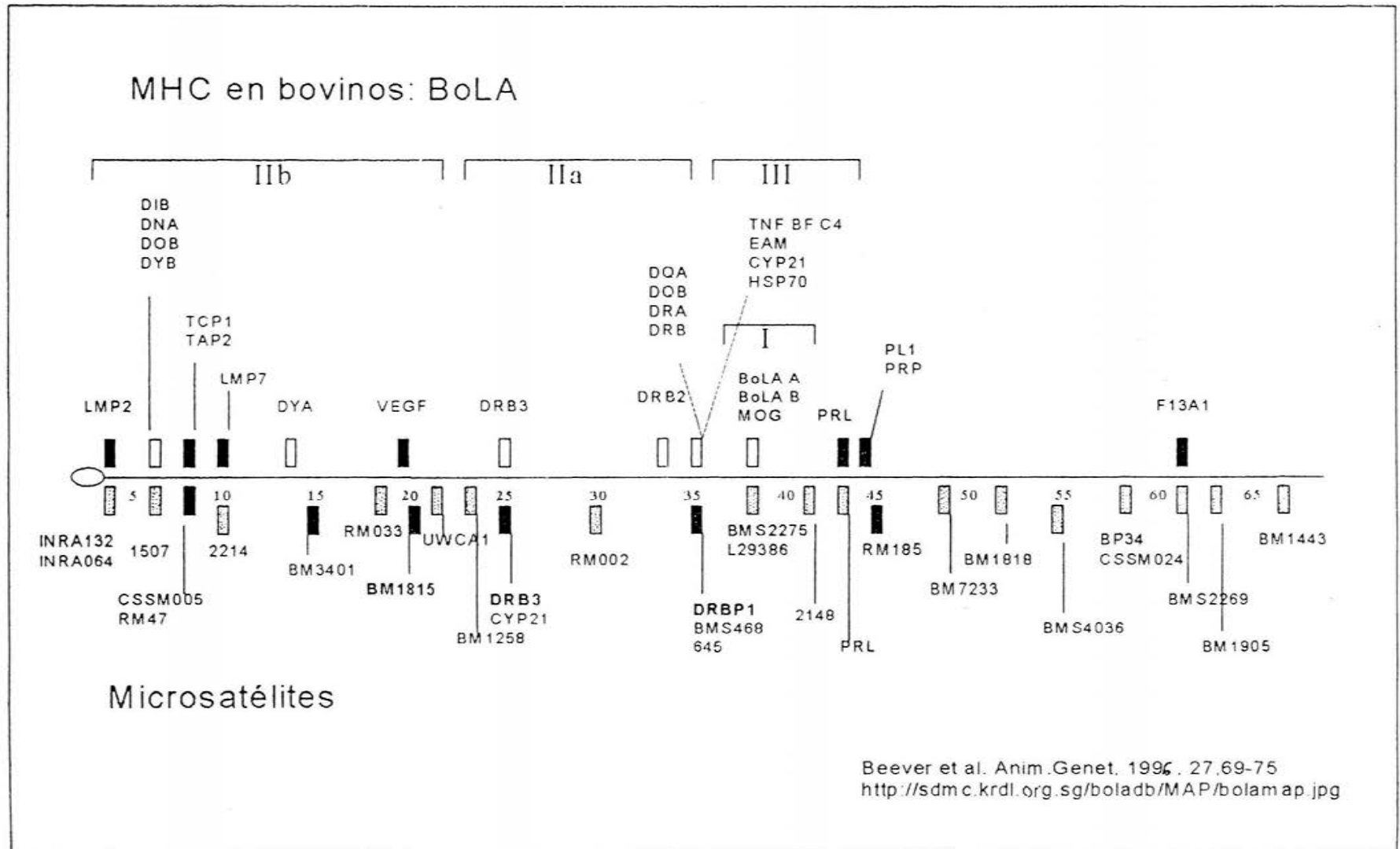


Figura 5. Mapa del cromosoma 23

El ganado expresa un par de genes DR clase II: DRA y DRB3. El gen DRA es monomórfico, y DRB3 es el más polimórfico. Se conocían 14 alelos (Sigurdardottir *et al.*, 1991^a) y más tarde alrededor de 66 alelos. (Davies *et al.*, 1997). Hay tres genes DQ por haplotipo (Burke *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1993; Aida, 1994; Fraser *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1994; Ballingall *et al.*, 1997) donde los genes DQA y DQB son polimórficos y se han caracterizado aproximadamente de 26 a 31 alelos: 15, 6, y 8 alelos para DQA1, DQA2 y DQA3 respectivamente (Stear *et al.*, 1988; Leveziel, 1989; Xu *et al.*, 1991). Más tarde un adicional DQA4 (Ballingal *et al.*, 1998) y un nuevo DQA5 (BN113) (Gelhaus *et al.*, 1999a). Del DQB se conocen 5 loci (Marello *et al.*, 1995; Gelhaus *et al.*, 1999b). Russell, (2000) informó los haplotipos del BoLA clase II que expresan DQB por RFLPs. Con RFLP's se ha evaluado el exon 2 del DRB3 en diferentes razas y hay diferencias en las distribuciones alélicas entre razas (Miretti *et al.*, 2001).

Morooka *et al.* (1995) informaron de un nuevo gen A2 en DQ, y se ha comprobado ligamiento entre DQB y BoLA-A (Xu *et al.*, 1991). Estudios posteriores en el locus DQB mostraron nuevos alelos: DQB1*15, *16 y *17, DQB3*2 en ganado *Bos indicus* (Marello *et al.* 1995).

Los haplotipos del BoLA clase II definidos en el 5º Taller Internacional del BoLA (Lunney y Grimm, 1994) usaron múltiples métodos para tipificar lo que probablemente represente la única combinación de los alelos DR y DQ. La nomenclatura de haplotipo (DH) fue basada en el método más específico y disponible, PCR-RFLP del exon 2 de DRB3, pero solamente 13 de los 31 haplotipos de clase II asignados fueron definidos por este método (van Eijk *et al.*, 1992) y más tarde, 14 alelos identificados por Gelhaus *et al.* (1995). BoLA-DYA fue identificado a partir de DQA del humano, con un 75% de similitud. El gen DIB es parecido a DYA y según los resultados ambos son transcritos, aunque con bajos niveles y con una distribución poco usual en los tejidos (Ellis y Ballingall, 1999a) (Anexos 2-4).

No todos los haplotipos de BoLA tienen el mismo complemento de genes, sobre todo con la variación principalmente en la clase I y regiones DQ. Los genes DQA1-

DQA4 han sido identificados por el análisis del MHC en ganado homocigoto, representado en dos subespecies: *Bos indicus* y *Bos taurus*. Los análisis de PCR-RFLP sugieren que DQA1 solo y DQA1/DQA2 que es un par de genes duplicados, se encuentran en los haplotipos de bovinos europeos, mientras que los haplotipos del ganado Cebú de Africa son frecuentes (no siempre) el duplicado de DQA2 y DQA3/DQA4 (Stear *et al.*, 1989).

El locus DRB3 exon 2 ha sido estudiado en diferentes razas bovinas (Holstein y Jersey). Es muy polimórfico (66 alelos) por PCR-RFLP (Davies *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1997). Los alelos mas frecuentes encontrados en Holstein son DRB3.2*8, *11, *16, *22, *23 y *24 que representan un 70-83% en la población, y en Jersey, DRB3.2 *8, *10, *15, *21 y *36 representado un 74%. Se ha visto que estos alelos están relacionados con inmunidad, número de células somáticas e incidencia de mastitis (Gilliespie *et al.*, 1999). Sin embargo solo tres secuencias han sido informadas en la literatura: DRB3*0102, *1601 y *3101 (Russell *et al.*, 2000).

Takeshima *et al* (2001) por medio de Sequence Based Typing (SBT) definió 103 alelos del DRB3 en 12 razas diferentes. Encontraron los alelos DRB3*2006, *2502, *4501 y *4401 solamente en la raza Jersey. Existen diferencias entre razas con respecto a las frecuencias de los alelos del DRB3 (Takeshima *et al.*, 2002).

Maillard *et al* (2001) informan de nuevos alelos de los loci DRB3 (*1103, *2007, *2402 y *4401) en ganado Cebú Gudali y DQB (*1804, *1805, *2201, *2301, *2401, *2501) en ganado Cebú Brahman con clonación y secuenciación.

BoLA asociado con enfermedades y producción

El MHC como parte integral del sistema inmunológico, participa en la relación con la resistencia/susceptibilidad a las enfermedades (Lunden *et al*, 1990). Desde el punto de vista económico y ético, la incidencia de las enfermedades en animales de granja es de gran interés y los enormes avances hechos en biología molecular, así como el rápido desarrollo de mapas genómicos, han brindado las herramientas exactas para un posible control genético de las enfermedades (Mejdell *et al*, 1994).

Las investigaciones de la leucosis bovina por ejemplo, han indicado que ciertos alelos del MHC estaban asociados con la linfocitosis persistente (Stear *et al.*, 1988, Leveziel, 1989). El virus de la leucosis bovina (BLV) es un oncovirus de la familia retroviridae. La prevalencia de anticuerpos de la BLV varia grandemente entre las razas pero sobre todo en ganado de leche que de carne, habiendo una predisposición en ganado viejo.

En la linfocitosis persistente (PL) cerca del 30% del ganado desarrolla anticuerpos positivos contra PL y solo el 5% desarrolla un linfosarcoma entre 4 y 8 años de edad (Stear *et al.*, 1988).

Park *et al.*, (1993) encontraron asociación entre BoLA-A8 y Parálisis Espinal Posterior (PSP) en toros Holstein con un Riesgo Relativo = 34% sugiriendo una relación directa con el desarrollo de PSP crónica o que genes que codifican para alelos de la clase I estan muy estrechamente ligados al supuesto gen(es) de PSP.

Con respecto a la resistencia a la Fiebre aftosa se ha relacionado con moléculas MHC clase II, García-Briones, *et al* (2001) mostraron su relación con el grado de protección inducido por diferentes tipos de vacunas administradas al ganado. No se encontró correlación alguna con los alelos DRB3 y los títulos de suero neutralizante y protección inducida. Sin embargo dentro de los haplotipos encontrados, se detectaron asociaciones de los alelos DRB3.2*1, 3, 7 y 12 con bajo titulo de suero y DRB3.2*12 y 18 con sin protección. Es posible que las variantes alélicas den respuestas inmunes y de protección variables en esta enfermedad, pero hay evidencia que los genes no relacionados con MHC también juegan un papel importante en la respuesta del individuo.

En cuanto a la susceptibilidad a la mastitis, causada por bacterias, se asoció al alelo W16 de clase I y al grupo sanguíneo M, ambos se heredan juntos (Ostergard *et al.*, 1989), pero una disminución de la mastitis con el alelo W14(W8) en el estudio de Weigel *et al* (1990). Más tarde Lunden *et al* (1990) encontraron una asociación en DQA clase II y la mastitis clínica con valores genéticos estimados de toros con respecto a sus hijas.

Mejdel et al (1994) utilizó análisis de varianza para relacionar los alelos de mastitis, cetosis y fertilidad, y se encontraron resultados diferentes. El alelo A2 se asocia significativamente con resistencia a mastitis y A7(W50) con susceptibilidad.

El BoLA clase I también ha sido estudiado en características de producción pero de forma indirecta en fertilidad o capacidad productiva por la resistencia a enfermedades. En el estudio de Arriens et al. (1996) se analizaron 18 alelos en cruces de Braunvieh con Suizo y Simmental con Holstein rojo asociados con crecimiento y características de canal, grupo genético y número de hijos por semental. Ningún efecto total significativo fue encontrado en esta relación según los autores.

En otros trabajos los alelos del exon 2 del DRB3 se encontraron relacionados con producción de leche y mastitis. Starkengurg et al (1997) encontraron por el método de RFLP en las tres primeras lactancias de vacas Holstein asociados a los alelos 7 y 26 a producción de leche y el 24 a grasa, el alelo 8 en un decremento de la producción y proteína y el 24 a mastitis. Debido a la inconsistencia de los resultados, los autores sugieren investigaciones adicionales antes de confirmar los resultados de asociación entre el locus DRB3 y la producción de leche. Sin embargo en otro estudio con el locus BoLA DR (Sharif et al., 2000) los autores encontraron una asociación entre la bolsa cuatro de la molécula BoLA DR con mastitis clínica causada por *Staphylococcus* spp.

En un estudio de fertilidad, crecimiento y producción de leche de padres e hijas, relacionados con locus DQ clase II, utilizando RFLP y análisis de varianza donde a pesar del gran número de observaciones no se encontró asociación consistente (Lunden et al., 1993).

La falta de concordancia en los artículos publicados del BoLA y producción de leche según algunos autores (Elo et al., 1999) podría ser debida a la existencia de correlación entre las características, por ejemplo, una alta susceptibilidad a las enfermedades puede causar un tasa pequeña de crecimiento o reducir el promedio de producción de leche.

Algunas características inmunológicas como reducido número de células mononucleares circulando y un incremento en las concentraciones de IgM en el suero se han asociado con BoLA-DRB3.2 *8, *11, *22 y 16, mientras que los alelos DRB3.2 *11, *12 o *23 fueron mas resistentes a infecciones intramamarias y sus efectos patógenos (Dietz et al., 1997).

Además del BoLA, existen otros genes candidatos utilizados como marcadores de QTL's (quantitative trait loci) como son los relacionados a funciones fisiológicas como prolactina, hidroxilasa 21 esteroide (CYP21) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que son características de interés económico importantes en el ganado (Elo et al., 1999).

Microsatélites

Los microsatélites son un conjunto de secuencias de ADN que exhiben altos niveles de variabilidad y son generalmente secuencias de baja complejidad que se encuentran altamente repetidas, dispersas por el genoma y organizadas en tandem (Ramel, 1997). Los microsatélites son secuencias que se están utilizando con gran éxito como marcadores genéticos (Weber, 1990a; Weber, 1990b) y deben cumplir algunas características, entre las que se encuentran el que se heredan de forma mendeliana codominante, que sean polimórficos y que sean fácilmente reproducibles en cualquier laboratorio (Yañez, 1996; Schlettereer, 1998) (Anexo 5).

Su utilidad depende de su nivel de información genética. Esto está dado por el número distinto de formas (alelos) en las cuales se presenta el marcador en una población (polimorfismo). A mayor número de alelos existentes, más fácil será seguir su segregación en los individuos, en generaciones sucesivas en familias o en poblaciones (Botstein *et al.*, 1980). Debido a que los microsatélites comúnmente se extienden por regiones no mayores de 200 pares de bases, éstos pueden detectarse fácilmente por medio de la amplificación con PCR. Se sabe que en humanos, las mutaciones en determinados microsatelites son la causa de enfermedades hereditarias y son marcadores para la detección de cáncer. Estudios empíricos han mostrado que las mutaciones son el resultado de inserciones o

eliminaciones de uno o dos unidades de repetición, supuestamente por corte de replicación o crossing over en minisatelites, produciendo variación en su longitud.

Por otro lado, si la secuencia de los microsatélites fuera estable, existiría un significativo desequilibrio de ligamiento entre los microsatélites adyacentes altamente polimórficos, el desequilibrio de ligamiento es altamente dependiente de la tasa de mutación (Todd, 1992). La tasa de mutación en los microsatelites varia entre 1.2×10^{-3} y 10^{-6} por sitio por meiosis, mas alta que la encontrada en MHC de 2.4×10^{-4} . La estimación de la tasa de mutación es difícil de obtener mismo en estudios de grandes familias, por ser un evento raro (Crouau-Roy et al., 1996).

Hasta el momento se conocen entre 1200 y 1500 pares de iniciadores de microsatélites bovino (Stone et al., 1995) y solo mas de 400 microsatélites han sido caracterizados y mapeados por análisis de ligamiento y por hibridación somática celular (Ma et al., 1996) lo que ha ayudado a considerar marcadores que estén involucrados en las características de interés económico en el ganado (Hirano et al., 1996).

Varios autores han caracterizado microsatélites altamente polimórficos en diferentes cromosomas bovinos (Ma et al., 1996; Hirano et al., 1996) dirigidos a estudiar las características de interés económico, el tipo de dinucleótidos encontrados han sido CA/TG (Ma et al., 1996) y GT/CA (Hirano et al., 1996).

Uno de los microsatélites evolutivamente mas estable en bovinos se ha encontrado en el segundo intron del gen DRB, el DRB3 localizado a 50-100 pb bajo el polimórfico exon 2 (Ellegren et al., 1993).

Ademas, los microsatélites detectados por PCR se han vuelto marcadores primordiales en mapas de ligamiento en mamíferos, determinación de diversidad genética y distancias genéticas en especies relativamente cercanas (Kemp et al., 1995), así como marcadores de características de interés económico (ETL's), ligados a enfermedades y fecundidad en ganado (Stone et al., 1995). Se ha demostrado que aproximadamente el 50% de los iniciadores de microstélites bovino puede amplificar productos polimórficos de ADN en ovinos y caprinos, siendo de 61% y 57% de homología con bovinos respectivamente (Kemp et al.,

1995) y una gran conservación tanto en orden y distancia entre los marcadores presentes en los mapas de ligamiento en ambos, ovinos y bovinos (Crawford et al., 1995).

Crawford et al., (1998) estudiaron la evolución de los microsatélites según el tamaño de éstos en ovinos y bovinos, ya que cuando el tamaño de la distribución de los alelos de los microsatélites a través de diferentes especies es comparado, la talla del alelo de donde el microsatélite es originario es mayor que el encontrado en una especie relativa. Los autores concluyeron que los resultados no eran debidos a una determinación sesgada en la selección de clonas para secuenciar y desarrollar un iniciador, sino a una evolución direccional que ocurre dentro de las diferentes especies.

Por otro lado Amos et al., (1996) y Weber (1990b) encontraron que existe una relación positiva entre el tamaño del alelo y la diversidad genética de la población, mientras mas diversa sea la población, mas largos serán los microsatélites.

La eficiencia de la producción de un marcador en el ganado puede ser reducida porque el 40-50% de los microsatelites están flanqueados por elementos cortos dispersados (SINEs: short interdispersed elements) los cuales frecuentemente inhiben la amplificación del microsatélite o resulta en bandas extensas, haciendo la genotipificación difícil (Stone et al., 1995). De igual forma, cuando se comparan polimorfismos de un solo nucleotido (SNP's: single nucleotide polymorphisms), los microsatélites son mucho mas poderosos que los marcadores dialelicos para distinguir polimorfismo entre razas de bovinos (Blott et al., 1999).

Un estudio hecho con los microsatélites DRBP1 y DRB3 localizados en el intron 2 del correspondiente gene DRB, mostró que existe un fuerte desequilibrio de enlace entre ellos que hace posible establecer haplotipos DRB en animales heterocigotos (van Haeringen et al., 1999). Los fragmentos encontrados para DRBP1 fueron de 118-142 pb y para DRB3 de 143-215 pb. El haplotipo 120/175 se ha determinado asociado con mas de una variante del exon 2 del DRB3, pero tres variantes de este exon (*0201, *1201 y *1801) fueron asociados con dos o tres haplotipos de

microsatélites. Con este trabajo se mostró una mejor resolución para tipificar el DRB MHC a partir de haplotipos que con solo un microsatélite utilizado.

En estudios en diferentes razas (Aberdeen Angus, Jersey, Hereford, Friesian, Simmenthal y Charolais) se ha encontrado que el número de alelos en algunos loci (HBB, DRBP1, DR2B, RASA, RBP3, OGAM, MISATA, PRL, ETH152, ETH225, ILSTS001 Y ILSTS014) varían ampliamente (de 1 a 45 alelos) entre las razas (MacHugh et al., 1994).

Otra forma de utilizar microsatélites, es en la localización de loci de caracteres cuantitativos (QTL: quantitative traits loci) que son genes relacionados a caracteres cuantitativos relacionados a la producción animal y los cuales se encuentran en regiones bien delimitadas por microsatélites conocidos, por ejemplo crecimiento, mortalidad, días abiertos, depósito de grasa, grasa en leche, fertilidad, marmoleado de la carne, tasa de ovulación, proteína en leche y algunas características de la canal. Se conocen 100 QTL en bovinos, 46 están tipificados y solo 31 son polimórficos (Beever et al., 1990; Eggen y Fries, 1995).

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de estudio:

El trabajo se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM localizado en el Km. 5.5 de la carretera federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Ver. El clima es cálido húmedo tipo Af (m) w (e), con una temperatura media anual de 23.6°C y una precipitación media anual de 1991 mm.

La altitud es de 105 msnm. Los suelos son ultisoles deficientes en nitrógeno y fósforo. El ganado en el CEIEGT se pastorea en un sistema rotacional intensivo en praderas de estrella Santo Domingo (*Cynodon nlemfuensis*), gramas nativas (*Axonopus sp* y *Paspalum sp*) y *Brachiaria sp*, con periodos de ocupación de 2.5 días y un tiempo de recuperación de 25 días, con una carga aproximada de 3.6 UA/ha. .

Diseño de estudios de campo

Durante los meses de abril a septiembre del año 2000 se hizo un previo seguimiento en infestación natural de 85 animales de diferentes genotipos (cuadro 1) para establecer los meses de estudio. Los animales del CEIEGT se dejaron de bañar un mes antes de comenzar el experimento y el conteo de garrapatas de más de 4mm de diámetro por un lado del animal se hizo una vez al mes a la misma hora.

Cuadro 1

Número de animales utilizados en el estudio preliminar (año 2000)

N	Genotipo	Cruce	Propietario
16	AFS	Ho x Sahiwal	CEIEGT
23	Brahman	Puro	CEIEGT
14	¾ europeo	½ SM, ¼ Ho, ¼ Cebú	CEIEGT
20	F1	½ Ho x ½ Cebú	CEIEGT
12	Cebú*	Puro	Particular

AFS=Australian Frisian Sahiwal, SM=Simmenthal, Ho=Holstein. *Cebú comercial

Los animales particulares no llevaban un programa de baños regular.

Una vez establecidos los meses de infestación, en el año 2001 se realizaron dos tipos de experimentos, uno en infestación natural y dos con infestación experimental (2001 y 2002). (Cuadro 2).

Cuadro 2

Número de animales empleados en este estudio

N	Genotipo	Cruce	Edad	Infestación	Año
31	F1	½ Ho x ½ Cebú	2-7 a	Experimental	2001
28	F1	½ Ho x ½ Cebú	22 m	Experimental	2002
33	¾ euro	½ SM, ¼ Ho, ¼ Cebú	15-20 m	Natural	2001

Ho: Holstein, SM: Simmenthal, Euro: europeo, a: años, m: meses

Infestación natural. Se utilizó un grupo de 33 machos ¾ europeo entre 15 y 20 meses de edad destinados a la engorda en pradera. Los animales previo al estudio estaban libres de garrapata *B. microplus* y fueron bañados con deltamethrin (Butox, Hoechst) 45 días antes. Se seleccionó la pradera que estaba infestada y los animales se alojaron por un periodo de 3 meses, comenzando el 1º de junio al 31 de agosto del 2001. Los machos se encontraban en un área de 15 ha (2 unidades animales/ha) de Estrella Sto. Domingo con una rotación de 1 día de pastoreo y 25 días de descanso. De igual forma se complementaron con una ración de 16% de proteína cruda al 1% de su peso vivo.

Después de 21 días de haber entrado a la pradera se hizo la observación semanal de cada uno de los animales para inspeccionar y contar garrapatas adultas ingurgitadas de más de 4 mm. Se contó de un solo lado y el número de garrapatas encontradas se multiplicó por dos.

Por el grado de susceptibilidad de los ¾ europeo, se previó tratarlos contra babesiosis (Ganaseg, Novartis) en cuanto se dejó de bañar al ganado, lo cual no fue necesario. Se mantuvieron los animales en observación con objeto de determinar una sintomatología clínica de Babesiosis para establecer un

tratamiento. La infección podía presentarse debido a garrapatas infectadas en el predio.

Infestación experimental 1. Del 14 de noviembre al 4 de diciembre del 2001 se formó un grupo de 31 vacas F1 que no tuvieron padres en comun de un rango de edad de 2 a 7 años pertenecientes al CEIEGT (cuadro 2). Las vacas (2 unidades animales/ha) siguieron un sistema rotacional de 1 día de pastoreo x 22 días de descanso y fueron suplementadas con pacas de Pangola. Los animales se bañaron con Deltametrin (Butox, Hoechst) 45 días antes de entrar en el potrero destinado donde no se movieron durante 20 días. A partir del 21avo día después de la infestación se extrajeron manualmente solo las garrapatas mayores a un diámetro de 4mm durante 5 días, siendo la duración total del experimento de 25 días. Las garrapatas fueron colocadas en bolsas de plástico previa identificación del animal para ser contadas en el laboratorio.

Infestación experimental 2. Del 4 al 28 de noviembre del 2002 se formó un grupo de 28 vaquillas F1 de 22 meses de edad pertenecientes al CEIEGT (cuadro 2). Las vaquillas (2 unidades animales/ha) siguieron el mismo manejo que las del experimento 1.

Con los dos experimentos se completaron 59 vacas F1 para el análisis.

a) Infestación:

La infestación experimental se hizo con 5000 (250 mg) larvas de 15 días de edad de garrapata *Boophilus microplus* libres de *Babesia* spp. y donadas por el CENID-PAVET-INIFAP de Jiutepec, Morelos. La infestación se realizó depositando las larvas en el lomo del animal, con la ayuda de un pincel de cerdas.

A partir del día 21 de la infestación se colectaron manualmente durante cinco días seguidos las garrapatas adultas ingurgitadas ≥ 4 mm en todo el animal. La duración del experimento fue de 25 días.

b) Reproducción de larvas:

En las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria en Jiutepec, Morelos, se infestó un bovino de raza Angus de aproximadamente 200 kg. con un gramo de larvas (20,000 larvas) de una cepa de

Boophilus microplus susceptible a los ixodicidas y libre de *Babesia* spp. El bovino estuvo alojado en aislamiento con agua y comida *ad libitum*. A los 21 días post-infestación se colectaron las garrapatas adultas repletas durante los siguientes cinco días. Las garrapatas *B. microplus* adultas injurgitadas, se colocaron en una caja de petri y se colocaron en una estufa de incubación a 28° C con 80% de humedad relativa. La ovoposición ocurrió entre 3 y 5 días y se colectan los huevecillos en un mismo lote.

Posteriormente, se pesaron 500 mg de huevos en viales de vidrio con tapón de algodón. Se incubaron nuevamente en la estufa por un periodo de 15 a 16 días hasta que empezó la eclosión. Posteriormente se dejaron las larvas hasta tener 15 días de edad para ser utilizadas para la infestación experimental. Los viales de 250 mg de larvas (5000 larvas) fueron transportados en frío al sitio donde se realizó la infestación experimental.

c) Toma de muestra sanguínea:

De cada uno de los animales de los tres experimentos se tomó una muestra de sangre de la vena caudal utilizando tubos vacutainer de 7 ml con anticoagulante EDTA al final del experimento. Cada uno de los tubos se identificó y se congeló a -4°C hasta ser procesada en el laboratorio.

Extracción de ADN a partir de sangre periférica

Se extrajo el ADN de acuerdo al protocolo que se encuentra en el anexo 6. Se combinó la metodología utilizada en el laboratorio de Inmunogenética del InDRE y la utilizada en el laboratorio de genética molecular de la FMVZ. La extracción de ADN se llevó a cabo en el laboratorio de genética molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Evaluación de los microsatélites del sistema BoLA:

Del ADN de cada individuo se evaluaron los alelos presentes para cuatro microsatélites. Estos microsatelites se localizan dentro o adyacentes al MHC bovino (Fig 5). Los microsatelites empleados fueron DRBP1, DRB3, RM185 y BM1815. BM1815 se encuentra a 20 cM del centrómero, DRBP1 y DRB3 se localizan en el intron 2 del correspondiente gene DRB, (Ellegren et al., 1993; van

Haeringen et al., 1999) a 25 y 35 cM del centrómero y RM185 a 45 cM y relativamente cerca de clase I (Fig 5).

Los diferentes microsatélites se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (anexo 7) y los iniciadores utilizados son:

DRB3 (Ellegren et al., 1993):

F: 5'-GAG AGT TTC ACT GTG CAG-3'

R: 5'-CGC GAA TTC CCG AGT GAG TGA AGT ATC T-3'

DRBP1 (MacHugh, 1996):

F: 5'-TATA ATG GTG CAG CAG CAA GGT GAG CA-3'

R: 5'-GGG ACT CAG TCT CTC TAT CTC TTT G-3'

BM1815 (Kappes et al., 1997)

F: 5'-AGA GGA TGA TGG CCT CCT G-3'

R: 5'-CAA GGA GAC AAG TCA AGT TCC C-3'

RM185 (Kappes et al., 1997)

F: 5'-TGG CCT GCT TAT GCT TGC ATC

R: 5'-GAG TTT CCT TTG CAT GCC AGT C

Las condiciones de amplificación para los microsatélites se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3.

Condiciones de amplificación para los microsatélites utilizados

Microsatelite	Desnatural (1 ciclo)	Alineación (30 ciclos)	Extensión (1 ciclo)
DRB3	94°C/3 min	94°C/30 s 58°C/30 s 72°C/30 s	72°C/3 min
DRBP1 y BM1815	94°C/3 min	94°C/30 s 64°C/30 s 72°C/30 s	72°C/3 min
RM185	94°C/3 min	94°C/30 s 59°C/30 s 72°C/30 s	72°C/3 min

Amplificación y tipificación de microsatélites

La PCR se realizó a partir de 50 ng de ADN genómico. Brevemente, en un volumen de 30 μ l de reacción usando 0.3 unidades de Taq polimerasa contenida en la solución amortiguadora (1X): 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.4; 1.5 mM $MgCl_2$ 0.1% Triton X-100, 0.15 mg/ml BSA, 0.2 mM cada dATP, dGTP, dTTP, dCTP y 0.3 μ M de cada iniciador. La amplificación se hizo en un termociclador (Omne-E Hybaid) bajo las condiciones expuestas en el cuadro 3 para los diferentes microsatélites y fue corroborada en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

Una vez confirmado cada uno de los microsatélites, las muestras se diluyeron con agua en una proporción de 1:20 y se tomaron 2 μ l de cada una de las muestras para mezclar con 0.5 μ l de TAMRA y 12 μ l de formamida desnaturalizada. La lectura de los alelos de cada microsatélite se realizó en un secuenciador de ADN marca Perkin Elmer's Applied Biosystem Division modelo 310 Genetic Analyzer (Anexo 8) en el Instituto de Diagnostico Referencial y Epidemiológico (InDRE) perteneciente a la Secretaría de Salud y Asistencia (SSA).

Análisis estadístico:

Los alelos del microsatélite se obtuvieron directamente de los electroferogramas (Anexos 9-12) y la frecuencia de cada microsatélite se calculó por cuenta directa.

1/ Frecuencia poblacional. La frecuencia poblacional se define como: el número de copias de un alelo en una población / 2 x número total de animales.

2/ Prueba de exacta de Fisher. La diferencia para cada alelo entre los animales susceptibles y no susceptibles fue calculada por la prueba exacta de Fischer, debido al número de comparaciones, para el calculo se utilizó una tabla 2x2 usando el paquete estadístico SPSS (SPSS, 1999).

Una vez que se obtuvo la X^2Y , se comparó con el valor esperado para la distribución de Fisher estableciéndose el valor limite de significancia de 0.05 y los grados de libertad de 1. La comparación de éstos datos reveló si existe o no diferencia entre ambas poblaciones. En el caso en que el valor de F obtenido

fuera igual o superior que el valor límite de significancia se determina que hay una asociación. El programa calcula el valor de significancia estadística (P) si es <0.05 se tratara de una asociación real no debida al azar.

3/ Razón de momios según Woolf (OR) (1955). Es una estimación de la intensidad de la asociación e indica cuantas veces mas riesgo tiene un individuo sano portador del alelo en cuestión de desarrollar la enfermedad. Mientras mayor sea este valor, mayor será el riesgo de desarrollar la enfermedad en presencia del alelo. La formula es:

$$OR = a \times c / b \times d$$

donde a y c son los animales susceptibles positivos y negativos respectivamente con el alelo; b y d son los animals no susceptibles positivos y negativos portadores del alelo.

Fracción etiológica (FE). Cuando un alelo se halla significativamente incrementado en los enfermos, se calcula la FE que es una medida relativa que indica cuanto de la asociación encontrada es debida al marcador. Mientras mas cerca este de la unidad, mas fuerte es la relación del marcador con la enfermedad. Se calcula usando la formula:

$$FE = (OR-1)/OR \times a/(a+b)$$

Donde OR = riesgo relativo y es calculado según la formula de Woolf (1955).

RESULTADOS

Infestación previa:

En el cuadro 4 se muestra la distribución de garrapatas encontradas en la infestación natural previa llevada a cabo en el año 2000 para establecer los meses de seguimiento de los animales de este trabajo. Todos los animales a excepción del Cebú pertenecen al CEIEGT.

Cuadro 4
Distribución de garrapatas totales por mes en infestación natural durante el año 2000

	AFS (16)	Brahmn (23)	Terminales (14)	F1 (20)	Cebú (12)	Total (85)
Abril	65	15	10	28	no hubo	118
Mayo	10	0	4	8	46	68
Junio	21	5	155	12	71	264
Julio	87	0	220	15	93	415
Agosto	10	1	286	2	146	445
Septiembre	63	0	190	0	167	420
Total	256	21	865	65	523	1730

AFS=Australian Friesian Sahiwal, Terminales: F1 con Limousin o Simmenthal, F1 (Holstein x Cebú) pertenecientes al CEIEGT y Cebú Indobrasil propiedad Lic. Maitret

Los meses con mayor número de garrapatas fueron junio (264), julio (415), agosto (445) y septiembre (420). Se escogieron los meses junio a agosto como periodo de seguimiento para las infestaciones del siguiente año (2001).

Infestación natural

Por ser mucho mas susceptibles a las garrapatas y a las enfermedades que transmiten (babesiosis o anaplasmosis) que las F1, los machos $\frac{3}{4}$ europeo (llamados aquí $\frac{3}{4}$ euro) utilizados en la infestación natural estuvieron en observación y con tratamiento cuando fue necesario. La edad de los animales (15-20 meses) no tuvo influencia en el grado de infestación ($P < 0.01$).

Se contaron un total de 490 garrapatas de los tres meses de exposición natural y en todos los animales. El número total por mes fue: Junio 113, Julio 193 y en Agosto 184 garrapatas totales. Los promedios fueron de 3.2 ± 2.9 , 5.7 ± 3.9 y 5.4 ± 4.6 garrapatas por animal/mes.

La distribución de las garrapatas presentó una curva normal ($N \pm ds$) con una media = 29 ± 16 . Los animales susceptibles (casos) se consideraron los que sobrepasaron la media + 1 desviación estandar (≥ 46 garrapatas) y los animales no susceptibles (controles) ≤ 45 garrapatas. La distribución de garrapatas por individuo se muestra en la figura 6.

Existen 9 animales con < 20 garrapatas, la mayoría se encuentra en el rango de >20 a 40 garrapatas y solo 7 animales con mas de 40 garrapatas. Solo 6 animales se consideraron susceptibles (≥ 46) y los controles fueron 27 animales.

En el anexo 13 se muestran la distribución total de las garrapatas por individuo en los meses en que se tomaron las muestras. Existió una gran variabilidad entre individuos, encontrándose los animales con menos o igual a cinco garrapatas en total (2, 11, 30, 31, 32 y 33); animales que solo tuvieron ≤ 5 garrapatas en un solo mes (12, 20 y 29), y los animales 5, 10, 15, 19, 21 y 25 en el extremo (≥ 46). La figura 7 muestra parte de esta variabilidad.

Figura 6
Distribución de garrapatas por individuo en la infestación natural (3/4 europeo)

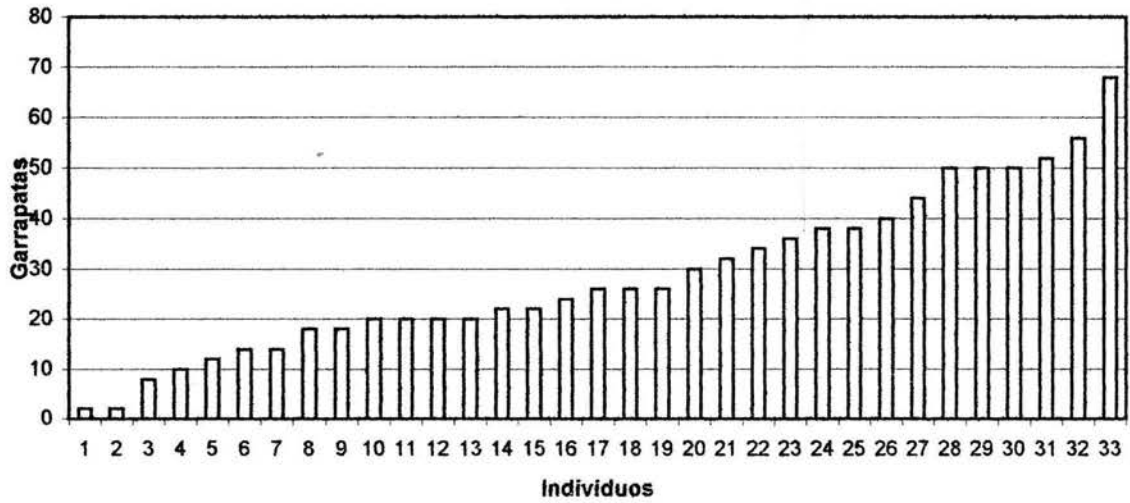
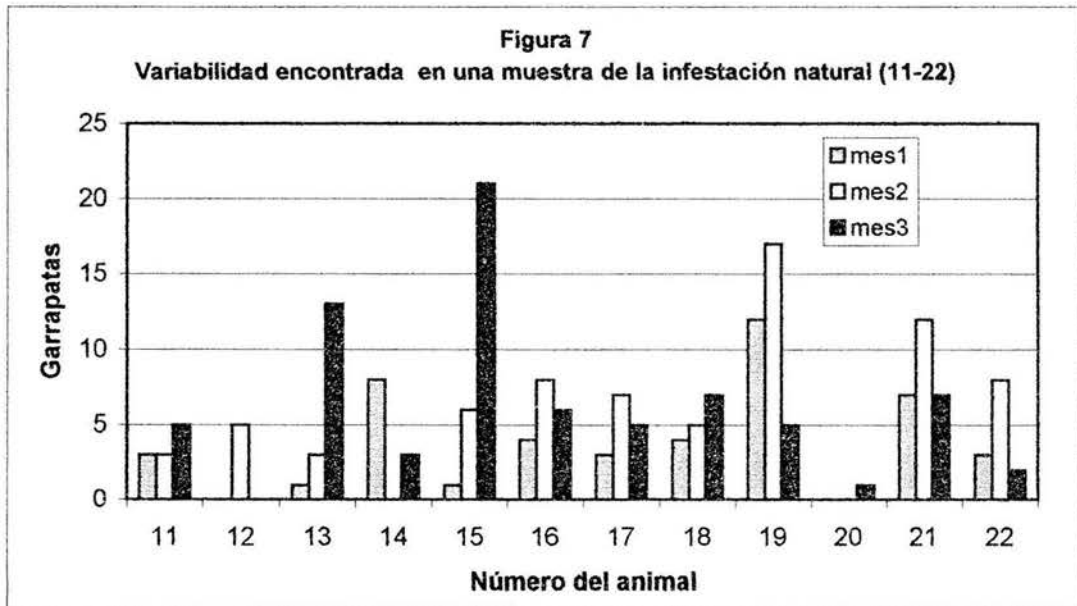


Figura 7
Variabilidad encontrada en una muestra de la infestación natural (11-22)



Infestación experimental

La infestación experimental se repitió en dos años consecutivos durante el mes de noviembre (2001 y 2002) según la metodología mencionada en material y métodos. Las vacas F1 de 2 a 7 años de edad eran vacas secas. Por ser animales mucho más resistentes a la infestación natural, se infestaron experimentalmente y a los 21 días después de la inoculación se comenzó el conteo y el desprendimiento manual de las garrapatas ≥ 4 mm.

En el caso de las F1 el comportamiento de acicalamiento se observó en los dos grupos estudiados. La extracción se hizo con el apoyo del personal de parasitología de la FMVZ y dos técnicos del CEIEGT, en total seis personas. La edad no tuvo influencia en la infestación ($P \leq 0.01$), pero el temperamento más nervioso de algunas vacas sí, por lo que las vacas más nerviosas presentaron muy pocas garrapatas.

La distribución de las garrapatas presentó un sesgo hacia la izquierda con una mediana de 51 y un rango de 3-206 garrapatas (figura 8). El grupo susceptible (≥ 79) fue de 14 animales y el no susceptible (≤ 78) de 45. Durante los cinco días de recolección de garrapatas ≥ 4 mm se obtuvieron un total de 346, 818, 851, 804 y 771 por día en los dos años. La distribución por individuo y día de recolección se muestran en el anexo 14.

El porcentaje de supervivencia de las garrapatas fue del 14%, por encima del 10% informado en la literatura. Cabe señalar también que el mes de noviembre aunque húmedo es frío en los extremos del día, lo que pudo influir en la supervivencia de las garrapatas (Precipitación pluvial=115.4 mm, temperatura media=20.9°C, humedad relativa=58.3, temperatura mínima=15°C y máxima=26.8°C). La variabilidad del número de garrapatas individual en las vacas F1 también fue importante y se observa en la figura 9. Hubo animales con menos de 26 garrapatas y con menos de 10 garrapatas.

Figura 8
Distribución de garrapatas por individuo en la infestación experimental (F1)

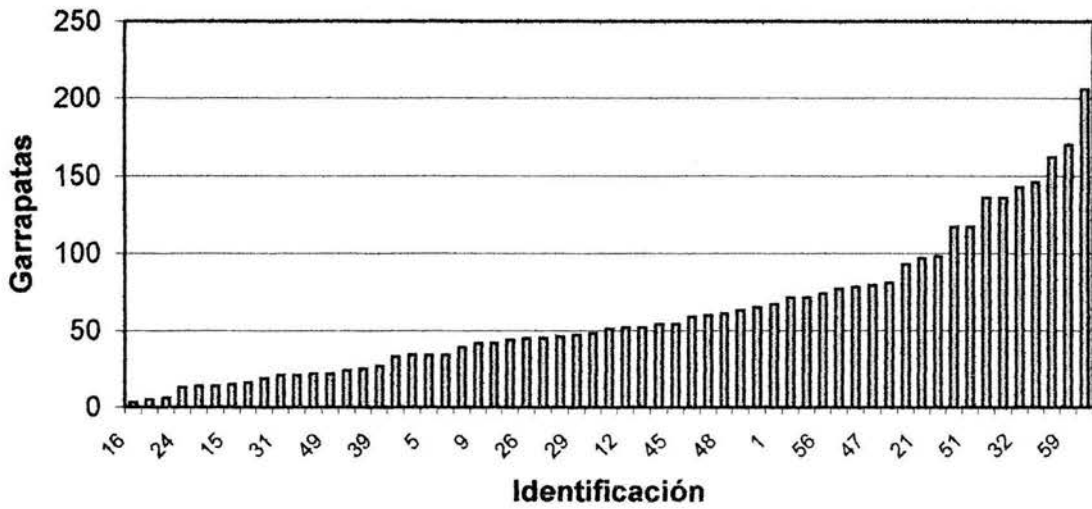
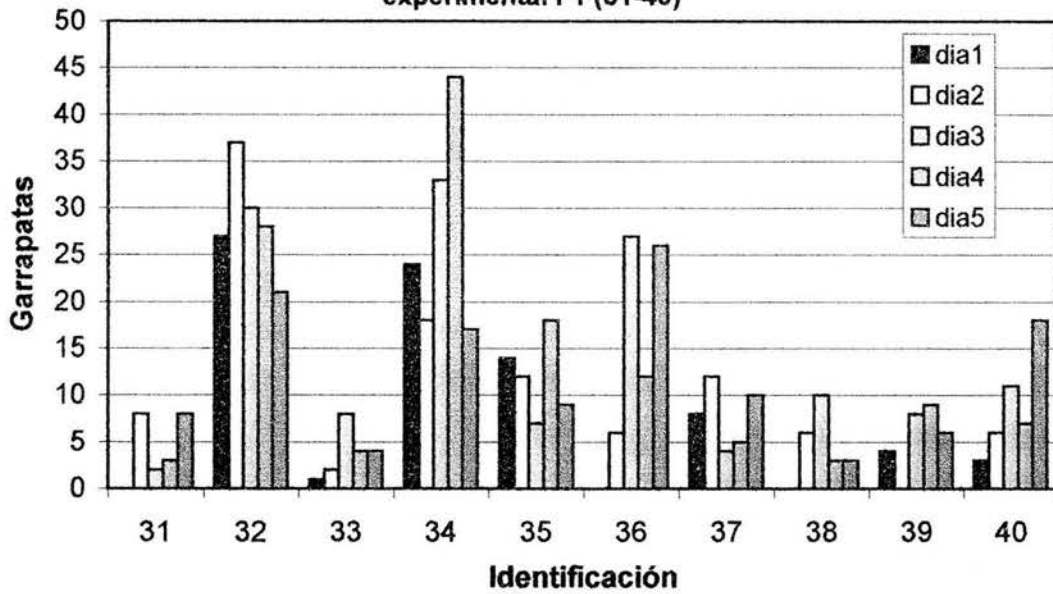


Figura 9
Variabilidad encontrada en una muestra de la infestación experimental F1 (31-40)



Microsatélites

La amplificación de los microsatélites estudiados se muestran en las figuras 10-12.

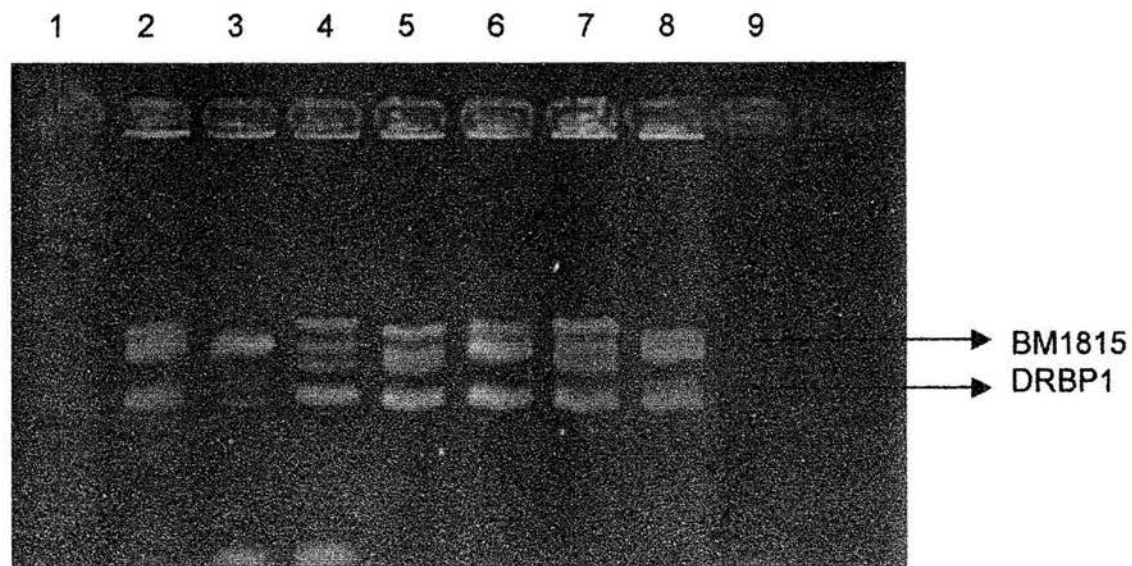


Fig. 10. Amplificación de los loci DRBP1 y BM1815 del MHC bovino.

Los fragmentos de DRBP1 miden 120-140 pb y los de BM1815 140-170pb los cuales fueron visualizados en un gel de agarosa al 3% teñido con Bromuro de etidio. En la línea 1 se depositó el marcador de peso molecular pBR 322/Mspl y en los carriles restantes algunas de las muestras utilizadas.

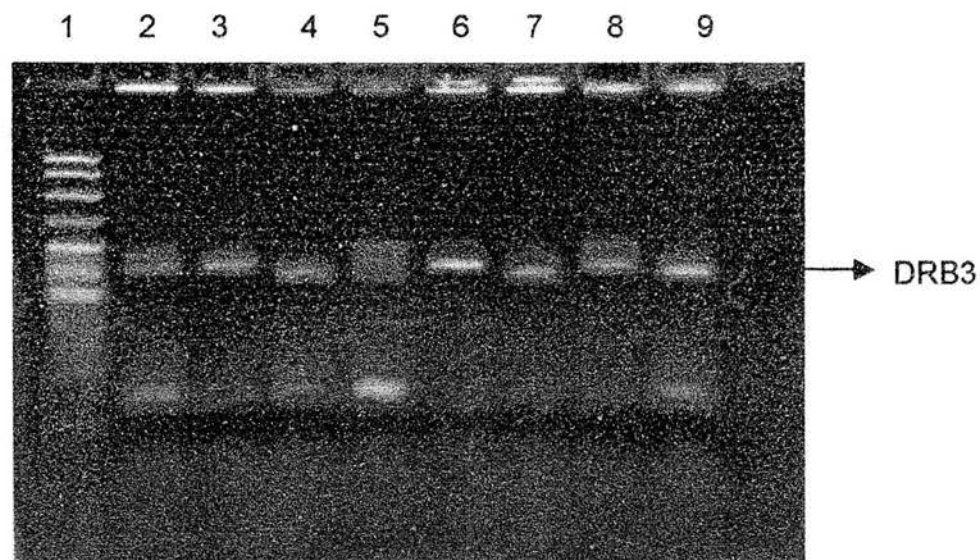


Fig. 11. Amplificación del locus DRB3 del MHC bovino.

Los fragmentos de DRB3 miden 158-210 pb y fueron visualizados en un gel de agarosa al 3% teñido con Bromuro de etidio. En la línea 1 se depositó el marcador de peso molecular pBR 322/Mspl y en los carriles restantes algunas de las muestras utilizadas.

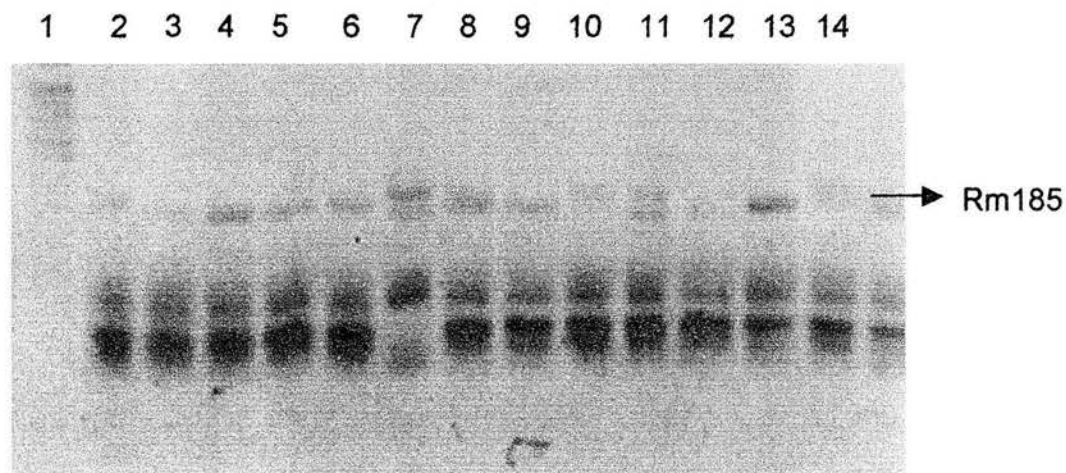


Fig. 12. Amplificación del locus RM185 del MHC bovino.

Los fragmentos de RM185 miden 96-112 pb y fueron visualizados en un gel de agarosa al 3% teñido con Bromuro de etidio. En la línea 1 se depositó el marcador de peso molecular pBR 322/Mspl y en los carriles restantes algunas de las muestras utilizadas.

Una vez amplificados, los productos de PCR y visualizados en el gel de agarosa se analizaron en el secuenciador automático y los resultados se muestran en los electroferogramas que se encuentran en los anexos 9-12.

Los microsatélites L29386, BM1818, BMS2275 y BM3401 no amplificaron por lo que se eliminaron para su estudio.

Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas para los loci DRBP1, DRB3 y BM1815 que se estudiaron previamente a este estudio en diferentes razas (Hereford, Holstein, Guzarat, Brahman, Criollo centroamericano y Criollo de Tamaulipas) en el año

2000 se muestran en el cuadro 5 donde se encontró gran variabilidad entre las razas.

Para el locus DRBP1, los alelos mas frecuentes en todas las razas, fueron el 116, 118 y 128 y los menos frecuentes, el 114 (Holstein), 126 y 134 (Guzerat y Criollo de Tamaulipas). El DRB3 presentó los alelos 178 y 184 con mas frecuencia mientras que los alelos 140 (Criollo Tamaulipas), 158 (Holstein), 160 (Guzerat), 172 (Criollo Centroamericano) y 220 (Brahman) fueron los menos frecuentes. Para el locus BM1815 los alelos que estuvieron en todas las razas fueron el 148 y 168, los menos frecuentes, 144 (Criollo centroamericano), 158 (Criollo Tamaulipas) y 172 (Hereford).

Con relación al polimorfismo encontrado en los grupos de estudio F1 y $\frac{3}{4}$ euro, los resultados se muestran en el cuadro 6.

Se encontraron 10 alelos en la población F1 y 9 en los $\frac{3}{4}$ euro, no presentando esta última los alelos 120, 126 ni 130, pero un alelo diferente, el 140 para el locus DRBP1. El locus DRB3 fue el mas polimorfo en F1 (18) y solo 12 en el $\frac{3}{4}$ euro. No se encontraron los alelos 140, 168, 170, 180, 186, 188, 192 y 194 en $\frac{3}{4}$ euro y los 156 y 182 en F1. Para el locus BM1815, el alelo 146 solo estuvo presente en F1 y los alelos 154, 158 y 182 en $\frac{3}{4}$ euro, con 10 y 11 alelos respectivamente. Para RM185 el polimorfismo fue exactamente el mismo en ambas poblaciones (8 alelos).

La distribución y frecuencia de los alelos en los animales susceptibles y no susceptibles F1 se muestran en el cuadro 7.

Los alelos mas frecuentes encontrados fueron DRBP1-118 (FA=0.48), DRB3-184 (FA=0.24), BM1815-148 (FA=0.16), BM1815-162 (FA=0.13) y RM185-98 (FA=0.30). DRB3 180, 194 y 196 (FA=0.008), BM1815-146 (FA=0.008) fueron alelos raros. DRBP1, 126; DRB3, 142-160, 166, 182 y 190; BM1815, 154-158 y 164 no se encontraron en esta población.

Cuadro 5

Frecuencias alélicas de los loci DRBP1, DRB3 y BM1815 encontradas en las diferentes razas utilizadas en el estudio previo

Alelos	Her	Hols	Guz	Brah	CA	TP
DRBP1						
114		3				
116	34	34	7	33	8	
118	9	16	42	33	21	34
120	28				8	120
122	3	16	4	6	8	9
124		6	7	6	12	9
126			4			6
128	22	6	19	16	21	6
130			4			3
132			7		21	
134			4			3
136	/12 3	19		6		
DRB3						
140						4
146					12	8
158		4				
160			6			
162		7		6	17	
164			31	19	3	
168			12	12	6	
170	3			19	9	4
172					3	
174	30		19		3	

DRB3	Her	Hols	Guz	Brah	CA	TP
176	7	30			21	20
178		15	6	12	3	12
180					21	4
184	53	19	19	19	3	25
186	7	12				12
192			6			8
198		12		6		
220	/18			6		
BM1815						
144					2	
146				5		6
148	27	53	7	5	31	22
150	50	12			48	19
152	3			11	10	15
154			4			3
158						3
160			30	11		3
162			19	5		3
164			15	22		3
166	7	12	4	5		3
168	3	23	7	27	8	19
170			11	5		
172	/14	10				

Her=Hereford, Hols=Holstein, Guz=Guzerat, Brah=Brahman, CA=Criollo Centroamericano y TP=Criollo de Tamaulipas.

Cuadro 6

Polimorfismo encontrado para los loci DRBP1, DRB3, BM1815 y RM185
en las infestaciones experimental (F1) y natural (3/4 euro).

DRBP1 (120-140)		DRB3 (159-219)		BM1815 (140-180)		RM185 (94-112)	
F1	¾ euro	F1	¾ euro	F1	¾ euro	F1	¾ euro
116	116	140		146		94	94
118	118		156	148	148	96	96
120		162	162	150	150	98	98
122	122	164	164	152	152	100	100
124	124	168			154	102	102
128		170			158	104	104
130	128	172	172	160	160	106	106
132		174	174	162	162	108	108
134	132	176	176	164			
136	134	178	178	166	166		
	136	180		168	168		
	140		182	170	170		
		184	184		182		
		186					
		188					
		192					
		194					
		196	196				
		198	198				
		210	210				
10	9	18	12	10	11	8	8

La distribución y frecuencia de los alelos $\frac{3}{4}$ euro se muestran en el cuadro 8.

Al igual que en la F1 el locus DRB3 fue el más polimórfico, encontrándose 12 alelos, contra 9 para DRBP1 y 11 en BM1815, RM185 solo presentó 8 alelos. Siendo un total de 40 alelos.

Los alelos más frecuentes encontrados fueron DRBP1-118 (FA=0.36), DRB3-184 (FA=0.35), BM1815-148 y 150 (FA=0.23) y RM185-100 (FA=0.18). Los alelos menos frecuentes fueron: DRB3-156, 162, 182 y 196 (FA=0.015), BM1815-152, 154 y 182 (FA=0.015), RM185-108 (FA=0.015). Los alelos DRBP1 120, 126, 130, 138; DRB3, 158, 160, 166, 168, 170, 180, 186-194; y BM1815, 156, 164 no se encontraron en este estudio.

En el cuadro 9 se muestra la asociación encontrada entre los microsatélites y el número de garrapatas

Para la infestación natural se encontraron los loci DRB3 y DRBP1 relacionados con la susceptibilidad a la garrapata. DRB3-184 fue significativo ($P < 0.02$) con un OR=5.2 (1.3-9.8), esto es, que los animales con este alelo tienen cinco veces más oportunidad de ser infestados que los animales que no tienen el alelo. La FE de 28%, significa que solo el 28% de la susceptibilidad a la garrapata la explica el alelo, el resto es debido a otros factores como medio ambiente o a otros genes en otro lado del genoma.

El locus DRBP1-128 ($P < 0.03$) con un OR=6.3 (1.3-30.2) y una FE=42%.

En la infestación experimental, estuvieron asociados a susceptibilidad a la garrapata los loci BM1815-152 ($P < 0.01$), con OR=15 (1.6-138) y FE=74% y DRBP1-130 ($P < 0.05$) con un OR=4.4 (3.2-6.2) y una FE=77%.

Para ambos alelos, la susceptibilidad a la garrapata presentó una alta FE debido posiblemente al poco número de observaciones.

Cuadro 7

Distribución y frecuencias alélicas de los loci DRBP1, DRB3, BM1815 y RM185 en la infestación experimental (F1) con *Boophilus microplus*.

Alelo	Locus DRBP1				Locus DRB3				Locus BM1815				Locus RM185						
	S	FA %	No-S	FA %	Alelo	S	FA %	No-S	FA %	Alelo	S	FA %	No-S	FA %	Alelo	S	FA %	No-S	FA %
116	1	3.6	10	11	140			2	2.2	146			1	1.1	94	3	10.7	8	8.9
118	13	46.4	44	48.9	162	1	3.6	3	3.3	148	4	14.3	15	16.7	96	2	7.1	3	3.3
120	1	3.6	5	5.6	164	5	17.9	13	14.4	150	2	7.1	10	11.1	98	8	28.6	27	30
122	1	3.6	5	5.6	168	5	17.9	5	5.6	152	4	14.3	1	1.1	100	2	7.1	21	33.3
124	3	10.7	10	11	170	1	3.6	3	3.3	160	3	10.7	9	10	102	8	28.6	24	26.7
128			4	4.4	172			3	3.3	162	3	10.7	12	13.3	104	1	3.6	5	5.6
130	2	7.1			174	1	3.6	7	7.8	164			2	2.2	106	3	10.7	2	2.2
132	2	7.1	4	4.4	176	4	4.3	6	6.7	166	9	32.1	30	33.3	108	1	3.6		
134	5	17.9	6	6.7	178	2	7.1	5	5.6	168	2	7.1	8	8.9					
136			2	2.2	180			2	2.2	170	1	3.6	2	2.2					
					184	4	14.3	22	24.4										
					186	1	3.6	5	5.6										
					188	1	3.6	3	3.3										
					192			2	2.2										
					194			1	1.1										
					196	1	3.6												
					198	2	7.1	6	6.7										
					210			2	2.2										

Número total de animals infestados = 59. S=susceptibles (N=14). No S=no susceptibles (N=45). FA=frecuencia alélica

Cuadro 8

Distribución y frecuencias alélicas de los loci DRBP1, DRB3, BM1815 y RM185 en la infestación natural (3/4 euro) con *Boophilus microplus*.

Alelo	Locus DRBP1				Locus DRB3				Locus BM1815				Locus RM185						
	S	FA %	No-S	FA %	Alelo	S	FA %	No-S	FA %	Alelo	S	FA %	No-S	FA %	Alelo	S	FA %	No-S	FA %
116			8	14.8	156			1	1.8	148	3	25	12	22.2	94	1	8.3	8	14.8
118	4	33.3	20	37	162			1	1.8	150	2	16.7	13	24	96	1	8.3	5	9.2
122			3	5.6	164			5	9.2	152			1	1.8	98	1	8.3	7	16.7
124	1	8.3	5	9.2	172			4	7.4	154			1	1.8	100	3	25	9	12.9
128	4	33.3	4	7.4	174			8	14.8	158	1	8.3	1	1.8	102	1	8.3	7	16.7
132			4	7.4	176			4	7.4	160			4	7.4	104	1	8.3	10	18.5
134	1	8.3	6	11	178	1	8.3	4	7.4	162	1	8.3	6	11	106	3	25	8	14.8
136	1	8.3	2	3.7	182			1	1.8	166	2	16.7	8	14.8	108	1	8.3		
140	1	8.3	2	3.7	184	8	66.7	15	27.8	168	1	8.3	5	9.2					
					196			1	1.8	170	2	16.7	2	3.7					
					198	1	8.3	5	9.2	182			1	1.8					
					210	2	16.7	5	9.2										

Número total de animals infestados = 33. S=susceptibles (N=6). No S=no susceptibles (N=27). FA=Frecuencia alélica

Cuadro 9

Alelos de BoLA asociados a la infestación natural (3/4 euro) y experimental (F1) con la garrapata *Boophilus microplus*

Natural Locus	S	No-S	T	FA %	Prueba Exacta Fisher	OR (IC)	FE %	Experimental Locus	S	No-S	T	AF %	Prueba Exacta Fisher	OR (IC)	FE %
Alelo								Alelo							
DRB3								BM1815							
184	8	15	23	35	0.02	5.2 (1.3-9.8)	28	152	4	1	5	4.2	0.01	14.8 (1.6-138)	74
DRBP1								DRBP1							
128	4	4	8	12	0.03	6.3 (1.3-30)	42	130	2	0	2	1.7	0.05	4.4 (3.2-6.2)	77

Infestación Natural: ¾ euro = ½ Simmenthal x ¼ Holstein x ¼ Cebú

Infestación Experimental: F1 (½ Holstein x ½ Cebú)

S=susceptible. No-S = No susceptible. T=total. FA = Frecuencia alélica. OR=odds ratio. IC = Intervalo de Confianza. FE= Fracción Etiológica.

DISCUSION

Este trabajo es a nuestro conocimiento el primero relacionado con los genes del MHC y la infestación de garrapatas basada en el polimorfismo de clase II. Hasta la fecha todos los estudios han sido en la tipificación directa de clase I y II del BoLA.

Una de las principales metas del trabajo fue evaluar la participación del BoLA que pudieran dar la clave de los factores genéticos involucrados en la infestación por garrapata.

Tanto el locus DRB3 como DRBP1 utilizados en este trabajo, están cercanos a genes bien definidos en el ganado bovino, son funcionalmente importantes y altamente polimórficos (Takeshima et al., 2002).

Se encontraron dos alelos de susceptibilidad en el $\frac{3}{4}$ europeo, uno localizado en el locus DRB3-184 (OR=5.2) y el otro en DRBP1-128 (OR=6.3) con un fuerte riesgo y FE. En los animales infestados experimentalmente también se encontraron dos alelos de susceptibilidad, BM1815-152 (OR=14.8) y DRBP1-130 (OR=4.4) donde FE fue muy alta (74 y 77% respectivamente).

La diversidad genética encontrada en este estudio es equivalente a la encontrada por otros autores (MacHugh, 1996; van Haeringen et al., 1999; Ulloa, 2001).

DRBP1 es un locus que muestra un fuerte desequilibrio de ligamiento y fue el mas variable de todos los loci examinados con 11 alelos en el trabajo de MacHugh et al (1994). En este trabajo se encontraron nueve alelos DRBP1 con tamaños entre 116-136 pb en el $\frac{3}{4}$ europeo y diez alelos en el F1, entre 116 a 140 pb. Existen diferencias de nuestros resultados con los encontrados en Ulloa (2001) que encontró alelos con tamaños entre 140-160 pb tipificados en razas puras Holstein, Suizo y Cebú. Posiblemente en el cruce F1 de Holstein x Cebú no todos los alelos de cada raza se expresaron de manera igual.

Los autores MacHugh (1996) y Ulloa (2001) demostraron la variación del locus DRBP1 según la raza utilizada. MacHugh encontró que las razas de las islas Británicas mostraron de 5 a 7 alelos entre 120 y 136 pb, las razas de Europa continental, 8 a 9 alelos entre 120 y 142 pb y en el Cebú Africano de 8 a 11 alelos

entre 118-136 pb. Este estudio se hizo tipificando microsátélites en geles de poliacrilamida.

Ulloa (2001) utilizó GENESCAN como método automático para tipificar los microsátélites, el cual es mucho mas sensible que la poliacrilamida, en su estudio la variabilidad fue mucho mayor para el mismo DRBP1, así en la raza Hereford se encontraron 13 alelos, 16 en Suizo y 14 en Holstein de 114 a 160 pb. En Cebú Brahman y Guzerat, se encontraron 14 y 16 alelos respectivamente, de 118 a 160 pb. En la raza de Lidia, 8 alelos entre 118-148 pb y en el Criollo la variabilidad fue de 11 a 15 alelos (112-152pb).

En otro estudio con diferentes iniciadores para DRBP1 se amplificaron alelos entre 207-226 pb (Glowatzki-Mullis et al., 1995).

El microsátélite DRB3 es el mas polimórfico. En este estudio se encontraron 12 alelos en el $\frac{3}{4}$ europeo y 18 alelos en el F1 con una longitud de 140-210 pb. El tamaño de los alelos se ajustaron a números pares correspondientes al rango descrito por Ellegren et al (1993) quien encontró 14 alelos entre 159-219 pb en 116 animales (Holstein, Red Swedish y Angus). En el 5°. Workshop internacional del BoLA, un alelo adicional fue descrito (DRB3-157).

En este estudio la FE=28% del DRB3-184 sugiere que solo un 28% de la asociación encontrada es debida al marcador y por lo tanto otros genes a lo largo del genoma no explorados aun, pudieran estar contribuyendo a la resistencia, así como los factores ambientales como nivel nutricional, productividad, gestación y patógenos, que pueden aumentar la infestación en el huésped susceptible.

Once alelos se encontraron en el grupo de infestación natural y diez en el de infestación experimental para BM1815. Kappes et al (1997) encontraron un tamaño de 140-170 pb en mapa de ligamiento que corresponde al tamaño encontrado en este estudio. Este marcador esta en la misma posición que el locus VEGF.

El microsátélite RM185 se encuentra relativamente cerca de la región de la clase I. Se encontraron 8 alelos en ambas poblaciones estudiadas con un tamaño de 94-108 pb.

Algunos puntos a considerar, serian:

La alta resistencia del hospedero es una ventaja en cualquier programa de erradicación/control de garrapata. Es el principal método usado en el trópico pero su mejoramiento ha sido olvidado. Mucha, si no toda la resistencia encontrada en diferentes razas es el resultado de una selección natural no deliberada.

También la resistencia del huésped varía a través del tiempo debido a factores de época ligados a nutrición, crianza, estrés, enfermedades asociadas, lactación y edad (de Castro et al., 1993). En el caso de los animales del estudio, los 3/4 europeo si estuvieron expuestos a enfermedades que transmite la garrapata por lo que estuvieron en observación durante el experimento. La mayoría de las vacas F1 no estaban lactando, se encontraban secas en el primer grupo del 2001 y las del 2002 eran novillonas. La edad no fue significativa en ambos grupos como lo menciona del mismo modo Seifert (1971) en ganado cruzado Brahman y europeo de 3 a 9 años de edad.

Uno de los trabajos de infestaciones con garrapata relacionadas con BoLA, se ha hecho en clase I. Los resultados de este trabajo mostraron que BoLA es uno de los sistemas genéticos que influyen la resistencia a *B. microplus*. Los becerros con los antígenos W6.1 y W7 tuvieron menos garrapatas que los que no tenían estos antígenos, pero en estudios previos (Stear et al, 1989), W6.1 estuvo asociado con susceptibilidad, lo que los autores argumentan que W6.1 no tiene efecto directo en la maduración de las garrapatas, pero está en desequilibrio de ligamiento con genes de susceptibilidad en algunas poblaciones y con resistencia en otras.

Existe una considerable variación genética en todas las razas en la resistencia hacia la garrapata y métodos mas eficientes se necesitan para explotar esta variación. Además aunque existen fuertes indicaciones para creer que la resistencia parece estar directamente relacionada con la presencia de genes Cebú, se necesitarían mas estudios que involucren un gran número de animales con conocimiento de su resistencia a parasitosis para establecer la causa de la

diferencia y mostrar que existen razas que tienen resistencia innata o adquirida contra la garrapata (Minjauw y de Castro, 2000).

La variación genética también se ha observado en Tuberculosis en cepas de ratones, los híbridos F1 de resistentes x susceptibles fueron resistentes, mostrando así que la resistencia es dominante. En el cruce F1 se mostró que la resistencia esta bajo el control de mas de un gene fuera del MHC. Lo mismo se encontró en conejos. Resultados por retrocruzas en cepas congénicas de ratones se encontraron los loci H-2b, H-2d y H-2^a asociados con resistencia. Sin embargo los haplotipos H-2b y H-2d pueden estar asociados con susceptibilidad también (cepas 129/SvJ y DBA/2). Esto sugiere que aunque los genes del MHC pueden modificar la influencia en la resistencia, existen otros genes que también son importantes y que no estan en el MHC (Medina et North, 1998).

Esta misma variación entre animales produce una habilidad diferente a responder a la vacunación comercial (con Bm86 y Bm91) por lo que el control completo no puede ser alcanzado por este método.

Varios autores (Frisch, 1999) coinciden en que hasta el momento un método integrado utilizando la vacunación y la alta resistencia del huésped sería mucho mas efectiva en el control de la garrapata que la vacunación sola, sobre todo en los sistemas extensivos ya que el uso de acaricidas como método principal para el control implica un nunca terminar e incrementar continuamente el gasto en los productores de ganado.

Ninguna de las asociaciones observadas es definitiva y esto indica que muchos factores (ambientales, razas) y/o genes (un gen principal o multigenes) pueden estar involucrados en la resistencia/susceptibilidad de la enfermedad o infestación o que el MHC puede no estar directamente involucrado en el mecanismo de la infestación sino indirectamente a través del desequilibrio de ligamiento o del ligamiento en sí.

CONCLUSIONES

1. En la infestación natural se encontraron 9, 11 y 8 alelos y en la experimental 10, 10 y 8 alelos para los loci DRBP1, BM1815 y RM185 respectivamente. El locus más polimórfico fue DRB3 con 12 alelos en $\frac{3}{4}$ europeo y 18 en F1.
2. El polimorfismo encontrado coincide en diversidad con lo informado en la literatura, pero en el genotipo $\frac{3}{4}$ europeo se observó un nuevo alelo (182) en el locus BM1815 no descrito en otras razas.
3. Se encontraron dos genes de susceptibilidad a la infestación por garrapata tanto en la infestación natural (DRB3-184, OR=5.2, FE=28% y DRBP1-128, OR=6.3, FE=42%) como en la experimental (BM1815-152, OR=14.8, FE=74% y DRBP1-130, OR=4.4, FE=77%).
4. Se necesitan mas estudios con un número mayor de animales para reforzar estos resultados.
5. El estudio de familias ayudaría a seguir la segregación de estos microsatélites en las poblaciones y poder establecer los haplotipos relacionados con la susceptibilidad o resistencia a la garrapata para ser considerados en un programa de selección.

LITERATURA CITADA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 3^a ed. España. Mc Graw Hill, 1998.
2. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia, USA. Elsevier Science. 2003.
3. Aida Y. Cloning of cDNAs and the molecular evolution of a bovine MHC class II DRA gene. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 204:195-202.
4. Aljamali M, Bowman AS, Dillwith JW, Tucker JS, Yates GW, Essenberg RC, Sauer JR. Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), as assessed by radio-immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect Bioch Mol Biol* 2002, 32: 331-341.
5. Alonso MR, Ulloa A. Hacia un proyecto nacional de investigación en genomas de animales domésticos. *Vet Mex* 1997; 28: 365-370.
6. Amos W, Sawcer SJ, Feakes RW, Rubinsztein DC. Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nat Genet* 1996; 13: 390-391.
7. Andersson L, Bohme J, Rask L, Peterson PA. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 1. Extensive polymorphism of DQ α and DQ β genes. *Anim Genet* 1986a; 17: 95-112.
8. Andersson L, Bohme J, Peterson PA, Rask L. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 2. Polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Anim Genet* 1986b; 17: 295-304.
9. Arriens MA, Hofer A, Obexer-Ruff G, Lazary S. Lack of association of bovine MHC class I alleles with carcass and reproductive traits. *Anim Genet* 1996; 27: 429-431.
10. Ballingall KT, Luyai A, McKeever DJ. Analysis of genetic diversity at the DQA loci in African cattle: evidence for a BoLA DQA3 locus. *Immunogenetics* 1997; 46:237-247.

11. Ballingall KT, Marasa BS, Luyai A, McKeever DJ. Identification of diverse BoLA DQA3 genes consistent with non-allelic sequences. *Anim Genet* 1998; 29: 123-129.
12. Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Neibergs HL, Li L, Zhang N, Grosse WM, Weiss J, Creighton P, McCarthy F, Ron M, Teale AJ, Fries R, McGraw RA, Moore SS, Georges M, Soller M, Womack JE, Hetzel DJS. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 1994; 6: 227-235.
13. Barendse W, Vaiman D, Kempes SJ, Sugimoto Y, Armitage SM, Williams JJ, Sun hs, Eggen A, Agaba M, Aleyasin SA, Band M, Bishop MD, Buitkamp J, Byrne K, Collins F, Cooper L, Coppettiers W, Denys B, Drinkwater RD, Easterday K, Elduque C, Ennis S, Erhardt, Ferretti L, Flavin N, Gao Q, Georges M, Gurung R, Hrlizius B, Hawkins G, Hetzel J, Hirano T, Hulme D, Jorgensen C, Kessler M, Kirkpatrick BW, Konfortov B, Kostia S, Kuhn C, Lenstra JA, Leveziel, H, Lewin HA, Leyhe B, Lil L, Martin Burriel I, McGraw RA, Miller JR, Moody DE, Moore SS, Nakane S, Nijman IJ, Olsaker I, Pomp d, Rando A, Ron M, Shalom A, Teale AJ, Thieven U, Urquhart BGD, Vage DI, Van de Weghe A, Varvio s, Velmala R, Vilkki J, Weikard R, Woodside C, Womack JE, Zanotti M, Zaragoza P. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm Genome* 1997; 8: 21-28.
14. Barger I.A., Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. *Vet Parasitol* 1989; 32: 21-35.
15. Baron RW, Weintraub J. Immunological responses to parasitic arthropods. *Parasitol Today* 1987; 3: 77-82.
16. Barriga OO, da Silva SS, Azevedo JSC. Relationships and influences between *Boophilus microplus* characteristics in tick naive or repeatedly infested cattle. *Vet Parasitol* 1995; 56: 225-238.
17. Beever JE, George PD, Fernando RL, Stormont CJ, Lewin HA. Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a paternal half-sib family of Angus cattle. *J Anim Sci* 1990; 68: 337-344.

18. Beever JE, Lewin HA, Barendse W, Andersson L, Armitage SM, Kukpatrick BW, Ma RZ, McGraw RA, Stone RT, Taylor JF. Report of the first workshop on the genetic map of bovine chromosome 23. *Anim Genet* 1996; 27: 69-75.
19. Bensaid A, Kaushal A, Machugh ND, Shapiro SZ, Teale AJ. Biochemical characterization of activation-associated bovine class I major histocompatibility complex antigens. *Anim Genet* 1989a; 20:241-255.
20. Bensaid A, Kaushal A, Young JR, Kemp SJ, Teale AJ. Organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité du bovin. *Ann Res Vet* 1989b; 20:389-394.
21. Bergman DK, Palmer MJ, Caimano MJ, Radolf JD, Wikel SK. Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. *J Parasitol* 2000; 86(3): 516-525.
22. Beugnet F, Chardonnet L. Tick resistance to pyrethroids in New Caledonia. *Vet Parasitol* 1995; 56: 325-338.
23. Blott SC, Williams JL, Haley CS. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 1999; 82: 613-619.
24. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet* 1980; 32:314-331.
25. Bowman AS, Dillwith JW, Sauer JR. Tick salivary prostaglandin: presence, origin and significance. *Parasitol today* 1996; 12(10): 388-396.
26. Burke MG, Stone RT, Muggli-Cockett EN. Nucleotide sequences and Northern analysis of a bovine major histocompatibility class II DR β -like cDNA. *Anim Genet* 1991; 22:343-352.
27. Caldwell J, Cumberland PA, Weseli DF, Williams JD. Breed differences in frequency of BoLA specificities. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1979; 10: 93-98.
28. Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, Pierson CA, Montgomery GW, Garmonsway HG, Beattie AE, Davies K, Maddox JF, Kappes SW, Stone RT, Nguyen TC, Penty JM, Lord EA, Broom JE, Buitkamp J, Schwaiger W,

- Epplen JT, Matthew P, Matthews Me, Hulme DJ, Beh KJ, McGraw RA, Beattie CW. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 1995; 140, 703-724.
29. Crawford AM, Kappes SM, Paterson KA, de Gortari MJ, Dodds KG, Freking BA, Stone RT, Beattie CW. Microsatellite evolution: testing the ascertainment bias hypothesis. *J Mol Evol* 1998; 46: 256-260.
30. Crouau-Roy B, Bouzekri N, Carcassi C, Clayton J, Contu L, Cambon-Thomsen A. Strong association between microsatellites and an HLA-B, DR haplotype (B18-DR3): implication for microsatellite evolution. *Immunogenetics* 1996; 43: 255-260.
31. Davies CJ, Joosten I, Andersson L, Arriens MA, Bernoco D, Byrns G, Bissumbhar B, van Eijk MJT, Kristensen B, Lewin HA, Mikko S, Morgan ALG, Muggli-Cockett NE, Nilsson PR, Oliver RA, Park CA, van der Poel JJ, Polli M, Spooner RL, Stewart JA. Polymorphism of bovine MHC class II genes. Joint report of the fifth international bovine lymphocyte antigen (BoLA) workshop. Interlaken Switzerland, 1 august. 1992. BoLA nomenclature Web Site. www.ri.bbsrc.ac.uk/bola.
32. Davies CJ, Andersson L, Ellis SA, Hensen EJ, Lewin HA, Mikko S, Muggli-Cockett EN, Van der Poel JJ, Russell GC. Nomenclature for factor of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA nomenclature committee. *Anim Genet* 1997; 28:159-168.
33. De la Fuente J, Rodríguez M, Redondo M, Montero C, García JC, Méndez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boué O, Machado H, Leonart R, Armas CA, Rey S, Rodríguez JL, Artiles M, García L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GavacTM against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 1997; 15:1-8.
34. De la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Mendez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boué O, Machado H, Leonart R. Vaccination against ticks (*Boophilus spp*): the experience with the Bm86 vaccine GavacTM. *Genet anal* 1999; 15: 143-148.

35. De la Fuente J, García-García JC, González DM, Izquierdo G, Ochagavía ME. Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. *Vet Parasitol* 2000, 92:209-222.
36. De Vos S, Zeinstra L, Taoufic O, Willadsen P, Jongejan F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp App Acarol* 2001; 25: 245-261.
37. Dietz AB, Detilleux JC, Freeman AE, Kelley DH, Stabel JR, Kehrl ME. Genetic association of Bovine Lymphocyte Antigen DRBE alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J Dai Sci* 1997; 80: 400-405.
38. Doenhoff MJ. The immune system. In: *Breeding for disease resistance in farm animals*. Edit by Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB. CABI publishing. NY, USA. 2nd edit. 2000. p.47-72.
39. Dossa SC, Kaaya GP, Essuman S, Odulaja A, Assoku RGK. Acquisition of resistance to the tick *Amblyomma variegatum* in Boran cattle, *Bos indicus* and the effects of *Trypanosoma congolense* and *Babesia bigemina* on host resistance. *Vet Parasitol* 1996; 62:317-330.
40. Dutia BM, MacCarthy-Morrogh L, Glass EJ, Knowles G, Spooner RL. Discrimination between major histocompatibility complex class II DQ and DR locus products in cattle. *Anim Genet* 1995; 26: 111-114.
41. Eggen A, Fries R. An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Anim Genet* 1995; 26, 215-236.
42. Ellegren H, Davies CJ, Andersson L. Strong association between polymorphisms in an intronic microsatellite and in the coding sequence of the BoLA-DRB3 gene: implications for microsatellite stability and PCR based DRB3 typing. *Anim Genet* 1993; 24:269-275.
43. Ellis SA, Ballingall KT. Cattle MHC: evolution in action? *Immunol Rev* 1999a; 167:159-168.
44. Ellis SH, Holmes EC, Staines KA, Smith KB, Stear MJ, McKeever DJ, MacHugh ND, Morrison WI. Variation in the number of expressed MHC

- genes in different cattle class I haplotypes. *Immunogenetics* 1999b; 50: 319-328.
45. Elo KT, Vilkki J, de Koning DJ, Velmala RJ, Maki-Tanila AV. A quantitative trait locus for live weight maps to bovine chromosome 23. *Mamm Genome* 1999; 10: 831-835.
46. Ennis PD, Jackson AP, Parham P. Molecular cloning of bovine class I MHC cDNA. *J Immunol* 1988; 141: 642-651.
47. Estrada-Peña A. Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. *Vet Parasitol* 2001; 98: 111-132.
48. Francischetti IMB, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 2002, 99 (10): 3602-3612.
49. Fraser DC, Craigmile S, Russell GC. Molecular cloning and sequencing of a cattle DRA cDNA. *Immunogenetics* 1994; 40:311.
50. Frisch JE. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int J Parasitol* 1999; 29: 57-71.
51. Frisch JE, O'Neill CJ, Kelly MJ. Using genetics to control cattle parasites, the Rockhampton experience. *Int J Parasitol* 2000; 30: 253-264.
52. García-Briones MM, Russell GC, Oliver RA, Tami C, Taboga O, Carrillo E, Palma EL, Sobrino F, Glass EJ. Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine* 2001; 19: 1167-1171.
53. García-García JC, Gonzalez IL, Gonzalez DM, Valdes M, Mendez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni d, Fragoso H, Ortiz M, Rodriguez M, De la Fuente J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 883-895.

54. García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González IL, Valdes M, Mendes L, de la Fuente J. Control of ticks resistant to immunizations with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000; 18: 2275-2287.
55. García-Vázquez ZS. Avances en el conocimiento de la epidemiología de la babesiosis. Memorias del 2o. Seminario Internacional de Parasitología Animal. 9-11 octubre 1991, Oaxtepec (Morelos) México. México D.F. DEC. FMVZ. UNAM, 1991: 172-170 p.
56. Gelhaus A, Schnittger L, Mehlitz D, Horstmann RD, Meyer CG. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. *Anim Genet* 1995; 26: 147-153.
57. Gelhaus A, Forster B, Wipperfurth C, Horstmann RD. Evidence for an additional cattle DQA locus, BoLA-DQA5. *Immunogenetics* 1999a; 49: 321-327.
58. Gelhaus A, Forster B, Horstmann RD. Evidence for an additional cattle DQB locus. *Immunogenetics* 1999b; 49: 879-885.
59. Gilliespie BE, Jayarao BM, Dowlen HH, Oliver SP. Analysis and frequency of Bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *J. Dairy Sci* 1999; 82: 2049-2053.
60. Gough JM, Kemp DH. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *J Parasitol* 1993; 79(6): 900-907.
61. Groenen MAM, Van der Poel JJ, Dijkhof RJM, Giphart MJ. Cloning of the bovine major histocompatibility complex class II genes. *Anim Genet* 1989; 20:267-278.
62. Guglielmone AA, Mangold AJ, Gaido AB, Aguirre DH. Natural parasitism with *Boophilus microplus* in cattle biotypes with different proportions of *Bos taurus* and *Bos indicus* genes. *Res Rev Parasitol* 1992; 52: 77-82.

63. Guglielmo AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in south and Central America. *Vet Parasitol* 1995; 57: 109-119.
64. Hines HC, Ross MJ. Serological relationships among antigens of the BoLA and the bovine M blood group systems. *Anim Genet* 1987;18: 361-369.
65. Hirano t, Nakane S, Mizoshita K, Yamakuchi H, Inoue-Murayama M, Watanabe T, Barendse W, Sugimoto Y. Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Anim Genet* 1996; 27: 365-368.
66. Hughes VL, Randolph SE. Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites. *J Parasitol* 2001; 87(1): 49-54.
67. Inokuma H, Kerlin RL, Kemp DH, Willadsen P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Vet Parasitol* 1993; 47: 107-118.
68. Jonsson NN. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. *Aust Vet J* 1997; 75: 802-807.
69. Jonsson NN, Mayer DG, Matschoss AL, Green PE, Ansell J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Vet Parasitol* 1998; 78: 65-77.
70. Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Albrecht MS, Hungerford J, Ansell J. Evaluation of TickGARD^{PLUS}, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol* 2000a, 88:275-285.
71. Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Ansell J. Resistance of Holstein Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet Parasitol* 2000b; 89: 297-305.
72. Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TPL, López Corrales NL, Beattie CW. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res* 1997; 7:235.

73. Kemp SJ, Hishida O, Wambugu J, Rink A, Longeri ML, Ma RZ, Da Y, Lewin HA, Barendse W, Teale AJ. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Anim Genet* 1995; 26, 299-306.
74. Kerr RJ, Frisch JE, Kinghorn BP. Evidence for a major gene for tick resistance in cattle. In: *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to livestock production*. 1994 August. Guelph (Ontario) Canada. 1994; 20: 265-268.
75. Kopecky J, Kuthejlova M, Pechova J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- γ by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunol* 1999; 21: 351-356.
76. Latif AA, Punyua DK, Capstick PB, Nokoe S, Walker AR, Fletcher JD. Histopathology of attachment sites of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* on Zebu cattle of varying resistance to ticks. *Vet Parasitol* 1991; 38:205-213.
77. Leveziel H. BoLA et leucose bovine. *Ann Rech Vet* 1989; 20:395-396.
78. Lunden A, Sigurdardottir S, Edfors-Lilja I, Danell B, Rendel J, Andersson L. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. *Anim Genet* 1990; 21:221-232.
79. Lunden A, Andersson-Eklund L, Andersson L. Lack of association between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and production traits. *J Dai Sci* 1993; 76: 843-852.
80. Lunney JK, Grimm DR. 1994. Major histocompatibility complex: current state of knowledge and its use in and impact livestock improvement. In: *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to livestock production*. 1994 August. Guelph (Ontario) Canada. 1994; 20: 230-237.
81. Ma RZ, Russ I, Park C, Heyen DW, Beever JE, Green CA, Lewin HA. Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellites from the bovine genome. *Anim Genet* 1996; 27: 43-47.

82. MacHugh DE, Loftus RT, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc Res Soc Lond B* 1994; 256: 25-31.
83. MacHugh DE. 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. These doctoral. Dpt. of genetics. Trinity College. Dublin University. 258 p.
84. Mackinnon MJ, Meyer K, Hetzel DJS. Genetic variation and covariation for growth, parasite resistance and heat tolerance in tropical cattle. *Livest Prod Sci* 1991; 27: 105-122.
85. McShane RD, Gallagher DS, Newkirk H, Taylor JF, Burzlafl JD, Davis SK, Skow LC. Physical localization and order of genes in the class I region of the bovine MHC. *Anim Genet* 2001; 32: 235-239.
86. Maillard JC, Kemp SJ, Leveziel H, Teale AJ, Quéval R. Le complexe majeur d'histocompatibilité de bovines ouest africains. Typage d'antigenes lymphocytaires (BoLA) de taurins Baoulé (*Bos Taurus*) et de zébus Soudaniens (*Bos indicus*) du Burkina Faso (Afrique occidentale). *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1989; 42:275-281.
87. Maillard JC, Chantal I, Berthier D. Sequencing of four new BoLA-DRB3 and six new BoLA-DQB alleles. *Anim Genet* 2001; 32: 40-53.
88. Maldini PV. Influência da raça na resistência aos parasitas. *Inf Agropec Belo Horizonte* 1992; 16: 40-44.
89. Marello KL, Gallagher A, McKeever DJ, Spooner RL, Russell GC. Expression of multiple DQB genes in *Bos indicus* cattle. *Anim Genet* 1995; 26: 345-349.
90. Medina E, North RJ. Resistance ranking of some common inbreeds mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramps1 genotype. *Immunology* 1998; 93: 270-274.
91. Mejdell CM, Lie O, Solbu H, Arnet EF, Spooner RL. Association of major histocompatibility complex antigens (BoLA-A) with AI bull progeny test

- results for mastitis, ketosis and fertility in Norwegian cattle. *Anim Genet* 1994; 25: 99-104.
92. Mellor W, O'Rourke PK, Waters KS. Tick infestations and their effects on growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* cattle in the wet tropics. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 1983; 23: 348-353.
93. Meltzer M. A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. *Vet Parasitol* 1996; 67: 275-279.
94. Minjauw B, de Castro JJ. Host resistance to ticks and tick-borne diseases: its role in integrated control. In: *Breeding for disease resistance in farm animals*. Edit by Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB. CABI publishing. NY, USA. 2nd edit. 2000. p.153-170.
95. Miranpuri GS. Relationship between the resistance of crossbred cattle to ticks, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) and *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch, 1844). *Vet Parasitol* 1989; 31: 289-301.
96. Miretti MM, Ferro JA, Lara MA, Contel EPB. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in South American cattle. *Biochem Genet* 2001; 39: 311-324.
97. Morooka A, Asahina M, Kohda Ch, Tajima S, Nimi M, Nishino Y, Sugiyama M, Aida Y. Nucleotide sequence and the molecular evolution of a new A2 gene in the DQ subregion of the bovine major histocompatibility complex. *Bioch and Biophys Res* 1995; 212 (1):110-117.
98. Morrow AN, Koney EBM, Heron D. Control of *Amblyomma variegatum* and dermatophilosis on local and exotic breeds of cattle in Ghana. *Trop Anim Hlth Prod* 1996; 28: 44S-49S.
99. Muggli-Cockett NE, Stone RT. Identification of genetic variation in the bovine major histocompatibility complex DR β -like genes using sequenced bovine genomic probes. *Anim Genet* 1988; 19: 213.
100. Muggli-Cockett NE, Stone RT. Partial nucleotide sequence of a bovine

- major histocompatibility class II DR β -like gene. *Anim Genet* 1989; 20:361-370.
101. Oberem PT. The immunological basis of host resistance to ticks. A review. *J South African Vet Assoc* 1984; 55: 215-217.
102. Ostergard H, Kristensen B, Andersen S. Investigations in farm animals of associations between the MHC system and disease resistance and fertility. *Livestock Prod Sci* 1989; 22:49-67.
103. Park CA, Hines HC, Monke DR, Threlfall WT. Association between the bovine major histocompatibility complex and chronic posterior spinal paresis –a form of ankylosing spondylitis- in Holstein bulls. *Anim Genet* 1993; 24: 53-58.
104. Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Couto Pimentel J, Guzman F, Patarroyo ME, Vargas MI, Prates AA, Dias Mendes MA. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopath* 2002, 88: 163-172.
105. Paterson S, Wilson K, Pemberton JM. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries L.*). *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:3714-3719.
106. Quiroz RH. 1991. Situación actual de la problemática de las garrapatas. Memorias del 2º. Seminario Internacional en Parasitología Animal; 1991 octubre 9-11. Oaxtepec, (Morelos) México. DEC-UNAM, 1991: 3-18 p.
107. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 1ª ed. México, D.F. Limusa, 1990.
108. Quiroz R.H., 1993. Importancia sanitaria y económica de las garrapatas. En: Programa de acreditación de MVZ. Campaña contra la garrapata. SARH ed. México D.F.
109. Ramel C. Mini and microsatellites. Environmental health perspectives. 1997; 105:781-787.

110. Rijo CE. Control biológico de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1878). Memorias del XXXavo. Aniversario del Instituto de Ciencia Animal. 1995. La Habana, Cuba. Instituto de Ciencia Animal.
111. Roberts JA. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). J of Parasitol 1968a; 54: 657-662.
112. Roberts JA. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. I. Development of ticks on *Bos taurus*. J Parasitol 1968b; 54: 663-666.
113. Roberts JA. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. J Parasitol 1968c; 54: 667-673.
114. Rothschild MF, Skow L, Lamont SJ. The major histocompatibility complex and its role in disease resistance and immune responsiveness. In: Breeding for disease resistance in farm animals. Edit by Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB. CABI publishing. NY, USA. 2nd edit. 2000. p.73-106.
115. Russell GC. BoLA class II nucleotide sequences, 1996. Report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. Anim Genet 1997; 28:169-180.
116. Russell GC, Marelllo KL, Gallagher A, McKeever DJ, Spooner RL. Amplification and sequencing of expressed DRB second exons from *Bos indicus*. Immunogenetics 1994; 39:432-436.
117. Russell GC, Fraser DC, Craigmile S, Oliver RA, Dutia BM, Glass EJ. Sequence and transfection of BoLA-DRB3 cDNAs. Anim Genet 2000; 31:219-222.
118. Russell GC. Sequence duplication at the 3' end of BoLA-DQB gene suggests multiple allelic lineages. Immunogenetics 2000; 52: 101-106.
119. Sangster NC. Managing parasiticide resistance. Vet Parasitol 2001; 98: 90-109.
120. SAS Institute Inc. 1990. SAS Institute Inc (Ed.). Cary, NC. USA
121. Sawhney SMS, Taylor DW, Russell GC. Polymorphism of bovine major histocompatibility complex (MHC) class I genes revealed by polymerase

- chain reaction (PCR) and restriction enzyme analysis. *Anim Genet* 2001; 32: 27-31.
122. Schletterer C. Microsatellites in Molecular genetics. Analysis of population, a practical approach. Hoelzel AR, editor. Oxford University Press. NY. 1998.
123. Seifert GW. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust J Agric Res* 1971; 22: 159-168.
124. Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JCM, Leslie KE. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim Genet* 1998; 29:185-193.
125. Sharif S, Mallard BA, Sargeant JM. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Vet Immunol Immunopath* 2000; 76: 231-238.
126. Sigurdardottir S, Borsch C, Gustafsson K, Andersson L. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Anim Genet* 1991a; 22:199-209.
127. Sigurdadottir S, Mariani P, Groenen MAM, Van der Poel J, Andersson L. Organization and polymorphism of bovine major histocompatibility complex class II genes as revealed by genomic hybridizations with bovine probes. *Anim Genet* 1991b; 22:465-475.
128. Sigurdardottir S, Lunden A, Andersson L. Restriction fragment length polymorphism of DQ and DR class II genes of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Genet* 1988; 19:133-150.
129. Sitte K, Brinkworth R, East IJ, Jazwinska EC. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85:129-135

130. Solis SS. Epidemiología de garrapatas *Boophilus* y *Amblyomma* en México. Memorias del 2o. Seminario Internacional de Parasitología Animal. 9-11 octubre 1991. Oaxtepec (Morelos) México. México D.F. DEC. FMVZ. UNAM. 1991: 19-30 p.
131. Solomon G, Kaaya GP. Development, reproductive capacity and survival of *Amblyomma variegatum* and *Boophilus decoloratus* in relation to host resistance and climatic factors under field conditions. *Vet Parasitol* 1998; 75: 241-253.
132. Spooner RL. Genetics of disease resistance and the potential of genome mapping. *Trop Anim Hlt Prod* 1997; 29: 95s-97s.
133. SPSS for Windows statistical analysis. V.10.0. 1999. SPSS Inc. Chicago, Ill. USA.
134. Starckenburg RJ, Hanser LB, Kehrl ME, Chester-Jones H. Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins in milk selection and control lines. *J. Dai Sci* 1997; 80:3411-3419.
135. Stear MJ, Lyons I, Duffy JH, Nicholas FW, Brown SC. A comparison of bovine lymphocyte antigens. *Anim Blood Groups Bioch Genet* 1985;16: 135-143.
136. Stear MJ, Dimmock CK, Newman MJ, Nicholas FW. BoLA antigens are associated with increased frequency of persistent lymphocytosis in bovine leukaemia virus infected cattle and with increased incidence of antibodies to bovine leukaemia virus. *Anim Genet* 1988; 19: 151-158.
137. Stear MJ, Nicholas FW, Brown SC, Holroyd RG. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick (*Boophilus microplus*) assessed in three different seasons. *Vet Parasitol* 1989; 31:303-315.
138. Stear MJ, Hetzel DJS, Brown SC, Gershwin LJ, Mackinnon MJ, Nicholas FW. The relationships among ecto and endoparasite levels, Class antigens of the Bovine Major Histocompatibility System, Immunoglobulin E levels and weight gain. *Vet Parasitol* 1990; 34:303-321.

139. Stone RT, Pulido JC, Duyk GM, Kappes SM, Keele JW, Beattie CW. A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mamm Genome* 1995; 6, 714-724.
140. Sutherst RW, Wharton RH, Cook IM, Sutherland ID, Bourne AS. Long-term population studies on the cattle tick (*B. microplus*) on untreated cattle selected for different levels of tick resistance. *Aust J Agric Res* 1979; 30: 353-368.
141. Takeshima S, Ikegami M, Morita M, Nakai Y, Aida Y. Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics* 2001; 53: 74-81.
142. Takeshima S, Nakai Y, Ohta M, Aida Y. Short communication: characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese Shorthorn cattle by polymerase chain reaction- sequence-based typing. *J. Dairy Sci* 2002; 85: 1630-1632.
143. Tawah CL. Comparative study of tick burdens in Gudali and Wakwa cattle under natural infestation in the subhumid highlands of Wakwa, Cameroon. Preliminary observations. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1992; 45: 310-313.
144. Teale AJ, Kemp SJ, Morrison WI. The major histocompatibility complex and disease resistance in cattle. In: Owen AR, Gwynedd JB, editors. United Kingdom: CAB international, 1994: 86-99.
145. Teale AJ, Baldwin CL, Ellis JA, Newson J, Goddeeris BM, Morrison I. Alloreactive bovine T lymphocyte clones: an analysis of function, phenotype and specificity. *J Immunol* 1986; 136: 4392-4398.
146. Tizard I. *Inmunología veterinaria*. 6^a ed. México. Mc Graw Hill Interamericana editores S.A. de C.V., 2002.
147. Todd JA. La carte de microsatellites est arrivée. *Hum Mol Genet* 1992, 1(9): 663-666.
148. Turner HG, Short AJ. Effects of field infestations of gastrointestinal helminthes and of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on growth of three breeds of cattle. *Aust J Agric Res* 1972, 23: 177-193.

149. Utech KBW, Seifert GW, Wharton RH. Breeding Australian Illawarra Shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors affecting resistance. Aust J Agric Res 1978; 29: 411-422.
150. van Eijk MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. Anim Genet 1992; 23: 483-496.
151. van Haeringen WA, Gwakisa PS, Mikko S, Eythorsdottir E, Holm LE, Olsaker I, Outteridge P, Andersson L. Heterozygosity excess at the cattle DR locus revealed by large-scale genotyping of two closely linked microsatellites. Anim Genet 1999; 30: 169-176.
152. Vega MCA. Actualidad e importancia de las enfermedades del ganado causadas por hemoparásitos. Memorias del 2o. Seminario Internacional de Parasitología Animal. 9-11 oct 1991. Oaxtepec (Morelos) México. México D.F. DEC. FMVZ. UNAM, 1991: 144-152.
153. Wambura PN, Gwakisa PS, Silayo RS, Rugaimukamu EA. Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. Vet Parasitol 1998; 77: 63-70.
154. Wharton RH, Utech KBW, Turner HG. Resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and heritability. Aust J Agric Res 1970; 21: 163-181.
155. Weber JL. Informativeness of human (dC-A)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. Genomics 1990a; 7:524-530.
156. Weber J.L., 1990b. Human DNA polymorphisms based on length variations in simple sequence tandem repeats. In: Genome analysis. Genetic and physical mapping. Vol. 1. Cold Spring Harbor Lab. Press.
157. Weigel KA, Freeman AE, Kehrli ME, Stear MJ, Kelley DH. Association of class I bovine lymphocyte antigen complex alleles with health and production traits in dairy cattle. J Dai Sci 1990; 73:2538-2546.

158. Wikel SK, Alarcon-Chaidez FJ. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Vet Parasitol* 2001; 101: 275 - 287.
159. Willadsen P. Vaccines, genetics and chemicals in tick control. The Australian experience. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 1997a; 29: 91s-94s.
160. Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet Parasitol* 1997b; 71: 209-222.
161. Willadsen P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Vet Parasito* 2001, 101: 353-367.
162. Woolf, B., 1955. One estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet.* 19, 251-253.
163. Xu A, Clarke TJ, Teutsch MR, Schook LB, Lewin HA. Sequencing and genetic analysis of a bovine DQB cDNA clone. *Anim Genet* 1991; 22:381-389.
164. Xu A. McKenna K. Lewin H. Sequencing and genetic analysis of a bovine DQA cDNA clone. *Immunogenetics* 1993; 37:231-234.
166. Yañez KM. Uso de marcadores moleculares RAPDs (Random amplified polymorphic DNA) en ganado bovino adaptado a condiciones de trópico húmedo (tesis de maestría). Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. (CATIE), 1996.

Anexo 1
Loci del Cromosoma 23
(BoLA nomenclature web site. www.ri.bbsrc.ac.uk/bola/mhclseq.htm)

Simbolo	Nombre
1507	Segmento 1507 de ADN
2148	Segmento 2148 de ADN
2214	Segmento 2214 de ADN
645	Segmento 645 de ADN
AP2B	
BF	Factor B, properdina
BM1258	Segmento BM1258 de ADN
BM1443	Segmento BM1443 de ADN
BM1815	Segmento BM1815 de ADN
BM1818	Segmento BM1818 de ADN
BM1905	Segmento BM1905 de ADN
BM3401	Segmento BM3401 de ADN
BM47	Segmento BM47 de ADN
BM7233	Segmento BM7233 de ADN
BMS2279	Segmento BMS2279 de ADN
BMS2275	Segmento BMS2275 de ADN
BMS4036	Segmento BMS4036 de ADN
BMS468	Segmento BMS468 de ADN
BP34	Segmento BP34 de ADN
BTN	Butyrofilina
BoLA-A	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase I
BoLA-B	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase I
BoLA-D@	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, cluster
BoLA-DIB	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DIB
BoLA-DMA	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DMA
BoLA-DMB	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DMB
BoLA-DNA	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DNA
BoLA-DQA	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DQA
BoLA-DQB	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DQB
BoLA-DRA	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DRA
BoLA-DRB	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DRB
BoLA-DRB1	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DRB1
BoLA-DRB2	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DRB2
BoLA-DRB3	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DRB3
BoLA-DRBP1	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DRBP1
BoLA-DYA	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DYB
BoLA-DYB	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DYB
BoLA-DZA	Complejo Principal de Histocompatibilidad, clase II, DZA
C4A	Componente 4 del complemento
CSH1	Hormona Somatomatropina corionica 1 (PL)
CSNK2B	Casein Kinasa2, polipeptido beta
CSSM005	Segmento CSSM005 de ADN
CSSM010	Segmento CSSM010 de ADN

CSSM024	Segmento CSSM024 de ADN
CSSM035	Segmento CSSM035 de ADN
CYP21	Citocromo 450, subfamilia XXI, (esteroide 21 hidroxilasa)
EAM	Antígeno M del eritrocito
F13A1	Factor XIII de coagulación, Polipeptido A1
GLO1	Glioxalaza 1
HEL15	Segmento HEL15 de ADN
HSPA1	Proteína 1 de choque térmico 70 kD
HSPA2	Proteína 2 de choque térmico 70 kD
INRA064	Segmento INRA064 de ADN
INRA132	Segmento INRA132 de ADN
IOBT1479	Segmento IOBT1479 de ADN
IOBT528	Segmento IOBT528 de ADN
KIEL_E7	Est A1461436 (KIEL_E7)
KIEL AF_4	Segmento KIEL AF_4 de ADN
KIEL AF_5	Segmento KIEL AF_5 de ADN
LMP7	Proteosoma subunidad, beta tipo 8
MGTG7	Segmento MGTG7 de ADN
MOG	Glicoproteína oligodendrocito mielina
PL	Lactogeno placentar
PRL	Prolactina
PRP1	Proteína 1 relacionada a prolactina
PRP10	Proteína 10 relacionada a prolactina
PRP3	Proteína 3 relacionada a prolactina
PRP6	Proteína 6 relacionada a prolactina
PRP@	Proteína relacionada a prolactina, cluster
PSMB9	Proteosoma subunidad, beta tipo 9
RI1479	Segmento RI1479 de ADN
RM002	Segmento RM002 de ADN
RM033	Segmento RM033 de ADN
RM185	Segmento RM185 de ADN
SMHCC	Microsatélite del MHC clase I de Ovino
SRC119	Segmento SRC119 de ADN
TAMLS113.3	Segmento TAMLS113.3 de ADN
TAP2	Transportador 2
TCP1	Complejo T-1
TNF	Factor de necrosis tumoral alfa
UWCA1	Segmento UWCA1 de ADN
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Anexo 2.
Genes del BoLA
(Davies *et al*, 1997)

Genes	Características
BoLA clase I	Cadena clase I
A	
B	
BoLA clase IIa	
DRA	DR α monomórfica
DRB1	DRB pseudogene
DRB2	DR β bajo nivel de transcripción
DRB3	DR β alto nivel expresado
DQA	DQ α expresado
DQB	DQ β expresado
BoLA clase IIb	
DOB	DO β no se sabe si esta expresado
DNA	DN α no se sabe si esta expresado
DYA	DY α selectivamente expresado
DYB	DY β no se sabe si esta expresado
DIB	DI β selectivamente expresado
DMA	DM α expresado
DMB	DM β expresado
TAP	Transporta el péptido
LMP2	Secuencia relacionada al proteosoma
LMP7	Secuencia relacionada al proteosoma

Anexo 3

Secuencias de ADN en BoLA clase I

(BoLA nomenclature web site. www.ri.bbsrc.ac.uk/bola/mhclseq.htm)

Nombre de la secuencia	Especificidad asociada a BoLA	Número de acceso
BL3-6	Aw33	M21044
BL3-7	Aw33	M21043
pBoLA-1	Nd	M24090
A10	A10	M69206
KN104	KN104 (B.indicus)	M69204
BSA	A2/A30	L02832
BSF	A2/A30	L02834
BSN	A2/A30	L02835
BSC	A2/A30	L02833
BSX	A2/A30	U01187
pBoLA-19	A11	X82671-75
HD6	A18	X80934
HD1	A31	X80933
HD7	A31	X80935
HD15	A18/A31	X80936
JSP.1	A10	X92870
pBoLA-4	A11	X87645, X97646-49
D18.1	A14	Y09205
D18.2	A11	Y09206
D18.3	A11	Y09207
D18.4	A14	Y09208
D18.5	A14	AJ010867
MAN1	A12	AJ010863
MAN2	A19	AJ010861
MAN3	A12 (Angus)	AJ010864
MAN8	A19 (Angus)	AJ010866
4221.1	A12 (Friesian)	AJ010865
3349.1	A17	AJ010862

Anexo 4

Haplotipos del BoLA clase II

BoLA nomenclatura web site (www.ri.bbsrc.ac.uk/bola/mhc2hap.htm)

DH ^a	Serología Clase II	DRB IEF	DRB3 PCR RFLP	DRB3 MS PCR	DRB2 TM RFLP	DRB RFLP	DQA RFLP	DQB RFLP	DQB TM RFLP	Ra za s
1 ^a	Nd	9	1	189	11	5A	5	5	Neg	1
3A	Dw1,Dc6	5	3	195	21	10	10	10	14	2
3B	Dc6	12	3	207	21	10	7F	7E	53	3
7 ^A	Dw2	2	7	193	32	2 ^A	2	2	44	4
7 ^A	Dw2	2	7	193	32	2B	2	2	44	5
8 ^A	Dw1, Dc12	6	8	207	46	12B	12	12	213	6
9 ^A	Dc13	U19	9	185	26	3F	3 ^a	3B	43	7
9B	Nd	Nd	9	185	23	3C	3B	3B	43	8
10 ^A	Nd	7	10	165	44	14	14	14	46	9
10B	Nd	6	10	193	25	11 ^A	14	14	46	10
10C	Dw1,8	6	10	193	25	11 ^A	11B	11 ^A	11	11
11 ^A	Dc13.20	1	11	187	11	3D	3 ^A	3 ^A	43	12
11 ^A	Dc13.20	1	11	187	11	3E	3 ^A	3 ^A	43	13
11B	Dc13.20	1	11	187	11	3E/G	3B	3B	43	14
11C	Dw1	6	11	195	25	Nd	9 ^A	9A	13	15
12 ^A	Dc5	6	12	179	31	13C	13B	13B	11	16
12B	Dc5	6	12	185	21	7E	7C	7E	53	17
15 ^A	Dw3	U17	15	167	21	1F	1D	1	45	18
15B	Dw3	6	15	183	13	1E	1E	1	45	19
15C	Nd	U18	15	185	11	3F	3B	3B	43	20
16 ^A	Dw1,8	5	16	193	25	11 ^A	11 ^A	11C	13	21
17 ^A	Dw1	Nd	17	179	21	11E	11D	11E	11	22
18 ^A	Dw1,4 Dc7	4	18	183	46	5B	5	5	Neg	23

18 ^A	Dw1,4 Dc7	4	18	183	46	5C	5	5	Neg	24
20 ^A	Dw3	U21	20	173	46	1G	1D	1	45	25
21 ^A	Nd	4	21	187	21	8 ^A	8	8	46	26
21 ^A	Nd	4	21	187	21	8C	8	8	46	27
22 ^A	Dc13	11	22	165	24	3I	3C	3C	33	28
22B	Dw1, Dc9,12	7	22	175	25	11 ^A	9B	9B	42	29
22C	Dw1,8 Dc9	7	22	187	25	11 ^A	11 ^A	11 ^A	12	30
22E	Dw1,Dc9	7	22	187	25	11 ^A	11F	11C	13	31
22F	Dc9	7	22	187	25	4 ^A	3 ^A	4	43	32
22G	Nd	11	22	191	11	3H	3B	3C	33	33
23 ^A	Dw3	10	23	157	11	7D	7D	7A	45	34
24 ^A	Dw3	3	24	185	25	1 ^A	1 ^A	1	45	35
27 ^A	Dw3, Dc11	7	27	171	25	1B	1B	1	45	36
28 ^A	Dw3	8	28	163	11	7 ^A	7 ^A	7 ^A	45	37
31 ^A	Dw1,4	2	31	181	25	5D	5	5	Neg	38

a= Haplotipo clase IIa, número de referencia

Nd = no determinado

1= 1 British Friesian x Hereford

2= 4 British Friesian, 2 Danish Black Pied

3= 1 British Friesian

4= 1 British Friesian, 7 Danish Black, 1 Holstein F, 1 British Friesian x Hereford

5= 1 Jersey

6= 4 British Friesian, 5 Danish Black Pied

7= 1 Jersey

8= 1Brown Swiss

9= 1 Jersey

10= 1 Ayrshire x Limousin

11= 1 Brown Swiss, 2 Danish Red

12= 3 British Friesian, 1 Holstein F

13= 1 British Friesian x Ayrshire

14= 1 Danish Red

15= 1 Danish Red

16= 1 Ayrshire x Limousin

17= 1 British Friesian x Hereford

18= 5 Danish Red
19= 2 British Friesian
20= 4 Jersey
21= 7 Danish Black Pied, 1 British Friesian x Ayrshire
22= 1 Jersey
23= 2 Danish Black Pied, 1 British Friesian x Hereford
24= 3 British Friesian
25= 1 Jersey
26= 1 Jersey
29= 1 British Friesian
30= 3 British Friesian, 2 Danish Black Pied
31= 3 Danish Red
32= 1 British Friesian
33= 1 Brown Swiss
34= 2 Holstein F
35= 5 British Friesian, 3 Danish Black Pied, 1 Holstein F
36= 3 Danish Red
37= 4 British Friesian, 1 Brown Swiss, 3 Danish Black Pied
38= 4 Danish Black Pied

Anexo 5.
Microstélites de la región del BoLA
(Beever *et al*, 1996)

Nombre	Tipo	Alelos	Pares bases	Otro nombre
INRA064	Micro	10	177-187	
INRA132	Micro	9	155-165	
BoLA-DIB	RFLP	3		
COSSM005				
BM47	Micro	19	94-196	
BM3401	Micro	9	119-145	
RM033	Micro	8	150-166	
BM1815	Micro	8	140-170	
VEGF	Micro	2	162-168	
UWCA1	Micro	12	102-130	
BM1258	Micro	9	100-128	
EAM	Ag	2		
	eritrocitos			
BoLA-DRB1	Micro	10	121-137	MB025
BoLA-DRB1	Micro	12	202-229	MB026
BoLA-DRB2	SSCP	3		MB024SP
BoLA-DRB2	SSCP	3		MB024SM
RM002	Micro	5	102-112	CA002
BMS468	Micro	4	128-134	
CYP21	Micro	11	188-224	MB019
CYP21	Micro	4	189-221	CSPS107
L29386	Micro	10	148-170	TAMSLS113
BMS2275	Micro	9	108-140	
PRL	Micro	3	156-162	MB027
RM185	Micro	8	96-112	
BM7233	Micro	11	104-126	
BM1818	Micro	8	258-272	
BMS4036	Micro	3	95-101	
BP34	Micro	8	310-324	
CSSM024				
BMS2269	Micro	10	137-161	
BM1905	Micro	11	170-199	
BM1443	Micro	11	137-165	

Anexo 6

EXTRACCION DE ADN (sangre)

Equipo y reactivos:

EDTA 500 mM, Cloruro de Mg 1M, Nonidet P40 10%, agua destilada, proteinasa K 20 mg/ml, solución de lisis (10 mM TRIS HCl pH8, NaCl 400 mM, EDT 20 mM, SDS 0,5%), NaCl 6M, isopropanol, etanol 70%, TE (TRIS Cl pH8 10 mM + EDTA pH8 1 mM).

Tubos de 50 ml, tubos ependorf, centrifuga refrigerada, vortex, baño Ma., minicentrifuga, baño seco.

Métodología:

1. Extracción:

1. Se toma una muestra de sangre en tubo vacutainer con EDTA (7 ml)
2. Se coloca en tubos de 50 ml y se le agrega solución 1 (5 ml MgCl + 1000 agua destilada)
3. Se centrifuga a 3000 r.p.m. por 20 min y se decanta
4. Se agrega solución 1 y se agita. Centrifugar a 3000 r.p.m. por 20 min.
5. Se decanta y se agrega solución 2 (5 ml MgCl, 10 ml nonidet P40 y agua destilada). Se deshace el tapon blanco y se pasa a otros tubos
6. Se centrifuga a 3000 r.p.m. por 20 min., se decanta y se agita.
7. Se agrega un volumen de solución de lisis y la proteinasa K (50-100 µg/ml)
8. Dejar en baño Ma toda la noche
9. Agregar NaCl (175 µl/ml sangre) y agitar vigorosamente. Centrifugar a 3000 r.p.m. por 20 min.
10. Al sobrenadante se le agregan partes iguales de isopropanol. Agitar
11. Centrifugar a 4000 r.p.m. por 10 min. y decantar
12. Pasar el ADN a eppendorf y agregar etanol (300 µl). Centrifugar a 10 000 r.p.m. por 5 min.
13. Decantar y agregar de nuevo etanol y centrifugar
14. Secar al vacío o al medio ambiente y agregar agua bidestilada o TE según el tamaño de la pastilla
15. Incubar a 60°C por una hora

b) Integridad:

Una vez obtenido el ADN se procede a evaluar su integridad en un gel de agarosa al 1% (85 volts a 40 min). Se prepara 100 ml de gel con 1 g de agarosa, 20 ml de TBE 5X y agua destilada. De cada una de las muestras se toma 3 μ l de ADN + 2 μ l de buffer + 5 μ l TBE y como referencia se utiliza el marcador lambda BS2. Despues del corrimiento electroforetico el gel se pasa a teñir en bromuro de etidio y posteriormente se visualiza por luz ultravioleta (UVP)

c) Cuantificación del ADN

Para realizar la cuantificación se lleva a cabo en el fluorómetro, el cual utiliza un buffer TNE 1X (colorante, TNE 10X y agua destilada) y el ADN estandar para calibrarlo, ademas del ADN muestra para leerlo. Se estadariza el fluorometro con ADN estandar (100 ng/ μ l) y finalmente se realiza la cuantificación de las muestras.

Anexo 7

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Equipo y reactivos

ADN (50ng/ μ l)m Oligos (Fy R) (10 μ mol), dNTP's (2mM), Triton (2%), BSA (10mg/ml), Buffer C (MgCl₂ 1M + tris HCl pH 8.4 1M + KCl 1M + 20 mg/ml gelatina + H₂O), Tag polimerasa (5U/ μ l) + H₂O.

Termociclador, camaras para electroforesis

Metodología

1. Se prepara un cocktail según el numero de muestras + 1
2. Se toma 27 μ l del cocktail + 3 μ l de ADN muestra, en total son 30 μ l para amplificar
3. La tag polimerasa debe estar en hielo cuando se saca del congelador
4. Se prepara un gel de agarosa al 3%
5. Se utiliza TBE 1X como buffer de corrida
6. Programar el termociclador según la alineación de cada microsatélite

Microsatelite	Desnaturaliza (1ciclo)	Alineación (30 ciclos)	Extensión (1 ciclo)
DRB3	94°C/3 min	94°C/30 s 58°C/30 s 72°C/30 s	72°C/3 min
DRBP1-BM1815	94°C/3 min	94°C/30 s 64°C/30 s 72°C/30 s	72°C/3 min
RM185	94°C/3 min	94°C/30 s 59°C/30 s 72°C/30 s	72°C/3 min

7. Producto de PCR

Para evaluar el producto de PCR se hace un corrimiento electroforetico utilizando un gel de agarosa (82 volts/45 min) al 3% teñido con bromuro de etidio y para evaluar los fragmentos amplificados se utiliza un marcador (pBR / Msp1),.Se visualiza y se evalua por UVP

Anexo 8

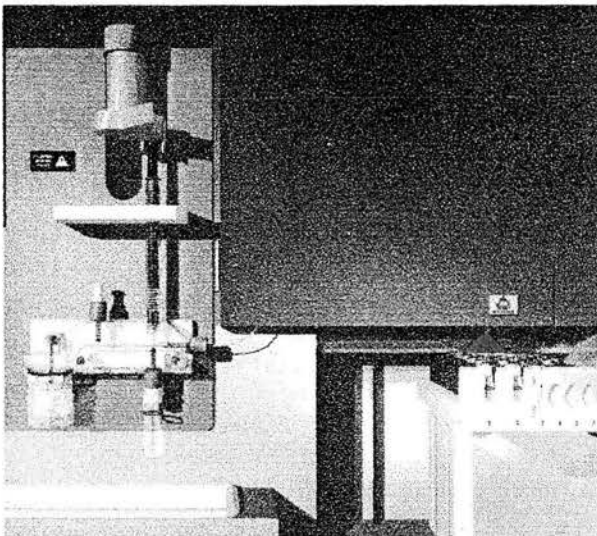
LECTURA EN EL SECUENCIADOR AUTOMATICO

Equipo y reactivos

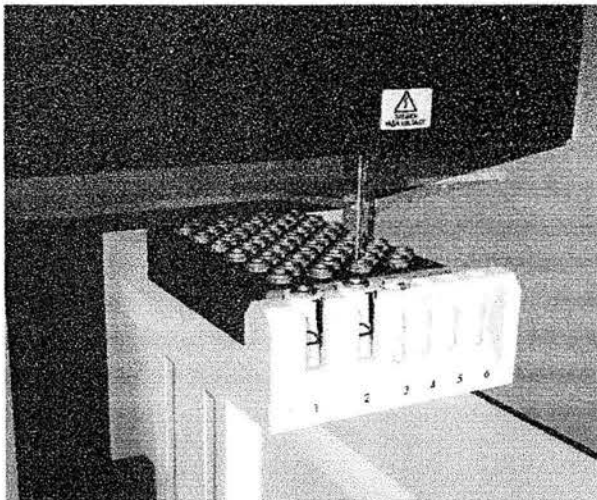
Muestras de ADN (50 ng/ μ l), Formamida, TAMRA, H₂O
Secuenciador automático ABI prism 310, Gene scan software

Metodología

1. Tomar 0.5 μ l directo del producto de PCR
2. Colocar 12 μ l formamida + 0.5 μ l de TAMRA por muestra
3. Colocar en tubos especiales para bandejas de 48 o 96 muestras
4. Se prepara una lista de inyección en el secuenciador con la identificación de las muestras y el tipo de colorante



Se desnaturalizan las muestras
Se colocan en hielo
Se instalan el capilar, el buffer, polimero y jeringa
Se llena una hoja de muestras y lista de inyección, indicando el marcador de cada muestra
Se colocan los tubos en las bandejas. Se checan el tiempo de inyección, voltaje y tiempo de corrida
Se indica la temperatura a 60°C
Y se corre



El capilar consta de un anodo y un catodo, la corriente va de negativo a positivo.
Una vez tomada la muestra viaja por el capilar donde pasa por la ventana que lee el rayo laser e identifica el marcador, el cual es enviado al software de la computadora para verlo en un electroferograma

Anexo 9

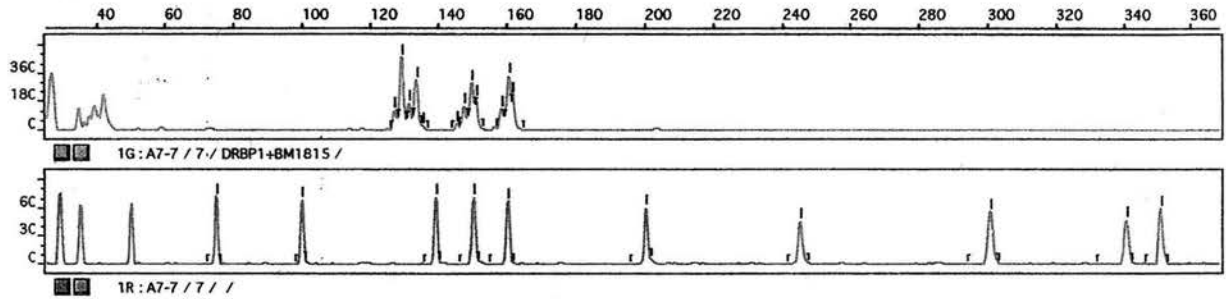
Electroferograma de los loci DRBP1 (116-140) y BM1815 (146-182)



GeneScan® 3.1

GeneScan™ Project-9/12/02 Display-46

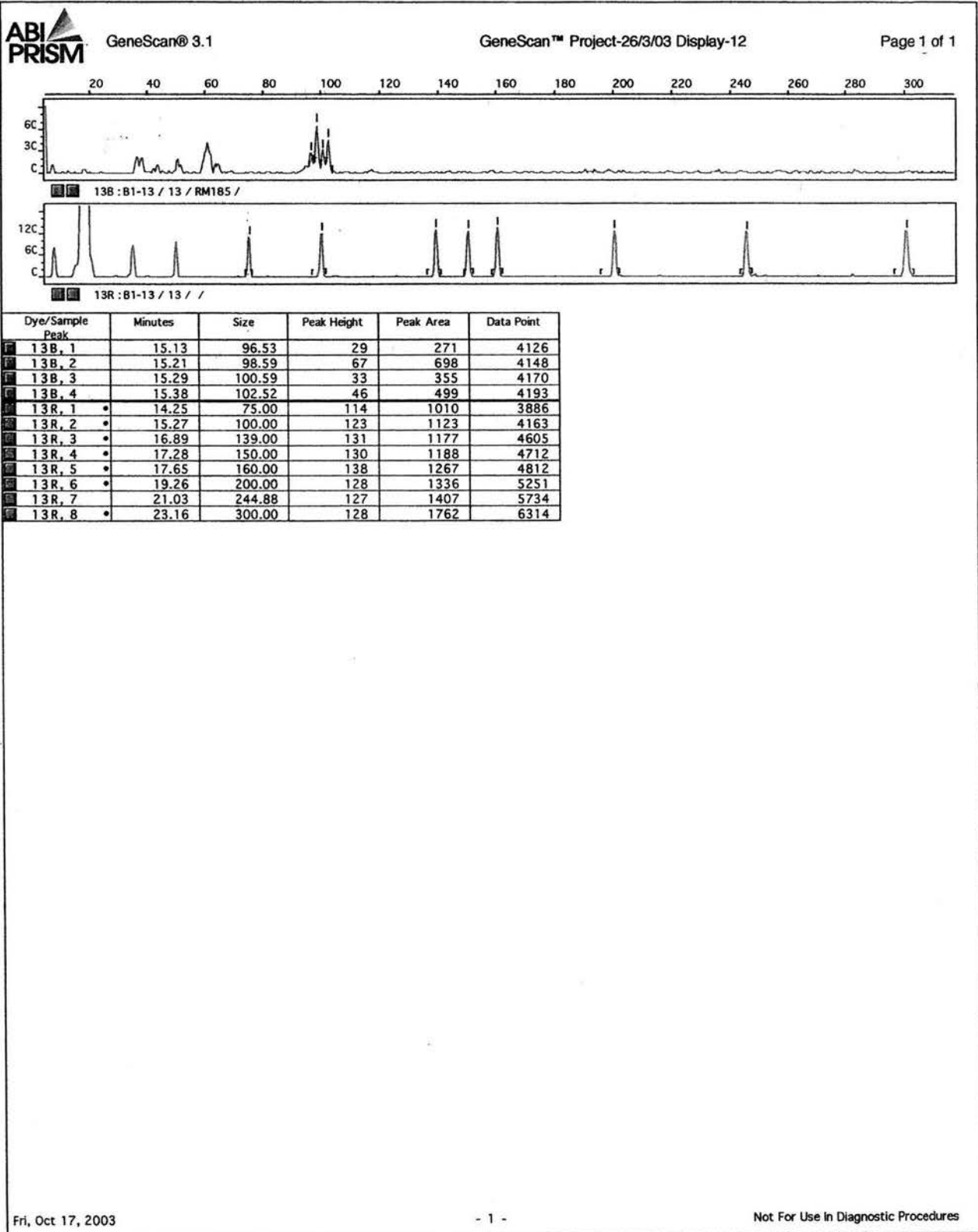
Page 1 of 1



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
1G, 1	15.38	126.96	125	1289	4194
1G, 2	15.46	129.02	467	5307	4215
1G, 3	15.54	131.09	174	2137	4236
1G, 4	15.61	133.18	323	3819	4257
1G, 5	15.68	135.07	32	294	4276
1G, 6	16.03	145.20	40	354	4371
1G, 7	16.10	147.31	153	1605	4390
1G, 8	16.17	149.55	305	3537	4410
1G, 9	16.21	150.66	199	1902	4420
1G, 10	16.46	158.06	137	1319	4488
1G, 11	16.53	160.21	347	3811	4508
1G, 12	16.57	161.23	225	2354	4518
1R, 1 *	13.39	75.00	73	632	3652
1R, 2 *	14.33	100.00	70	583	3908
1R, 3 *	15.83	139.00	72	619	4315
1R, 4 *	16.19	150.00	72	616	4414
1R, 5 *	16.53	160.00	68	562	4506
1R, 6 *	17.99	200.00	61	632	4905
1R, 7 *	19.59	244.89	46	537	5341
1R, 8 *	21.45	300.00	57	725	5849
1R, 9 *	22.72	340.00	48	607	6194
1R, 10 *	23.11	350.00	60	790	6301

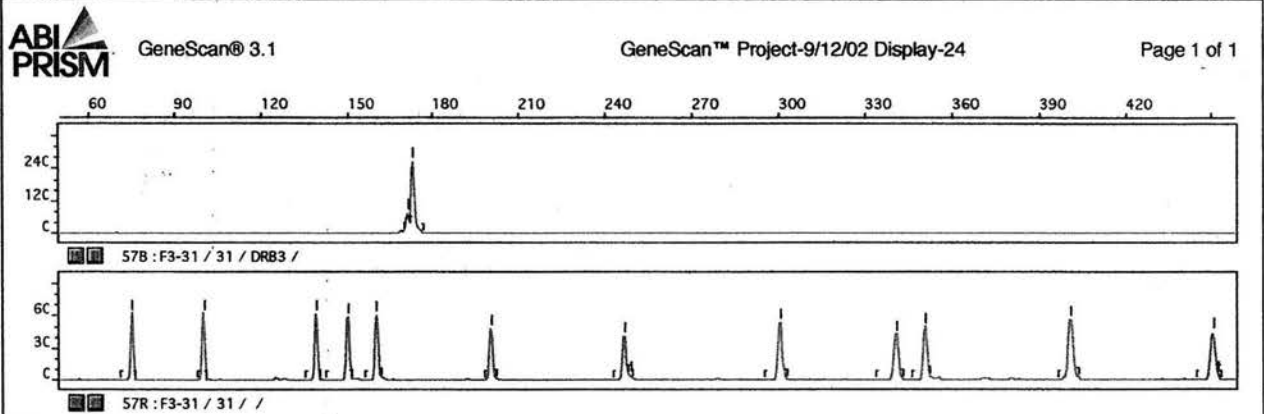
Anexo 10

Electroferograma del locus RM185 (94-108)



Anexo 11

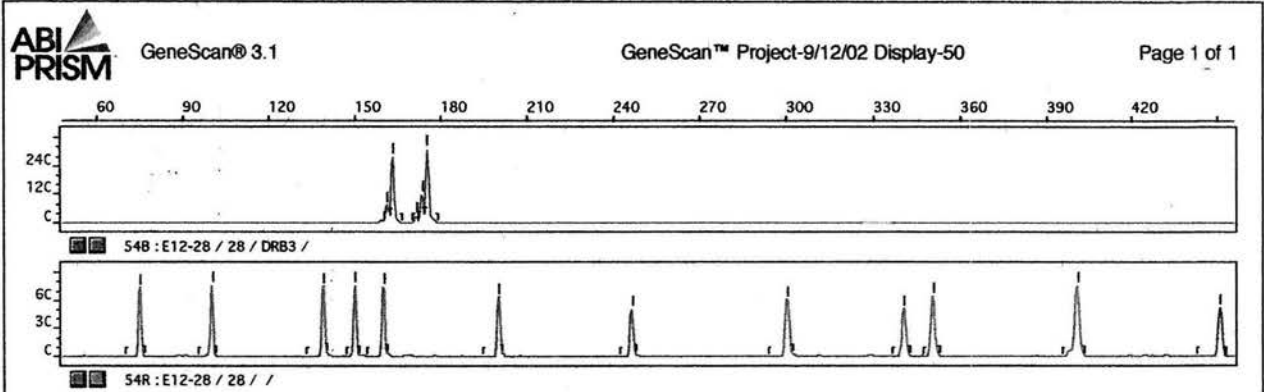
Electroferograma del locus DRB3 (140-210) homocigoto



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
57B, 1	15.39	170.91	78	724	4195
57B, 2	15.45	172.87	270	2744	4212
57R, 1 *	12.25	75.00	64	485	3340
57R, 2 *	13.10	100.00	64	461	3572
57R, 3 *	14.42	139.00	64	490	3931
57R, 4 *	14.74	150.00	60	457	4019
57R, 5 *	15.04	160.00	62	483	4101
57R, 6 *	16.32	200.00	49	436	4450
57R, 7	17.76	246.29	42	417	4843
57R, 8	17.82	248.10	5	44	4858
57R, 9 *	19.35	300.00	55	579	5277
57R, 10 *	20.47	340.00	44	527	5581
57R, 11 *	20.78	350.00	51	565	5667
57R, 12 *	22.23	400.00	58	771	6062
57R, 13 *	23.58	450.00	46	547	6430
57R, 14	23.63		5	24	6444

Anexo 12

Electroferograma del locus DRB3 (140-210) heterocigoto



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
54B, 1	15.13	161.27	79	695	4125
54B, 2	15.19	163.23	283	2563	4142
54B, 3	15.45	171.40	32	256	4213
54B, 4	15.51	173.35	121	1072	4230
54B, 5	15.58	175.29	318	2994	4247
54R, 1 *	12.30	75.00	75	550	3353
54R, 2 *	13.15	100.00	77	616	3584
54R, 3 *	14.46	139.00	76	565	3943
54R, 4 *	14.78	150.00	77	564	4031
54R, 5 *	15.09	160.00	76	577	4114
54R, 6 *	16.38	200.00	65	506	4465
54R, 7 *	17.82	246.10	51	455	4858
54R, 8 *	19.42	300.00	62	637	5295
54R, 9 *	20.54	340.00	52	579	5600
54R, 10 *	20.86	350.00	66	761	5687
54R, 11 *	22.32	400.00	77	1009	6085
54R, 12 *	23.67	450.00	53	545	6454

Anexo 13

Distribución de garrapatas por mes de muestreo y por individuo
en la población de $\frac{3}{4}$ europeo (infestación natural, 2001)

Ident	Junio Julio Agosto			Totales	Multiplicado por dos
	Número mes1	Mes2	mes3		
6-0	1	1	3	15	38
8-0	2	2	4	4	20
10-0	3	0	3	6	18
15-0	4	0	3	1	8
19-0	5	8	7	10	50
21-0	6	0	8	5	26
25-0	7	1	3	6	20
26-0	8	2	12	6	40
27-0	9	2	5	2	18
28-0	10	6	12	7	50
29-0	11	3	3	5	22
30-0	12	0	5	0	10
31-0	13	1	3	13	34
32-0	14	8	0	3	22
33-0	15	1	6	21	56
35-0	16	4	8	6	36
37-0	17	3	7	5	30
38-0	18	4	5	7	32
39-0	19	12	17	5	68
41-0	20	0	0	1	2
48-0	21	7	12	7	52
54-0	22	3	8	2	26
60-0	23	3	1	6	20
62-0	24	2	6	4	24
63-0	25	4	11	10	50
66-0	26	9	9	1	38
67-0	27	4	5	1	20
69-0	28	5	5	12	44
663-0	29	1	0	0	2
664-0	30	1	4	2	14
667-0	31	2	1	3	12
674-0	32	4	2	1	14
675-0	33	3	5	5	26
Total		106	183	182	942

Anexo 14

Distribución de garrapatas por día de muestreo y por individuo en la población F1
(infestación experimental) para los años 2001 y 2002.

Ident	Número	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4	Dia5	Total
13-1	1	0	5	3	16	43	67
56-1	2	5	3	4	13	9	34
58-1	3	0	8	9	17	14	48
117-2	4	6	25	6	21	20	78
501-8	5	2	8	4	15	5	34
507-0	6	0	3	1	4	6	14
518-8	7	2	15	8	16	13	54
521-9	8	9	26	52	38	21	146
523-9	9	1	8	13	5	15	42
524-9	10	26	82	41	29	28	206
532-9	11	1	33	44	55	29	162
542-8	12	2	9	1	27	13	52
542-9	13	2	3	10	7	11	33
551-9	14	4	10	11	15	31	71
595-5	15	1	5	5	2	2	15
608-8	16	0	1	0	1	1	3
612-8	17	2	4	11	12	15	44
653-0	18	0	0	2	1	2	5
681-8	19	13	56	21	32	14	136
684-6	20	6	27	10	11	9	63
690-6	21	4	35	9	25	24	97
701-6	22	1	10	14	16	18	59
739-4	23	4	40	12	31	30	117
755-4	24	0	0	3	3	7	13
768-4	25	5	13	12	11	11	52
778-7	26	1	6	12	16	10	45
791-4	27	0	15	12	15	4	46
821-4	28	8	42	24	7	0	81
829-4	29	2	15	11	10	9	47
839-7	30	6	13	28	28	23	98
973-5	31	0	8	2	3	8	21
501	32	27	37	30	28	21	143
505	33	1	2	8	4	4	19
511	34	24	18	33	44	17	136
512	35	14	12	7	18	9	60
514	36	0	6	27	12	26	71
525	37	8	12	4	5	10	39
526	38	0	6	10	3	3	22
529	39	4	0	8	9	6	27

535	40	3	6	11	7	18	45
536	41	14	18	26	10	9	77
537	42	8	17	17	17	6	65
549	43	3	2	3	3	3	14
551	44	4	4	9	1	3	21
552	45	17	13	14	6	4	54
553	46	3	8	10	13	8	42
558	47	18	16	24	9	12	79
560	48	15	14	15	5	12	61
562	49	4	7	4	5	2	22
568	50	1	6	2	3	4	16
569	51	23	4	40	14	36	117
570	52	0	2	1	1	2	6
577	53	2	0	6	8	8	24
585	54	3	6	17	1	7	34
603	55	7	7	21	11	5	51
651	56	13	11	23	11	16	74
652	57	1	7	6	4	7	25
653	58	5	12	34	16	26	93
662	59	11	37	46	34	42	170
Total		346	818	851	804	771	3590
