



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR EN
TIEMPO REAL PARA LA TIPIFICACIÓN DE BOLA-DRB3.2
EN VACAS LECHERAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

LILIA ALHELÍ GONZÁLEZ TAPIA

ASESORES:

MVZ, Dra. Lucía Angélica García Camacho

MVZ, M.C. Dr. Alejandro Vargas Ruíz



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2019



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.

DEDICATORIA

A mi mamá Lilia Armida Tapia Déciga y mi papá Federico González Espino por su amor, sacrificio y esfuerzo para darme una carrera y su apoyo a lo largo de mi vida.

A mi hermano Federico González Tapia por brindarme su apoyo incondicional.

A mi abuela Margarita “Moni” (Q.E.P.D.) por brindarme su amor y por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por las enseñanzas que me brindaron sus profesores a lo largo de mi estancia.

A mi asesora, la Dra. Lucía Angélica García Camacho por creer en mí, brindarme su apoyo, paciencia, sus conocimientos y por motivarme a continuar este proyecto.

Al Dr. Alejandro Vargas Ruíz por su amistad, su paciencia y por compartirme sus conocimientos.

A Ernesto Marín Flamand por su amistad, consejos, apoyo, asesoría y paciencia en este trabajo.

A Michele Araiza Hernández por ser mi compañera de trabajo y amiga.

A Mauricio, Ángel y Ziad, por ser mis amigos y compañeros de la carrera que me apoyaron motivándome para concluir este trabajo.

Al proyecto DGAPA-UNAM (PAPIIT IN228416). Sin el cual no hubiera sido posible este trabajo.

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Introducción	3
Material y métodos	12
Resultados	18
Discusión	31
Conclusiones	36
Referencias	37

Lista de tablas

Tabla 1. Estatus de infección por BLV y de LP

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la PCR punto final y qPCR.

Tabla 3. Comparación de genotipos.

Lista de figuras

Figura 1. Representación de la estructura del vLEB.

Figura 2. Mecanismos de transmisión de vLEB.

Figura 3. Amplificación de BoLA-DRB3.2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada: Concentración de MgCl₂

Figura 4. Amplificación de BoLA-DRB3.2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada: Concentración de templado.

Figura 5. Amplificación de BoLA-DRB3.2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada: Concentración de iniciadores.

Figura 6. Curva de amplificación de BoLA-DRB3.2 por qPCR.

Figura 7. Curva de disociación de BoLA-DRB3.2 por qPCR.

Figura 8. Curvas de desnaturalización de alta resolución (HRM) del grupo BLV⁻/LP⁻

Figura 9. Curvas de desnaturalización de alta resolución (HRM) del grupo BLV⁺/LP⁻

Figura 10. Curvas de desnaturalización de alta resolución (HRM) del grupo BLV⁺/LP⁺.

Figura 11. Temperatura de desnaturalización de alta resolución (HRM) entre los grupos experimentales.

Figura 12. Predicción de Aminoácidos. Muestras correspondientes al estatus BLV⁻/LP⁻.

Figura 13. Predicción de Aminoácidos. Muestras correspondientes al estatus BLV⁺/LP⁺

Figura 14. Predicción de Aminoácidos. Muestras correspondientes al estatus BLV⁺/LP⁻.

Figura 15. Curvas de diferenciación por desnaturalización de alta resolución (HRM).

Abreviaturas y siglas usadas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- BoLA: Antígenos de los leucocitos bovinos
- BLV: Leucemia viral bovina
- *g*: Gravedades
- HRM: Curva de desnaturalización de alta resolución
- Kbp: Kilo par de bases
- LEB: Leucosis enzootica bovina
- LP: Linfocitosis persistente
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
- MgCl₂: Cloruro de Magnesio
- µl: Microlitro
- mM: Milimolar
- ng: Nanogramos
- pb: Pares de bases
- pmol: Picomol
- MPM: Marcador de peso molecular
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- s: Segundo
- vLEB: Virus de la leucosis enzootica bovina

RESUMEN

GONZÁLEZ TAPIA LILIA ALHELÍ. Estandarización de una técnica de PCR en tiempo real para la tipificación de BoLA-DRB3.2 en vacas lecheras. (bajo la dirección de: MVZ, Dra. Lucía Angélica García Camacho y MVZ, M.C., Dr. Alejandro Vargas Ruíz)

Los alelos de los antígenos de histocompatibilidad bovinos DRB-3.2 (BoLA-DRB3.2) han sido asociados con rasgos de resistencia o susceptibilidad al desarrollo de linfocitosis persistente (LP) en vacas infectadas con el virus de la leucosis bovina (BLV). Con la finalidad de tipificar alelos de BoLA-DRB3.2, se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real para el análisis de los amplicones obtenidos de vacas lecheras con estatus predeterminado de infección por BLV y de LP mediante curvas de desnaturalización en alta resolución (HRM). Se conformaron los siguientes grupos de 6 vacas cada uno: BLV⁺/LP⁺, BLV⁺/LP⁻ y BLV⁻/LP⁻. Se utilizaron iniciadores y condiciones de amplificación previamente descritos, obteniéndose productos de tamaño esperado (283 pb) mismos que fueron secuenciados. Por HRM, se observaron curvas que discriminaron diferentes alelos con base en los perfiles y temperatura característicos de cada grupo experimental, mientras que por secuenciación se detectaron motivos de resistencia (ER o EK/70-71) y susceptibilidad (VDTV, VDTY, o VDRV/75-78) descritos y un motivo inédito

(VDTL). Con dichos motivos, se conformaron 4 tipos de alelos en la curva de diferenciación por HRM. Se determinó que los alelos se agruparon con base a la presencia de motivos de resistencia o susceptibilidad en congruencia con el estatus de LP y que el motivo VDTL posiblemente esté asociado con resistencia. Se concluye que la técnica estandarizada permite la tipificación de alelos de BoLA-DRB3.2 para detección de alelos de resistencia y susceptibilidad y su implementación puede coadyuvar a la selección de animales de reemplazo.

Palabras clave: BoLA-DRB3.2, BLV, linfocitosis persistente, alelos, tipificación

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA (LEB)

1.1.1 Definición

También conocida como linfosarcoma, leucemia o linfoma maligno, es una de las enfermedades neoplásicas más frecuentes en el ganado. (1). Esto se refleja bajo índice de fertilidad como consecuencia de problemas reproductivos, incremento de gastos debido a tratamientos y medicamentos veterinarios, uso de antibióticos que afectan la seguridad alimentaria. (2).

1.1.2 Etiología

Ésta, enfermedad es causada por el virus de la leucosis enzootica bovina; BLV, por sus siglas en inglés (Figura 1), el cual es un virus ARN, de polaridad positivo, que pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, del género *Deltaretrovirus* (3). Las células blanco de la infección son principalmente los linfocitos B que expresan en su superficie IgM+, CD5+, CD11B+, y MHC-II+ (4), sobre todo aquellos que presentan en su superficie el marcador CD5. Después de la infección el genoma del virus se transforma en ADN por medio de la enzima transcriptasa reversa y se integra al genoma de la célula infectada al genoma de la célula infectada, convirtiéndose en provirus el cual es detectable en animales infectados. (5)

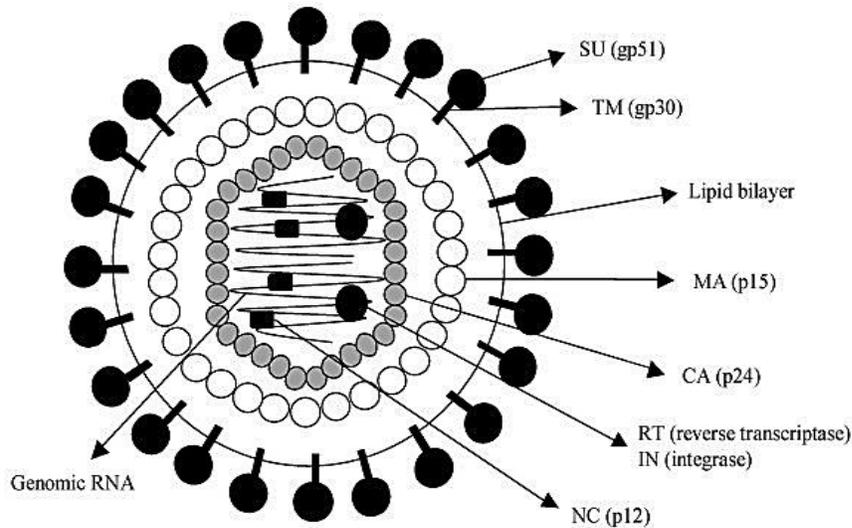


Figura 1. Representación de la estructura del vLEB. Contiene dos copias de ARN genómico de cadena sencilla empaquetada en la partícula viral. Las proteínas CA (p24) forman la cápside que contiene el ARN viral en interacción con la nucleocápside NC (p12). Contiene dos proteínas enzimáticas (RT e IN), requeridas, respectivamente, para la transcripción inversa e integración del genoma viral. La proteína de matriz (p15) interconecta la cápside y la envoltura externa que está formada por una bicapa lipídica de origen celular en la que se insertan el complejo de proteínas virales (gp51 SU y gp30 TM). (4)

1.1.3 Transmisión

La principal ruta de transmisión de la enfermedad es la vía horizontal. A pesar de que el provirus traspasa la barrera placentaria, la probabilidad de transmisión vertical es del 3% al 8%. De darse lugar, la infección intrauterina ocurre en el tercer mes de gestación cuando se establece la competencia inmune del feto (6,7). En procedimientos iatrogénicos que implican el contacto de los animales con sangre infectada tales como el descorne, castración, venopunción e incluso en la palpación rectal ya sea cuando hay heridas internas o cuando el material no ha sido debidamente lavado y desinfectado, incrementan el riesgo de la transmisión de la

enfermedad. (8, 9). El virus puede estar presente en sangre, leche, exudado vaginal, orina y semen (9, 10).

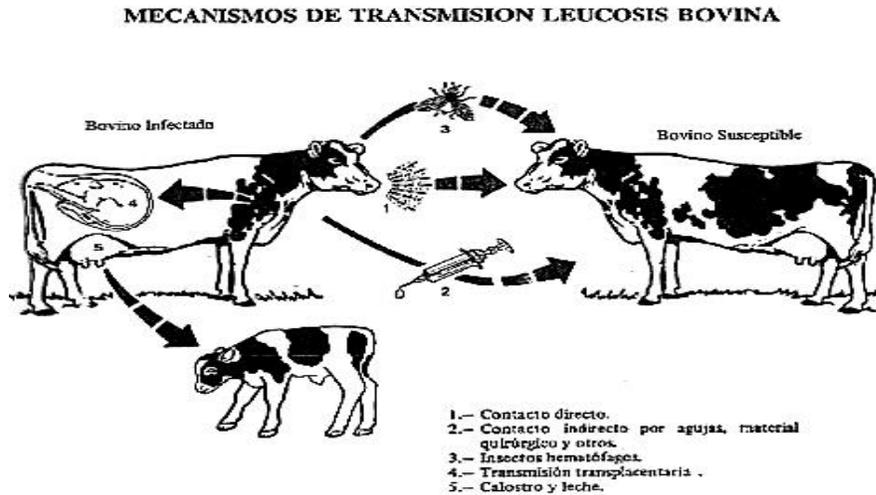


Figura 2. Mecanismos de transmisión de vLEB. (11)

1.1.4 Formas de presentación

Aproximadamente 70% de los bovinos infectados no presentan signología mientras que una tercera parte desarrolla un aumento constante en el número de linfocitos B CD5+, IgM+, CD11b+ y Complejo Principal de Histocompatibilidad tipo II+ (MHC-II+ sus siglas en inglés) de sangre periférica (2) denominado como linfocitosis persistente (LP) misma que representa el incremento en el número absoluto de linfocitos por encima de tres desviaciones estándar sobre la media normal (7,500/ μ l). Este incremento debe persistir por más de tres meses (12). Se menciona que la transmisión de BLV es más eficiente en bovinos infectados que presentan LP dado que una alta proporción de linfocitos contienen alto número de copias províricas (13). Sólo un bajo porcentaje del ganado infectado desarrolla la forma clínica de la enfermedad que se caracteriza por la presencia de linfoma. Cuando la

enfermedad es de curso crónico, los animales afectados llegan a presentar signología como es la disminución de la producción láctea y peso, anorexia, paresia posterior, también pueden estar presente fiebre, exoftalmos unilateral o bilateral y diarrea (2).

1.1.5 Forma tumoral

El mayor daño se localiza en los ganglios linfáticos, describiéndose como generalizada (76 a 100 %), diseminada (26 a 75 %) y localizada (1 a 25 %) (14). Siendo los más afectados ilíacos, intratorácicos y mesentéricos; y con menor frecuencia los pre-escapulares, precurales y de la región cervical. Macroscópicamente, los ganglios linfáticos se aprecian aumentados de tamaño y externamente son lisos o nodulares, blanda o turgente o bien, firmes y friables edematosa consistencia. Al corte, la estructura anatómica se pierde debido a la infiltración de tejido neoplásico (14 - 16). La médula ósea puede estar infiltrada por tejido neoplásico de color blanco grisáceo. Lo anterior conduce al desarrollo de leucemia que corresponde a la presencia de células tumorales en el torrente sanguíneo (14, 17). El bazo puede presentar aumento de tamaño; la superficie presenta nódulos blanquecinos diseminados por todo el parénquima. En el corazón, pueden aparecer nódulos difusos de color blanquecino (14 -16). La pared uterina y del abomaso, pueden estar engrosados debido a la infiltración de tejido (14 -16). En el intestino, se encuentran lesiones similares con mayor predisposición de úlceras en la mucosa. En riñones aparecen lesiones infiltrativas que producen hemorragias en la superficie del órgano, o bien nódulos que resultan en atrofia del parénquima

renal. (14 -16). También puede verse afectado el tejido retro-ocular y provocar con su crecimiento protrusión del globo ocular o exoftalmo. Se ha observado infiltración tumoral de la córnea y la aparición del tumor en la cámara anterior del ojo (14 -16).

1.1.6 Importancia

El ganado infectado, limita la exportación y comercialización de semen y embriones, las pérdidas por reemplazos tempranos de semovientes, decomiso de vísceras a causa de linfomas, baja en la eficiencia reproductiva y en la producción láctea, son factores que afectan el bolsillo del productor (18). Además, debido a que se producen cambios en las poblaciones de linfocitos hay una notable disminución en la capacidad del animal para resistir o combatir otras enfermedades (19)

1.2 BoLA DRB3.2

El MHC en bovinos es denominado como Antígenos Leucocitarios Bovinos (BoLA por sus siglas en inglés) y éste se ubica en el cromosoma 23. Estos antígenos corresponden a glicoproteínas que se localizan en la superficie celular cuya función primordial consiste en la presentación de antígenos a los linfocitos T (20). Existen tres clases de antígenos leucocitarios bovinos, los antígenos clase I que constan de dos cadenas polipeptídicas codificadas por locus diferentes. Una de ellas atraviesa la membrana celular, tiene un peso molecular aproximado de 45000 Da. y la cadena más corta llamada microglobulina $\beta 2$ que tiene un peso aproximado de 12000 Da. Los genes de BoLA clase I codifican proteínas implicadas en el reconocimiento de las células del hospedero que han sido infectadas y en la presentación de péptidos

a los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Los antígenos clase II son dos cadenas de un tamaño similar. Los genes clase II están localizados en dos partes diferentes del cromosoma 23; dos regiones llamadas clase IIa y clase IIb intervenidas por 15cM. La clase IIa contiene los genes DR y DQ y la clase IIb los genes DYA, DYB, DMA, DMB, DOB, DOA, TAP1, TAP2, LAPM2 y LMP7. Estos genes producen proteínas que promueven comunicación entre las células B y T, procesan y presentan antígenos extracelulares a linfocitos T CD4+ y otras funciones inmunes. También existen los genes clase III que codifican proteínas del sistema de complemento, moléculas relacionadas con la inflamación y proteínas de choque térmico (20).

Los genes y los productos de la región clase IIa son los más estudiados porque presentan altos niveles de polimorfismo. Han sido identificados 14 genes en esta región: DRA, DRB (DRB1, DRB2, DRB3), DQA (DQA1, DQA2, DQA3, DQA4, DQA5) y DQB (DQB1, DQB2, DQB3, DQB4, DQB5), donde el gen DRB3 es el más estudiado, este tiene una longitud de 11,4 Kbp con cinco intrones y seis exones, de los cuales el más polimórfico es el exón 2 (BoLA-DRB3.2) de un tamaño aproximado de 270bp (20).

Los genes BoLA-DRB3.2 han sido asociados con parámetros productivos como producción de leche, proteína y grasa en leche y así como en la resistencia a enfermedades tales como el desarrollo de linfocitosis persistente y carga proviral de BLV, brucelosis, mastitis y parasitosis por garrapatas (20).

1.2.3 Motivos de resistencia y susceptibilidad.

En el locus del BoLA-DRB3.2, se han encontrado algunos de los alelos asociados con resistencia y susceptibilidad a la infección por el BLV con base a la ausencia y presencia de LP, respectivamente (21-23). Adicionalmente, se ha descrito que los haplotipos resistentes de BoLA-DRB3.2 muestran una fuerte asociación con la secuencia de aminoácidos en las posiciones 70-71, predominantemente caracterizada por la presencia de ácido glutámico y arginina (motivos ER). Dichos motivos han sido determinados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final en combinación con el uso de iniciadores alelo-específicos. Así mismo, se menciona que la eliminación de un solo aminoácido en esta secuencia; la cual corresponde al sitio de unión del antígeno, afecta la unión y presentación del péptido lo que puede tener fuertes repercusiones en el establecimiento de una respuesta inmune (22). Por otro lado, se informa que los individuos que llevan el motivo ER de resistencia también muestran una reducción significativa en la carga proviral BLV (16). Por otro lado, se describe que existen motivos de susceptibilidad localizados en la posición 75-78. Los más reconocidos son los motivos VDTV, VDTY y VDRV (22, 23).

1.2.4 Curvas de desnaturalización en alta resolución (HRM)

El análisis de curvas de desnaturalización en alta resolución (High Resolution Melting [HRM, por sus siglas en inglés]) junto con la PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real fue descrito como método de diagnóstico en 1997 (24, 25). La HRM es un método simple, rápido y de bajo costo que se usa para la identificación de

variaciones en secuencias de ácidos nucleicos (por ej. SNP, mutaciones, metilación de bases) (26). El método se basa en la caracterización de los productos de la PCR de acuerdo al comportamiento de disociación de hebras, o dicho de otra manera, se basa en las características de desnaturalización térmica de los amplicones y suministra información con un rendimiento nunca antes alcanzado por el análisis de la curva de disociación clásica de ADN. Las variaciones en las secuencias son detectadas tanto por un cambio en la T_m como por un cambio en la forma de la curva de disociación (26).

1. JUSTIFICACIÓN

Se sugiere que mutaciones en motivos ER de alelos de BoLA-DRB3.2 influyen en la presentación de antígenos a los linfocitos T, siendo un factor determinante en la determinación de alelos resistentes o susceptibles a la infección por BLV. Por tal motivo, la progresión al desarrollo de LP es compatible con presencia de dichos polimorfismos los cuales pueden ser detectados mediante PCR en tiempo real y análisis de desnaturalización en alta resolución (HRM). La implementación de una técnica basada en dicha tecnología será de utilidad en la tipificación de BoLA-DRB3.2 con el fin de identificar los alelos de resistencia a la enfermedad con base al desarrollo de linfocitosis persistente (LP), considerada por consenso como el rasgo de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad sobre el cual se establece la selección de alelos de BoLA-DRB3.2. Se propone que la detección de alelos por HRM puede ser un método rápido y de bajo costo que puede ser utilizado en la selección de animales de reemplazo y de cría, contribuyendo al mejoramiento de hatos lecheros.

2. HIPÓTESIS

1. La técnica de qPCR podrá discriminar alelos con base a construcción de curvas de HRM
2. Los alelos que presenten motivos ER en posición 70-71 estarán relacionados con la ausencia de LP

3. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para la tipificación de BoLA-DRB3.2 mediante la detección de polimorfismos por curvas de desnaturalización de alta resolución en vacas lecheras.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ para la amplificación de BoLA-DRB3.2 por PCR de punto final.
- ❖ Determinar la concentración mínima de detección de templado para la amplificación de BoLA-DRB3.2 por PCR de punto final.
- ❖ Determinar la concentración óptima de iniciadores para la PCR de punto final.
- ❖ Optimizar las condiciones de amplificación de BoLA-DRB3.2 por PCR en tiempo real.
- ❖ Realizar curvas de desnaturalización en alta resolución (HRM) para la tipificación de BoLA-DRB3.2
- ❖ Determinar la presencia de motivos de aminoácidos de resistencia o susceptibilidad de los productos amplificados por PCR en tiempo real.
- ❖ Realizar curvas de diferenciación por alta resolución (HRM) para la tipificación de BoLA-DRB3.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Se utilizaron muestras de sangre completa procedentes de 18 vacas del Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca (CAIT) con un estatus predeterminado por BLV y LP mediante PCR en tiempo real y por conteo leucocitario realizado en el Hospital de pequeñas especies de la FES Cuautitlán bajo la supervisión del MVZ MC Ignacio Rangel, respectivamente. Para establecer dichos parámetros, se utilizaron muestras correspondientes a 3 muestreos mensuales para conformar 3 grupos de 6 vacas cada uno: BLV⁺/LP⁺, BLV⁺/LP⁻ y BLV⁻/LP⁻ (Tabla 1). Por consenso, dichos grupos son representativos de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad con base la presencia o ausencia de LP, respectivamente. El ADN se utilizó como templado para la optimización de las condiciones de amplificación de BoLA-DRB3.2 por PCR punto final y en PCR tiempo real. Los productos amplificados por PCR tiempo real se utilizaron para la realización de curvas de diferenciación en el canal de HRM y la evaluación de la presencia de polimorfismos. Para validar la técnica se secuenciaron los productos obtenidos para la localización de motivos de resistencia y susceptibilidad descritos en la literatura.

6.2 Hematología

El conteo total de leucocitos se realizó con métodos automáticos (Abacus Junior Vet) y el conteo diferencial se realizó con frotis de sangre teñidos con Wright para calcular el número absoluto de linfocitos siguiendo metodología rutinaria (Stoddart, 2011).

# vaca	BLV	LP	# vaca	BLV	LP	# vaca	BLV	LP
815	+	+	396	+	-	493	-	-
557	+	+	672	+	-	378	-	-
674	+	+	812	+	-	849	-	-
581	+	+	798	+	-	631	-	-
455	+	+	771	+	-	677	-	-
344	+	+	654	+	-	776	-	-

Tabla 1. Estatus de infección por BLV y LP. Grupo experimental.

6.3 Extracción de ADN

Se obtuvo ADN de muestra de sangre mediante el equipo de juego de reactivos (QIAamp® DNA Blood Mini kit, QIAGEN® Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se adicionaron 20 µl de proteasa QIAGEN® o Proteinasa K, en un tubo de 1.5 µl con 200 µl de sangre. Adicionalmente se agregó 200 µl de Buffer AL Lysis QIAGEN® y se mezcló en el vortex por 15 segundos. Posteriormente se incubó a 56° C por 10 minutos (Eppendorf ThermoMixer® Hamburgo, Alemania.), después se centrifugó el tubo para remover los remanentes en la tapa. Después se adicionaron 200 µl de Etanol al 100% y se mezcló en el vortex por 15 s. Nuevamente se centrifugó el tubo para remover remanentes de la tapa. Se transfirió el lisado a la columna (QIAamp Mini Spin Column, QIAGEN® Hilden, Alemania) y se centrifugó a 6000 g durante 1 minuto. Se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo. Se adicionaron 500 µl de Buffer de lavado AW1

(QIAGEN® Hilden, Alemania) y nuevamente se centrifugó a 6000 g durante 1 minuto y se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo. A continuación se adicionaron 500 µl de Buffer de lavado AW2 (QIAGEN® Hilden, Alemania) y se centrifugó a 20 000 g durante 3 minutos. Se eliminó el tubo colector y se colocó uno nuevo, inmediatamente se volvió a centrifugar a 20 000 g durante 1 minuto. Por último la columna (QIAamp Mini Spin Column, QIAGEN® Hilden, Alemania) se colocó en un tubo de 1.5 µl, se adicionaron 200 µl de Buffer de elución AE (QIAGEN® Hilden, Alemania), se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 6000 g durante 1 minuto y el producto obtenido se congelo a -80 °C. La concentración del ADN obtenido se determinó mediante espectrofotometría (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) y la concentración de ADN se ajustó en alícuotas de 25 ng/µl que se conservaron a -70°C.

6.4 PCR punto final semi-anidada

Para realizar la amplificación de productos de BoLA-DRB3.2 se utilizaron los iniciadores (Tabla 2) y condiciones descritas (18) los cuales amplifican productos de 302 y 283 pb en la reacción 1 y 2, respectivamente. La amplificación se realizó un termociclador de gradientes (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y utilizando reacciones de 50 µl conteniendo: amortiguador de reacción de PCR 1X [KCl 100 mM, Tris- HCl 20 mM (pH 9.0) y 0.2% Triton X-100] (Promega Corp., Madison WI., USA), 0.2 mM de dNTP's (Promega Corp., Madison WI., USA), MgCl₂ 1.5 mM o 2.5 mM (Promega Corp., Madison WI., USA), 2.5 unidades

de Taq Polimerasa (GoTaq. Promega Corp., Madison WI., USA) y agua grado biología molecular cbp 50 µl. Para la optimización de la técnica se realizaron curvas de concentración de templado (100ng, 50 ng, 25 ng y 12.5 ng) para la determinación de la concentración mínima de detección y curvas de concentración de iniciadores (100 pmol, 75 pmol, 50 pmol, 25 pmol y 12.5 pmol) para determinar la concentración óptima. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a de 94°C por 4 min., seguido por 20 ciclos (reacción 1) y 35 ciclos (reacción 2) de 94.5°C por 90 s, 66°C por 120 s y 72°C por 60 s para la reacción 1 y 25 ciclos finalmente un paso de extensión de 72°C por 5 min. Los productos amplificados se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta (Apollo Instrumentation, Claremont, California, EUA) para su fotodocumentación (Doc-It System; UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK).

Secuencia 3' – 5'	Iniciador	Producto esperado
Reacción 1		
HL030-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC	Sentido	302 pb
HL031-TTTAAATTGCGCTCACCTCGCCGCT	Antisentido	
Reacción 2		
HL030-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC	Sentido	283 pb
HL032-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC	Antisentido	
HL062-GAAGGAGATCCTGGAGGAGAG	Antisentido (Alelo específico)	

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la PCR punto final y qPCR.

6.4.1 qPCR

La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador con canal específico de HRM (Rotor-GeneQ, QIAGEN® Hilden, Alemania) utilizando los tres iniciadores de la reacción 2 (Tabla 2) y basándose en las concentraciones óptimas de $MgCl_2$, templado e iniciadores determinados por PCR punto final. Cada muestra se ejecutó por triplicado y con una reacción control sin template de ADN (NTC, Non Template Control) en microtubos ópticos de 0.2 μ l. Se emplearon reacciones 25 μ l, conteniendo: 12.5 ng de DNA, 1x SensiFast™ HRM mix (Bioline®, Toronto, Canada), 50 pM de cada iniciador y agua de grado molecular cbp 25 μ l. Las condiciones de amplificación se modificaron de acuerdo con, las recomendadas por el proveedor del reactivo (Bioline®, Toronto, Canada) del siguiente modo: un paso de activación de 90°C por 120 s, seguido por 35 ciclos de 95°C por 5 s, 66°C por 10 s y 72°C por 10 s, y una extensión final de 72°C por 5 min. Posteriormente, se realizó curva de disociación a 95°C para determinar la especificidad del producto amplificado.

6.5. Análisis de desnaturalización de alta resolución (HRM)

Los productos amplificados por PCR en tiempo real, se analizaron en el canal específico de HRM del termociclador utilizando el software Rotor-Gene Q Series (QIAGEN® Hilden, Alemania). Con los datos obtenidos en el software, se realizaron curvas de HRM para la selección del área de temperatura distintiva que permitió la diferenciación de cada alelo contenido en las muestras de la población experimental. Una vez seleccionada el área, se determinó un rango de temperatura

para la visualización de los alelos y se normalizó la fluorescencia. Así mismo, se realizó análisis de varianza y prueba de Tukey de las temperaturas obtenidas en cada muestra para determinar la diferencia entre los grupos experimentales. Posteriormente, se realizaron curvas de diferenciación de alelos.

6.4 Secuenciación

Una vez obtenidos los productos esperados en el qPCR utilizando el canal HRM, se purificaron los productos de la reacción con el equipo de reactivo (SureClean Plus, Bioline®, Toronto, Canadá). Siguiendo las instrucciones del fabricante. Se adicionó 3 μ l de co-precipitante rosa (Bioline®, Toronto, Canadá) y se mezcló por 30 seg. en el vortex. Posteriormente se adicionó un volumen de 20 μ l SureClean Plus (Bioline®, Toronto, Canadá) a la solución, se mezcló en el vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se centrifugó a 14 000 g por 20 min. Y se removió el sobrenadante. Inmediatamente se adicionó un volumen de 40 μ l a la muestra original de etanol al 70%, dándole vortex por 10 seg. Nuevamente se centrifugó a 14 000 g por 10 min y se removió el sobrenadante. Se realizó un lavado más con etanol al 70%, posteriormente se volvió a centrifugar a 14000 g por 10 min y finalmente se re suspendió el pellet en 15 μ l de agua inyectable. El ADN purificado se envió al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México para su secuenciación.

1. RESULTADOS

7.1. Amplificación de BOLA- DRB3.2

Las técnicas de PCR punto final fueron estandarizadas para obtener productos de 283 pb que corresponden a la región del gen BoLA-DRB3.2. Se determinaron las concentraciones óptimas de MgCl₂, templado e iniciadores (Figuras 3, 4 y 5) para la amplificación del gen BoLA-DRB3.2, siguiendo las condiciones de amplificación descritas por Gilliespie et. al. 1997. En la curva de concentración de templado, se observó amplificación de productos utilizando 12.5 ng/ µl (Figura 4). Las concentraciones finales que se seleccionaron para la amplificación fueron 1.5 mM de MgCl₂, 25 ng de templado y 50 pm de iniciadores en reacciones de 25 µl. Además, se logró obtener concentración óptima para la amplificación de iniciadores a 100 pM, 75 pM, 50 pM, 25 pM y 12.5 pM, obteniendo bandas positivas de 283 pb desde 12.5 pM. para la reacción 2 (Figura 5). Una vez estandarizados las concentraciones de MgCl₂, iniciadores y templado, se utilizaron las condiciones de amplificación en punto final para realizar la reacción dos en PCR tiempo real. Las figuras 6 y 7 muestran las curvas de amplificación y de disociación del BoLA-DRB3.2; respectivamente, las cuales son representativas de las curvas obtenidas en el grupo experimental. Se observó que el ciclo de umbral (threshold cycle/C_t) de los productos de BoLA-DRB3.2 se ubicó entre los ciclos 22 al 24 (Figura 6). Así mismo, no se apreciaron productos inespecíficos en las curvas de disociación (Figura 7).

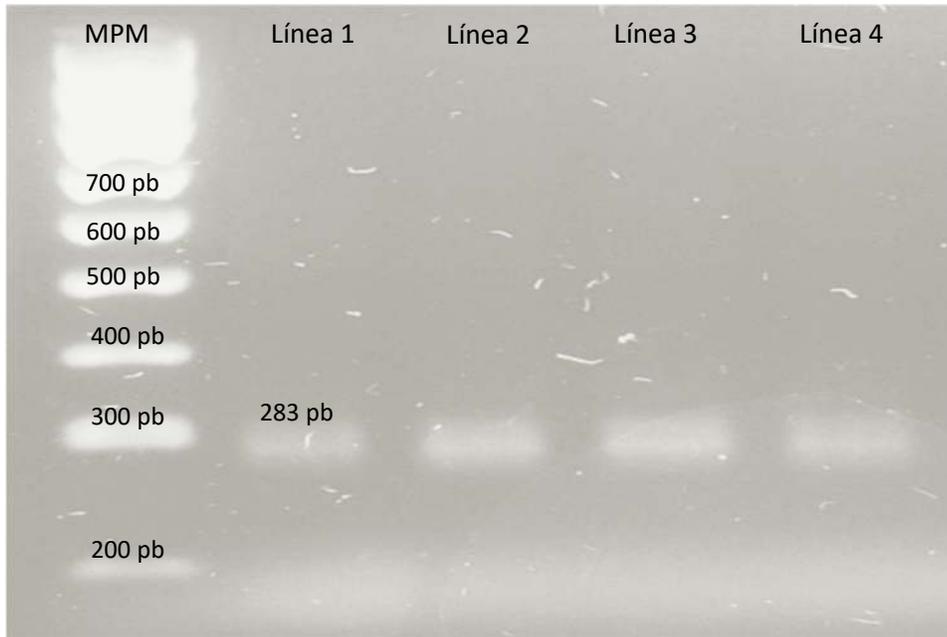


Figura 3. Amplificación de BoLA-DRB3.2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-anidada: Concentración de $MgCl_2$. MPM marcador de peso molecular de cien pares de bases. Línea 1 y 2 (1.5 mM de $MgCl_2$) línea 3 y 4 cuatro (2.5 mM de $MgCl_2$), mostrando productos amplificados de 283 pb en gel de agarosa al 1.5 %

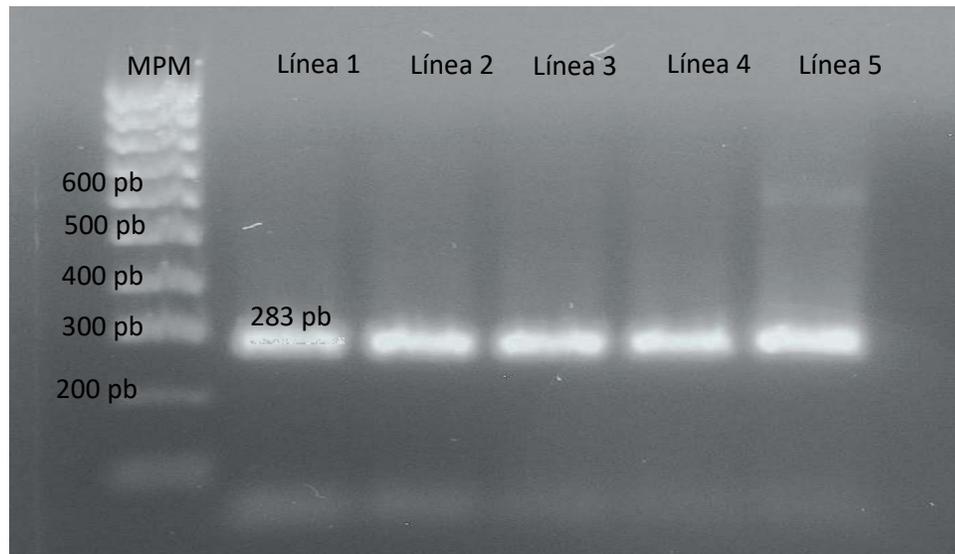


Figura 4. Amplificación de BoLA-DRB3.2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-anidada: Concentración de **templado.** MPM marcador de peso molecular de cien pares de bases. Línea 1 (100 ng/μl), línea 2 (75 ng/μl), línea 3 (50 ng/μl), línea 4 (25 ng/μl) y línea 5 (12.5 ng/μl), mostrando productos amplificados de 283 pb en gel de agarosa al 1.5 %

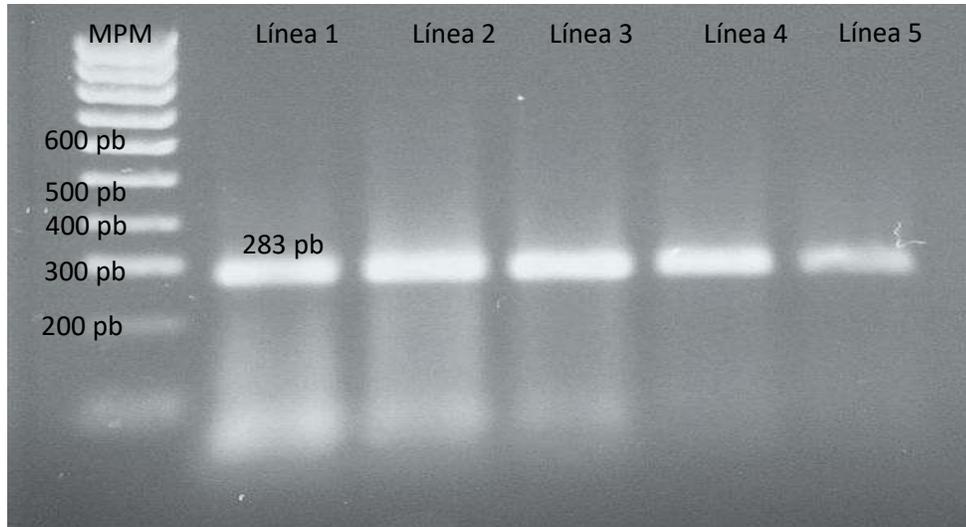


Figura 5. Amplificación de BoLA-DRB3.2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-anidada: Concentración de iniciadores. MPM marcador de peso molecular de cien pares de bases. Línea 1 (100 pM), línea 2 (75 pM), línea 3 (50 pM), línea 4 (25 pM) y línea 5 (12.5 pM), mostrando productos amplificados de 283 pb en gel de agarosa al 1.5 %

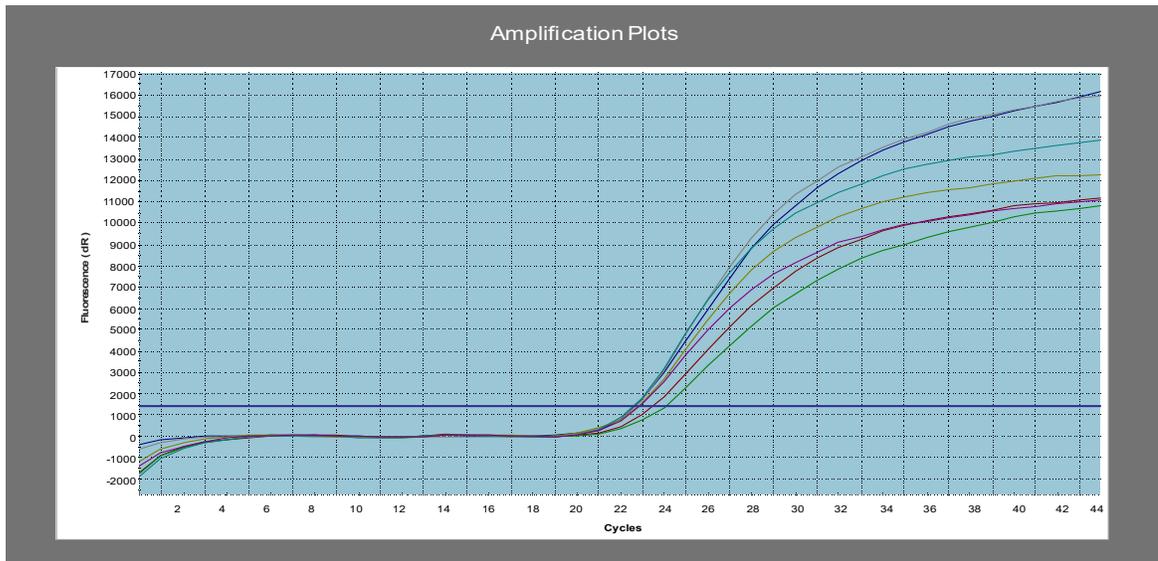


Figura 6. Curva de amplificación de BoLA-DRB3.2 por qPCR. Se muestran el C_t de las muestras representativas y el control sin template (NTC/Non Template Control, por sus siglas en inglés).

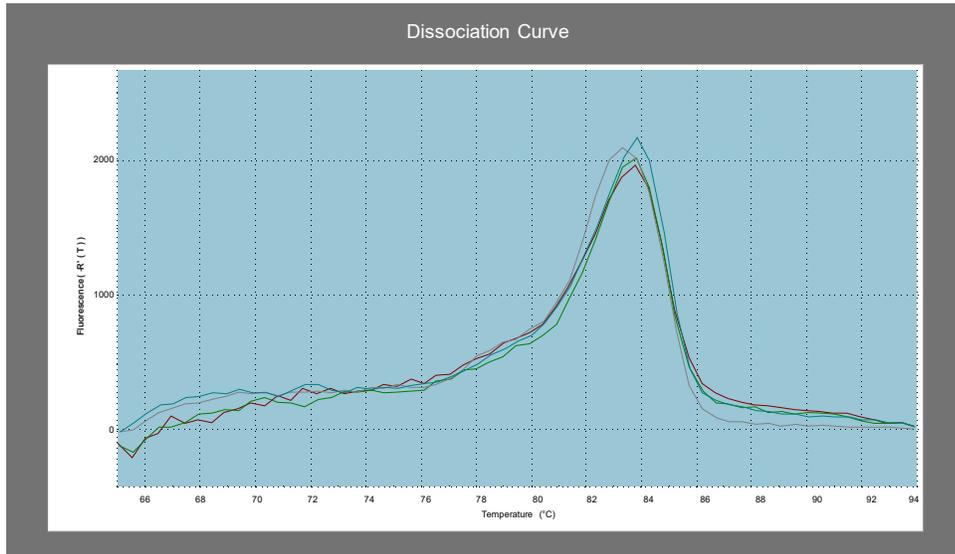


Figura 7. Curva de disociación de BoLA-DRB3.2 por qPCR. Las curvas representativas muestran la especificidad de los productos amplificados debido a la ausencia de productos inespecíficos.

7.2. HRM

Utilizando el canal HRM del termociclador, se corrieron las muestras de la población experimental. Debido a que la región amplificada corresponde a una región altamente polimórfica de BoLA-DRB3.2, las curvas se evaluaron para determinar el intervalo de temperatura en el que se observara una desnaturalización distintiva para cada producto, indicativo de la presencia de alelos diferentes. De este modo, se seleccionó el rango de temperatura de 87.5°C a 92°C para mostrar las curvas obtenidas por cada grupo experimental. Las curvas de HRM de las vacas negativas a la infección (BLV⁻/LP⁻) se muestran en la figura 8. En este grupo, el promedio de temperatura de desnaturalización fue de 89.29°C y 4/6 (66.6%) productos presentaron temperaturas por debajo de 89.5°C. Así mismo, se observó que 4/6 vacas presentaron un pico secundario de fluorescencia en posición variable, dos de

estas muy cercanas una de otra y con perfiles semejantes (vacas 776 y 631). Los valores normalizados de estas curvas presentaron una similitud de 98%. Del mismo modo, la curva de la vaca 849 mostró alta similitud con las curvas de las vacas 776 y 631. En el grupo conformado por vacas BLV⁺/LP⁻, el promedio de temperatura de desnaturalización fue de 89.5°C. En las curvas de HRM de este grupo (Figura 9), se observó una curva con dos picos de fluorescencia (vaca 654) similar a los del grupo BLV⁻/LP⁻ (vacas 776 y 631). Por otro lado, el grupo de vacas con estatus BLV⁺/LP⁺ el promedio de temperatura de desnaturalización fue de 89.77°C, la mayoría de las curvas (5/6) se observaron por encima de 89.5°C y una muestra (vaca 674) presentó desnaturalización a una temperatura mayor de los 90°C (Figura 10). La temperatura de desnaturalización del BLV⁺/LP⁺ fue estadísticamente mayor que la del grupo BLV⁻/LP⁻ mientras que el grupo BLV⁺/LP⁻ no presentó diferencia estadísticamente significativa con los otros dos grupos (Figura 11).

5.3. Secuenciación

Se obtuvieron 230 nucleótidos de los productos amplificados por PCR en tiempo real los cuales fueron analizados en el programa BioEdit (California, 2005). En el grupo BLV⁻/LP⁻ (Figura 12), una muestra (vaca 776) presentó el motivo ER en posición 70-71 (resistencia) Así mismo, se observó un motivo EK en la misma posición en 2/4 muestras; una de éstas con el motivo VDTV en posición 75-78 (vaca 378).

Adicionalmente, se observó un motivo VDTL no descrito en la literatura en 2/4 muestras, una de ellas con un motivo EK (vaca 631). La muestra de la vaca 378

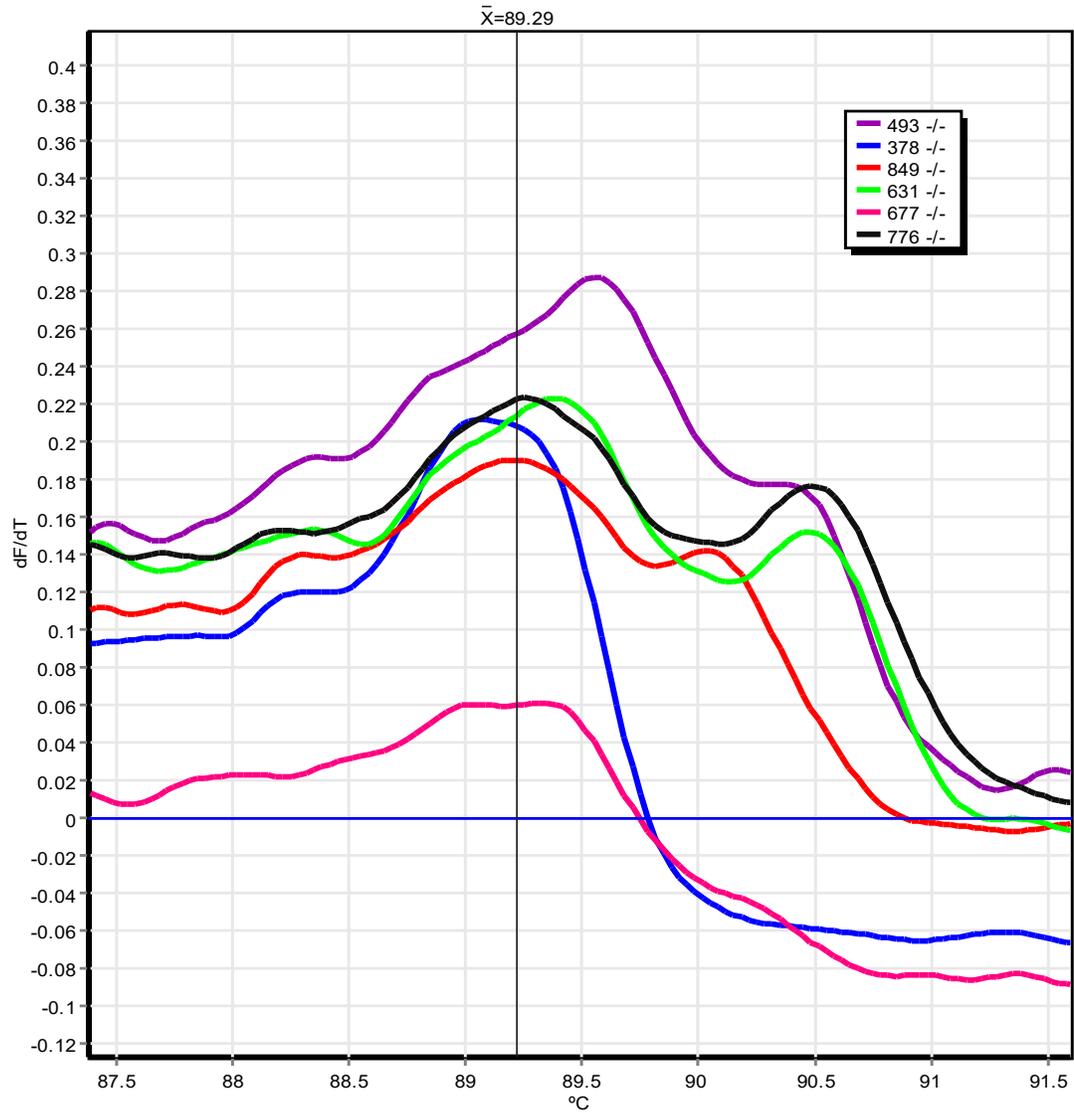


Figura 8. Curvas de desnaturalización de alta resolución (HRM) del grupo BLV/LP⁺. Se muestran los alelos obtenidos de las siguientes muestras: 493, 378, 849, 631, 677 y 776

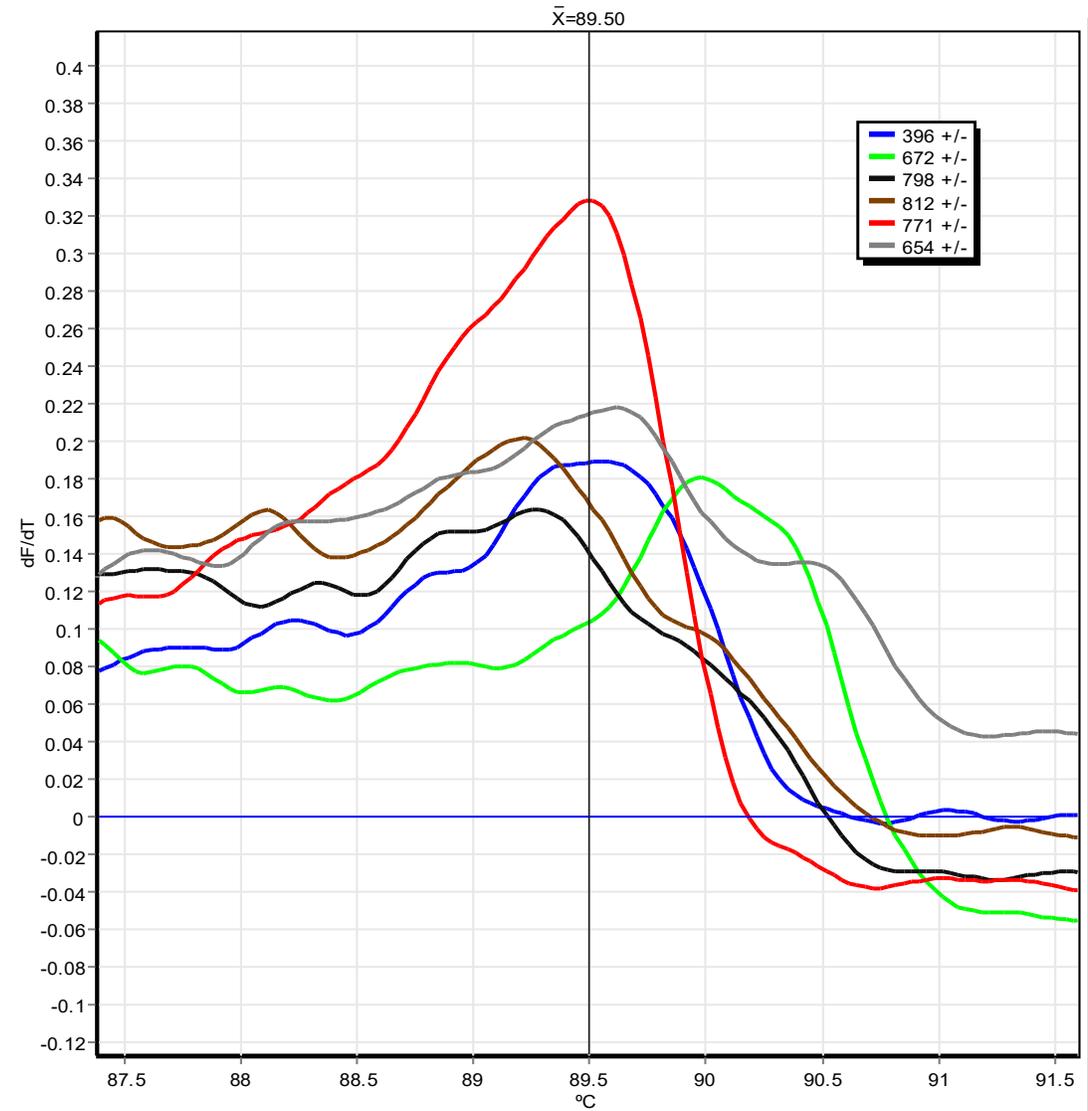


Figura 9. Curvas de desnaturalización de alta resolución (HRM) del grupo BLV^+/LP^- . Se muestran los alelos obtenidos de las siguientes muestras: 396, 672, 798, 812, 771 y 654.

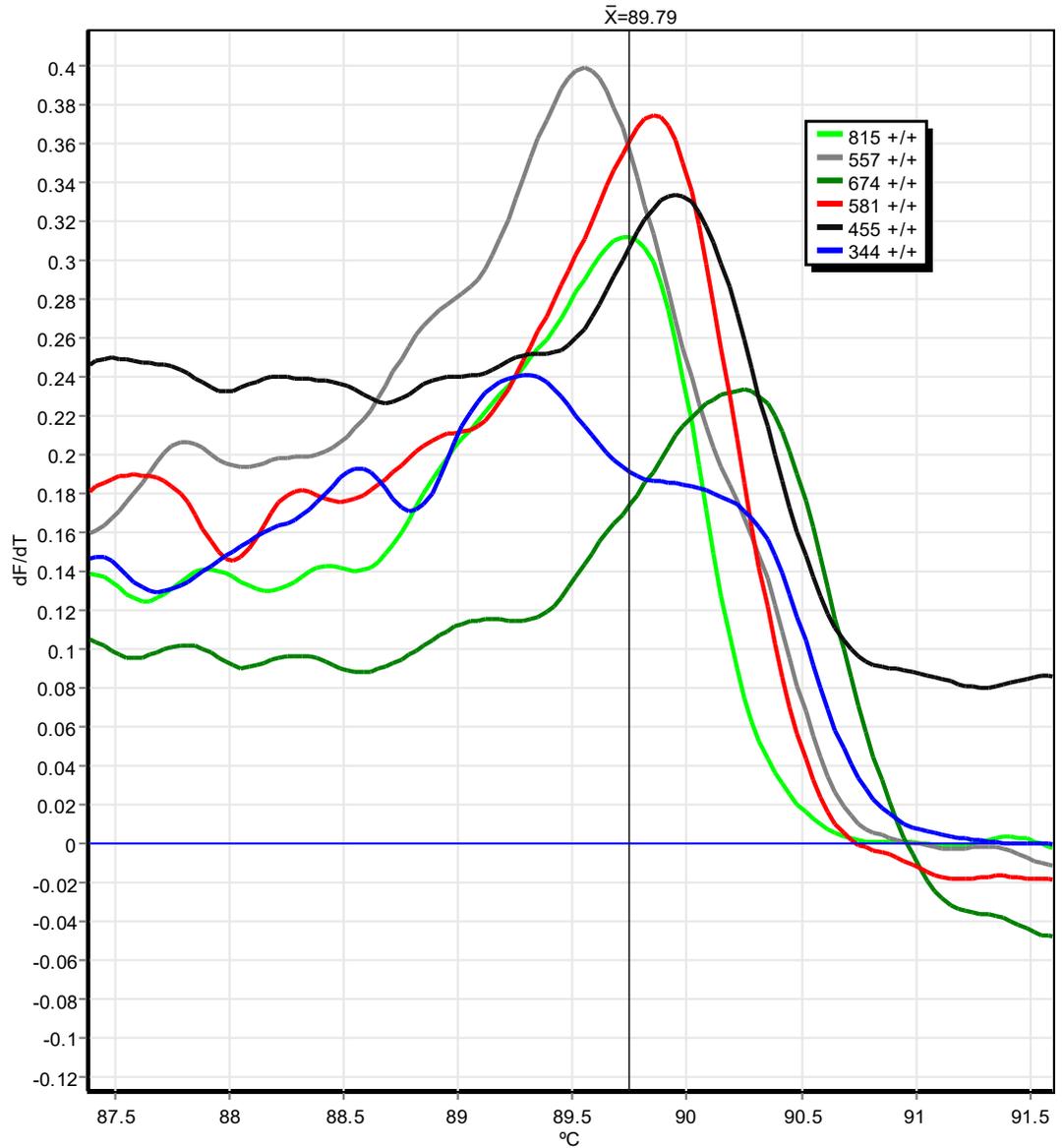


Figura 10. Curvas de desnaturalización de alta resolución (HRM) del grupo BLV⁺/LP⁺. Se muestran los alelos obtenidos de las siguientes muestras: 815, 557, 674, 581, 455 y 344.

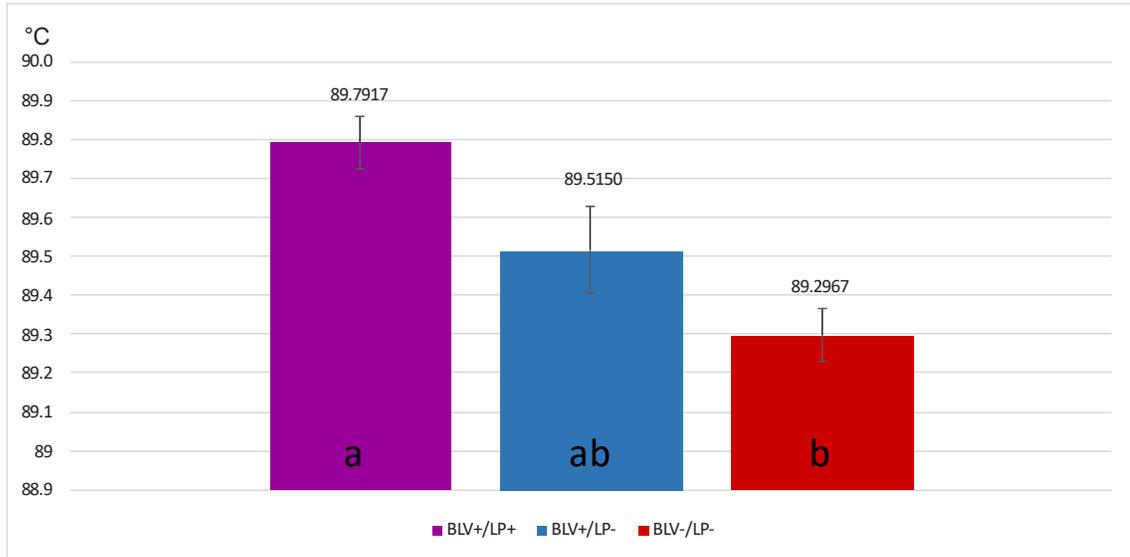


Figura 11. Temperatura de desnaturalización de alta resolución (HRM) entre los grupos experimentales. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa. *Promedio de temperatura.

presentó el motivo VDTV (susceptibilidad) en presencia del motivo EK. Por otro lado, las secuencias de las vacas BLV⁺/LP⁺ (Figura 13), 3/6 vacas presentaron el motivo de susceptibilidad VDTV o VDTY en las posiciones 75-78 sin la presencia de un motivo ER o EK en posición 70-71 mientras que las 3 restantes, presentaron un codón de paro en la posición 78. Sólo una secuencia de este grupo exhibió un motivo EK pero en conjunto con un codón de paro. En el grupo BLV⁺/LP⁻ (Figura 14), 2/4 presentaron el motivo EK (70-71) en presencia del motivo inédito VDTL (75-78). En la vaca 771 se apreció un codón de paro en posición 78 al igual que las vacas BLV⁺/LP⁺. No se obtuvieron secuencias de las muestras pertenecientes a las vacas 396 y 672 (BLV⁺/LP⁻) ni de las vacas 849 y 677 (BLV⁻/LP⁻).

493	-/-	CAGACGCGGGCCGAGGTGGACACGTTG
493		QTRAEVDTL
378	-/-	GAGAAGCGGGCCGAGGTGGACAGGGTG
378		EKRAEVDRV
631	-/-	GAGAAGCGGGCCGAGGTGGACACGTTG
631		EKRAEVDTL
776	-/-	GAGAGGCGGGCCGATGTGGACACGTGG
776		ERRADVDTW
849	Ss	
677	Ss	

Figura 12. Predicción de Aminoácidos. Muestras correspondientes al estatus BLV⁻/LP⁻.

Ss: No se obtuvo secuencia

815	+/+	CGGAGGCGGGCCGAGGTGGACACGGTG
815		RRRAEVDTV
557	+/+	GAGAAGCGGGCCTATGTGGACACGTAG
557		EKRAYVDT*
674	+/+	CGGGAGCGGGCCTATGTGGACACGTAC
674		RERAYVDTY
581	+/+	CGGAAGCGGGCCTATGTGGACACGGTG
581		RKRAYVDTV
455	+/+	CGGGAGCGGGCCTATGTGGACACGTAG
455		RERAYVDT*
344	+/+	GAGGCGCGGGCCGAGGTGGACACGTAG
344		EARAEVDT*

Figura 13. Predicción de Aminoácidos. Muestras correspondientes al estatus BLV⁺/LP⁺.

*Codón de paro

798	+/-	GAGAAGCGGGCCTATGTGGACACGTTG
798		EKRAYVDTL
812	+/-	GAAAAACGTGCGTATGTGGATACCCTG
812		EKRAYVDTL
771	+/-	GATAAACGTGCGAGCGTGGATACCTAA
771		DKRASVDT*
654	+/-	CGGGCGCGGGCCGTGGCGGCCATGTGG
654		RARAVAAMW
396	Ss	
672	Ss	

Figura 14. Predicción de Aminoácidos. Muestras correspondientes al estatus BLV⁺/LP⁻.

*Codón de paro

Ss: No se obtuvo secuencia

5.4. Curvas de diferenciación

Para determinar los genotipos potenciales presentes en la población experimental, se construyeron curvas de diferenciación, agrupando los alelos con base a la presencia de los motivos ER/70-71 (resistencia/tipo 1), VDTV/75-78 (susceptibilidad/tipo 2), VDTY/75-78 (susceptibilidad/tipo 3) y VDTL/75-78 (inédito/tipo 4). Los alelos representativos por grupo fueron: vaca 776 (tipo 1/BLV⁻/LP⁻), vaca 581 (tipo 2/BLV⁺/LP⁺), vaca 674 (tipo 3/ BLV⁺/LP⁺) y vaca 812 (tipo 4/BLV⁺/LP⁻). En la curva de diferenciación (Figura 15), se aprecian los alelos del grupo experimental agrupados en los 4 tipos conformados, así como 3 variantes de alelos que corresponden a los alelos 378/BLV⁻/LP⁻ (motivos EK/70-71 y VDRD/75-78), 771/ BLV⁺/LP⁻ (codon de paro/78) y 396/ BLV⁺/LP⁻ (sin secuencia). El porcentaje coincidencia de los alelos con relación al representativo de grupo, así como la información pertinente presencia de motivos de aminoácidos y del grupo experimental, se muestran en la tabla 3.

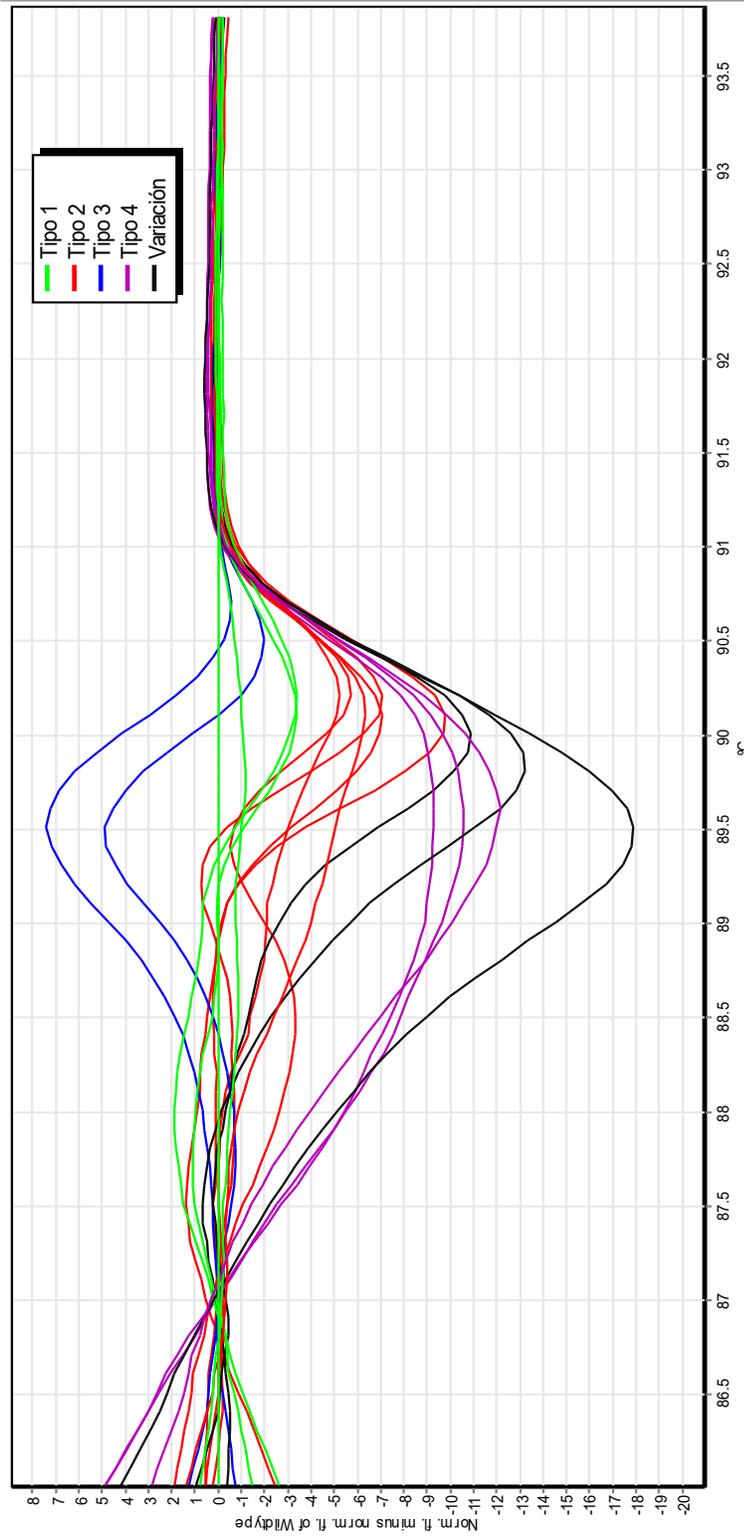


Figura 15. Curvas de diferenciación por desnaturalización de alta resolución (HRM). Se muestra la agrupación de alelos con base a los patrones de HRM obtenidos (Genotipos) en el grupo experimental. * El genotipo “wild type” corresponde al alelo de referencia que contiene el motivo ER en posición 70-71 (vaca 776).

Id. Vaca con estatus	Genotipo	Coincidencia %	Motivo resistencia	Motivo susceptibilidad	Motivo no descrito
776 -/-	Tipo 1	100	ER	-	
631 -/-	Tipo 1	97.35	EK	-	VDTL
654 +/-	Tipo 1	88.4	-	-	-
493 -/-	Tipo 1	84.36	-	-	VDTL
581 +/+	Tipo 2	100	-	VDTV	-
344 +/+	Tipo 2	88.53	-	VDT*	-
455 +/+	Tipo 2	88.27	-	VDT*	-
557 +/+	Tipo 2	87.46	EK	VDT*	-
815 +/+	Tipo 2	85.81		VDTV	
849 -/-	Tipo 2	77.06	S/S	S/S	S/S
674 +/+	Tipo 3	100	-	VDTY	-
672 +/-	Tipo 3	85.37	S/S	S/S	S/S
812 +/-	Tipo 4	100	EK	-	VDTL
798 +/-	Tipo 4	97.8	EK	-	VDTL
677 -/-	Tipo 4	93.84	S/S	S/S	S/S
396 +/-	Variación		S/S	S/S	S/S
378 -/-	Variación		EK	VDRV	-
771 +/-	Variación		-	VDT*	-

Tabla 3. Comparación de genotipos. *Codón de paro
S/S: Sin secuencia.

6. DISCUSIÓN

La técnica de PCR es una eficaz técnica que permite amplificar una secuencia específica de DNA en unas cuantas horas o minutos, dependiendo del tamaño del fragmento amplificado, y su variante en tiempo real nos permite realizar la cuantificación de los productos amplificados y puede ser combinada con otras técnicas de análisis tales como la HRM la cual es una técnica relativamente reciente que es rápida y económica que permite diversas aplicaciones entre las que destaca la detección de mutaciones, detección de polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms [SNP, por sus siglas en inglés]) y genotipificación de productos pequeños amplificados por PCR; entre otras (27, 28). Esta última aplicación es compatible con el modelo experimental del presente estudio puesto que los productos amplificados de BoLA-DRB3.2 son de aproximadamente 283 pb. De hecho, la sensibilidad del análisis por HRM es mayor en fragmentos pequeños de ADN ya que generalmente representan a un fragmento por exon (29). Adicionalmente, para el análisis por HRM es indispensable que las condiciones de amplificación por PCR sean excelentes (28); por tal motivo, los iniciadores empleados para la tipificación de BoLA-DRB3.2 por HRM corresponden a los iniciadores descritos en la literatura los cuales han sido bien caracterizados para la genotipificación de BoLA-DRB3.2 por fragmentos polimórficos de restricción (restriction fragment length polymorphisms [RFLP, por sus siglas en inglés]) y por secuenciación (21 -23) De este modo, el objetivo de la estandarización de la técnica de tipificación de BoLA-DRB3.2 fue proponer un método simple, rápido y de bajo costo que permita la identificación de polimorfismos en el exón 2 para la detección

de alelos de resistencia y susceptibilidad. Adicionalmente, en la técnica estandarizada se utilizaron tres iniciadores con la finalidad de incrementar la probabilidad de detección de productos con el motivo ER/70-71 (iniciador alelo específico) tal y como se describe en la técnica original (27).

Con relación a la amplificación de productos de BoLA-DRB3.2, los resultados obtenidos constataron que los iniciadores y condiciones de amplificación descritos son altamente sensibles y específicos puesto que se pueden obtener productos a una baja concentración de templado e iniciadores, utilizando concentración estándar de $MgCl_2$ por PCR en punto final y qPCR.

El análisis de las curvas de HRM de los productos demostró que puede discriminar diferentes alelos en un intervalo de temperatura de $87.5^{\circ}C$ a $92^{\circ}C$, presentando perfiles similares por grupo experimental. Así mismo, se apreció que la temperatura de desnaturalización en cada grupo experimental mostraba desviaciones características, siendo estadísticamente significativamente más baja en el grupo BLV⁻/LP⁻ (desviación a la izquierda) que la del grupo BLV⁺/LP⁺ (desviación a la derecha). Este efecto ha sido descrito cuando se utilizan productos de PCR cortos, los cuales presentan poca variación en forma, pero son más fáciles de detectar que las diferencias de T_m . Así mismo, la diferencia en forma de las curvas se comparan fácilmente por las desviaciones en la temperatura (30 - 33). De este modo, se puede inferir que con base al grupo al que pertenece el alelo, se clasifiquen los alelos como resistentes resistencia (BLV⁻/LP⁻) y de susceptibilidad (BLV⁺/LP⁺). Las curvas del grupo BLV⁺/LP⁻ presentaron un patrón mixto y por tanto, no presentó diferencia significativa de temperatura, indicando que ese grupo presenta tanto alelos de resistencia como de susceptibilidad. Tal es el caso de la vaca 654 (BLV⁺/LP⁻) que

presentó un perfil de curva similar a los obtenidos en las 776 y 631 (BLV⁻/LP⁻) mismas que presentaron una alta similitud, indicando que el alelo de la vaca 654 sea de resistencia. Los hallazgos descritos sustentan el uso de esta técnica como prueba tamiz.

La secuenciación de los productos y la predicción de aminoácidos de la región en la que se describen los motivos de resistencia y susceptibilidad confirmó la presencia de motivo ER/70-71 en una muestra (vaca 776/ BLV⁻/LP⁻) y por esta razón se seleccionó utilizó para representa el del tipo 1 (resistencia). En este mismo grupo, se detectó el motivo inédito VDTL/75-78 sólo o en combinación con, sugiriendo que este motivo es de resistencia. Con respecto al motivo EK/70-71, se ha descrito asociación con susceptibilidad en presencia del motivo VDRV/75-78 (22). Es posible que el efecto del motivo EK/70-71 se determine por el motivo 75-78 que se exprese en la región y por tanto en el presente estudio potencialmente está asociado con resistencia. Adicionalmente, el motivo EK está presente en un número considerable de muestras, particularmente en aquellas vacas que no han desarrollado LP. Para evaluar la asociación de los motivos VDTL/75-78 y EK/70-71 con el rasgo de resistencia, se seleccionó la muestra de la vaca 812 (BLV⁺/LP⁻) para conformar el tipo 4 (resistencia).

Las secuencias de las vacas del grupo BLV⁺/LP⁺ mostraron los motivos de susceptibilidad (VDTV o VDTY) o codificaron un codón de paro (VDT^{*}). Este último es un hallazgo no descrito que se observó en 3/6 vacas de este grupo y en un animal del BLV⁺/LP⁻, sugiriendo que la susceptibilidad esta asociada a la traducción de una proteína trunca que podría alterar el sitio de unión al antígeno (22) y/o anular la función de la misma. Se requiere validación adicional para estudiar la frecuencia y

significado de este hallazgo. Para la tipificación de alelos de susceptibilidad, se seleccionaron las secuencias con motivos VDTV (vaca 581) o VDTY (vaca 674) para integrar los tipos 2 y 3, respectivamente.

Por último, en la curva de diferenciación se agruparon los alelos amplificados, apreciándose que los tipo 1 (resistencia) y tipo 2 (susceptibilidad) son los más frecuentes en su categoría y están relacionados con la presencia de los motivos de resistencia (ER, EK y VDTL) y susceptibilidad (VDTV y VDT*/paro), apoyando los hallazgos descritos previamente. La curva de la vaca 654 (BLV⁺/LP⁻) se agrupó efectivamente en el tipo 1 junto con las vacas 776 y 631 (BLV⁻/LP⁻) con alto porcentaje de coincidencia entre las mismas lo cual fue un hallazgo descrito en el tamizaje inicial. Los tipos 3 y 4 fueron los menos frecuentes, pero también muestran concordancia con la presencia de motivos de susceptibilidad y resistencia, respectivamente.

Sin embargo, la vaca 849 (BLV⁻/LP⁻) se agrupó en el tipo 2, siendo discordante con el resto de los alelos tipo 2. Desafortunadamente, no se obtuvo para determinar los motivos presentes en este alelo, pero el porcentaje de coincidencia con la curva prototipo fue la menor del tipo 2 (77.06%). Así mismo, se observó la presencia de tres variantes, una de ellas sin secuencia, que incluye a la vaca 378 (BLV⁻/LP⁻) la cual presentó un motivo EK/70-71 en compañía con el motivo VDRV. Como se mencionó anteriormente, esta combinación ha sido descrita como alelo de susceptibilidad (22). Sin embargo, en este estudio se está observando en una vaca negativa a infección y a LP que representa un factor predominante de resistencia. Es posible que la población nacional presente distintos tipos de asociaciones con respecto al ganado de otras regiones geográficas. La otra variante únicamente

presentó el codón de paro por lo que es probable que represente un alelo de susceptibilidad como los de tipo 2. Se requiere un análisis posterior que incluya un mayor número de muestras permita proponer estos alelos como tipo particulares, al incrementarse el número de tipos de alelos potenciales.

La implementación de esta técnica para la tipificación de alelos de BoLA-DRB3.2 puede probar ser de mucha utilidad en la selección de ganado lechero ya que permitirá reducir costos al no requerir gastos de secuenciación, representando una técnica rápida y sencilla de interpretar una vez validada.

Debido a que la infección por BLV promueve linfocitosis persistente; generando linfocitos B reactivos que no tienen la capacidad de presentar antígenos, los animales afectados también tienen mayor susceptibilidad de contraer enfermedades. Lo anterior conduce a un mayor decomiso de animales en el rastro, ocasionando grandes pérdidas económicas para el productor. Por otra parte, el costo total de la infección en un rebaño con 50% de prevalencia de la infección por BLV, incluyó el costo de la enfermedad clínica y los efectos de la infección subclínica en la producción de leche y la segregación prematura de los animales. Se realizó un estimado de 412 USD por caso de linfosarcoma y el costo anual de la infección subclínica fue de 6,406 USD (34). De este modo, el análisis de BoLA-DRB3.2 por HRM podría utilizarse como prueba rápida de tamiz coadyuvando a la selección de los animales para reemplazo o como sementales.

7. CONCLUSIONES

- Los iniciadores y condiciones de amplificación utilizados mostraron alta eficiencia para su utilización en análisis por HRM.
- Las curvas de HRM permitieron la detección de alelos a partir de los productos amplificados en la PCR en tiempo real optimizada, discriminando los alelos tanto por perfiles como por desviación de la T_m característicos de cada grupo experimental.
- Por secuenciación, se detectaron motivos de resistencia (ER y EK/70-71) y de susceptibilidad (VDTV, VDTY y VDRV/75-78) así como un motivo inédito (VDTL/75-78).
- Con base en los motivos presentes (resistencia o susceptibilidad), se seleccionaron 4 tipos de alelos mismos que en la curva de diferenciación agruparon los alelos restantes de la población experimental en congruencia con su estatus de LP.
- Se determinó que el motivo inédito VDTL/75-78 posiblemente está asociado con resistencia al desarrollo de LP debido a los alelos con este motivo con base en los perfiles de la curva de diferenciación se situaron dentro del grupo 1, representado por el alelo con motivo de resistencia ER, presentando porcentajes de coincidencia.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez S. M., Florins A., Gillet N., de Brogniez A, Sanchez-Alcaraz M.T., Boxus M., Boulanger F., Gutierrez G., Trono K., Alvarez I., et.al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTVL. *Viruses*. 2011; 3: 1210-1248.
2. Zambrano J, Echeverri J, López A, editors. Polymorphism of BoLA DRB3.2 gene in holstein and bonxholstein cows using PCR-RFLP. *AICA* [Internet] 2011 [citado 3 noviembre de 2017] 1(1): 173-6. Disponible en: <https://aicarevista.jimdo.com/números/volúmen-1-2011/>
3. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet] 2019 [citado julio 2019]. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/>
4. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, *et. al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 2007; 4(18):1-32
5. Liu D. Bovine Leukemia Virus. En: Gutiérrez S y Forletti A, editors. *Molecular detection of animal viral pathogens*. Florida: Taylor y Francis Group; 2016 p. 157-67.
6. Hernández DY. Asociación del locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en razas criollas y colombianas. (Tesis de maestría). Palmira (Colombia) Colombia: Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2010.
7. González E.T., Olivia G. A., Valera A., Bonzo E., Licursi M., Etcheverrigaray M. E., Leucosis Enzootica Bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID,

- ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inculados experimentalmente. *Analecta Vet.* 2001, 21(2): 12-20.
8. Wilesmith, J. W., Straub, O. C., & Lorenz, R. J. Some observations on the epidemiology of bovine leucosis virus infection in a large dairy herd. *Research in veterinary science.* 1980. 28(1): 10-6.
 9. Motton D. D., Buhering G. C., Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. *Journal Dairy Science* 2003; 86: 2826-2838.
 10. Dimmock, C. K., Chung, Y. S., & MacKenzie, A. R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *AUST. VET. J.* 1991, 68(7): 230-33.
 11. Castelli M., Mangold A., Martín M., Abdala A. *Infortambo*, 1999; 1(28):68
 12. Parodi AI: Pathology of enzootic bovine leukosis. *Conf. ISCAH*, 1985.
 13. Mirsky, M. L., Olmstead, C., Da, Y., & Lewin, H. A.. Reducen bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J. Vet. Med. Sci.* 2000; 62: 779-781.
 14. Chamizo Pestana, E.G.. En: *Patología Especial y Diagnóstico de las Enfermedades de los Animales Domésticos*. 1º Ed. *Leucosis Bovina Enzoótica UABC Mexicali* . 1995 p:78-81.
 15. Andrews A. H., *Bovine Medicine Diseases and Husbrandy of Cattle*. 2004, 2º Ed. Blackwell Science.
 16. Khars R. F., *Viral Diseases of Cattle*. Iowa State University Press. 2001, 2º Edition.
 17. Ferrer, J.f. Bovine lymphosarcoma *Adv. Veto Sel. Comp. Med.* 1980.. 24;1

18. Baruta DA, Ardoino SM, Brandan JL, Sosa RE, Mariani EL, Albreth EM. Leucosis enzootica bovina. *Ciencia Veterinaria* 2011; 13(1): 9-16
19. Erskine, R.J.; Bartlett, P.C.; Sabo, K.M.; Sordillo, L.M. 2011. Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Veterinary Medicine International* vol. 2011, Article ID 915747, 5 pages. doi:10.4061/2011/915747.
20. Hernández D, Posso T, Muñoz J y Giovambattista G. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2 en ganado criollo colombiano. *Rev. MVZ Córdoba* 2013, 18(Supl):3665-71.
21. Van Eijk, M.J.T., Stewart-Haynes J.A. y Lewin, H.A. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genet.* 1992, 23: 483-96.
22. Xu, A. van Eijk, M J. T. Park, C Lewin H. A.. Polymorphism in *BOLA-DRB3* Exon 2 Correlates with Resistance to Persistent Lymphocytosis Caused by Bovine Leukemia Virus. *J Immunol.* 1993; 153(12): 6977-85
23. Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, Russo S, Lewin HA, van Eijk MJ. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genet.* 1996; 27(5): 337-41.
24. Mirsky, M. L., Olmstead, C., Da, Y., & Lewin, H. A.. BoLA-DRB3-associated resistance to persistent lymphocytosis is characterized by reduced bovine leukaemia virus proviral load. *Animal Genetics-Supplement*, 1996; 27(45)

25. Ririe, Kirk M.; Rasmussen, Randy P.; Wittwer, Carl T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 1997; 245 (2): 154-60
26. Gallego F, Arjona R. Análisis de Variación génica mediante el método HRM (High Resolution Melting). VHIR [Internet], 2012 [citado 18 agosto 2017] Barcelona.p:2-4. Disponible en: http://www.vhir.org/global/pdf/ucts/Informe_HRM.pdf
27. Gilliespie, B. E. Jayarao, B. M. Dowlen, H. H. Oliver, S. P. Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Jersey Cows. *J Dairy Sci* 1999; 82: 2049–53
28. Farrar J.S, Wittwer C.T., High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. *Molecular Diagnostics*, 2017; 6: 79-97
29. Wittwer, C. T. High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations. *Human Mutation*, 2009; (6): 857–9
30. Vossen, R. H.A.M, Aten,E., Roos, A., and den Dunnen, J.T. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More Than Just Sequence Variant Screening. *Hum. Mutat.*, 2009; 30(6): 860–6
31. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, and Pryor RJ. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clin. Chem.* 2003; 49(6): 853–60.
32. Dobrowolski S, Gray J, Miller T, Sears M.. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling. *Hum Mutat* 2009; 30:891–8.

33. van der Stoep N, van Paridon CDM, Janssens T, Krenkova P, Stambergova A, Macek M, Matthijs G, Bakker E. Diagnostic guidelines for high resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner . Hum Mutat 2009; 30:889–909.
34. Chamizo E. Leucosis Bovina Enzootica. REDVET [Internet] 2005 [citado 3 noviembre de 2017] 6(1): Disponible en: <https://www.veterinaria.org/revistas/redvet/>