

# Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 asociados con resistencia / susceptibilidad a leucosis en ganado Holstein de La Pampa

Baltian, L.R.<sup>1</sup>; Follmer, A.V.<sup>1</sup>; Peratta, D.L.<sup>1</sup>; Schmidt, E.E.<sup>1</sup>; Severini, R.A.<sup>1</sup>; Delbonis, S.<sup>1</sup>; Borrego, C.<sup>1</sup>; Alvarez Rubianez, N.<sup>1</sup>; Ripoli, M.V.<sup>2</sup>; Giovambattista, G.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>FCV, UNLPam. <sup>2</sup>IGEVET- CONICET, FCV- UNLP

Correspondencia: lbaltian@yahoo.com.ar

Recibido: 28 de septiembre de 2016

Aceptado: 6 de diciembre de 2016

## Resumen

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad del ganado bovino adulto causada por el retrovirus de la leucemia bovina. Se puede manifestar como: una forma asintomática aleucémica, con un número normal de linfocitos B en sangre; una forma de linfocitosis permanente, con aumento del número de linfocitos B y como una presentación linfoproliferativa tumoral en forma de linfosarcoma. Los alelos de los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad Bovino (BoLA) han sido asociados con resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas. El objetivo general del presente estudio consistió en asociar los polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3.2, definidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y la técnica de Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP), con resistencia/susceptibilidad a leucosis en vacas Holstein de La Pampa. Se basó en un diseño caso/control, para lo cual se tomó muestra de sangre a 150 animales en 3 oportunidades con intervalos de tres meses cada una. Los animales fueron incluidos en el grupo caso cuando dieron positivos en la prueba de inmunodeficiencia en agar (DIDA) y cuyo recuento linfocitario en sangre fue  $\geq 10.000$  linfocitos/ $\mu\text{l}$  y el grupo control estuvo constituido con animales negativos en DIDA y que tenían  $< 10.000$  linfocitos/ $\mu\text{l}$  de sangre. Los tests Exacto de Fisher y Odds Ratio (OR) de Woolf-Haldane se utilizaron para estudiar la asociación entre recuento de linfocitos y resultados del DIDA con las variantes alélicas. En 82 animales genotipados por PCR-RFLP el alelo DRB3.2\*22 evidenció un OR= 5,332 ( $p= 0,0138$ ) y el alelo DRB3.2\*11 mostró un OR= 0,11 ( $p=0,001$ ) siendo más

frecuentes en el grupo caso y en el grupo control, respectivamente. Estos resultados evidenciarían que vacas con el alelo DRB3.2\*22 presentarían mayor riesgo a desarrollar leucosis y vacas con el alelo DRB3.2\*11 un menor riesgo (resistencia). El análisis de la relación entre alelos del gen BoLA-DRB3.2 y resistencia/susceptibilidad a leucosis podría mejorarse con investigaciones profundas en linajes familiares de vacas lecheras.

**Palabras claves:** Gen DRB3, PCR-RFLP, resistencia, susceptibilidad, leucosis.

## ***Polymorphisms of BoLA-DRB3 gene and its association with resistance / susceptibility to Leucosis in Holstein cattle from La Pampa***

### **Abstract**

EBL is a disease of adult cattle caused by the retrovirus, bovine leukemia. It can manifest: aleukemic an asymptomatic form, with a normal number of B lymphocytes in the blood; a form of permanent lymphocytosis, with an increase in the number of B lymphocytes and finally a lymphoproliferative tumor presentation in the form of lymphosarcoma. The alleles of the genes of the Bovine Major Histocompatibility Complex (BoLA) have been associated with resistance and susceptibility to infectious diseases. The overall objective of this study was to associate polymorphisms of the BoLA-DRB3.2 gene, defined by the technique of polymerase chain reaction technique and polymorphisms length of the restriction fragment (PCR-RFLP), with resistance / susceptibility to leucosis in Holstein cows of La Pampa. It relied on a case/control design, for which blood samples were taken to 150 animals in 3 opportunities with intervals of three months each. The case group comprised animals that were positive in the immunodiffusion agar animals test (DIDA) and whose blood lymphocyte count was  $\geq 10.000$  linf/ $\mu$ l and the control group included cows that were negative for DIDA and present  $< 10.000$  linf/ $\mu$ l of blood. Fisher's Exact test and Odds Ratio (OR) of Woolf-Haldane were used to study the association between lymphocyte count and DIDA results with allelic variants. In 82 animals genotyped by PCR-RFLP, the DRB3.2\*22 allele showed an

OR = 5.332 ( $p = 0.0138$ ) and DRB3.2\*11 allele had a OR value of 0.11 ( $p=0.001$ ) and were the most frequent in the control group and in the case group, respectively. These results would showed DRB3.2\*22 allele and DRB3.2\*11 allele a high risk of having leucosis (susceptibility) and low risk to suffer (resistance) respectively. The analysis of the relationship between alleles of the BoLA and resistance/susceptibility to leucosis could be improved with deep research on family lineages of dairy cows.

**Keywords:** BoLA-DRB3 gene, PCR-RFLP, resistance, susceptibility, leucosis

## Introducción

La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad del ganado bovino adulto causada por el retrovirus de la leucemia bovina (VLB). Se puede manifestar de tres formas diferentes: una forma asintomática aleucémica (AL), caracterizada por un número normal de linfocitos B en la circulación sanguínea; una forma de linfocitosis permanente (LP), que posee un aumento sostenido del número absoluto de linfocitos B en la sangre y por último una presentación linfoproliferativa tumoral en forma de linfosarcoma o linfoma maligno con la presencia de masas sólidas tumorales, infiltrando diferentes órganos y tejidos (Burny *et al.*, 1987; Ogawa *et al.*, 1987).

El ganado puede infectarse a cualquier edad, incluida la fase embrionaria. La forma Aleucémica (AL) afecta al 70% de los bovino VLB positivos (+). Estos animales no muestran trastornos hematológicos, siendo el número de linfocitos B dentro de los valores normales. En la linfocitosis persistente (LP) afecta a un 30-35% de los animales infectados y puede prolongarse por años. Se traduce en un aumento en el número de linfocitos B circulantes (Ketman *et al.*, 1980) y una pequeña proporción tumores (linfosarcomas) en varios órganos internos (Martinez *et al.*, 2005). Los síntomas clínicos, cuando se presentan, dependen de los órganos afectados. La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente está determinada genéticamente y quizá también el desarrollo del propio tumor. Se demostró que los rodeos infectados con VLB presentaban menor producción láctea (2,5-3% a nivel poblacional) y un aumento en la tasa de pérdidas selectivas, así como una mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa, del tipo de la mastitis,

diarrea y neumonía, pero el efecto sobre la fertilidad fue escaso (Emanuelsson *et al.*, 1992). También se ha registrado infección natural en búfalos y ovejas. El ganado con linfosarcomas (5%) casi siempre muere súbitamente, en semanas o en meses después de la aparición de los síntomas clínicos. En general la fase de tumor se presenta en animales con LP, pero también puede desarrollarse en animales aleucémicos sin signos clínicos (Ferrer *et al.*, 1979). Generalmente se acompaña con anemia, emaciación e infertilidad. El signo más específico de la enfermedad es la linfoandromegalia bilateral de los ganglios linfáticos (Chamizo, 1995).

Los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) son de importancia para los criadores de animales y genetistas porque juegan un rol central en la respuesta inmune y han sido asociados con resistencia/susceptibilidad a una amplia cantidad de enfermedades. El MHC es poligénico y cada uno de los genes a su vez tiene muchos alelos por lo que es también polimórfico. Este polimorfismo tiene un profundo efecto en el reconocimiento de los antígenos por las células T y la combinación de poligenia y polimorfismo extiende ampliamente el rango de péptidos que pueden ser presentados a las células T por un individuo (Brown *et al.*, 1993). El MHC de los mamíferos se divide comúnmente en tres regiones llamadas: MHC de clase I; clase II y de clase III, las cuales codifican para proteínas con diferentes funciones y distribución en los tejidos (Lewin *et al.*, 1999; Takeshima y Aida, 2006).

En bovinos, el MHC se denomina Antígeno Leucocítico Bovino (BoLA) y su descubrimiento es atribuido a Amorena y Stone (1978) y a Spooner *et al.* (1978). El BoLA ha sido mapeado en el cromosoma autosómico bovino 23 (BTA23, Fries *et al.*, 1993) dentro de una extensión de 4.000 Kb que contiene más de 154 genes estrechamente ligados. Estos incluyen 60 genes dentro de la región clase I, 38 dentro de la región clase II (que se divide en subregión IIa y clase IIb) y 56 dentro de la región clase III (*The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al.*, 2009). Las moléculas de clase II se encuentran en la superficie de las células procesadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B). Estas células tienen como función la presentación de antígenos exógenos para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T helper (Panei, 2011). La subregión clase IIa contiene genes funcionales como DR y DQ. En bovinos,

hay un gen DRA, tres genes DRB (DRB1, DRB2 y DRB3) y varios genes DQA y DQB. El gen BoLA-DRB3 es el más polimórfico en bovinos y tiene influencia en la presentación de antígenos a células T en la respuesta inmune a enfermedades infecciosas. El exón 2 de dicho gen es altamente polimórfico y es reconocido por su rol en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas y autoinmunes (Yoshida *et al.*, 2008).

Diferentes autores han asociado los polimorfismos presentes en los genes del BoLA con enfermedades infecciosas (Xu *et al.*, 1993; Dietz *et al.*, 1997b; Mirsky *et al.*, 1998; Aida *et al.*, 2001, Martínez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2006; Do Nascimento *et al.*, 2006; Juliarena *et al.*, 2008; Panei *et al.*, 2009, Baltian *et al.*, 2012). Entre las enfermedades infecciosas estudiadas pueden mencionarse la brucelosis, mastitis, leucosis, dermatofitosis y ectoparasitosis, las que han sido asociadas principalmente a los polimorfismos presentes en el segundo exón del gen de clase II BoLA-DRB3 (Takeshima y Aida, 2006; Baltian *et al.*, 2012; 2014). También, estos polimorfismos han sido asociados con caracteres productivos como producción de leche, proteínas y grasa en leche, crecimiento (Machado *et al.*, 2005; Do Nascimento *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2009b).

Un número de factores pueden influenciar el resultado de la infección, los que por conveniencia se clasifican en variables ambientales, variables propias del patógeno y factores del hospedador. Generalmente, los factores ambientales en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas tienen un efecto considerable, por lo que estos caracteres presentan una mediana-baja heredabilidad. Las variables ambientales pueden incluir, entre otros, el estado reproductivo y nutricional, la edad de exposición al patógeno y la presencia de toxinas ambientales.

Por otra parte, aquellas variables derivadas del patógeno generalmente implican factores de virulencia, que por ejemplo pueden incrementar o atenuar la habilidad de colonización del organismo, o aumentar la patogenicidad a través de la expresión de una toxina. Debido a que el control de las infecciones se ha realizado básicamente mediante drogas y vacunas, su utilización indiscriminada ha llevado a la selección de patógenos con resistencia a los fármacos. Finalmente, los factores atribuidos al hospedador, implican principalmente la dotación genética del organismo, dado que en toda población existen diferencias

individuales en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Díaz *et al.*, 2010).

Un único cambio en las bases del ADN del individuo lo pueden predisponer a padecer la enfermedad. En ese caso estamos ante alelos de susceptibilidad o bien puede resultar que dicho cambio le dé resistencia a la enfermedad, en ese caso el alelo tiene efecto protector. Esos cambios pueden darse tanto en las regiones codificantes como en las no codificantes del ADN. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar los polimorfismos en el exón 2 de la molécula de clase II del gen BoLA-DRB3 y asociarlos con resistencia/susceptibilidad a leucosis.

## ***Materiales y Métodos***

Para este estudio se analizaron 150 bovinos de la raza Holstein de la provincia de La Pampa.

El presente estudio se basó en la identificación de los alelos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 de susceptibilidad/resistencia a través de la búsqueda de cambios en el ADN que estén presentes con mayor frecuencia en individuos que padecen o no leucosis.

### *II.1. Estudios hematológicos*

Se tomaron muestras de sangre para realizar el recuento linfocitario, las cuales se realizaron en un laboratorio comercial (General Pico, La Pampa). La extracción se efectuó en 3 ocasiones con intervalos de 3 meses para descartar procesos agudos atribuibles a otros agentes etiológicos.

Las muestras se fraccionaron de la siguiente manera: de los 12 ml extraídos a cada vaca durante el primer muestreo, 5 ml fueron colectados en tubos con anticoagulante (EDTA) para realizar la extracción de ADN en el laboratorio de Genética de la FCV-UNLPam; 3 ml en otro tubo con EDTA para enviar al laboratorio de hematología citado anteriormente y 4 ml sin anticoagulante para obtener, tras centrifugación, 2 ml de suero, aproximadamente, para ser utilizados en inmunodiagnóstico.

Se tomó como referencia el número de linfocitos (linf.):  $\geq$  de 10.000 linfocitos/ $\mu$ l: leucosis persistente (LP) y aleucosis (AL) < de 10.000 linfocitos/ $\mu$ l.

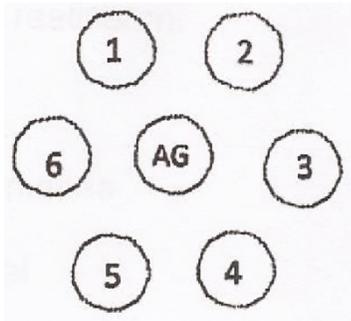
### *II.2. Análisis serológicos*

#### *Inmunodifusión en gel de agar: (DIDA)*

Se realizó el análisis serológico en todas las muestras por la prueba de doble inmunodifusión en agar (DIDA) dado que esta prueba tiene alta especificidad, por lo tanto los animales positivos fueron considerados portadores de VLB.

El test de DIDA es un kit comercial producido en el laboratorio de Virología FCV-UNLP (aprobado por SENASA). Se realizó la siembra en geles de agar con 6 pocillos externos y uno central (Fig. 1). En sentido de las agujas del reloj y en círculo en los pocillos 1, 2, 4, 5 se colocó 35  $\mu$ l de sueros problemáticos; mientras que en los pocillos 3 y 6 sueros control positivos y en el pocillo central el antígeno VLB.

**Figura N° 1:** Esquema de siembra de los sueros en placa de Petri para Kit de doble inmunodifusión en gel de Agar (DIDA).



Referencias: En los pocillos 1, 2, 4 y 5 siembra de sueros problema. Pocillos 3 y 6, sueros controles positivos. Pocillo central: antígeno VLB.

### *II.3. Diseño experimental*

#### *Diseño de caso /control*

Grupo caso: este grupo estuvo compuesto por los animales con registro de linfocitos mayor a 10.000 por microlitro de sangre ( $\geq 10000$  linf./  $\mu$ l) y positivos para DIDA.

Grupo control: este grupo estuvo compuesto por los animales con registros de linfocitos menor a 10.000 por microlitro de sangre ( $< 10.000$  linf./  $\mu$ l) y negativos para DIDA.

### *II.4. Extracción del ADN*

El ADN genómico se extrajo a partir de las muestras de sangre mediante la técnica de DNA zol® (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA), según las indicaciones del proveedor. La calidad y cantidad del ADN genómico extraído se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% 0,5X TBE. Las muestras se mezclaron con 3µl colorante y la electroforesis se realizó a 100 voltios durante ~30 minutos. Los geles se sumergieron en bromuro de etidio durante ~10 minutos y se observaron en transiluminador de emisión de luz ultravioleta (UV).

### *II.5. Estudio de los polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3*

La caracterización de los alelos del segundo exón del gen BoLA-DRB3 fue llevada a cabo por el método de PCR anidado-RFLP descrito por van Eijk *et al.* (1992a). Dicha técnica consiste en la amplificación de la secuencia de ADN de 284 pb que codifica para la región de reconocimiento del antígeno o ARS (exón 2 del gen BoLA-DRB3) y la posterior digestión de los productos de PCR con las enzimas de restricción *Rsa* I, *Bst* I y *Hae* III. La clasificación de los alelos se realizó teniendo en cuenta las combinaciones de los patrones de restricción obtenidos en forma independiente para las enzimas antes mencionadas. El producto digerido por cada enzima y por cada animal fue corrido en un gel de poliacrilamida al 8% 0,1X TBE a 150 voltios y teñido con nitrato de plata para la visualización de los diferentes patrones de bandas.

Luego de la corrida electroforética, a cada patrón de bandas obtenido por animal y por enzima se le asigna una letra según la nomenclatura de la Sociedad Internacional de Genética Animal ([http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view\\_nomenclature.cgi?bola.dr3](http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.dr3)). Finalmente, se combinan los resultados de cada una de las enzimas por animal para la determinación del genotipo del gen BoLA-DRB3 definidos por la técnica utilizada.

### *II.6 Análisis estadísticos*

Las frecuencias génicas y genotípicas para cada grupo estudiado fueron analizadas por conteo directo. El test Exacto de Fisher, el de Odds ratio (OR) de Woolf-Haldane y los intervalos de confianza (CI) fueron aplicados para estudiar la asociación entre leucosis y los alelos del BoLA-DRB3.2. El odds ratio es una forma de comparar si la probabilidad de ocurrencia de un evento

es la misma entre dos grupos. Estos cálculos se realizaron mediante el paquete de R EpiTools (<http://www.r-project.org/>).

Un valor de OR > 1 indicaría que los animales tienen riesgo de desarrollar LP y por lo tanto se considerarían susceptibles.

Un OR < 1 indicaría que los animales tienen bajo riesgo de desarrollar LP y serían considerados resistentes.

## ***Resultados***

Del registro de 150 animales en cada muestreo, se logró reunir los datos completos de 82 animales. La genotipificación del gen BoLA-DRB3.2 permitió la identificación de 17 alelos. Las frecuencias alélicas oscilaron entre 1,82 y 25% en el grupo control y entre 0,97 y 20,39% en el grupo caso.

### *III.1 Resultados de la prueba de Inmunodifusión en agar (DIDA)*

A partir de las muestras de sueros correspondientes a 82 bovinos Holstein seleccionados, se procedió a realizar el diagnóstico de LEB mediante la prueba de DIDA. Este análisis dio como resultado: 57 animales dieron positivos para VLB (69,51%) y 25 bovinos negativos (30,48 %). El alelo más frecuente en el grupo DIDA (+) fue DRB3.2\*22 (20%) y el menos frecuente el alelo DRB3.2\*21, DRB3.2\* 37, DRB3.2\*27. En los animales DIDA (-) el alelo más frecuente fue DRB3.2\*23 con el 25% y los alelos menos frecuentes fueron: DRB3.2\*6, DRB3.2\*8, DRB3.2\* 27, y DRB3.2\*28 con el 2,3%.

### *III.2 Resultados de los análisis de laboratorio*

El resultado de los análisis de laboratorio sobre el conteo de linfocitos en animales VLB (+) determinó la presencia de 51 animales con LP (conteo  $\geq 10000$  linf./  $\mu\text{l}$ ) y 31 animales con  $<10.000$  linf./  $\mu\text{l}$  (aleucósicos). El alelo más frecuente en el grupo con conteo  $\geq 10000$  linf. / $\mu\text{l}$  fue el DRB3.2\*22 con el 15,37%. En tanto en el grupo de  $<10.000$  linf./  $\mu\text{l}$  fue el alelo DRB3.2\*23 con el 23,16%.

### III. 3 Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA- DRB3

Los resultados de las digestiones con las enzimas de restricción Rsa I, BstY I y Hae III permitieron genotipificar los 82 animales analizados. Se los analizó de acuerdo a la nomenclatura de la Sociedad Internacional de Genética animal ([http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view\\_nomenclature.cgi?bola.drb3](http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.drb3)). Este análisis permitió la identificación de 17 alelos distintos en los 82 animales analizados: DRB3.2\*6; DRB3.2\*8, DRB3.2\*10, DRB3.2\*11, DRB3.2\*15, DRB3.2\*16, DRB3.2\*20, DRB3.2\*21, DRB3.2\*22, DRB3.2\*23, DRB3.2\*24, DRB3.2\*25, DRB3.2\*27, DRB3.2\*28, DRB3.2\*34; DRB3.2\*36, y DRB3.2\*37, cuyas frecuencias oscilaron desde 0,97% la más baja hasta 25% la más alta (Tabla N°1).

Tabla N° 1: Frecuencias alélicas en porcentaje en cada categoría.

Alelos	CATEGORÍAS			
	≥ 10.000 linf./ul(LP)	<10.000linfoc./ul(AL)	DIDA Positivo	DIDA Negativo
DRB3.2*6	6,80	3,64	6,80	2,27
DRB3.2*8	7,77	3,64	7,77	2,27
DRB3.2*10	6,80	5,45	6,80	9,09
DRB3.2*11	2,91	14,55	2,91	20,45
DRB3.2*15	5,83	5,45	5,83	4,55
DRB3.2*16	3,88	10,91	3,88	15,91
DRB3.2*20	4,85	5,45	4,85	4,55
DRB3.2*22	20,39	12,73	20,39	4,55
DRB3.2*23	9,71	16,36	9,71	25,00
DRB3.2*24	10,68	7,27	10,68	4,55
DRB3.2*37	0,97	0,00	0,97	0,00
DRB3.2*36	2,91	1,82	2,91	0,00
DRB3.2*25	4,85	3,64	4,85	2,27
DRB3.2*21	0,97	0,00	0,97	0,00
DRB3.2*34	4,85	1,82	4,85	2,27
DRB3.2*28	4,85	5,45	4,85	0,00
DRB3.2*27	0,97	1,82	0,97	2,27

Referencia: AL: aleucósico; LP: leucosis persistente

La comparación de las frecuencias génicas no evidenció diferencias significativas entre el grupo caso y el grupo control. Sin embargo, dos alelos exhibieron distribuciones diferenciales. Por ejemplo, los alelos BoLA-DRB3.2\*37, BoLA-DRB3.2\*21, sólo se encontraron en el grupo caso. Los alelos BoLA-DRB3.2\*23 y BoLA-DRB3.2\*11 se encontraron con mayor frecuencia en el grupo control (25% y 20,45%, respectivamente). A su vez en el grupo caso los alelos BoLA-DRB3.2\*22, BoLA-DRB3.2\*24 fueron los más frecuentes (20,39% y 10,68% respectivamente).

### III.4 Resultados de los análisis de asociación:

El test exacto de Fisher y el Odds ratio (OR) de Woolf-Haldane se utilizaron para estudiar la asociación entre número de linfocitos - resultados del test DIDA y la frecuencia alélica de los alelos del BoLA-DRB3.2 definidos por PCR-RFLP. Estos tests solo se calcularon para aquellos alelos BoLA-DRB3.2\*23 y BoLA-DRB3.2\*11 DRB3.2\*22, BoLA-DRB3.2\*24 que se encontraron en mayor frecuencia en los dos grupos comparados, control y caso respectivamente.

Los resultados del estudio de asociación indicaron que los animales portadores del alelo DRB3.2\*11 tendrían bajo riesgo a padecer LP, con un  $p = 0,001$  (Tabla N° 2), por lo tanto indicaría resistencia a LP. El alelo DRB3.2\*22 evidenció un  $OR = 5,332$  con un valor de  $p = 0,0138$  evidenciando susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

Tabla N° 2: Alelos más frecuentes y los valores de Odd ratio y su significancia

Alelo	N° linf. / $\mu$ l		DIDA	
	Odd ratio	p-value	Odd ratio	p-value
DRB3.2*11	0,118	<b>0,001</b>	0,279	0,058
DRB3.2*22	5,332	<b>0,013</b>	1,277	0,808
DRB3.2*23	2,543	0,067	0,797	0,635
DRB3.2*24	2,497	0,345	1,43	0,766

## Discusión

### IV.1 Polimorfismos del gen BoLA-DRB3

Dentro del BoLA, el exón 2 del gen BoLA-DRB3 es altamente polimórfico y es reconocido por su rol en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas y autoinmunes (Yoshida *et al.*, 2008; Baltian *et al.*, 2012; 2014). Por este motivo han sido llevados a cabo numerosos estudios sobre el polimorfismo de esta región del gen BoLA-DRB3 en diferentes razas bovinas, tanto criollas como comerciales, utilizando diferentes metodologías (Behl *et al.*, 2007; Dietz *et al.*, 1997a, 1997b; Gilliespie *et al.*, 1999; Giovambattista *et al.*, 1996, 2001; Hernández-Herrera *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2012; Maillard *et al.*, 1999;

Miretti *et al.*, 2001; Miyasaka *et al.*, 2011, 2012; Mohammadi *et al.*, 2009; Nassiry *et al.*, 2005; Ripoli *et al.*, 2004; Rupp *et al.*, 2007; Ruzina *et al.*, 2010; Sharif *et al.*, 1998; Starkenburg *et al.*, 1997; Stear *et al.*, 1982; Takeshima *et al.*, 2003; Udina *et al.*, 1998).

En el presente estudio realizado en 82 animales de la raza Holstein de la provincia de La Pampa se identificaron 17 alelos: DRB3.2\*6; DRB3.2\*8, DRB3.2\*10, DRB3.2\*11, DRB3.2\*15, DRB3.2\*16, DRB3.2\*20, DRB3.2\*21, DRB3.2\*22, DRB3.2\*23, DRB3.2\*24, DRB3.2\*25, DRB3.2\*27, DRB3.2\*28, DRB3.2\*36, y DRB3.2\*37, cuyas frecuencias oscilaron entre 0,97% y 25%.

El alto nivel de polimorfismo presente en este gen ha sido reportado en diferentes poblaciones bovinas. Así por ejemplo, en el ganado criollo argentino Giovambattista *et al.* (1996) y Juliarena *et al.* 2008, encontraron 21 y 26 alelos respectivamente. Dietz *et al.* (1997) en bovinos Holstein, encontraron 26 alelos de los cuales los más frecuentes fueron el \*08 y el \*11. Sharif *et al.* (1998) en 60 animales, encontraron 14 alelos, en tanto Saama *et al.* (2004) en 835 animales encontraron 27 alelos. En el Holstein canadiense (Rupp *et al.*, 2007) reportan que los alelos más frecuentes son el \*8 y el \*11 que concuerda con lo reportado por Parnian *et al.* (2006) en ganado Holstein Iraní.

En el Holstein Colombiano y la crucea Blanco orejinegro x Holstein (hato Paysandú, Universidad Nacional de Colombia) con 66 y 25 animales respectivamente se encontraron 27 alelos del gen BoLA-DRB3. En el ganado Ayrshire (n = 129) se reportaron 18 alelos y comparte con el ganado criollo colombiano los alelos \*8, \*24 y \*28 entre los más frecuentes (Udina *et al.*, 1998).

En el ganado Black Pied, Udina *et al.* (1999) reportan 21 alelos y los alelos más frecuentes fueron el \*8, \*24 y \*27. Para Ripoli *et al.* (2004) en ganado Saavedreño (n = 125) los alelos más frecuentes fueron: \*16, \*36, \*8, \*11, \*27, \*37, \*7. Kulberg *et al.* (2007) en ganado de raza Norwegian Red (n = 523) reportaron 27 alelos siendo los más frecuentes el 8, \*24 y \*28.

En otro estudio realizado por nuestro equipo de trabajo en ganado Holstein de La Pampa (Baltian *et al.*, 2011), se analizaron 35 animales por Secuenciación directa (PCR-SBT) y los resultados obtenidos mostraron que en la muestra analizada se detectaron en total 21 alelos en el exón 2 del gen DRB3. La nomenclatura para estos es: DRB3\*0101 (\*24) (entre paréntesis se indica a que alelo corresponde de la técnica PCR-RFLP

usada en este trabajo). DRB3\*1701 (\*43); DRB3\*2006 (\*10); DRB3\*0901 y DRB3\*0902 (\*11); DRB3\*1101 (\*22); DRB3\*4501 (\*15); BRB3\* 0201 (\*7); DRB3\*1801 (\*18); DRB3\*2707 (\*23); DRB3\*1501 (\*16); DRB3\*1001 (\*3); DRB3\*20011(\*15); DRB3\*0701(\*28); DRB3\*0301 (\*9); DRB3\*0101 (\*24); DRB3\*1801 (\*18); DRB3\*14011 (\*27); DRB3\*2703 (\*23); DRB3\*1201 (\*8); DRB3\*0601(\*26) y DRB3\*021 (\*?). De estos alelos el más frecuente fué el alelo DRB3\*1101 (\*22), seguido por el DRB3\*1501(\*16); DRB3\*2006 (\*10) y el DRB3\*0101(\*24); cuyas frecuencias son 21,54; 12,31 10,77 y 10,77% respectivamente. Coincidiendo con nuestro estudio actual que el alelo DRB3\*22 es uno de los más frecuentes.

En el ganado Shorthorn Japonés Takeshima *et al.* (2002) identificaron 21 alelos siendo el más frecuente el \*8 y los menos frecuente los alelos\*16 y \*19, todos ellos en baja frecuencia en el GCC.

En el presente estudio el alelo \*24 es el tercer alelo más frecuente en los individuos del grupo caso con una frecuencia del 10,68% y el alelo \*15 se encuentra en una frecuencia semejante en los dos grupos es decir caso y control y baja del 5%, lo cual no coincide con Panei *et al.* (2009) y Giovambattista *et al.* (1996) quienes lo consideraron uno de los más frecuentes junto al alelo \*24 en la raza Holstein.

#### IV.2 Asociación entre los alelos del locus BoLA-DRB3 y VLB

Los genes del MHC son muy interesantes para los criadores de animales y genetistas, porque han sido asociados con resistencia o susceptibilidad a una amplia serie de enfermedades. Numerosos estudios han analizado la asociación entre los alelos del gen BoLA-DRB3 y la susceptibilidad/resistencia a varias enfermedades infecciosas, focalizándose principalmente en mastitis, leucosis bovina y dermatofilosis, entre otras (Baltian *et al.*, 2012; Baltian *et al.*, 2014; Dietz *et al.*, 1997a, 1997b; Maillard *et al.*, 2002; Sharif *et al.*, 1998; Starkenburg *et al.*, 1997; Sulimova *et al.*, 1995).

El alelo DRB3.2\*11 fue más frecuente en el grupo control, coincidiendo con lo reportado por Lewin *et al.* 1988, Xu *et al.* 1993; Martinez *et al.* 2005; Juliarena *et al.* 2008 y en oposición a lo informado Hernández Herrera (2010). Dicho alelo evidenció un valor de OR= 0,11 y un p=0,001 lo cual estaría indicando bajo riesgo a desarrollar la enfermedad coincidiendo con lo

reportado por Juliarena *et al.* (2008) quienes encontraron al alelo \*11 asociado a una baja carga proviral.

El alelo DRB3.2\*23 se lo encontró en mayor frecuencia en los animales con riesgo a padecer a leucosis con un valor de OR = 2,543 p=0,067. Hernández Herrera (2010) coincidió en que el alelo \*23 era más frecuente en la raza Holstein colombiana y con un valor de OR mucho mayor a 1 indicando susceptibilidad a padecer LP.

El alelo DRB3.2\*22 y el alelo DRB3.2\*24 fueron los alelos más frecuentes en el grupo caso con un 20,39% y un OR de 5,33 y 2,5 respectivamente. Esto indicaría que son posibles marcadores para susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. En oposición a lo encontrado por Panei *et al.* 2009. En tanto Sulimova *et al.* (1995) asociaron a los alelos \*22 y \*24 con susceptibilidad a LP.

En otros Estudios se confirmaron la asociación del alelo DRB3\*11 (Sulimova *et al.*, 1995; Zanotti *et al.*, 1996; Mirsky *et al.*, 1998), DRB3\*23 y DRB3\*28 (Sulimova *et al.*, 1995) con resistencia a LP, y de los alelos \*8 (Zanotti *et al.*, 1996; Sulimova *et al.*, 1995), \*16, con susceptibilidad a LP (Sulimova *et al.*, 1995). Estos reportes son diferentes con lo aquí mostrado, pues el alelo \*11 fue considerado como alelo protector para desarrollar la enfermedad. Kulberg *et al.*, (2007) concuerdan con nuestro estudio en que el alelo \*11 está asociado a resistencia a enfermedades infecciosas y con susceptibilidad el alelo \*22, más precisamente a la mastitis.

Herrera (2010), encontró al alelo \*24 en el ganado Colombiano Costeño con Cuernos y San Martinero además fue un alelo considerado como resistente, mientras que el alelo \*28 tuvo alta frecuencia en las razas Blanco orejinegro Costeño con Cuernos, Lucerna, San Martinero y es considerado como alelo “neutral”.

En el ganado Holstein canadiense se encontró que los alelos \*3 y \*11 se relacionaban con resistencia mastitis y que los alelos susceptibles eran el \*22 y \*23, este último asociado a susceptibilidad a la presencia del VLB. Además que la respuesta inmune mediada por anticuerpos fue mayor en el alelo \*24 y menor en el alelo \*22, (Rupp *et al.*, 2007).

Panei *et al.* (2009) en el ganado Holando Argentino encontraron que los alelos \*11, \*23 y \*28 se asociaban a una baja presencia de LP, de los cuales solo el alelo \*11 se encontró en

el ganado CQT, el alelo \*23 en todas las razas con alta frecuencia en el HV. Por otro lado ellos reportan que los alelos \*22 y \*24 se asociaban a un aumento de presencia de LP, lo cual concuerda con lo aquí reportado.

## ***Conclusiones***

Podemos concluir que los niveles de diversidad alélica reportada en la población estudiada concuerdan con los resultados reportados previamente, aunque la combinación y frecuencias génicas varían significativamente entre las diferentes poblaciones bovinas.

Por otro lado resaltamos que los programas de vigilancia para rodeos lecheros deberían incluir exámenes de diagnóstico para VLB. El diagnóstico precoz permite programas de control eficiente en el reemplazo de animales, además de prevenir la propagación del virus en los hatos lecheros.

El análisis de la relación entre alelos del gene BoLA-DRB3 y resistencia/susceptibilidad a leucosis podría mejorarse con investigaciones profundas en linajes familiares de vacas lecheras.

## ***Bibliografía***

- Aida, Y. 2001.** Influence of host genetic differences on leukemogenesis induced bovine leukemia virus. *AIDS. Research and Human Retroviruses*, 17: 812.
- Amorena, B.; Stone, W. 1978.** Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science*, 201: 159-160.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Takeshima, S.N.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2011.** Estimación de frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3 en una población de ganado Holstein de La Pampa mediante secuenciación directa. *Ciencia Veterinaria*, 13: 65-67.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Sanfilippo, S.; Takeshima, S.N.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2012.** Association between BoLA-DRB3 and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. *Molecular Biology Reproduction*, 39: 7215-7220.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Giovambattista, G. 2014.** Determinación de los motivos aminoacídicos presentes en los sitios de unión a los antígenos de los alelos del gen BoLA-DRB3 en una población Holstein de La Pampa y su asociación con mastitis. *Ciencia Veterinaria*, 16: 9-23.
- Behl, J.D.; Verma, N.K.; Behl, R.; Mukesh, M.; Ahlawat, S.P. 2007.** Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (*Bos indicus*). *Journal Dairy Science*, 90: 2997-3001.

- Brown, J.H.; Jardetzky, T.S.; Gorga, J.C.; Stern, L.J.; Urban, R.G.; Strominger, J.L.; Wiley, D.C. 1993.** Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DRI. *Nature*, 364: 33-39.
- Burny, A.; Cleuter, Y.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Marbaix, G.; Portelle, D.; Van den Broeke, A.; Willems, L.; Thomas, R. 1987.** Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Cancer Survey*, 6: 139-159.
- Castro, G.S.; Trujillo, E.B.; Duran, C.V. 2006.** Polimorfismos del gen BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 19 (3): 270-279.
- Chamizo, E.G. 1997.** Leucosis Bovina Enzootica. En *Patología Orgánica y Enfermedades de los Animales Domésticos*. Ed. Félix Varela. La Habana. Cuba. P. 209.
- Díaz, S.; Ripoli, M.V.; Peral García, P.; Giovambattista, G. 2010.** Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. En Giovambattista, G.; Peral García, P. *Genética de Animales Domésticos*. 1° Ed. Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter-Médica. Pp. 157-178.
- Dietz, A. B.; Cohen, N.D.; Timms, L.; Kehrli, M. E. Jr. 1997a.** Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*, 80(2): 406-412.
- Dietz, A.B.; Dettileux, J.C.; Freeman, A.E.; Kelley, D.H.; Stabel, J.R.; Kehrli, M.E. 1997b.** Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *Journal Dairy Science*, 80: 400-405.
- Do Nascimento, C.S.; Machado, M.A; Martinez, M.L.; Barbosa Da Silva, M.V.G, Martins Guimarães, M.F.; Campos, A.L.; Sousa Azevedo, A.L.; Teodoro, R.L.; Da Silva Verneque, R.; Fancioni Guimarães, S.E.; Andrade Oliveira, D.A. 2006.** Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). *Genetics Molecular Biology*, 29 (4):641-647.
- Emanuelsson, U.; Scherling, K.; Pettersson, H. 1992.** Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 12: 121-131.
- Ferrer, J.F.; Marshak, R.R.; Abt, D.A.; Kenyon, S.J. 1979.** Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review. *Journal American Veterinary Medical Association*, 175: 705-708.
- Fries, R.; Eggen, A.; Womack, J.E. 1993.** The bovine genome map. *Mammal Genome*, 4: 405-428.
- Gilliespie, B.E.; Jayarao, B.M.; Dowlen, H.H.; Oliver, S.P. 1999.** Analysis and frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *Journal Dairy Science*, 82: 2049-2053.
- Giovambattista, G.; Golijow, D.C.; Dulout, F.N.; Lojo, M.M. 1996.** Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics*, 27: 55-56.

- Giovambattista, G.; Ripoli, M.V.; Peral García, P.; Bouzat, J.L. 2001.** Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. *Animal Genetics*, 32:240-247.
- Hernández Herrera, D.Y.; Posso Terranova, A.M.; Benavides, J.A.; Muñoz-Flórez, J.E.; Giovambattista, G.; Álvarez-Franco, L.A. 2009.** Polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2 en razas criollas colombianas. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 22: 469.
- Hernández Herrera, D.J. 2010.** Asociación del Locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en razas criollas et Colombianas. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Pp. 1-102.
- Hernández Herrera, D.J.; Posso Terranova, A.M.; Muñoz Flórez, J.E.; Giovambattista, G.; Álvarez Franco, L.A. 2011.** Evaluación de la resistencia genética del ganado criollo Hartón del Valle al virus de la leucosis bovina. *AICA*, 1: 169-172.
- Juliarena, M.A.; Poli M.; Sala, L.; Ceriani, C.; Gutiérrez, S.M.; Dolcini, G.; Rodríguez, E.M.; Mariño, B.; Rodríguez Dubra, C.; Esteban, E.N. 2008.** Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Animal Genetics*, 39: 432-438.
- Kettman, J.; Wetzel, M. 1980.** Antibody synthesis in vitro, a marker of B cell differentiation. *Journal of Immunology Methods*, 39(3): 203-222.
- Kulberg, S.; Heringstad, B.; Guttersrud, O.A.; Olsaker, I. 2007.** Study on the association BoLA- DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red Cows. *Animal Breed Genetics*, 124: 201-207
- Lee, B.Y.; Hur, T.Y.; Jung, Y.H.; Kim, H. 2012.** Identification of BoLA-DRB3.2 alleles in Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein populations using a next generation sequencer. *Animal Genetics*, 43: 38-441.
- Lei, W.; Liang, Q.; Jing, L.; Wang, C.; Wu, X.; He, H. 2012.** BoLA-DRB3 gene polymorphism and FMD resistance or susceptibility in Wanbei cattle. *Molecular Biology Reproduction*, 39: 9203-9209.
- Lewin, H.A.; Wu, M.C.; Stewart, J.A.; Nolan, T.J. 1988.** Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetic*, 27: 338-344.
- Machado, M.A.; Nascimento, C.S.; Martínez, M.L.; Silva, M.V.G.B.; Campos, A.L.; Teodoro, R. L.; Verneque, R.S.; Guimarães, S.E.F. 2005.** Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 57: 380-389.
- Maillard, J.C.; Renard, C.; Chardon, P.; Chantal, I.; Bensaid, A. 1999.** Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Animal Genetics*, 30: 200-203.
- Martínez, R.; Toro, R.; Montoya, F.; Burbano, M.; Tobón, J.; Gallego, J.; Ariza, F. 2005.** Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Archivos de Zootecnia*, 54: 349-356.
- Miretti, M.M.; Ferro, J.A.; Lara, M.A.; Contel, E.P.B. 2001.** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA gene in South American Cattle. *Biochemical Genetics*, 39: 311-324.
- Miyasaka, T.; Takeshima, S.N.; Matsumoto, Y.; Kobayashi, N.; Matsuhashi, T.; Miyazaki, Y.; Tanabe, Y.; Ishibashi, K.; Sentsui, H.; Aida, Y. 2011.** The diversity of bovine MHC class II DRB3 and DQA1 alleles in different herds of Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *Genetics*, 472: 42-49.

- Miyasaka, T.; Takeshima, S.N.; Sentsui, H.; Aida, Y. 2012.** Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *Journal Dairy Science*, 95: 420-431.
- Ogawa, R.; Sugamura, K.; Watanabe, Y. 1987.** Tyrosine phosphorylation of an interleukin 2 receptor-like protein in cells transformed by human T cell leukemia virus type I. *Journal Experimental Medicine*, 165(4): 959-969.
- Mohammadi, A.; Nassiry, M.R.; Mosafer, J.; Mohammadabadi, M.R.; Sulimova, G.E. 2009.** Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed sistani (*Bos indicus*). *Genetika*, 45: 224-229.
- Nassiry, M.R.; Eftekhar Shahroodi, F.; Mosafer, J.; Mohammadi, A.; Manshad, E.; Ghazanfari, S.; Mohammad Abadi, M.R.; Sulimova, G.E. 2005.** Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Iranian Holstein cattle. *Genetika*, 41:817-822.
- Panei, C.J.; Suzuki, K.; Echeverria, M.G.; Serena, M.S.; Metz, G.E.; Gonzalez, E.T. 2009.** Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *International Dairy Journal*, 4: 123-128.
- Panei, C.J. 2011.** Estudios moleculares en segmentos provirales del virus de la leucosis bovina relacionados a procesos de tumorigénesis y en las regiones asociadas a resistencia/susceptibilidad en el MHC de clase II bovino. Tesis doctoral. UNLP.
- Parnian, M.; Ghoroshi S.A.; Salehi, A.; Pashmi, M.; Mollasalehi, M.R. 2006.** Polymorphism of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Holstein bulls of Iran using PCR-RFLP. *Iranian Journal Biotechnology*, 4: 197-200.
- Ripoli, M.V.; Lirón, J.P.; De Luca, J.C.; Rojas, F.; Dulout, F.N.; Giovambattista, G. 2004.** Gene Frequency Distribution of the BoLA-DRB3 Locus in Saavedreño Creole Dairy Cattle. *Biochemical Genetics*, 42: 231-240.
- Rupp, R.; Hernandez, A.; Mallard, B.A. 2007.** Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *Journal Dairy Science*, 90:1029-1038.
- Ruzina, M.N.; Shtyfurko, T.A.; Mohammadabadi, M.R.; Gendzhieva, O.V.; Tsedev, T.; Sulimova, G.E. 2010.** Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Mongolian, Kalmyk and Yakut cattle breeds. *Genetika*, 46:517-525.
- Saama, P.M.; Jacob, J.B.; Kehrli, M.E.; Freeman, A.E.; Kelm, S.C.; Kuck, A.L.; Tempelman, R.J.; Burton, J.L. 2004.** Genetic Variation in Bovine Mononuclear Leukocyte Responses to Dexamethasone. *Journal Dairy Science*, 87: 3928-3937.
- Sharif, S.; Mallard, B.A.; Wilkie, B.N.; Sargeant, J.M.; Scott, H.M.; Dekkers, J.C.; Leslie, K.E. 1998.** Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29: 185-193.
- Spooner, R.L.; Leveziel, H.; Grosclaude, F.; Oliver, R.A.; Vaiman, M. 1978.** Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *Journal Immunogenetics*, 5: 325-346.
- Starkenbourg, R.J.; Hansen, L.B.; Kehrli, J.R.; Chester-Jones. 1997.** Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte

- antigen for Holstein in milk selection and control lines. *Journal Dairy Science*, 80: 3411-3419.
- Stear, M.J.; Dimmock, C.K.; Newman, M.J.; Nicholas, F.W. 1988.** 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. *Animal Genetics*, 19: 151-158.
- Sulimova, G.E.; Udina, I.G.; Shaïkhaev, G.O.; Zakharov, I.A. 1995.** DNA polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in cattle in connection with resistance and susceptibility to leukemia. *Genetika*, 31: 1294-1299.
- Takeshima, S.; Nakai, Y.; Ohta, M.; Aida, Y. 2002.** Short Communication: Characterization of DRB3 Alleles in the MHC of Japanese Shorthorn Cattle by Polymerase Chain Reaction-Sequence-Based Typing. *Journal Dairy Science*, 85: 1630-1632.
- Takeshima, S.N.; Aida, Y. 2006.** Structure function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*, 77: 138-150.
- Udina, I.G.; Karamysheva, E.E.; Turkova, S.O.; Orlova, A.R.; Sulimova, G.E. 2003.** Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire and black pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene Bola-DRB3. *Russian Journal Genetics*, 39: 306-317.
- Van Eijk, M.J.; Stewart Haynes, J.A.; Lewin, H.A. 1992.** Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23(6):483-496.
- Yoshida, T.; Mukoyama, H.; Furuta, H.; Holmes, C.W.; Kosugiyama, M.; Tomagane, H. 2008.** Allelic frequency of PCR-RFLP type of the BoLA-DRB3 in Japanese Holstein herds and the relation to mastitis. *Animal Science Journal*, 79: 409-416.
- Xu, A.; van Eijk, M.J.; Park, C.; Lewin, H.A. 1993.** Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *Journal Immunology*, 151(12): 6977-6985.
- Zanotti, M.; Poli, G.; Ponti, W.; Poli, M.; Rocchi, M.; Bolzani, E.; Longeri, M.; Russo, S.; Lewin, H.A.; van Eijk, M.J. 1996.** Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genetics*, 27: 337-341. [http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view\\_nomenclature.cgi?bola.drb3](http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.drb3). <http://www.r-project.org/>.