

DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE 4 STRS EN LA REGIÓN BOLA Y ANÁLISIS DE SU EFECTO SOBRE MASTITIS CLÍNICA BOVINA EN LA RAZA HOLSTEIN

POLYMORPHISMS DETECTION OF FOUR STRS LOCATED IN BOLA REGION AND ANALYSIS OF THE EFFECT ON CLINIC MASTITIS BOVINE IN HOLSTEIN CATTLE

Paola A. Rodríguez-Y.¹, Esperanza Trujillo-Bravo¹, Luis A. Cartagena¹

Resumen

En este trabajo se determinó la existencia de asociaciones no espúreas entre los polimorfismos de cuatro STRs de la región BoLA (BM1818, CYP21, TALMS113.2 y UWCA1) y la susceptibilidad a mastitis clínica en una población Holstein del departamento de Antioquia, Colombia. La población no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg para los *locus* CYP21, TAMLS113.3 y UWCA1. El alelo más frecuente para BM1818 fue 262 (0,527), para TAMLS113.3 fue 162 (0,285), para CYP21 fue 194 (0,269) y para UWCA1 fue 110 (0,317), siendo éste último el más polimórfico de los 4 STRs analizados. Los alelos TAMLS113.3*170 y UWCA1*110, 112 y 116 mostraron efecto significativo ($p < 0,05$) con la susceptibilidad a mastitis clínica bovina en la población analizada.

Palabras clave: mastitis, BM1818, CYP21, TAMLS113.3, UWCA1.

Abstract

In this study, the existence of non spurious associations between polymorphism in four STRs (BM1818, CYP21, TAMLS113.3 and UWCA1) located in region BoLA, and the susceptibility to mastitis in Holstein population in Antioquia, Colombia was determined. Statistically significant deviation from Hardy-Weinberg expectations was found at the 3 locus in the population (CYP21, TALMS113.2, and UWCA1). The most common alleles were BM1818*262 (0.527), TAMLS113.3*162 (0.2851), CYP21*194 (0.269), and UWCA1*110 (0.3173), being the last one the most polymorphic of the STRs analyzed. TAMLS113.3*170 and UWCA1*110, 112, and 116 alleles, showed a significant effect ($p < 0.05$) on the susceptibility to bovine mastitis in the population analyzed.

Key words: mastitis, BM1818, CYP21, TAMLS113.3, UWCA1.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria en la hembra, ocasionada usualmente por la presencia de microorganismos. Se considera como una enfermedad multifactorial, resultado de las condiciones ambientales, el grado de exposición al patógeno y la susceptibilidad individual (Barajas et al., 1999). Epidemiológicamente es considerada la enfermedad más común y costosa del ganado le-

chero en la mayor parte del mundo (Dohoo y Meek, 1982; Eberhart et al., 1987).

La infección penetra a través del *ductus papilaris* del pezón por la presencia de lesiones o simplemente por la pérdida de resistencia de la barrera epitelial. En consecuencia, los microorganismos pueden alcanzar el parénquima mamario debido a los movimientos del ordeño, impulsándose dentro del canal del pezón y la cisterna mamaria. La enfer-

¹ Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <etbravo@epm.net.co>.

medad tiene efectos colaterales como cambios físico-químicos y biológicos de las secreciones, debido al aumento en el contenido leucocitario producto de la respuesta inmune o por efecto de la secreción de productos bacterianos (Eberhart et al., 1987; Schalm et al., 1971). Se desarrolla en dos etapas: la primera o subclínica, se presenta asintomática, sutil y difícil de corregir; la ubre no muestra ningún signo de inflamación y el aspecto de la leche es normal. Sin embargo, los microorganismos y las células somáticas leucocitarias que combaten las infecciones se encuentran elevados en la leche. En la segunda etapa o clínica, se presentan signos evidentes de infección, el cuarto infectado se inflama, es sensible al tacto y la leche se altera por la presencia de coágulos, descamaciones y anormalidad en las secreciones (Crist et al., 1997).

Los agentes infecciosos más frecuentemente aislados en los casos de mastitis bovina son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Hay patógenos ambientales menores que causan del 5 al 10% de las infecciones tales como: *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, todos estos provenientes del microambiente de los bovinos que colonizan de manera oportunista los tejidos lesionados. Se han reportado un total de 137 microorganismos aislados en las ubres, la mayoría de ellos inocua en animales con sistemas inmunes eficientes (Brand et al., 1996; DeRosa et al., 1997; Watts y Owens, 1988).

Los signos y efectos de la mastitis varían de acuerdo con factores propios del hospedero y el patógeno invasor, esto evidencia una susceptibilidad individual a la proliferación y avidez de la infección, que combina los efectos de la manipulación con las expresiones individuales de la respuesta inmune (Leigh, 1999).

La respuesta inmune asociada con los tejidos y secreciones de la glándula mamaria, es vital en contra de las enfermedades infecciosas y en la transmisión de la inmunidad pasiva a los neonatos (Opdebeeck, 1982). Actualmente, la investigación se ha enfocado hacia el análisis de los mecanismos de defensa naturales durante los periodos de susceptibilidad a la enfermedad, tal es el caso de genes que gobier-

nan la respuesta inmune a un antígeno y controlan la calidad y cantidad de la respuesta innata, o genes que codifican opsoninas no específicas, receptores y enzimas involucrados en la fagocitosis y otros que controlan la especificidad de la respuesta inmune adaptativa como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), receptores de células T y genes de Inmunoglobulinas (Kelm et al., 1997).

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad es conocido en los bovinos como BoLA y está ubicado en la región 23q (Andersson y Davies, 1994). Codifica dos tipos de glicoproteínas de membrana, molecular y funcionalmente diferentes (BoLA clase I y BoLA clase II) cuyas funciones primarias son la presentación de antígenos procesados a las células efectoras del sistema inmune (Andersson y Davies, 1994).

La región clase I designada como BoLA A, ha sido definida serológicamente por Amorena y Stone (1978) y comprende 50 aloantígenos reconocidos internacionalmente (Bernoco et al., 1991). Los genes BoLA clase II están distribuidos en dos regiones diferentes IIA y IIB (Davies et al., 1994). La región IIA involucra los genes DRA, DRB, DQA y DQB y la región IIB involucra a DOB, DYA, DYB, y DIB (Davies et al., 1994).

Algunos de los alelos de varios *loci* de regiones BoLA A y BoLA DQ han sido asociados con la susceptibilidad o resistencia a mastitis (Lie et al., 1994; Lunden et al., 1990), con variaciones en la ocurrencia de la enfermedad (Kelm et al., 1997; Sharif et al., 1998) y podrían tener una potencial utilidad como marcadores genéticos de alto y bajo riesgo de infección en bovinos. (Aarestrup et al., 1995; Sharif et al., 1998).

En la raza Holstein, grupo seleccionado para éste estudio, los cruces y la presión selectiva sobre las características fisiológicas, anatómicas y de calidad de la ubre, han permitido elevar su productividad, pero la selección dirigida a estas características también se sugiere como posible factor para la susceptibilidad a las infecciones (Hoeschele y Meinert, 1990; Powell et al., 1997). Teniendo en cuenta lo anterior, la presente investigación estuvo dirigida a

buscar una asociación entre algunos *loci* de la región BoLA y la susceptibilidad a mastitis clínica en la raza Holstein de la región de Antioquia, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Fueron evaluadas 258 hembras Holstein y muestreados en 5 diferentes hatos de la zona norte del departamento de Antioquia, Colombia. Los hatos presentaron características comunes tales como: temperatura promedio 14 °C, topografía praderas, pasto estrella y ordeño mecánico. Del grupo seleccionado, 112 hembras presentaron diagnóstico previo y recurrente de mastitis clínica (**A** = Afectadas) y 104 diagnóstico negativo de mastitis clínica (**NA** = No afectadas). Para ésta clasificación se consideraron los registros históricos de casos de mastitis clínica (Sharif et al., 1998), en los cuales los animales que habían presentado cuadros de leche anormal, fiebre y anorexia, evaluados por un médico veterinario durante cada lactancia, conformaron la subpoblación A y los que no los habían presentado la subpoblación NA. No se consideró el recuento de células somáticas como indicador de la enfermedad. Cada uno de los hatos evaluados presentaron hembras NA y A según la tabla 1. Para la extracción de ADN se utilizaron 7 ml de sangre de cada animal, en tubos vacutainer con EDTA, por el método de *Salting out* y precipitación con isopropanol (Miller et al., 1988).

Genotipificación. Se genotipificaron cuatro STRs (sequence tandem repeat), ubicados en la región BoLA (*Bovine Leucocyte antigen*), entre 23q14-15 a 23q21 y q1.5 a q2.2. Se utilizaron los cebadores específicos para cada STR (TAMLS 113.3, acceso BTA000982; BM1818, acceso BTA000976; UWCA1, acceso BTA000989; CYP21, acceso BTA000094) (*IDT*, Coraville (Iowa), E. U. A.) (tabla 2). Cada uno de los STRs fue evaluado en un número de animales así: BM1818 en 258, TAMLS113.3 en 254, UWCA1 en 115 y CYP21 en 152. La variación en el número de animales genotipificados para cada STR, se debió a dificultades técnicas generadas en la amplificación, que no permitieron obtener resultados en la totalidad de las muestras colectadas.

Tabla 1. Registros históricos de los casos de mastitis clínica en cada uno de los hatos evaluados (**afectadas** = Animales que presentaron mastitis clínica; **no afectadas** = Animales que no presentaron mastitis clínica)

Sitios de muestreo	Afectadas	No Afectadas
Hato 1	66	11
Hato 2	22	8
Hato 3	1	32
Hato 4	6	31
Hato 5	17	22
Total	112	104

Tabla 2. Cebadores utilizados en las reacciones de amplificación para cada STR de la región BoLA (**F** = oligo directo; **R** = oligo reverso; **Locus** = STRs analizados)

<i>Locus</i>		Cebadores	Variación en tamaño	Referencia
BM1818	F R	5'-AGCTGGGAATATAACCAAAGG-3' 3'-AGTACTTTCAAGGGTCCATGC-5'	258 a 272 pb	Kappes et al. (1997)
CYP21	F R	5'-GGAGGGTTACAGTCCATGAGTTTG-3' 5'-TCGCGATCCAACCTCCTCTGAAG-3'	186 a 224 pb	Creighton et al. (1992)
TAMLS 113.2	F R	5'-TTACTGCTGAGCCACCGG-3' 5'-GATGGGGGTCACAACTGAC-3'	148 a 170 pb	Kappes et al. (1997)
UWCA1	F R	5'-AGAGTGTCTTATAATTAGCCAGGAA-3' 5'-AACTCTTTCAGTTGGTTCCTGT-3'	100 a 128 pb	Sun et al. (1993)

Para cada par de iniciadores se estandarizaron las condiciones de PCR en un termociclador MJ Research (PTC 150), usando 20 µl de reacción que contenía: 50 ng de DNA, 1 µl de tampón 10 x (750 mM Tris-HCl, pH: 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, y 0,1% Tween 20); 1,25 mM de MgCl₂, 0,15 U de Taq DNA polimerasa (recombinante) *AMRESCO*, 2 mM de dNTPs y 0,25 pM de cada cebador.

La amplificación para los 4 STRs consistió en un ciclo a 95 °C por 150 s, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 60 s, hibridación a 63 °C para CYP21, 59 °C para TAMLS113.3 y 60 °C para UWCA1 y BM1818 por 60 s. Extensión 72 °C por 60 s y una extensión final a 72 °C por 10 min. Todos los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa al 2%, corridos a 60 voltios durante 20 min.

Los controles negativos fueron realizados utilizando la mezcla de reacción adicionando agua desionizada en reemplazo de ADN bovino. Los controles positivos se basaron en los tamaños reportados en publicaciones previas para cada STR (Creighton et al., 1992; Kappes et al., 1997; Sun et al., 1993) y en la utilización de marcadores de peso molecular que indicaron el rango de ubicación y cada uno de los tamaños encontrados.

Identificación de los genotipos de los STRS.

Los productos de amplificación para cada STR y para cada muestra se mezclaron con 2 µl de tampón de carga *AMRESCO*. Se desnaturalizaron a 95 °C por 210 s y se corrieron en geles de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 19:1) al 6% con marcadores de peso molecular, durante 90 min a 1,900 voltios. Finalmente, los geles fueron teñidos con plata (protocolo de *PROMEGA Silver sequence DNA staining reagents*).

Análisis estadístico. La determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas se llevó a cabo con los programas *GDA* y *GENEPOP* versión 3.3 (Statkin y Excoffier, 1996; Weir y Cockerham, 1984).

En la detección de las desviaciones significativas de las proporciones genotípicas observadas frente a

las esperadas, se utilizó la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, siguiendo el proceso descrito por Guo y Thomson (1992), usando una prueba análoga de Fisher y una tabla de contingencia de dos por dos. El desequilibrio de ligamiento fue analizado con la prueba de máxima verosimilitud. Las diferencias entre las frecuencias alélicas para cada uno de los STRs encontrados en las subpoblaciones afectadas y no afectadas, fue determinada con la prueba de proporciones Z (Weir y Cockerham, 1984).

La evaluación de la asociación entre cada uno de los alelos y para cada uno de los STRs, con susceptibilidad o resistencia a mastitis clínica, se realizó con el procedimiento CATMOD de SAS (SAS Institute, 1989), basado en regresión logística y modelo de sustitución génica (Batra et al., 1989), con el modelo: $Y_{ijk} = \mu + \text{hato}_i + \text{partos}_j + \sum b_l \text{BoLA}_{ijk} + e_{ijkl}$; donde Y_{ijk} = es la variable dependiente (mastitis clínica), medida teniendo en cuenta los registros en los hatos, para la presencia o no histórica de mastitis clínica en cada animal muestreado; μ = la media de la población; hato_i = sitios del muestreo, $i = 1, 2, 3, 4$ y 5 ; partos_j = número de partos en los animales, $j = 1-4$; b_l = coeficiente de regresión en el número de alelos; BoLA_{ijk} = efecto fijo del número de copias del los alelos BoLA l ($l = 1-9$) presentes en los animales; e_{ijkl} = error residual.

Los alelos más frecuentes para cada uno de los microsatélites (tablas 3-6), fueron incluidos en el modelo de sustitución génica de CATMOD (SAS Institute, 1989), y el resto de los alelos cuyas frecuencias fueron inferiores a 0,02 fueron reunidos en la categoría de menores (Sharif et al., 1998).

RESULTADOS

La genotipificación de los 4 STRs escogidos (Región BoLA) permitió identificar seis alelos diferentes para BM1818, catorce para CYP21, once para TAMLS113.3 y quince para UWCA1. Las frecuencias alélicas se muestran en las tablas 3-6.

Tabla 3. Frecuencias alélicas en la población total y en las subpoblaciones afectadas y no afectadas para el microsatélite BM1818 (**n** = número de alelos; **A.** y **No A.** = frecuencias alélicas en la subpoblación afectada y no afectada; **Pb. total** = frecuencias alélicas en la población total; **Ta. pb.** = tamaño en pares de bases)

STR	n	Alelo	Frecuencias			n	Alelo	Frecuencias		
		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.
BM1818	17	256	0,032	0,050	0,017	272	262	0,527	0,512	0,539
	194	258	0,375	0,351	0,396	3	264	0,005	0,012	0,000
	29	260	0,056	0,067	0,046	1	266	0,001	0,004	0,000

Tabla 4. Frecuencias alélicas en la población total y en las subpoblaciones afectadas y no afectadas para el microsatélite CYP21 (**n** = número de alelos; **A.** y **No A.** = frecuencias alélicas en la subpoblación afectada y no afectada; **Pb. total** = frecuencias alélicas en la población total; **Ta. pb.** = tamaño en pares de bases)

STR	n	Alelo	Frecuencias			n	Alelo	Frecuencias		
		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.
CYP21	7	186	0,023	0,031	0,013	2	200	0,006	0,012	0,000
	43	188	0,141	0,126	0,157	4	202	0,013	0,018	0,006
	56	190	0,184	0,158	0,212	7	204	0,023	0,031	0,013
	37	192	0,121	0,139	0,102	4	206	0,013	0,25	0,000
	82	194	0,269	0,246	0,294	4	208	0,013	0,018	0,006
	19	196	0,062	0,044	0,082	3	210	0,009	0,001	0,000
	35	198	0,115	0,120	0,109	1	212	0,003	0,006	0,000

Tabla 5. Frecuencias alélicas en la población total y en las subpoblaciones afectadas y no afectadas para el microsatélite TAMLS113.3 (**n** = número de alelos; **A.** y **No A.** = frecuencias alélicas en la subpoblación afectada y no afectada; **Pb. total** = frecuencias alélicas en la población total; **Ta. pb.** = tamaño en pares de bases)

STR	n	Alelo	Frecuencias			n	Alelo	Frecuencias		
		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.
TAMLS 113.3	10	152	0,019	0,025	0,014	44	164	0,085	0,084	0,086
	29	154	0,056	0,038	0,072	29	166	0,056	0,059	0,054
	132	156	0,257	0,233	0,278	39	168	0,076	0,114	0,043
	48	158	0,093	0,110	0,079	18	170	0,035	0,029	0,039
	16	160	0,031	0,029	0,032	1	172	0,001	0,000	0,003
	146	162	0,285	0,275	0,293					

Tabla 6. Frecuencias alelicas en la población total y las subpoblaciones afectadas y no afectadas para el microsatélite UWCA1 (**n** = número de alelos; **A.** y **No A.** = frecuencias alelicas en la subpoblación afectada y no afectada; **Pb. total** = frecuencias alelicas en la población total; **Ta. pb.** = tamaño en pares de bases)

STR	n	Alelo	Frecuencias			n	Alelo	Frecuencias		
		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.		Ta. pb.	Pb. total	A.	No A.
UWCA1	6	100	0,026	0,020	0,034	5	118	0,021	0,013	0,034
	5	102	0,021	0,000	0,058	6	120	0,026	0,027	0,023
	4	106	0,017	0,020	0,011	10	122	0,043	0,048	0,034
	7	108	0,030	0,013	0,058	1	124	0,004	0,000	0,011
	73	110	0,317	0,333	0,290	6	126	0,026	0,041	0,000
	21	112	0,091	0,090	0,093	6	128	0,026	0,041	0,000
	64	114	0,278	0,284	0,267	2	130	0,008	0,013	0,000
	14	116	0,060	0,048	0,081					

La población no presentó equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para CYP21, TAMLS113.3 y UWCA1 (tablas 4-6), pero si mostró equilibrio de H-W para BM1818, éste último resultado esperado en el análisis, teniendo en cuenta el número de alelos encontrados para el marcador BM1818 (tabla 3).

En cada uno de los diferentes STRs analizados, se detectaron alelos más y menos frecuentes para el total de la población Holstein. El alelo más frecuente para CYP21 fue 194 (0,269) y el menos frecuente 212 (0,003); para TAMLS113.2 el alelo más frecuente fue 162 (0,2851) y el menos frecuente 172 (0,002); para UWCA1 el más frecuente fue 110 (0,3174) y el menos frecuente 124 (0,004) (tablas 3-6). Considerando las poblaciones afectadas y no afectadas separadamente, los alelos 194 y 110 de CYP21 y UWCA1 respectivamente, fueron los más frecuentes tanto en la población con mastitis clínica, como en la población que no presenta la enfermedad. El alelo 162 de TAMLS113.3, fue el más frecuente en ambos grupos (A y NA) y el alelo 172 del mismo marcador, solamente se encontró en el grupo de no afectadas (tabla 5). La estimación de los valores de FIS para cada uno de los microsatélites en la población total, muestra un exceso de heterocigóticos

significativo para TAMLS113.3 y UWCA1, un déficit para CYP21 y BM1818 se encuentra en equilibrio (tabla 7).

Tabla 7. Estimación de los valores de FIS para la población total y para cada uno de los microsatélites de la región BoLA analizados (**Ns** = no significativa; * = significativa; **Prob** = probabilidad para los valores de FIS; **N** = número de animales genotipificados)

Locus	Población Holstein		
	FIS	Prob	N
BM1818	-0,027	0,1200 ^{ns}	217
TAMLS113.3	-0,163	0,0231 *	214
UWCA1	-0,079	0,000 *	193
CYP21	+0,227	0,000 *	191

Los resultados del análisis de desequilibrio de ligamiento entre los diferentes STRs, mostraron segregación independiente entre los diferentes *loci*, con un valor p significativo ($p < 0,5$) (tabla 8).

En éste estudio, el análisis de asociación de la mastitis clínica reconocida por registros históricos, con cada uno de los alelos de cada STR analizado, en la población Holstein, utilizando el procedimien-

to CATMOD de SAS (SAS Institute, 1989), no se encontró un efecto significativo ($p > 0,05$), de ninguno de los alelos de BM1818 y CYP21 con la presencia de mastitis clínica en el grupo de animales analizado. El alelo 170 de TAMLS113.3, tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$), sobre la presencia de la enfermedad, reconocida en los registros históricos (tabla 9). Este mismo resultado se encontró para los alelos 110, 112 y 116 de UWCA1 (tabla 10).

Tabla 8. Valores de desequilibrio de ligamiento de los genotipos evaluados (UWCA1, CYP21, TAMLS113.3, BM1818 = microsátelites de la región BoLA; valor P > 0,005; EE = Error estandar)

Población Holstein		
Locus	valor P	EE
UWCA1-CYP21	0,870	0,013
BM1818-TAMLS113.3	0,533	0,060

Tabla 9. Estimación del efecto del alelo 170 de TAMLS113.3 sobre la presencia de mastitis clínica (TAMLS113.3 = microsátelite de la región BoLA; P > Chi² = Probabilidad mayor que chi cuadrado; P < 0.05 = efecto significativo)

Locus	valor Chi ²	P > Chi ² (probabilidad)
TAMLS113.3		
170	3,72	0,051

Tabla 10. Resultados de la estimación del efecto de los alelos 110, 112 y 116 sobre la presencia de mastitis clínica en la población Holstein (UWCA1 = microsátelite de la región BoLA; Chi² = chi cuadrado; P > Chi² = Probabilidad mayor que Chi cuadrado)

Locus	Chi ² valor	P > Chi ² (probabilidad)
UWCA1		
110	14,86	0,001
112	7,32	0,008
116	6,47	0,0109

DISCUSIÓN

Los análisis de la composición, variabilidad y recursos genéticos, son el primer paso en el proceso del mejoramiento genético animal (Spooner et al., 1988). El conocimiento de las poblaciones deriva a largo plazo en programas de selección específicos para cada región y ambiente de producción, con el propósito de obtener y mantener poblaciones saludables. La región BoLA es de particular interés debido al papel que tienen los genes clase I y II en la inmunidad natural (Andersson y Davies, 1994). Previas investigaciones han demostrado fuertes asociaciones entre alelos de la región BoLA y mastitis (Aarestrup et al., 1995; Berryere et al., 1994; Kelm et al., 1997; Lunden et al., 1990; Oddgeirsson et al., 1988), y se ha reportado también que puede haber una variación genética con respecto a la susceptibilidad o resistencia en bovinos a enfermedades como ovario quístico, retención de placenta, susceptibilidad a mastitis y linfocitosis persistente, que pueden ser explicadas por polimorfismos en varios locus de la región BoLA (Lewin, 1989; Oddgeirsson et al., 1988; Uribe et al., 1995).

Con la genotipificación, determinación de los polimorfismos y posterior estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas se encontró que los marcadores UWCA1 y TAMLS113.3 presentaron un exceso de heterocigóticos (tabla 5) y CYP21 mostró déficit de heterocigóticos, este último resultado diferente a los demás microsátelites analizados, se debe quizás a que CYP21 forma parte del gen que codifica un miembro de la superfamilia de las enzimas P450, involucradas en el metabolismo de las drogas, síntesis de colesterol y otros lípidos (Chang y Kam, 1999; Lytton et al., 2002), y posiblemente ha sufrido el efecto de selección artificial constante que se ejerce actualmente sobre este grupo bovino con respecto a las características de producción.

No se presentaron diferencias entre las frecuencias de heterocigóticos observadas y esperadas para BM1818 en la población total (tabla 11), probablemente debido a que éste STR está ubicado en

una secuencia no codificante, alejada de genes involucrados con funciones específicas, libre de la acción de fuerzas evolutivas (Kappes et al., 1997), lo que podría significar ausencia de presión de selección, permitiendo conservar las frecuencias genotípicas propias de una población natural.

Tabla 11. Estimación de los valores de heterocigocidad de los genotipos encontrados para cada STR en la población Holstein (**H_o** = heterocigocidad observada; **H_e** = heterocigocidad esperada; * = déficit de heterocigóticos significativo; ** = exceso de heterocigóticos significativo; **n s** = no significativa)

Holstein	Ho He	
CYP21	0,650 *	0,840
UWCA1	0,869 **	0,806
BM1818	0,583 n s	0,577
TAMLS113.3	0,820 **	0,957

El microsatélite más polimórfico en esta evaluación fue UWCA1 (tabla 6), quizás debido a su ubicación en una región de mucha variabilidad (23q15) (Kappes et al., 1997; Sun et al., 1993). El microsatélite de menor polimorfismo fue BM1818, los 6 alelos detectados para BM1818 se presentaron con frecuencias muy bajas en la población total analizada, excepto para 262, el cual además, se encontró con una frecuencia superior a 0,5 tanto en la población afectada como en la no afectada (tabla 3). Adicionalmente, se encontró el alelo BM1818*256 cuyo tamaño está fuera del rango de reportes previos (Kappes et al., 1997). Cuando se analizaron las dos subpoblaciones A y NA, los valores correspondientes a las frecuencias alélicas para cada STR, muestran diferencias significativas entre las dos subpoblaciones, excepto para BM1818, éste último resultado, como consecuencia de su tendencia al bajo número de alelos (tabla 3).

BM1818 y TAMLS113.3, se encuentran en la región clase I (23q24dist), han sido utilizados en mapeo de ligamiento en bovinos y ubicados a 14 y

1 cM respectivamente de DRB3 (Ihara et al., 2004; Skow et al., 1994; Weimann et al., 2003), éste último marcador, asociado con resistencia o susceptibilidad a mastitis (Aarestrup et al., 1995; Lunden et al., 1990; Sharif et al., 1998). También están a 37 y 24,1 cM respectivamente de PSMB9 que codifica para la subunidad proteosomal de la proteasa multifuncional (Goy y Honeycutt, 1994). Esta región genómica además, presenta polimorfismos que han sido relacionados con variaciones en el sistema inmune (Glass et al., 1990; Lie et al., 1994; Lunden et al., 1990). Considerando la ubicación genómica de BM1818 y TAMLS113.3, potencialmente podrían ofrecer información acerca de genes asociados con resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Bishop et al., 1994). En éste sentido, se encontró un efecto significativo ($p < 0,05$) con la presencia de mastitis clínica, para el alelo TAMLS113.3*170, en resultados obtenidos con el procedimiento CATMOD de SAS (tabla 9). Podría considerarse entonces, que la cercanía de TAMLS113.3 a DRB3 sería, una de las razones del resultado de asociación obtenido (Beever et al., 1996; Gallagher et al., 2001).

UWCA1 es un microsatélite de la región clase II (23q14-q15), ubicado en una secuencia no codificante, aproximadamente a 9,5 cM de BoLA DRB3 y a 15,1 cM de PSMB9 (Ihara et al., 2004; Sun et al., 1993). Aunque hasta el momento su utilidad ha sido dirigida a mapeo genético (Barendse et al., 1994; Kappes et al., 1997; Slate et al., 1998; Sun et al., 1993), el efecto significativo ($p < 0,001$) de los alelos UWCA1*110, 112 y 116, sobre la presencia de mastitis clínica (tabla 10), en esta población Holstein, parece indicar que posiblemente UWCA1 se encuentre cercano o ligado a secuencias codificantes que tienen influencia sobre la susceptibilidad a la enfermedad (Sharif et al., 1998). Curiosamente el alelo UWCA1*110 fue uno de los más frecuentes en la población con mastitis clínica (tabla 6).

CYP21, se encuentra ubicado en la región I de BoLA, BTA 23q12q13 (Mcshane et al., 2001), su

producto es una enzima llamada esteroide 21 β -hidroxilasa (Andersson y Davies, 1994). El microsatélite CYP21 ubicado en uno de los intrones de este gen, fue analizado en ésta investigación y actualmente se han descrito 19 alelos en diferentes razas bovinas (Usha et al., 1995) y ha sido estudiado en mapeo genético, y estructuración poblacional (Weiman et al., 2003). Ninguno de los alelos de este microsatélite mostró efecto significativo sobre la incidencia de mastitis clínica en esta población Holstein.

La influencia de los sitios de muestreo, sobre la presencia de la mastitis clínica fue evaluada con el procedimiento CATMOD de SAS (SAS Institute, 1989). El modelo utilizado incluye el efecto de cada una de las zonas de muestreo sobre la incidencia de mastitis clínica; en los resultados se encontró que los hatos donde fueron colectadas las muestras, presentan una gran influencia sobre la presencia de la enfermedad, efecto éste debido posiblemente al manejo inadecuado de los factores ambientales que predisponen a la misma, tales como, la clase de ordeño (mecánico) (tabla 12).

REFERENCIAS

- Aarestrup F, Jensen N, Ostergard H.** 1995. Analysis of associations between major histocompatibility complex (BoLA) class I haplotypes and subclinical mastitis of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78:1684-1692.
- Amorena B, Stone WH.** 1978. Serologically defined SD locus in cattle. *Science*, 201:159-160.
- Andersson L, Davies CJ.** 1994. The major histocompatibility complex. Pp. 37-57. En: Goddeeris BML, Morrison WI (eds.). *Cell-mediated Immunity in ruminants*. CRC Press Boca Raton, Florida, E. U. A.
- Barajas R, Jaramillo A, Velásquez O.** 1999. Factores de riesgo asociados a infecciones subclínicas producidas por biotopos humano y bovino de *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria de vacas en lactancia. *Revista de Veterinaria y Zootecnia de Caldas*, 11:30-33.

Tabla 12. Análisis de máxima verosimilitud entre los sitios de muestreo y la presencia de mastitis (los hatos 3 y 4 no muestran influencia sobre la presencia de la mastitis clínica; Chi = Chi cuadrado; EE = error estandar; P = probabilidad)

Sitios de muestreo	Chi ²	P > Chi ²	EE
Hato 1	9,51	0,002	0,48
Hato 2	27,89	0,001	0,43
Hato 3	0,2	0,65	2,66
Hato 4	0,54	0,46	0,55
Hato 5	8,24	0,004	0,88

Los resultados del presente estudio, indican las diferencias entre 4 STRs de la región BoLA, analizados en la población Holstein de Antioquia (Colombia), con respecto a sus frecuencias alélicas, genotípicas y de asociación con enfermedades como mastitis clínica bovina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Comité del Desarrollo de la Investigación (CODI, Universidad de Antioquia), a la cooperativa lechera COLANTA y a Juan Carlos Cartagena por su apoyo técnico.

- Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayto D, Li L, Neibergs HL, Zhang N, Grosse WM, Weiss J, Creighton P, McCarthy F, Ron M, Teale A, Fries R, McGraw RA, Moore SS, Georges M, Soller M, Womack JE.** 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6:227-235.
- Batra TR, Lee AJ, Gavora JS, Stear MJ.** 1989. Class I alleles of the bovine major histocompatibility system and their association with economic traits. *Journal of Dairy Science*, 72:2115-2124.
- Beever Je, Da Y, Green CA, Russ I, Park C, Heyen DW, Everst RE, Fisher SR, Overton KM, Teale AJ, Kempes SJ, Hines HG, Guerin G, Lewin HA.** 1996. A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *Journal Heredity*, 87: 261-271.
- Bernoco D, Lewin HA, Andersson L.** 1991. Joint report of the fourth international bovine lymphocyte antigen (BoLA). *Genetics*, 22:477-496.

- Berryere TG, Muggli-Cockett N, Robins JW, Schmutz SM.** 1994. Molecular studies of DRB relative to *Staphylococcus aureus* mastitis. *Proceedings of the 5th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production of Guelph Canada*, 21:187-190.
- Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SLF, Hawkins GA, Solinas-Toldo S, Fries R, Grosz MD, Yoo J, Beattie CW.** 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136:619-639.
- Brand A, Gaastra W, Lam JGM, Lipman LJ, Schukken YW.** 1996. Epidemiological characteristic of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* on *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinter. *American Journal of Veterinarian Research*, 57:38-42.
- Chang GWM, Kam PCA.** 1999. The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia*, 54:42-50.
- Creighton PA, Eggen A, Fries R, Jordan SA, Hetzel J, Cunningham EP, Humphries P.** 1992. Mapping of bovine markers CYP21, PRL, and BoLA DRBP1 by genetic linkage analysis in reference pedigrees. *Genomics*, 14:526-529.
- Crist W, Harmon R, O'leary J, McAllister J.** 1997. *Mastitis and its control*. CES University of Kentucky Homepage. <<http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/asc/asc140/asc140.pdf>>. Fecha de consulta: 25 noviembre de 2005.
- Davies CJ, Joosten I, Berneco D, Arriens J, Ceriotti G, Ellis S, Hensen EJ, Hines HC, Horin P.** 1994. Polymorphism of bovine MHC class II genes. Joint report of the fifth international bovine lymphocyte antigen (BoLA) Workshop. Interlaken, Switzerland. 1 August 1992. *European Journal of Immunogenetics*, 21(4):259-289.
- DeRosa D, Shafer WK, Sordillo L.** 1997. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80:1851-1865.
- Dohoo IR, Meek AH.** 1982. Somatic cell counts in bovine milk. *Canadian Veterinary Journal*, 23:119-125.
- Eberhart RJ, Harmon RJ, Jasper DE, Natzke RP, Nickerson SC, Reneau JK, Row EH, Smith KL, Spencer SB.** 1987. *Current concepts of bovine mastitis*. 3rd Ed. National Mastitis Council. Arlington (VA), E. U. A.
- Gallagher DS, Newkirk H, Taylor JF, Burzlaff JD, Davies SK, Skow LC.** 2001. Physical localization and order of genes in the class I region of the bovine MHC. *Animal Genetics*, 32:235-239.
- Glass EJ, Oliver RA, Spooner RL.** 1990. Variation in T-Cell responses to ovalbumin in cattle: evidence for gene control. *Animal Genetics*, 21:15-28.
- Goy J, Honeycutt D.** 1994. Dinucleotide repeat polymorphism near a bovine MHC class I sequence. *Animal Genetics*, 25:290.
- Guo SW, Thompson EA.** 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion of multiple alleles. *Biometrics*, 48:361-372.
- Hoeschele I, Meinert TR.** 1990. Association of genetic defects with yield and type traits. *Journal of Dairy Science*, 73:2503-2515.
- Ihara N, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed K, Snelling W, Kapees S, Beattie C, Bennett G, Sugimoto Y.** 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3.802 microsatellites. *Genome Research*, 14:1987-1998.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW.** 1997. A second generation linkage map of bovine genome. *Genome Research*, 7:235-249.
- Kelm SC, Detilleux JC, Freeman AE.** 1997. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 80:1767-1775.
- Leigh JA.** 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine Mastitis. *The Veterinary Journal*, 157:225-238.
- Lewin HA.** 1989. Disease resistance and immune response genes in cattle: Strategies for their detection and evidence of their existence. *Journal of Dairy Science*, 72(5):1334-1348.
- Lie O, Solbu H.** 1994. Possible association of antibody responses human serum albumin and (T, G)-A-L with the bovine major histocompatibility complex (BoLA). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 11:333-350.
- Lunden A, Sigurdardottir S, Edfors-Lilja I, Danell B, Andersson L.** 1990. The relationship between bovine

- major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. *Animal Genetics*, 21:221-232.
- Lytton SD, Berg U, Nemeth A, Ingelman-Sundbe M.** 2002. Autoantibodies against cytochrome P450 in children treated with immunosuppressive drugs. *Clinical Experimental Immunobiology*, 127:293-302.
- McShane RD, Gallagher DS Jr, Newkirk H, Taylor JF, Burzlaff JD, Davis SK, Skow LC.** 2001. Physical localization and order of genes in the class I region of the bovine MHC. *Animal Genetics*, 32(5):235-239.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*, 16:1215.
- Oddgeirsson O, Simpson SP, Morgan ALG, Ross DS, Spooner RL.** 1988. Relationship between the bovine major histocompatibility complex (BoLA) erythrocyte markers and susceptibility to mastitis. *Animal Genetics*, 19:11-16.
- Opdebeeck JP.** 1982. Mammary gland immunity. *Journal American Veterinarian Medical Association*, 181:1061-1065.
- Powell RL, Wiggans GR, Sieber M.** 1997. Consistency of international genetic evaluations of Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 80:2177-2183.
- Russell G.** 1997. *BoLA*. Roslin Institute Homepage. <<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/bola/dr3ms>>. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2005.
- SAS Institute.** 1989. *Users guide. Version 6*. Cuarta edición. Cary (North Carolina), E. U. A.
- Schalm OW, Carrol EJ, Jain NC.** 1971. Bovine mastitis. Lea y Febiger Pub. Filadelfia (MA), E. U. A.
- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JCM, Leslie KE.** 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29:185-193.
- Skow LC, Honeycutt D, Goy J.** 1994. Dinucleotide repeat polymorphism near a bovine MHC class I sequence. *Animal Genetics*, 24:290.
- Slate J, Coltman DW, Goodman SJ, MacLean I, Pemberton JM, Williams JL.** 1998. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervus elephus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics*, 29(4):307-315.
- Spooner RL, Morgan ALG, Sales D, Simpson SP, Solbu H, Lie O.** 1988. MHC association with mastitis. *Animal Genetics*, 19-57.
- Statkin M, Excoffier L.** 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, 76:377-383.
- Sun HS, Hart GL, Kirkpatrick BW.** 1993. A polymorphic microsatellite (UWCA1) detected on bovine chromosome 23. *Animal Genetics*, 24:142.
- Uribe HA, Kennedy BW, Martin SW, Kelton DF.** 1995. Genetic parameters for common health disorders of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 78:421-430.
- Usha AP, Simpson SO, Williams JL.** 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics*, 26:155-161.
- Watts JL, Owens WE.** 1988. Evaluation of the Rapid Mastitis Test (RMT) for identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 26:672-674.
- Weimann C, Kraus M, Gauly M, Erhardt G.** 2003. Differences in recombination rates on chromosome 23 between German Angus and German Simmental and breed specific linkage mapping. *Animal Genetics*, 34(3):229-231.
- Weir C, Cockerham R.** 1984. Covariances of relatives stemming from a population undergoing mixed self and random mating. *Biometrics*, 40:157-64.

