

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
CAMPUS LOMA BONITA

MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO PECUARIO

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *BoLA-DRB3.2* PARA
Rhipicephalus microplus EN BOVINOS DOBLE PROPOSITO DE LA CUENCA DEL
PAPALOAPAN**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO PECUARIO**

PRESENTA:

L.Z. ADOLFO HAFID RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR

DR. JOSÉ ABAD ZA VALETA

LOMA BONITA, OAXACA, MÉXICO 2024



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/055
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 25 de junio de 2024

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestro en Producción y Procesamiento Pecuario** del C. **Adolfo Hafid Rodríguez Hernández**, con número de **Matrícula 21190004**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Identificación de polimorfismos del gen BoLA-DRB3.2 para *Rhipicephalus microplus* en bovinos doble propósito de la cuenca del Papaloapan**", para su posterior presentación y defensa por el sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chl jI jù

Dr. José Abad Zavaleta

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dr. José Abad Zavaleta– Director de tesis.
C.c.p. Dr. José Ángel Rueda Barrientos– Coordinador de la Maestría en Producción y Procesamiento Pecuario
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/056
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 25 de junio de 2024

ADOLFO HAFID RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO PECUARIO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestro en Producción y Procesamiento Pecuario** estará integrado por los siguientes investigadores.

Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dr. Victor Manuel Meza Villalvazo	Presidente
Dr. Wilbert Hernández Montiel	Secretario
Dr. José Abad Zavaleta	Vocal
Dr. Nicolás Valenzuela Jiménez	Primer Suplente
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	Segundo Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú

M. en C. Héctor López Arjona
Vicerrector Académico



C c p. Dr. José Abad Zavaleta- Director de tesis
C c p. Dr. José Ángel Rueda Barrientos- Coordinador de la Maestría en Producción y Procesamiento Pecuario
C c p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal - Jefa del Departamento de Servicios Escolares
C c p. Archivo

HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

DEDICATORIA

A mis padres **Pilar Diana Hernández** y **Adolfo Rodríguez**

A mis abuelos **Roberto Hernández** y **Victoria Alducín**.

AGRADECIMIENTOS

Al **CONAHCYT** por brindarme una beca para poder realizar una maestría.

A la **Universidad del Papaloapan** por darme la oportunidad de realizarme en esta parte de mi carrera.

A **Dr. José Abad Zavaleta** por ser un gran maestro y director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Al **Dr. Wilber Hernández Montiel** por su apoyo, seguimiento y observaciones para poder culminar este trabajo, muchas gracias

A **Dr. Cecilio Ubaldo Aguilar** por sus observaciones y correcciones para realizar de la manera más correcta de este trabajo.

Al **Dr. Nicolas Valenzuela** por sus correcciones en este trabajo.

Al **Dr. Víctor Manuel Meza** por su correcta orientación y apoyo.

A la **Dra. Blanca Barrera Figueroa** por su orientación, enseñanzas y paciencia.

Al **Dr. Julián Peña** por su apoyo en la parte de la secuenciación, consejos y guía en la parte experimental muchas gracias.

A **Dr. José A. Rueda Barrientos** por su ayudarme en la parte estadística.

A mi gran amiga **Maria del Carmen** gracias, por tanto.

Especialmente a la **IBt. Fabiola Saldaña Ascensión** quien fue mi principal apoyo, gracias por procurarme, guiarme, y enseñarme todo lo que aprendí sobre biotecnología, sin ella este trabajo no hubiera tenido inicio ni final.

Al **M.M.M. Luis Uribe Espejo** por su apoyo y orientación en la parte experimental.

Al **MBt. Maximiliano López Morales** por su amistad y consejos.

A mis compañeros de clases **Eleazar Gutiérrez, Christian Parroquin, Osiris Arceo, Roció López, Saul Hernández, Sbeydi Haro, Ignacio Salinas y Guillermo Rodríguez** por su excelente amistad y apoyo en cada en cada proyecto durante estos dos años de maestría por ser un grupo fuerte en cada semestre por los momentos compartidos.

Por último, gracias a todos mis profesores del cuerpo académico de MPPyP: Dr. José Juárez, Dr. Miguel Sánchez, Dr. Adolfo Amador, Dra Gladys Terán, Dra Tania Zúñiga, gracias por su apoyo.

CONTENIDO

Contenido	Página
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. HIPÓTESIS	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1 Sistemas de ganado doble propósito.....	6
4.2 Garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
4.2.1 Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
4.2.2 Importancia económica y zoonosológica de <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
4.3 Complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen).....	9
4.3.1 Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen - BoLA)	10
4.4 Resistencia en el ganado bovino	13
4.5 Relación del complejo mayor de histocompatibilidad (BoLA) con la garrapata	14
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
4.7 Mezcla de reacción	17
4.7.1 Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs)	17
4.7.2 Iones divalentes y monovalentes.	18
4.7.3 Solución tampón (buffer)	18
4.7.4 Oligonucleótidos.	18
4.7.5 ADN molde.	19
4.7.6 Agua.	19
4.8 Variantes de PCR punto final.	19
4.8.1 PCR anidada.	19
4.8.2 PCR semi anidada.	20

4.9.1 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).	21
4.9.2 PCR- RFLP.	21
4.10 Estimadores clásicos de diversidad genética a partir de datos moleculares.	22
4.10.1 Frecuencias alélicas.	22
4.10.2 Heterocidad observada y esperada.	23
4.10.3 Equilibrio Hardy-Weinberg.	24
4.10.4 El contenido de información del polimorfismo.	24
5.10.5 Coeficiente de endogamia.	24
5.11 Estudios del gen <i>BoLA DRB3.2</i>.	25
5. MATERIALES Y METODOS.	27
5.1 Ubicación.	27
5.2 Obtención de muestras.	28
5.3 Extracción de ADN.	28
5.6 Obtención de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) mediante digestión con enzimas de restricción.	31
5.7 Secuenciación de muestras representativas.	32
5.8 Análisis estadístico	32
5.8.1 Frecuencias alélicas y genotípicas.	33
5.8.2 Estadísticos descriptivos.	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1. Amplificaciones del <i>BoLA-DRB3</i>	35
6.2. PCR-RFLP.	37
6.3 Alelos <i>BoLA-DRB3.2</i> reportados con asociación de resistencia a patologías de interés en ganado bovino.....	41
6.4 Estadístico genéticos descriptivos.	42
ANEXOS	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
Cuadro 1: Características y coordenadas de las comunidades de los ranchos muestreados. ...	27
Cuadro 2: Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del exón 2 del gen <i>BoLA-DRB3</i> ..	29
Cuadro 3: Programa de la primera reacción de PCR semi-anidada.....	30
Cuadro4: Programa de la segunda reacción de PCR semi-anidada	30
Cuadro 5: Condiciones para la digestión con enzimas de restricción <i>RsaI</i> , <i>BstYI</i> y <i>HaeIII</i> ...	31
Cuadro 6: Genotipos detectados en este estudio por PCR-RFLP en cruzas de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.	38
Cuadro 7: Alelos detectados en este estudio bajo la nomenclatura de PCR-RFLP de Van Ejik en cruzas de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.	39
Cuadro 8: Frecuencias alélicas del gen <i>BoLA-DRB3.2</i> en cruzas de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.	40
Cuadro 9: Valores de Equilibrio Hardy - Weinberg, Desviación estándar (S.E), índice Weir & Cockerham (W&C) y estimación de endogamia (Fis).	42
Cuadro 10: Valores de las frecuencias de cada alelo <i>DRB3.2</i> por rancho encontrados en los bovinos doble propósito en la Cuenca del Papaloapan.....	44
Cuadro 11: Valor máximo (score), y porcentaje de identidad (%) de alelos de secuencias obtenidas del gen <i>BoLA-DRB3.2</i> en cruzas de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.....	45

LISTA DE FIGURAS

Cuadro	Pagina
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
Figura 2. Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA).....	13
Figura 3. Interfase garrapata - respuesta inmunitaria del hospedador.....	15
Figura 4. Principio de la reacción en cadena de la polimerasa.....	17
Figura 5: Electroforesis de amplicones de PCR correspondiente al segundo exón del gen BoLA- DRB3.2.....	35
Figura 6: Electroforesis de productos de digestión. Alelo 24 (A) y Alelo 10 (B).con enzimas: RsaI, BstYI y HaeII.	36
Figura 7: Secuencias de aminoácidos de 9 alelos del gen <i>BoLA DRB3.2</i> identificadas en cruzas de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.....	46

TABLA DE ABREVIATURAS

CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
BoLA	Antígeno leucocitario bovino
<i>BoLA-DRB3.2</i>	<i>BoLA-DRB3</i> exón 2
PCR	Reacción en cadena polimerasa
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
Pb	Pares de bases
Kpb	Kilopares de bases
Ho	Heterocigosidad observada
He	Heterocigosidad esperada
PIC	Contenido de información polimórfica
HWE	Equilibrio Hardy-Weinberg

RESUMEN

Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), denominados Antígeno Leucocitario Bovino (BoLA) en bovinos, especialmente los de clase II, desempeñan un papel crucial en la presentación de péptidos procesados a los linfocitos T CD4+. El alto polimorfismo de estos genes permite una amplia variedad de respuestas inmunes debido a su capacidad para reconocer diversos péptidos. Dentro de estos genes, el exón 2 del gen *BoLA-DRB3* presenta mayor nivel de polimorfismo, lo cual es crucial para la diversidad en la presentación de antígenos. El objetivo de este estudio fue identificar los alelos del gen *BoLA-DRB3.2*, reportados como resistentes a *Rhipicephalus microplus*, en 118 bovinos de la cuenca del Papaloapan. Este estudio reporta la diversidad genética del *BoLA-DRB3.2* en bovinos de doble propósito, cruce entre razas europeas e índicas, en dicha región. La identificación molecular de los alelos se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP, amplificando el exón 2 del gen *BoLA-DRB3* y su posterior digestión con las enzimas de restricción *RsaI*, *BstYI* y *HaeIII*. Los resultados mostraron una heterocigosidad observada (H_o) de 0.6610 y una heterocigosidad esperada (H_e) de 0.9267, con un índice de contenido de polimórfica (PIC) de 0.9181. Se identificaron 41 genotipos diferentes, con 77 individuos heterocigotos y 41 homocigotos, y 27 variantes alélicas de *BoLA-DRB3.2* con frecuencias que varían de 0.0085 a 0.178. De los alelos reportados como resistentes a *R. microplus*, se identificaron las variantes *16, *20, *23 y *24, con frecuencias de 0.0339, 0.0339, 0.0169 y 0.0085, respectivamente. Los alelos más frecuentes fueron *28, *43 y *17, con frecuencias de 0.178, 0.1017 y 0.0932, respectivamente. El alelo *28 estuvo presente en 8 de los 9 ranchos, excepto en el rancho de Río Manso, San Juan Lalana, donde se presentaron alelos únicos (*15, *33, *54 y *Ns 5).

Palabras clave: Antígeno Leucocitario Bovino (BoLA), polimorfismo, alelo, PCR, RFLP

ABSTRACT

The Major Histocompatibility Complex (MHC) genes, known as Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) in cattle, especially class II genes, play a crucial role in presenting processed peptides to CD4⁺ T lymphocytes. The high polymorphism of these genes allows for a wide range of immune responses due to their ability to recognize diverse peptides. Among these genes, exon 2 of the *BoLA-DRB3* gene exhibits the highest level of polymorphism, which is crucial for antigen presentation diversity. This study aimed to identify the alleles of the *BoLA-DRB3.2* gene, reported as resistant to *Rhipicephalus microplus*, in 118 cattle from the Papaloapan basin. This study reports the genetic diversity of *BoLA-DRB3.2* in dual-purpose cattle, crosses between European and Indian breeds, in this region. The molecular identification of the alleles was performed using the PCR-RFLP technique, amplifying exon 2 of the *BoLA-DRB3* gene and subsequently digesting with the restriction enzymes *RsaI*, *BstYI*, and *HaeIII*. The results showed an observed heterozygosity (H_o) of 0.6610 and an expected heterozygosity (H_e) of 0.9267, with a polymorphic information content (PIC) index of 0.9181. A total of 41 different genotypes were identified, with 77 heterozygous and 41 homozygous individuals, and 27 *BoLA-DRB3.2* allelic variants with frequencies ranging from 0.0085 to 0.178. Among the alleles reported as resistant to *R. microplus*, variants *16, *20, *23, and *24 were identified, with frequencies of 0.0339, 0.0339, 0.0169, and 0.0085, respectively. The most frequent alleles were *28, *43, and *17, with frequencies of 0.178, 0.1017, and 0.0932, respectively. The *28 allele was present in 8 of the 9 ranches, except in the Río Manso ranch, San Juan Lalana, where unique alleles (*15, *33, *54, and *Ns 5) were found.

Keywords: Bovine Leukocyte Antigen (BoLA), polymorphism, allele, PCR, RFLP

1. INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción bovinos en los trópicos y subtrópicos del mundo el ganado de doble propósito es el de mayor explotación el cual se obtiene mediante el cruzamiento de razas *Bos indicus* y *Bos taurus* con el fin de aumentar los beneficios económicos (Cuevas-Reyes *et al.*, 2013). Este ganado, se ve afectado por diversos patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos, siendo la garrapata *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*), uno de los principales problemas de salud pública, por las enfermedades que transmite (FAO, 2003; Álvarez *et al.*, 2003).

R. microplus es responsable de miles de dólares en pérdidas económicas como corporales directas debido a: la disminución de la ganancia de peso corporal, la anemia por riego sanguíneo, la desvalorización de la piel por daño, miosis y la disminución de la producción de leche (Jonsson, 2006); y otros factores asociados a la transmisión de enfermedades, ya que *R. microplus* es el principal vector de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Jongejan y Uilenberg, 2004).

El uso irresponsable de ixodicidas en el control de *R. microplus*, ha llevado a la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes aumentando los costos con tratamientos ineficaces y agregando la demanda del mercado por métodos de control en garrapatas con mejores efectos sin ser tan agresivo y sin efectos de residualidad en los productos, como es la convergencia de la resistencia del huésped con bovinos más resistentes, la vacunación y uso de baños estratégicos (Villanueva, 2011).

En los estudios de diversidad genética bovina, destacan la detección de genes de resistencia, como es el caso de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) que en bovinos se conoce como Antígeno Leucocitario Bovino (BoLA) (Martínez *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2006; Hernández, 2014). Los genes *BoLA* contienen variantes alélicas de resistencia a la

garrapata que son importantes para los criadores de animales y los genetistas porque juegan un papel clave en la respuesta inmune y están asociados con la resistencia y la susceptibilidad a diversas enfermedades (Villanueva, 2011). El CMH es poligénico y cada gen tiene muchos alelos, por lo que también es polimórfico, dichos polimorfismos tienen un profundo efecto sobre el reconocimiento de antígenos por parte de las células T, y la combinación de poligenicidad y polimorfismo amplía en gran medida la gama de péptidos los macrófagos, células B y otras células del sistema inmune específicas de la clase II del CMH presentan a las células T (Brown *et al.*, 1995). El CMH de los mamíferos generalmente se divide en tres regiones denominadas: CMH clase I, clase II y clase III, que codifican proteínas con diferentes funciones y distribución tisular (Takeshima y Aida, 2006). La clase II se subdivide en regiones IIa y IIb, donde los genes y productos de la región clase IIa son los más estudiados por ser los de mayor grado de polimorfismo. Se han identificado catorce genes en esta región: *DRA*, *DRB* (*DRB1*, *DRB2*, *DRB3*), *DQA* (*DQAI*, *DQA2*, *DQA3*, *DQA4*, *DQA5*) y *DQB* (*DQB1*, *DQB2*, *DQB3*, *DQB4*, *DQB5*), de los cuales el gen *DRB3* es el gen más estudiado con una longitud total de 11.4 Kilopares de bases (Kpb), 5 intrones y 6 exones, de los cuales el exón 2 es el más polimórfico (*BoLA-DRB3.2*), ya que tiene aproximadamente 270 pares de bases (pb) (Russell *et al.*, 2004). Los genes de clase IIa son altamente polimórficos y este polimorfismo se debe a una gran cantidad de aminoácidos entre los alelos en cada locus (Yakubu *et al.*, 2013). Diversos autores han asociado polimorfismos del gen *BoLA* con resistencia a enfermedades como brucelosis (Martínez *et al.*, 2005), mastitis (Zambrano *et al.*, 2009), leucemia bovina enzoótica (Panei *et al.*, 2009), e infestación por garrapatas y hemoparásitos (Martínez *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2013; Villanueva, 2011).

Inicialmente, la distribución genética de *BoLA* se investigó utilizando métodos serológicos para determinar la contribución de los genes *BoLA* a diversas enfermedades, más adelante se

desarrollaron herramientas moleculares como la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR), con diferentes técnicas para la detección de polimorfismos como la técnica de Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), usadas por diversos autores (Baltian *et al.*, 2016; Hernández, 2014; Martínez *et al.*, 2006).

La técnica de identificación por medio de PCR-RFLP incluye 3 enzimas de restricción informativa, que tienen sitios de reconocimiento únicos presentes en algunos alelos, pero no en otros, por lo que los productos de corte de enzimas (bandas RFLP) los patrones de fragmentos o perfiles de corte pueden identificarse mediante electroforesis (Van Ejijk *et al.*, 2009; Alkafajy *et al.*, 2020;). La técnica de PCR-RFLP ha demostrado ser un método rápido y sensible para la detección de polimorfismos en un dominio funcional relevante del gen *BoLA-DRB3* como los del exón dos y debería ser útil para estudiar la evolución del polimorfismo DRB en ganado bovino y otros bóvidos (Van Ejijk *et al.*, 2009). La técnica PCR-RFLP posee ventajas incluso sobre la estrategia secuenciación simple de polimorfismo (SSCP) para establecer de forma rápida, reproducible y confiable, incluso en el diagnóstico de enfermedades e individuos molecularmente ya caracterizadas (Esperón *et al.*, 2013).

A pesar de las diferentes técnicas para el análisis del *BoLA*, aún es escasa la información sobre la identificación de los alelos del gen *BoLA-DRB3.2* involucrados en la resistencia y susceptibilidad hacia *R. microplus* en bovinos cruce de *Bos taurus* por *Bos indicus* explotados en zonas tropicales como lo es la cuenca del Papaloapan. Por lo tanto, el objetivo del trabajo consistió en identificar los polimorfismos del gen *BoLA-DRB3.2* presentes en ganado doble propósito de la cuenca del Papaloapan mediante PCR-RFLP establecer cuáles de los alelos encontrados se encuentran reportados con su asociación a resistencia y/o susceptibilidad a para *R. microplus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Identificar mediante PCR-RFLP, los alelos del gen *BoLA-DRB3.2* del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II asociados a la resistencia y susceptibilidad a *R. microplus* en el ganado bovino doble propósito en algunos municipios de la cuenca del Papaloapan.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar frecuencias alélicas, genotípicas de la poblacional.
- Estimar la diversidad genética del gen *BoLA DRB3.2* en la cuenca del Papaloapan mediante la heterocigosidad observada y esperada.
- Secuenciar muestras representativas con base a los resultados obtenidos.

3. HIPÓTESIS

La técnica molecular PCR-RFLP permitirá identificar los alelos de resistencia a la garrapata *Rhipicephalus microplus* en los bovinos de la región de la cuenca del Papaloapan.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Sistemas de ganado doble propósito

Los sistemas de producción doble propósito tienen a fin la producción de leche y animales para la carne ya sea venta de becerros en pie o animales de desecho, presentan modalidades que dependen de 4 factores: el objetivo del productor, las condiciones agroecológicas, nivel de tecnificación y el tipo de ganado utilizado (Urdaneta *et al.*, 2008). El sistema de producción doble propósito es el que mayor predomina en las zonas de trópicos y subtrópicos en México, cuenta con 2.4 millones bovinos representando casi el 60 % a la producción de leche en esta región, el doble propósito aporta alrededor del 19.5 % de la leche y el 40 % de la carne nivel nacional (Román-Ponce *et al.*, 2013). Estos sistemas promedian una producción diaria por vaca de 3 a 9 litros periodos de lactación que rondan los 120 a 180 días con partos cada 18 a 24 meses (Koppel *et al.*, 2002; Fadul-Pacheco *et al.*, 2013; Salas-Reyes *et al.*, 2015). Calderón y colaboradores en 2019 reportan que en el trópico mexicano se produce del 40 % al 50 % de la carne y entre el 18 % y 19.5 % de leche en el país. Por su parte Oaxaca produce 145, 213 L de leche y 78, 331 toneladas de carne de ganado bovino de doble propósito, en los que 24, 503 L (16.8 %) de leche y 19,714 toneladas (25.2 %) de carne se producen por los bovinos doble propósito de la región del Papaloapan (Cortés-López *et al.*, 2014).

En áreas tropicales, ganado de doble propósito es un término comúnmente utilizado para describir el cruce de cebú, ganado criollo y europeo en México, doble propósito, este ganado se ha utilizado tanto para producción de carne como para leche (Koppel *et al.*, 2002). En la región del Papaloapan, el mestizaje de ganado cebú, se ha realizado indiscriminadamente por falta de orientación profesional. Ocasionalmente, se han utilizados toros genéticamente superiores, sin embargo, la mayoría del tiempo se seleccionan sólo individuos con un fenotipo deseable para el

productor (Cortés-López *et al.*, 2012). El ganado de doble propósito es grupo bien adaptado a las duras condiciones ambientales como alta temperatura y humedad, baja calidad de pastos, y alta incidencia de parásitos que comúnmente se encuentran en zonas tropicales y subtropicales, sin embargo, los genotipos de doble propósito tienen ventajas con respecto a grupos genéticos especializados, principalmente en los sistemas de producción de bajos insumos o tecnificados (Ortega y Ward, 2005).

4.2 Garrapata *Rhipicephalus microplus*.

R. microplus es considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial. Es una garrapata dura que se puede encontrar en diversos huéspedes, entre ellos bovinos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres (Rodríguez-Vivas, 2012). Una alta carga de garrapatas en los animales puede disminuir la producción y dañar los cueros. *R. microplus* también puede transmitir la babesiosis causada por *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y la anaplasmosis causada por *Anaplasma marginale* (FAO, 2007).

4.2.1 Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. El ciclo de vida de la garrapata común del ganado se completa en un solo huésped, ya que en las tres etapas del parásito (larvas, ninfas y machos y hembras adultos) se alimentan, mudan y aparean, mientras permanecen en el mismo individuo (Figura 1). El ciclo de *R. microplus* se divide en dos etapas: una etapa parasitaria en la que se desarrollan garrapatas en el ganado y una etapa no parasitaria o de vida libre (Nava *et al.*, 2011). Por otro lado, la fase no parasitaria se divide en períodos separados: el predesove en una hembra ingurgitada (teleogine) corresponde al período que va desde su separación del animal hasta el momento en que pone sus primeros huevos y dura de 2 a 6 días (Nava *et al.*, 2013). Luego, el período desde la puesta del primer huevo hasta la puesta del último huevo se denomina período de desove, y generalmente el número de huevos puestos es entre

2000 y 3000. Finalmente, el período desde la puesta de los huevos hasta el nacimiento de la larva se denomina eclosión y su duración varía de 20 a 45 días, dependiendo principalmente de la temperatura y la humedad ambiental (Canevari *et al.*, 2017). La etapa parasitaria comienza cuando las larvas que se encuentran en la vegetación se acercan al ganado y, a diferencia de la etapa no parasitaria, casi no se ven afectadas por las condiciones ambientales. Una vez en la vaca, las larvas se alimentan (3 a 5 días) y mudan a ninfas. Continúan alimentándose, y alrededor del día 9 al 12 se llenan y mudan a adultos (machos y hembras) en el huésped. Después del apareamiento, la hembra continúa ingurgitándose y eventualmente cae al suelo para poner sus huevos. La duración de la fase parasitaria se completa en 23 días (Nava *et al.*, 2011).

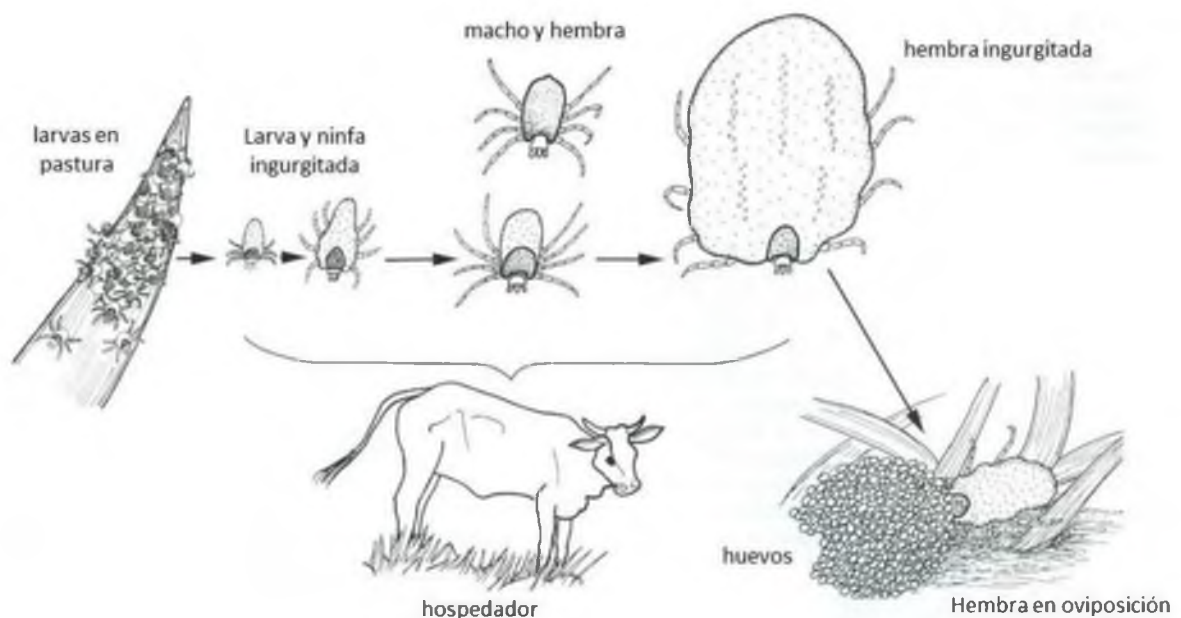


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*. Fuente: (Walker, 2011).

4.2.2 Importancia económica y zoonitaria de *Rhipicephalus microplus*. La importancia del control de este ectoparásito se debe principalmente a que las infestaciones de *R. microplus* ocasionan importantes pérdidas económicas y daños a la salud pública. Es un vector de diversos agentes patógenos, puede provocar la muerte por anemia severa, otros daños

como parálisis por inoculación de toxinas, y varias enfermedades mortales (Eremeeva *et al.*, 2011). En promedio, cada garrapata hembra bien alimentada en bovinos *Bos taurus* perdió 1.37 ± 0.25 gramos de peso, un valor comparable en cruces bovinos entre *Bos taurus* y *Bos indicus* fue de 1.18 ± 0.21 gramos por garrapata ingurgitada, que no fue estadísticamente diferente del valor anterior, por lo que este umbral de pérdida de peso podría considerarse independientemente del genotipo del animal (Jonsson, 2006), mientras Salazar *et al.* (2015), señalan un 40 % en pérdidas directas por la disminución de la producción láctea debido a que cada garrapata ingurgitada lleva a una disminución de 8.9 mL en producción diaria de leche y a un gramo de peso vivo diario. Por otro lado, García, (2014), menciona que infestaciones mayores de 50 garrapatas repletas de sangre, produce mermas en el aumento de peso de 500 gramos por garrapata al año y la reducción anual en leche puede ser de 200 litros año. Mientras que la anemia es una consecuencia inevitable de una gran infestación de garrapatas, por lo que la muerte y la mala salud del animal son comunes. Además, la disminución de la ganancia de peso corporal está asociada con el efecto de la reducción del consumo de alimentos (Seebeck, 1971), la digestión y el metabolismo normales en animales (componente hepatotóxico de *R. microplus*). Del mismo modo, una gran infestación puede causar lesiones en la piel que atraen *Cochliomyia hominivorax* (gusano barrenador), aumentando así el riesgo de desarrollar miosis (Reck *et al.*, 2014).

4.3 Complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen).

La resistencia genética es un rasgo multigénico, es decir, determinado por muchos genes, entre los cuales se encuentran los que codifican las moléculas que forman parte del sistema inmune, la diversidad de las proteínas codificadas en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) se debe al polimorfismo de los genes que se encuentran en este complejo. Esta diversidad

genética sería la responsable de la variación genotípica en la resistencia osusceptibilidad a enfermedades (Díaz *et al.*, 2005).

El (CMH) del bovino es conocido como Antígenos Leucocítico Bovino (*BoLA*) y se localiza en el cromosoma 23, su descubrimiento es atribuido a Amorena *et al.* (1978) y a Spooner *et al.* (1978).

El complejo *BoLA* como en el caso de los humanos, consiste en tres clases de genes, donde la clase II se encuentra ubicada centromericamente hacia la clase III, y la clase I se ubica hacia el telómero (Sharif *et al.*, 1998).

Los genes *BoLA* clase I codifican proteínas implicadas en el reconocimiento, por parte de las células T, citotóxicos de las células huésped que han sido infectadas y en la presentación de péptidos a las células citotóxicos t cd8+ (Takeshima *et al.*, 2006; Tamarin, 1996).

La región clase II esta subdividida en las clases IIa, y IIb, que se encuentran separados por una distancia de 17 centimorgans (Andresson *et al.*, 1988).

La región IIa contiene los genes *DR* y *DQ*, y es la región más estudiada por contener el elemento de restricción DRB3 por su asociación a resistencia y susceptibilidad a enfermedades y mostrar el más alto nivel de polimorfismo comparado con otras especies de vertebrados (Takeshima *et al.*, 2002). Los genes clase III codifican proteínas de complemento, implicadas en la destrucción de células extrañas (Tamarin, 1996)

4.3.1 Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen - *BoLA*). En el ganado bovino, la región clase I, contiene por lo menos 10 genes (Bensaid *et al.*, 1991). EL análisis de estas secuencias, han mostrado que al menos 4 genes clase I que pueden ser transcritos y 6 son considerados como genes no clásicos. (Ellis *et al.*, 1999). Dentro de la clase I, se encuentra el gen *HFE*, que codifica para una proteína asociada con la microglobulina beta 2, predominantemente expresada en el tracto digestivo y envuelto en

el metabolismo de hierro, sin embargo, no aparenta tener un rol inmunológico (Al-Murrani *et al.*, 2009).

Los genes clase II están localizados en dos diferentes regiones del cromosoma 23 del bovino, una llamada clase IIa y la otra clase IIb. 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* (Takeshima *et al.*, 2006). Estos genes producen proteínas implicadas en la comunicación intercelular entre las células B y T, procesos antígenos extracelulares con células T CD4+ y otras funciones inmunes. Los genes de la región clase IIa son los más estudiados porque presentan altos niveles de polimorfismo y porque tiene función inmunológica. Catorce genes han sido identificados en esta región: *DRA*, *DRB* (*DRB1*, *DRB2*, *DRB3*), *DQA* (*DQA1*, *DQA2*, *DQA3*, *DQA4*, *DQA5*) y *DQB* (*DQB1*, *DQB2*, *DQB3*, *DQB4*, *DQB5*) (Takeshima *et al.*, 2006).

En bovinos, solo un alelo del *BoLA-DRA* ha sido identificado basado en datos de secuencia. Por el contrario, los genes que codifican para la cadena beta de la molécula *DR* son altamente polimórficos. El polimorfismo está centrado principalmente en el segundo exón, éste tiene un gen altamente polimórfico, el *DRB*, que ha sido estudiado ampliamente en bovinos (Russell *et al.*, 1994), ovejas (Schwaiger *et al.*, 1994), cabras (Amills *et al.*, 1995), ciervos (Swarbrick *et al.*, 1997) y otras especies de rumiantes salvajes.

El gen *BoLA-DRB1* es un pseudogen que presenta múltiples codones de paro y el gen *BoLA-DRB2* es mal expresado (Russell *et al.*, 1994) pero exhibe algo de polimorfismo (Muggli-Cockett *et al.*, 1991). El gen *BoLA-DRB3* es altamente polimórfico puesto que se han reportado 130 alelos y codifica elementos funcionales de restricción (proceso mediante el cual un linfocito puede reconocer un antígeno como propio o extraño) (Davies *et al.*, 1997).

Algunos individuos pueden llevar una sola copia de *DQA* y *DQB*, mientras otros tienen haplotipos duplicados. La comparación de secuencias, por Southern Blot y análisis filogenéticos

indican la presencia de cinco genes *DQA*, de los cuales *DQA4* y *DQA5* son menos polimórficos que los *DQA1*, *DQA2* y *DQA3*, con aproximadamente 31 alelos para *DQA1*, 13 alelos para *DQA2* y dos alelos para *DQA3*. Los genes *DQB1*, *DQB2*, *DQB3*, *DQB4*, *DQB5* son altamente polimórficos y presentan aproximadamente 52 alelos cada uno (Takeshima *et al.*, 2006).

En los genes clase IIb, están los genes *DY* que solo se encuentran en rumiantes, los cuales exhiben altos niveles de polimorfismo y son transcritos en las células dendríticas. Los análisis de expresión demostraron la capacidad de los genes *DY* para traducir diferentes cadenas polipeptídicas α y β del *BoLA* clase II (Ballingall *et al.*, 2004).

Los genes *LMP2* y *LMP7* codifican subunidades de la proteasoma, y los genes *TAP1* y *TAP2* codifican moléculas de envoltura y péptidos de transporte desde el citosol al lumen del retículo endoplásmico (Takeshima *et al.*, 2006).

En comparación con otras partes del *BoLA*, la región III es la clase que tiene la mayor densidad de genes, con el menor número de pseudogenes; sin embargo, algunos de los genes localizados en esta área no están involucrados con el sistema inmune. Esta zona codifica para otros componentes inmunes, componentes del sistema del complemento, tales como: C2, C4 y el factor B (Bf), proteína HSP70, una hidroxilasa 21, el factor alfa, que participa en la necrosis de tumores y moléculas relacionadas con la inflamación (citoquinas: tales como TNF- α , LTA, LTB) o proteínas de choque térmico. Las moléculas de clase III no comparten las mismas funciones de la clase I y II, pero se encuentra entre ellas (Amills *et al.*, 1995). Hasta el ahora se han reportado 137 alelos *BoLA*-DRB3.2, que se encuentran registrados en la base de datos del EMBL-EBI IPD-MHC.

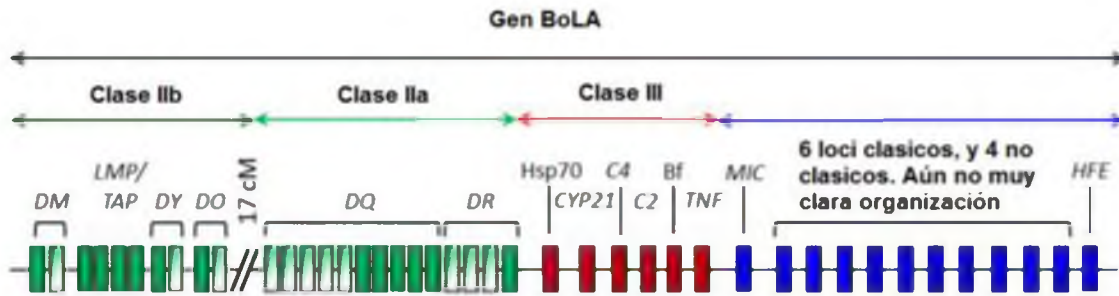


Figura 2. Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA). Fuente: (Takeshima *et al.*, 2006)

4.4 Resistencia en el ganado bovino

Los bovinos muestran una respuesta considerable a una variedad de enfermedades, y gran parte de la variabilidad es genética, lo que implica la viabilidad de la selección. Una vez infectados, los anfitriones pueden, en principio, protegerse de daños adicionales de dos maneras: pueden atacar al portador directamente, reduciendo así la carga (resistencia), o pueden limitar el daño que puede causar una carga determinada (tolerancia). En este sentido, la resistencia protege al huésped a expensas del portador, mientras que la tolerancia evita que el huésped sufra daños sin ningún efecto negativo directo sobre el huésped (Raberg *et al.*, 2009).

Asimismo, algunos vacunos presentan una rusticidad que les permite ser más resistentes a la garrapata algunos actúan como barreras físicas en el hospedero que afectan la resistencia a *Rhipicephalus microplus*, tales como: densidad del recubrimiento, espesor y pigmentación de la piel, vibración de la piel y/o capacidad de acicalamiento, papilas de la lengua y el olor asociado a componentes orgánicos volátiles (Bennet, 1969; De Castro *et al.*, 1985; Spickett *et al.*, 1989; Osterkamp *et al.*, 1999; Veríssimo *et al.*, 2002, 2015; Martínez *et al.*, 2006; Gasparin *et al.*, 2007). Esto es muy utilizado en las unidades de producción actual, aunque se sabe que el grado de resistencia varía mucho entre razas bovinas. Un ejemplo muy claro es el cruce entre razas *Bos indicus* (*B. indicus*) y *Bos taurus* (*B. taurus*) donde se obtienen animales híbridos F1 que

poseen una resistencia a la garrapata superior a la *Bos taurus*, pero inferior a la *Bos indicus* (Sutherst *et al.*, 1983).

Sin embargo, la mejora para la resistencia a las garrapatas en el ganado a través del cruce genético *Bos taurus* por *Bos indicus* tiene sus inconvenientes, ya que la adquisición de la resistencia no siempre se correlaciona con otras características deseables condicionando la producción de los animales. En este sentido, el nivel de infección en estos hatos será directamente proporcional a la composición genética de los animales. Ante esto, muchos productores optan por criar razas que se consideran más resistentes o por aumentar el porcentaje de genes cebú en el hato. Si bien se minimiza el impacto de los altos niveles de infección, esta práctica finalmente se opone a una alternativa para aumentar la productividad de muchos sistemas de crianza de ganado de carne y hacer más competitivo el sector, aumentando la participación de los animales *B. taurus* en los rebaños como una forma de mejorar calidad de la carne o leche (Biegelmeyer *et al.*, 2012). Además, la resistencia por esta vía muchas veces no es suficiente para controlar la infestación de parásitos y así evitar los graves problemas que ocasionan al ganado (Wharton 1976; Sutherst *et al.*, 1983).

4.5 Relación del complejo mayor de histocompatibilidad (BoLA) con la garrapata

La infestación por garrapata se caracteriza porque las células de la epidermis y la dermis reconocen inmunógenos salivales que se concentran en el sitio de la picadura. El tipo de inmunógeno introducido por el huésped varía durante el ciclo de vida de la garrapata. Las células de Langerhans y los macrófagos pueden procesar proteínas y otras moléculas inmunogénicas que se encuentran en la saliva de la garrapata en la epidermis y la dermis del animal (Bautista-Garfías, 2016). En los ganglios linfáticos, las moléculas salivales son procesadas por macrófagos o células dendríticas y finalmente se presentan a las células T específicas del antígeno en el contexto de los ganglios linfáticos secundarios. Del mismo modo, los linfocitos

T auxiliares detectan los inmunógenos de la garrapata junto con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH) en la superficie de las células presentadoras de antígenos, macrófagos, células dendríticas y células B. Los linfocitos Th1 y Th2 son los proveedores de señales inmunorreguladoras que permiten la generación de una respuesta mediada por células y anticuerpos (Figura 3) (Bautista, 2010). Además, los linfocitos Th1 son células involucradas en reacciones de hipersensibilidad retardada, incluida la reacción de hipersensibilidad cutánea asociada con la infiltración de basófilos inducida por garrapatas (Figura 3) (Quintanilla y Garfias, 2019). Los inmunógenos, como las células presentadoras de antígenos, los linfocitos T y las citoquinas promueven la activación y diferenciación de los linfocitos B, que producen anticuerpos homocitotrópicos circulantes y otros que responden contra las garrapatas (Francischetti *et al.*, 2009; Sajid *et al.*, 2021). Algunos estudios muestran que esta inmunidad se debilita durante el embarazo, la lactancia y las bajas temperaturas (Jonsson, 2006).

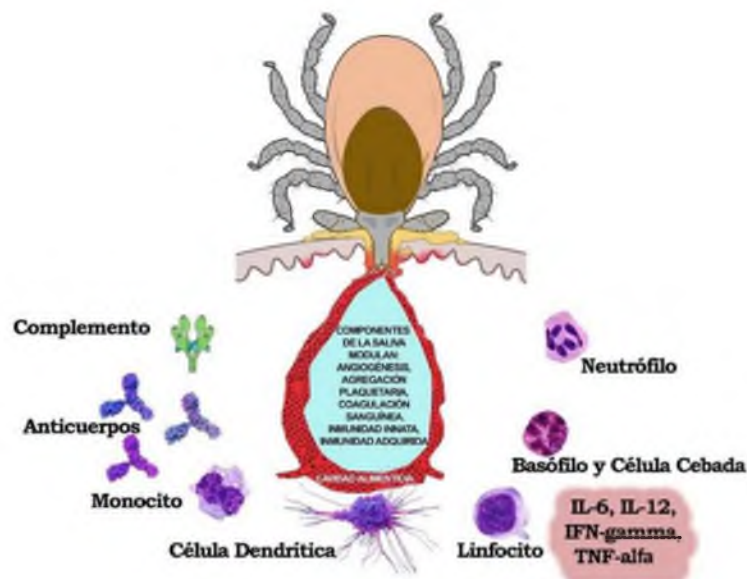


Figura 3. Interfase garrapata - respuesta inmunitaria del hospedador. Principales elementos del sistema inmunitario del bovino y los componentes de la saliva de la garrapata que modulan la respuesta inmune protectora del hospedador. IL-6, interleucina 6; IL-12, interleucina 12; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral. Fuente: (Quintanilla y Garfias, 2019).

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica una secuencia de ADN específica millones de veces durante múltiples ciclos repetitivos en los que la secuencia objetivo se replica verdaderamente (Asuar, 2007). Por lo tanto, esta reacción utiliza la actividad de la ADN polimerasa, que tiene la capacidad de sintetizar ADN de forma natural en las células. En la reacción, si se utiliza ADN genómico como sustrato, se suele denominar PCR, pero si se utiliza ADN complementario (ADNc) procedente de ARNm (ácido ribonucleico mensajero), se denomina RT-PCR por sus siglas en inglés. Esta conversión se produce mediante una reacción denominada transcripción inversa y está controlada por la enzima transcriptasa inversa, que convierte el ARNm en moléculas de ADNc. Este método se replica a partir de retrovirus, que utilizan la enzima transcriptasa inversa para convertir sus genomas de ARN en ADN y replicarse en millones de partículas virales. El ADNc se utiliza para analizar la expresión del ARNm del gen de interés (Tamay y Velasquillo, 2013).

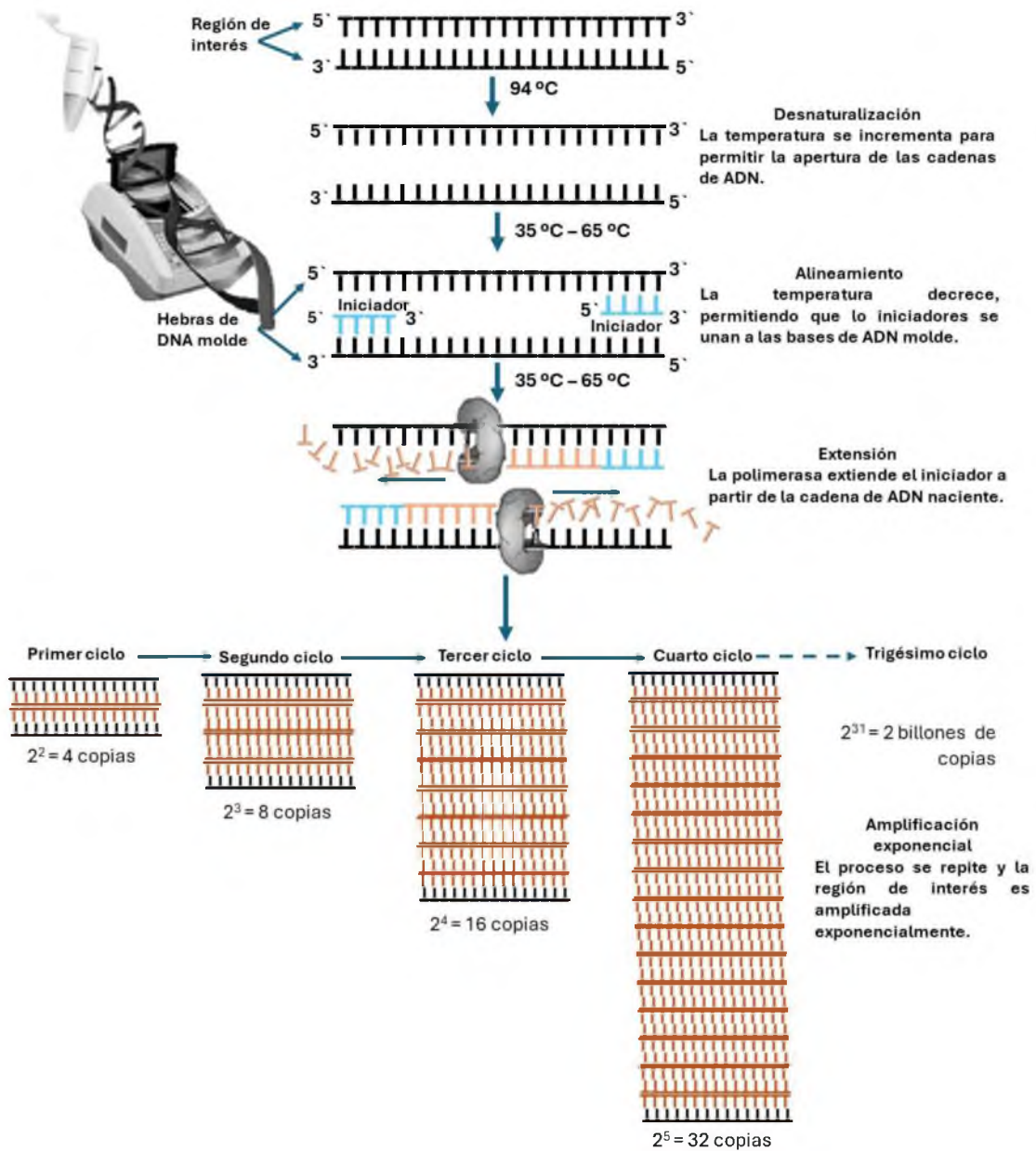


Figura 4. Principio de la reacción en cadena de la polimerasa. Adaptado de Ávila *et al.* (2018).

4.7 Mezcla de reacción

4.7.1 Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs). Correspondientes a las cuatro bases nitrogenadas (timina, adenina, guanina y citosina), son las piezas que la Taq polimerasa utiliza para construir las cadenas de ADN que se sintetizan en cada ciclo de PCR. Su concentración influye directamente en la especificidad de la reacción, si estos se encuentran en cantidades altas

disminuye la actividad de la polimerasa e incluso puede ser inhibida y en concentraciones no equimolares la fidelidad disminuye por ello, normalmente su concentración varía entre 0.2 y 1 mM (Rodríguez y Barrera, 2004).

4.7.2 Iones divalentes y monovalentes. Los iones divalentes son cofactores que están relacionados con el rendimiento y especificidad de la enzima, el más común es el magnesio (Mg^{2+}), añadido a la mezcla de reacción como cloruro de magnesio ($MgCl_2$) con una concentración que va de 0.5 - 2.5 mM El potasio (K) es el ion monovalente más utilizado, en forma de cloruro de potasio (KCl) en una solución tampón (Sint y Traugott, 2012).

4.7.3 Solución tampón (buffer). Es la solución amortiguadora que mantiene el pH ideal para que la polimerasa lleve a cabo la síntesis de cadenas de ADN correctamente. Sus componentes comunes son Tris-HCl (pH 8.4), cloruro de potasio (KCl) y cloruro de magnesio ($MgCl_2$). También se incluyen adyuvantes como el dimetilsulfóxido (DMSO) que evita la formación de estructuras secundarias de ADN, detergentes como Tween 20 o Tritón X-100 que proveen estabilidad a la enzima y otros componentes como polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida y seroalbúmina (Rodríguez y Barrera, 2004).

4.7.4 Oligonucleótidos. Son secuencias cortas de nucleótidos que delimitan la región que se desea amplificar. Se requieren dos fragmentos denominados forward y reverse, ambos son complementarios al templado (ADN molde) con el fin de que la polimerasa reconozca y extienda la zona flanqueada (Rodríguez y Barrera, 2004). Son el componente que determina el éxito o fracaso de la reacción de PCR por ello, se deben cumplir ciertas características en su diseño para garantizar su funcionamiento. Su tamaño oscila entre 18 y 25 pb y el contenido de G-C no debe rebasar el 55 % para evitar la formación de dímeros. Ambos cebadores deben tener temperaturas de fusión similares (T_m) entre 50 y 70 °C con distancias no mayores a 5 °C entre ellos. La concentración más utilizada está en el intervalo de 0.1 a 1.0 mM (Cha y Thilly, 1993).

4.7.5 ADN molde. Es el elemento principal para llevar a cabo la PCR. También llamado templado, es la cadena de ADN que se separan en la desnaturalización e incluye la secuencia blanca. Su concentración mínima es de 20 ng cuando es de células eucariotas. Aunque también se puede realizar la reacción a partir de ARN que previamente se transformó en ADNc por transcripción reversa. Se recomienda que el ADN esté purificado o libre de inhibidores enzimáticos sobre todo cuando se trabaja con ADN extraído de sangre o heces (Tamay y Velasquillo, 2013).

4.7.6 Agua. Es el disolvente en la reacción, se requiere que sea desionizada y libre de nucleasas (enzimas que degradan el ADN) o milli-Q grado molecular. Otra opción es utilizar agua utilizada para soluciones inyectables (Rodríguez y Barrera, 2004).

4.8 Variantes de PCR punto final.

4.8.1 PCR anidada. La técnica de PCR anidada se desarrolló para aumentar la sensibilidad y especificidad de la PCR convencional. Consta de dos rondas de amplificación que utilizan dos juegos de iniciadores distintos. En la primera ronda se realizan de 15 a 30 ciclos con un juego de iniciadores. Los productos de esta primera amplificación se utilizan luego en una segunda ronda con un juego de iniciadores interno, lo que incrementa la sensibilidad al alinear las secuencias de forma más específica (Dynon *et al.*, 2001; Perera y Acevedo, 2018).

El uso de PCR anidada permite resolver problemas de detección cuando hay un bajo número de copias de la secuencia objetivo en la muestra clínica en comparación con la gran cantidad de señales de fondo interferentes como el DNA, inhibidores o la DNA polimerasa del tejido del hospedero (OIE, 2008). Típicamente se comienza con 30-35 ciclos en la primera ronda, se toma una pequeña alícuota de esos productos y se realiza la segunda ronda con reactivos frescos e iniciadores internos. Esto ha demostrado ser más exitoso que diluir y reamplificar con los mismos iniciadores. La posición de los iniciadores internos es clave para determinar la

sensibilidad y especificidad del ensayo, permitiendo la diferenciación y selección específica de especies, biovariedades y serotipos. Por ello, la PCR anidada provee información valiosa para epidemiología y taxonomía. Otra ventaja es que al reamplificar con un juego de iniciadores diferentes en la segunda ronda, se reducen los productos inespecíficos generados en la primera (Martín *et al.*, 2015).

4.8.2 PCR semi anidada. Es una variante de la PCR-anidada, pero no se utilizan cuatro oligonucleótidos sino tres, pues uno de ellos se utiliza en ambas reacciones. El directo o reverso se utilizan nuevamente junto con un nuevo oligonucleótido, ya que en el fragmento que se amplificó en la primera reacción contiene la zona complementaria que sirve para amplificar la región de interés en la segunda PCR. En la PCR semi anidada se corre el riesgo de tener mayor contaminación al diluir los productos iniciales, sin embargo, ofrece alta sensibilidad (Van Ejjik *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2010).

4.9 Enzimas de restricción

También conocidas como endonucleasas de restricción son proteínas que cortan el ADN en bacterias (y son extraídas de estas para su utilización). Dado que cortan en el interior de la molécula, se les denomina a menudo endonucleasas (Farfán, 2015). Para secuenciar el ADN, primero hay que dividirlo en fragmentos más pequeños. Muchas enzimas que descomponen el ADN (como las presentes en el líquido pancreático) pueden hacer esto, pero la mayoría no son adecuadas para el trabajo secuencial, ya que cortan cada molécula de forma aleatoria. Esto conlleva a una mezcla variada de fragmentos de distintos tamaños. Lo que se requiere es una manera de dividir la molécula de ADN en pocos lugares específicos para generar un conjunto reducido de fragmentos uniformes. Las herramientas para esto son las endonucleasas de restricción. Cuanto menos común sea el lugar que reconocen, menor será el número de fragmentos generados por una endonucleasa de restricción específica (Kimball, 2023).

4.9.1 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP). Creada en 1980, la técnica de RFLP emplea enzimas de restricción para cortar secuencias de ADN en sitios específicos, generando conjuntos de fragmentos de diferentes tamaños (Uddin y Cheng, 2015). La RFLP tradicional se basa en una técnica de hibridación de ácidos nucleicos llamada transferencia Southern. Los procedimientos implican la digestión del ADN las enzimas de restricción cortan la doble hélice de ADN donde haya una secuencia de bases específica para una enzima, creando así una mezcla de fragmentos discretos que se separan en geles de agarosa mediante electroforesis (Angarita-Merchán y Diaz-Torres, 2017).

4.9.2 PCR- RFLP. Esta implica la digestión de productos de PCR mediante enzimas de restricción, generando fragmentos de ADN de diferentes tamaños, los amplicones digeridos generalmente son resueltos por electroforesis (Liu *et al.*, 2016).

El análisis de la variación del RFLP en los genomas fue una herramienta crucial en el mapeo del genoma humano y en el análisis de enfermedades genéticas (Vignal *et al.*, 2002). Para determinar la ubicación cromosómica de un gen de una enfermedad particular, las muestras de ADN se analizan para detectar alelos RFLP que muestren un patrón de herencia similar al de la enfermedad (Cortés-López *et al.*, 2020). Una vez localizado el gen de la enfermedad, el análisis RFLP de otras familias revelaría quiénes estaban en riesgo de padecer la enfermedad o quiénes eran probablemente portadores de los genes mutantes (Sharma *et al.*, 2016). Esta técnica fue el primer marcador molecular utilizado para detectar variabilidad genética en los organismos. Además, se usó para realizar el primer esfuerzo a gran escala en el mapeo del genoma humano (Vignal *et al.*, 2002). Los marcadores RFLP son altamente reproducibles (Mburu y Hanotte, 2005). No obstante, una de las limitaciones de los marcadores RFLP es que consumen mucho tiempo y las enzimas de restricción tienden a ser costosas.

4.10 Estimadores clásicos de diversidad genética a partir de datos moleculares.

La cuantificación de la variación genética en poblaciones es muy importante para comprender los efectos del apareamiento y la selección, pero lo más importante es conservación de recursos genéticos (Woolliams y Toro, 2007). Dados los avances en el análisis genético poblacional computacional, diversas estrategias de métodos para analizar la diversidad molecular a en la determinación genética estimadores como las frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o), desequilibrio de Hardy - Weinberg y el coeficiente de endogamia (F_{is}) siguen siendo norma de oro en el análisis de los recursos genéticos ganaderos (Martínez-Velázquez *et al.*, 2021).

4.10.1 Frecuencias alélicas. La definición de frecuencias alélicas se refiere a la proporción relativa de diferentes variantes alélicas de un gen en una población. Cada gen tiene múltiples formas alternativas llamadas alelos, y las frecuencias alélicas indican la prevalencia de cada alelo en la población (Lewontin, 1974). Por su parte Chon *et al.* (2021), las define como la proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de alelos que un gen puede tener en una población.

Las frecuencias alélicas son importantes debido a su relación con la diversidad genética de una población. Cuanto mayor sea la diversidad alélica, mayor será la capacidad de adaptación de la población a cambios ambientales y enfermedades (Hartl y Clark, 2007). Por el lado contrario la deriva genética por un proceso aleatorio que puede causar cambios significativos en las poblaciones pequeñas pudiendo llevar a una pérdida de diversidad genética y a la fijación de alelos, lo que puede afectar la capacidad de la población para adaptarse a futuros cambios ambientales (Frankham *et al.*, 2014). Las frecuencias alélicas también pueden influir en la expresión de rasgos fenotípicos y en la susceptibilidad a enfermedades.

En el caso de la identificación de polimorfismos en ganado de doble propósito, las frecuencias alélicas son relevantes porque permiten evaluar la variabilidad genética de la población. Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia de ADN que pueden estar asociadas con características deseables, como mayor producción de leche o carne. Al conocer las frecuencias alélicas de los polimorfismos en la población de ganado de doble propósito, los criadores pueden seleccionar animales con alelos favorables para mejorar la producción y la calidad de la carne y la leche (Da Fonseca *et al.*, 2019).

4.10.2 Heterocidad observada y esperada. Otro parámetro común en la mayoría de los análisis moleculares de la genética animal son la heterocidad, también conocida como diversidad genética. Shete y Elston, (2000), definieron la heterocidad como la probabilidad de que un individuo elegido aleatoriamente de la población es heterocigoto en un locus. Las medidas de heterocidad varían entre 0 y 1. Si bien los valores altos de heterocidad sugiere una alta variación genética, los valores bajos indican una baja variación genética (Mpfu *et al.*, 2011). Según se informa, la diferencia en la heterocidad observada y esperada indica un apareamiento no aleatorio (Mburu y Hanotte, 2005) y la selección de loci de alta heterocidad (cerca de 0.50) proporciona el mayor poder para el análisis de parentesco (Morin *et al.*, 2004). La heterocidad se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$H = 1 - \sum_i^K P_i^2$$

Donde P_i es la frecuencia de la i th del alelo k

El nivel observado de heterocidad generalmente se compara con el nivel esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

4.10.3 Equilibrio Hardy-Weinberg. La ley HWE predice que la variación genética (frecuencias genotípicas) permanecerá en equilibrio (permanecerá igual) de generación tras generación en ausencia de factores perturbadores como la selección natural, el apareamiento no aleatorio y la división de la población en subgrupos (Hardy, 1908; Mayo, 2008).

El desequilibrio de Hardy-Weinberg es una desviación de las frecuencias genotípicas esperadas en una población en equilibrio genético. Es importante en los estudios de ganado de doble propósito porque puede proporcionar información sobre la estructura genética de la población y revelar la presencia de factores selectivos o eventos históricos que han afectado la distribución de los alelos (Lachance, 2009). Como se mencionó anteriormente puede indicar la presencia de selección natural o artificial en la población. Si se observa un desequilibrio significativo, puede sugerir que ciertos alelos están siendo favorecidos o desfavorecidos en términos de adaptación a las características de producción de carne y leche (Portela y Huerta, 2007).

Además, el desequilibrio de Hardy-Weinberg también puede ser utilizado para evaluar la diversidad genética de la población de ganado de doble propósito. Si se encuentra un desequilibrio significativo, puede indicar una disminución en la variabilidad genética, lo que podría tener implicaciones para la salud y la capacidad de adaptación de la población (Contreras-Rodríguez, 2018).

4.10.4 El contenido de información del polimorfismo (PIC). El PIC es similar al índice de heterocigosidad, pero resta la probabilidad de apareamiento no informativo. PIC es una medida de qué tan informativo es un marcador en el análisis de diversidad genética de razas comúnmente utilizadas en el análisis de ligamiento (Botstein *et al.*, 1980).

5.10.5 Coeficiente de endogamia. El parámetro (F_{is}) se refiere a individuos dentro de una subdivisión, también se conoce como coeficiente de endogamia y es un indicador de endogamia ya que mide la deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio en una población

(Weir y Cockerham, 1984). El índice de fijación varía de 0 a 1, lo que indica no diferenciación y diferenciación máxima respectivamente (Ojango, 2011). El Fis permite evaluar el nivel de homocigosidad dentro de una población. Un alto Fis indica una mayor proporción de individuos homocigotos, lo que puede ser indicativo de una pérdida de diversidad genética (Muñoz *et al.*, 2015).

La endogamia puede llevar a la depresión endogámica, que se manifiesta en la disminución de la fertilidad, resistencia a enfermedades y otros rasgos vitales. Medir Fis ayuda a identificar poblaciones en riesgo y permite a los criadores implementar estrategias de manejo genético para minimizar estos efectos negativos, asegurando una producción eficiente y sostenible (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2015).

Un adecuado manejo del coeficiente de endogamia permite mejorar características tanto productivas (como la cantidad y calidad de la leche y carne) como adaptativas (resistencia a enfermedades y adaptación a diferentes entornos). Esto es especialmente importante en sistemas de producción doble propósito donde se requiere un equilibrio entre diversas capacidades productivas (Muller *et al.*, 2015).

5.11 Estudios del gen *BoLA DRB3.2*.

Existen antecedentes del estudio de este gen donde asocian los alelos del gen *BoLA-DRB3* con la infección natural de *Babesia spp.* en el ganado criollo Hartón del Valle. Previamente en un trabajo anterior identificaron los alelos presentes en la región de Hartón del Valle y continuando las investigaciones caracterizaron como resistentes (R), susceptibles (S) o neutrales (N) y a los individuos genotipados según la clasificación de sus alelos como: N/N, N/R, N/S, R/R, R/S y S/S, obtenido los siguientes porcentajes: individuos con genotipos homocigotos N/N, R/R y S/S fueron del 40.3 %, 19.4 % y 1.6 % respectivamente. Los genotipos heterocigotos N/R, N/S, y R/S presentaron frecuencias de 30.4 %, 7.3 % y 1 % respectivamente. Se concluye que algunos

alelos *DRB3.2* en el ganado criollo Hartón del Valle le confieren resistencia a la infección con *B. bigemina* (Bolaños *et al.*, 2017).

Así mismo, Vallejo *et al.*, (2011) asociaron alelos del gen *BoLA-DRB3.2* con la resistencia y susceptibilidad a mastitis en vacas lecheras. Encontrando 34 genotipos diferentes compuestos por 27 alelos, de los cuales 6 son nuevos y 21 previamente reportados. Los alelos *1801, *14011 y *4802 fueron los más frecuentes en las poblaciones analizadas, siendo de gran importancia pues reportan asociación a mastitis y resistencia a garrapatas. Zambrano *et al.* (2011) Identificaron genes *BoLA-DRB3.2* en vacas raza Holstein y cruces de Brahman x Holstein donde fueron identificados 27 alelos mediante PCR-RFLP encontrando frecuencias alélicas desde 0.8 hasta 15.9 % en la raza Holstein y desde 2 hasta 20 % en BxH. El alelo más frecuente en los dos grupos fue el alelo *23. El alelo *33 fue asociado con resistencia a esta misma enfermedad.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1 Ubicación.

Las muestras para este estudio se colectaron en nueve ranchos de comunidades pertenecientes a los municipios de Chacaltianguis Veracruz, Loma Bonita, Oaxaca, San Juan Lalana, Oaxaca y San Juan Bautista, Tuxtepec Oaxaca, en una zona agroecológica correspondiente de trópico húmedo y trópico seco (Cuadro 1) y sitios de muestreo donde la ganadería bovina es de doble propósito (leche y carne) cruza de razas europeas e indicas.

Cuadro 1: Características y coordenadas de las comunidades de los ranchos muestreados.

Municipio	Clima	Comunidad	Rancho	n	Ubicación geográfica		
					Longitud	Latitud	Altitud (msnm)
San Juan Bautista	Cálido – Húmedo	El Porvenir	1	20	96°22'44.47 W	18°15'14.26 N	41
Tuxtepec, Oaxaca		Zacate Colorado	2	15	96°11'21.477W	18°08'56.266 N	16
		El Palmar	3	15	96°17'88.89 W	18°12'72.22 N	20
San Juan Lalana, Oaxaca	Cálido	San Juan Rio Manso	5	10	95°52'48.603 W	17°40'11.255 N	77
San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca	Cálido – Húmedo	Benemérito Juárez	4	20	96°00'05.24 W	18°11'38.22 N	19
Chacaltianguis, Veracruz	Monzónico Cálido- Húmedo	Mata de Caña	6	20	95°50'17.170 W	18°12'48.594 N	10
Loma Bonita, Oaxaca	Cálido - Húmedo	San Benito el Encinal	7	15	95°54'32.342 W	17°59'11.888 N	90
			8	10	95°51'33.342 W	18°01'19.8 N	26
		Loma Bonita	9	10	95°87'59.532 W	18°02'91.876 N	44

msnm: metros sobre el nivel del mar. n: Numero de muestras recolectadas. Fuente: INEGI, 2022.

La extracción del ADN y amplificación del exón 2 del gen *BoLA-DRB3* se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Animal en el Centro de Investigaciones Científicas (CIC) de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec.

5.2 Obtención de muestras.

Se tomaron 135 muestras de sangre de la vena coccígea (5-7 mL) en tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante y fueron identificadas al momento del muestreo. Las muestras fueron depositadas en una hielera térmica con una temperatura de 2 - 8 °C para posteriormente, ser transportadas al Laboratorio de Biotecnología Animal, en el Centro de Investigaciones Científicas de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec donde se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta su procesamiento. Los criterios para incluir a los animales en el muestreo fueron los siguientes: que tuvieran una apariencia externa característica de cruce de alguna raza *Bos taurus* por alguna raza *Bos indicus* y que estuvieran clínicamente sanos.

5.3 Extracción de ADN.

El ADN fue extraído con el kit Quick-DNATM Universal Kit de la marca ZYMO RESEARCH® siguiendo las especificaciones del fabricante.

Los aislamientos de ADN fueron evaluados para determinar su rendimiento, pureza y concentración de ADN de las muestras midiendo la relación de las longitudes de onda A260/A280 con un espectrofotómetro Nanodrop 2000TM Thermo Scientific®. Los resultados obtenidos fueron corroborados mediante electroforesis en una cámara ENDURO™ (Electrophoresis systems). Se elaboró un gel de agarosa al 0.8 % y se cargaron en los pozos 5 µL de muestra combinados con 3 µL de buffer de carga. La electroforesis se programó a 120 Volts por 30 minutos. pasado ese tiempo, se realizó la tinción del gel en bromuro de etidio con una concentración de 0.1 mg/µL por 5 minutos y se observó en un sistema de foto documentación (Vilber®, modelo Bio-Print).

5.5 Amplificación del gen *BoLA-DRB3.2* por la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR).

Las amplificaciones del segundo exón del gen *BoLA-DRB3*, se obtuvieron por un protocolo de PCR de dos pasos (semi-anidado) (Van Eijk *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*,

2011; Lopez-Herrera *et al.*, 2016). Inicialmente se hizo una revisión de literatura para identificar los oligonucleótidos más usados en los estudios del gen *BoLA-DRB3.2* en bovinos seleccionándose los oligonucleótidos HLO30, HLO31, HLO32 (Van Eijk *et al.*, 1992; Villanueva, 2011; Vallejo *et al.*, 2014; Baltian *et al.*, 2016). Posteriormente se mandaron a sintetizar a la empresa T4OLIGO. Los oligonucleótidos se resuspendieron y se procedió a determinar si existía amplificación. La información referente a los iniciadores empleados en este estudio se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del exón 2 del gen *BoLA-DRB3* en bovinos (Martínez *et al.*, 2006; Villanueva, 2011; Vallejo *et al.*, 2014; Baltian *et al.*, 2016).

Oligonucleótido	Secuencia	<i>T_M</i>	No. de bases
HLO30 <i>Forward</i>	5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3'	65.2	24
HLO31 <i>Reverse</i>	5' TTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'	69.5	25
HLO32 <i>Reverse</i>	5'- TCGCCGCTCAGTGAAACTCTC -3'	63.2	22

T_m: temperatura de alineamiento ajustada, No: número de bases

En la primera reacción de amplificación se usaron los oligonucleótidos HLO30 y HLO31, en 25 µL de mezcla total donde: 12.5 µL mezcla de reacción comercial “Dream Taq PCR mix máster 2X”, 1.3 µL del oligonucleótido HLO30 como Forward (F) en una concentración de 1 µM, 1.3 µL del oligonucleótido HLO31 como Reverse (R) en una concentración de 1 µM, 6.5 µL de agua desionizada de grado molecular y 2 - 4 µL de muestra de extracción (60 - 80 ng de concentración ADN molde) de muestra de su respectiva extracción. El protocolo de PCR de la primera reacción se indica en el cuadro 3. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador modelo T-100® (Thermal Cycler BIO-RAD).

Cuadro 3: Programa de la primera reacción de PCR semi-anidada

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	94	4	1
2. Ciclos			
a. Desnaturalización	94	1	20
b. Alineación	60	2	
c. Extensión	72	1	
3. Extensión final	72	5	1

Para la segunda reacción se tomaron 5 µL del producto de la primera reacción de PCR como molde y se usaron los oligonucleótidos HLO30 Forward (F) y HLO32 Reverse (R) en 60 µL de mezcla total donde: 30 µL mezcla de reacción comercial “Dream Taq PCR mix máster 2X”, 2 µL del primer HL030 (F) en una concentración de 1 µM, 2 µL del primer HLO32 (R) en una concentración de 1 µM, 20 µL de agua desionizada de grado molecular. El protocolo de PCR de la segunda reacción se indica en el cuadro 4, todas las reacciones se realizaron en un termociclador modelo T-100® (Thermal Cycler BIO-RAD).

Cuadro4: Programa de la segunda reacción de PCR semi-anidada.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
1. Desnaturalización inicial	94	4	1
2. Ciclos			
a. Desnaturalización	94	1	35
b. Alineación	65.5	30 segundos	
c. Extensión	72	1	
3. Extensión final	72	5	1

Las reacciones de PCR fueron sometidas a electroforesis en geles agarosa al 2 %. La electroforesis se llevó a cabo con TAE al 1X como buffer de corrimiento. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN se cargó en el primer pozo 3 µL de marcador de peso de 50 pb (NZY DNA Ladder VI) y en el resto de los pozos se cargaron 5 µL de productos de la segunda PCR. La electroforesis se realizó a 100 volts por 70 minutos. Los geles fueron teñidos en bromuro de etidio a una concentración de 0.1 mg/µL por 5 minutos y se observó en un sistema

de foto documentación (Vilber®, modelo Bio-Print). Las imágenes de los geles fueron procesadas mediante el programa BioVision.lnk. Las reacciones de PCR se conservaron a menos 20 grados centígrados hasta el proceso de digestión con enzimas de restricción.

5.6 Obtención de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) mediante digestión con enzimas de restricción.

Para las digestiones, se usaron las enzimas RsaI, BstYI y HaeIII de la marca New England BioLabs® Inc. La digestión del fragmento amplificado se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL para cada enzima con cada muestra. Se utilizaron 17 µL del producto de PCR de la segunda reacción como ADN, para la digestión con 0.5 µL de enzima de reacción equivalente a 5 unidades de enzima, 2.5 µL de 10x NEbuffer y 1 µL de agua desionizada de grado molecular. Incubándose a diferentes grados y modificando el tiempo recomendado por del fabricante a 90 minutos (1: 30 horas) para las tres enzimas (Cuadro 5). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador modelo T-100® (Thermal Cycler BIO-RAD).

Cuadro 5: Condiciones para la digestión con enzimas de restricción RsaI, BstYI y HaeIII.

Enzima	Componentes	Volumen µl	Temperatura	Tiempo
RsaI	ADN	17 µL	37 °C	90 minutos
BstYI	NEBuffer	2.5 µL	60 °C	90 minutos
HaeIII	Enzima	0.5 µL	Activación 37 °C	90 minutos
	Agua desionizada	1 µL	Inactivación 80 °C	20 minutos

µL: microlitros.

Las muestras digeridas se cargaron en electroforesis en geles de agarosa (Gilliespie *et al.*, 1999; Zambrano *et al.*, 2011; López-Herrera *et al.*, 2016). La electroforesis se realizó en una cámara ENDURO™ (Electrophoresis systems). Las digestiones se cargaron en geles de agarosa al 4 %. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN, se utilizó un marcador de peso de 50 pb depositando en el primer pozo 4 µL de marcador de peso (NZY DNA Ladder VI) y en el

resto de los pozos con 20 μL de productos de digestión correspondiente de cada enzima, corriéndose a 90 Volts por 120 minutos y fueron teñidos con bromuro de etidio 0.1 mg/ μL por 10 minutos.

La identificación de los alelos se realizó siguiendo la metodología descrita por (Van Eijk *et al.*, 1992; Maillard *et al.*, 1996; Gilliespie *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2014; Lopez-Herrera *et al.*, 2016) a partir de los diferentes patrones de enzimas de restricción y la nomenclatura del 5th BoLA workshop (BoLA Nomenclature, International, Society for Animal Genetics) (www2.ri.bbsrc.ac.uk/bola/dr3pcr.htm), Anexos 3 y 4

5.7 Secuenciación de muestras representativas.

Se seleccionaron 9 muestras que presentaron mejor calidad en la cuantificación de ADN como calidad en la electroforesis después de la digestión. Se purificaron los productos de PCR de cada muestra seleccionada con el Kit de extracción QIAquick. Los productos purificados por columnas debían cumplir con una concentración mínima de 25 ng por μL , por lo que se midió la relación de las longitudes de onda A260/A280 con un espectrofotómetro Nanodrop 2000TM Thermo Scientific®. Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar mediante la técnica de secuenciación de Sanger, por un extremo al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-Irapuato (LANGEBIO).

Los resultados de las secuencias se procesaron en el programa MEGA para eliminar el ruido y posteriormente se alinearon. Las secuencias procesadas y alineadas fueron introducidas en un BLASTn de la base de datos oficial IPD-MHC BoLA: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/blast/>.

5.8 Análisis estadístico

Se asignó el genotipo a cada animal de acuerdo con los resultados obtenidos. Para el cálculo de las frecuencias alélicas (A1, A2, A3) y genotípicas (A1A1, A1A2, y A3A3), del gen *BoLA-DRB3* exón 2, se realizó mediante la ecuación de Equilibrio de Hardy-Weinberg de tres alelos o más.

$$(p + q+r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2pq + 2qr$$

En donde los 3 primeros términos de la derecha correspondientes a los homocigotos A1 A1, A2 A2, A3 A3 y el resto a los heterocigotos A1 A2, A1 A3 y A2 A3.

La ecuación anterior es generalizable a un número K de alelos, A1, A2... Ak de acuerdo con $(P1 + P2 + P3+... Pk)^2$

Mediante el modelo estadístico de X^2 (ji cuadrada), se comprobó si la población se encontraba en equilibrio, con el programa estadístico CERVUS versión 3.07. (Koshiishi *et al.*, 2021)

5.8.1 Frecuencias alélicas y genotípicas. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron estimadas por conteo directo, determinando la proporción de cada polimorfismo del gen entre el número de copias totales de la población en estudio. Se identificaron los homocigóticos (dos copias del mismo alelo) y los heterocigóticos (una copia de cada alelo) y se calculó la frecuencia de cada alelo contando los homocigotos y añadiendo la mitad de los heterocigotos, con el método descrito por Laird y Lange (Laird y Lange, 2011).

5.8.2 Estadísticos descriptivos. Se calculó la heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e), la desviación del Equilibrio Hardy- Weinberg utilizando el programa Genepop versión 1.4, Este programa permite analizar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones para datos diploides de marcadores codominantes (Baltian y Giovambattista, 2022). y el coeficiente de endogamia (F_{is}) con el programa Fstat (Rousset, 2008).

Para el análisis de los datos, fue necesario crear una carpeta donde se crearon otras subcarpetas, una carpeta con los datos en Excel guardando una copia en formato de texto separado por tabulaciones; otra con los datos en el que archivo de texto fue reconocido por el programa CERVUS; otra para el programa Genepop en la que reconoció el archivo obtenido por CERVUS y otra con los datos ya corridos por CERVUS y Genepop y convertidos en formato .data para el programa Fstat.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Amplificaciones del *BoLA-DRB3*.

Los fragmentos correspondientes al segundo exón del gen *BoLA-DRB3* de las poblaciones de ganado doble propósito de los sitios de muestreados en la región del Papaloapan variaron desde los 274 pares de bases hasta los 325 pares de bases; a los extremos izquierda, derecha y centro se presenta el marcador de peso (M) ver Figura 5 y Figura 6, donde se muestran los amplicones y la digestión con las enzimas de restricción del exón 2 del *BoLA-DRB3*, logrando amplificar un total de 118 muestras de las 135 recolectadas.

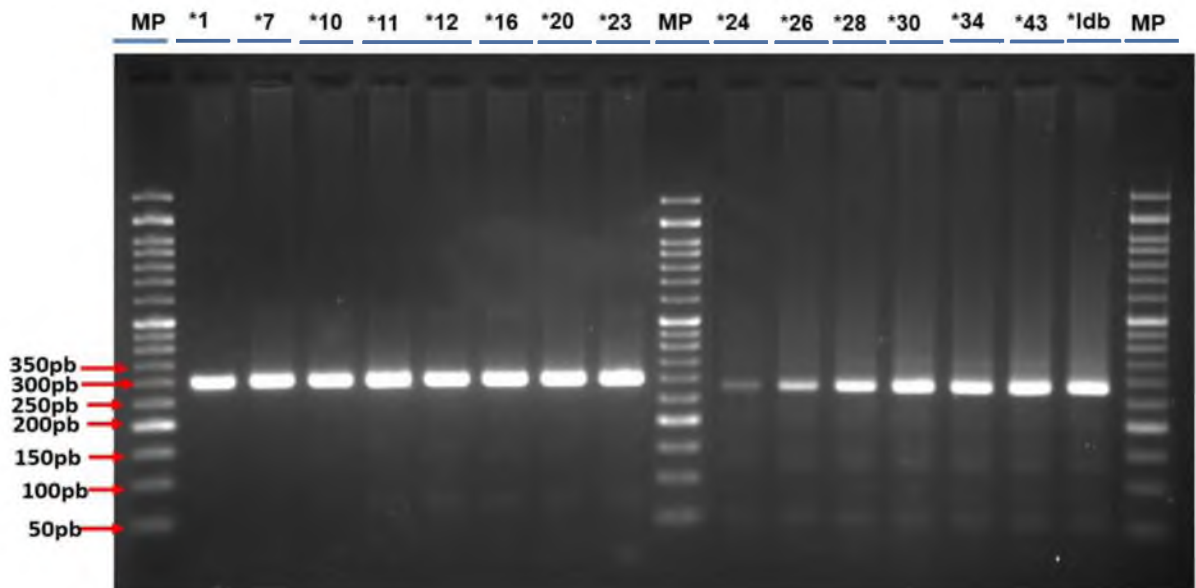


Figura 5: Electroforesis de amplicones de PCR correspondiente al segundo exón del gen *BoLA-DRB3*. MP= marcador de peso marcador NZY DNA Ladder V.I., a= alelo y numero de alelo.

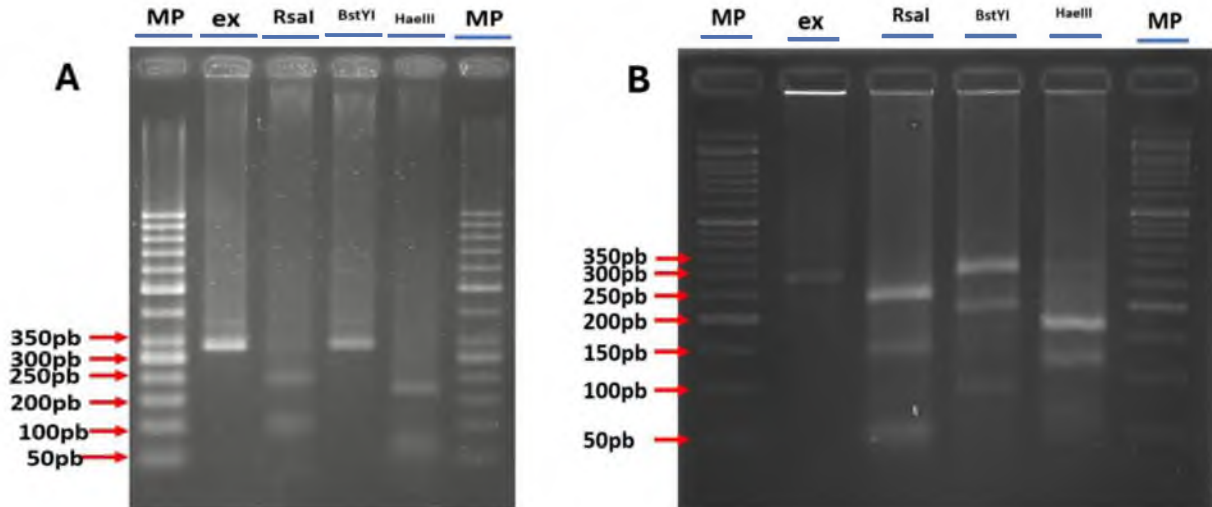


Figura 6: Electroforesis de productos de digestión. Alelo 24 (A) y Alelo 10 (B). MP: marcador de peso NZY DNA Ladder V.I; ex: Exón 2; enzimas: RsaI, BstYI y HaeII.

El tamaño de las amplificaciones, encontrados en este trabajo son similares con Paswan y colaboradores, que en 2005 trabajaron con bovinos y búfalos en India; Martínez *et al.* (2006), trabajaron con ganado Holstein cruzado con Brahman; Parnian *et al.* (2006) y Portillo *et al.* (2006), trabajaron con ganado criollo en México; Tamoorepur *et al.* (2007) y Sadeghi *et al.* (2008), trabajaron con ganado Sistani de Irán, en estas investigaciones utilizaron los iniciadores HLO30, HLO31 y HLO32 con el mismo número de pares de bases reportado por Van Eijk (1992). Todos ellos, reportan fragmentos del exón 2 con un tamaño que va de los 284 a los 294 pares de bases.

En otras investigaciones que emplearon los mismos iniciadores utilizados en este estudio, específicamente HLO30 y HLO31, se observó una variación en el tercer iniciador, HLO32, con una diferencia de 5 pares de bases. Esta variación es consistente con los hallazgos reportados por Fernández *et al.* (2008) en estudios con ganado criollo en México; Hernández *et al.* (2014) en razas de ganado criollo colombiano; y Zambrano *et al.* (2016) en ganado BON y cruces de BON con Holstein en Colombia. Estos estudios reportaron amplicones del exón 2 con tamaños que oscilan entre 284 y 305 pares de bases.

En otros estudios sobre el exón dos del *BoLA-DRB3* con iniciadores Bod1, Bod2 y PASA, donde Maillard *et al.* (1999) y Maillard *et al.* (2003), reportaron tamaños similares de 304 pares de bases en razas Cebú de la isla de Martinica; otros juegos de iniciadores como LA31 y LA32 utilizados por Behl *et al.* (2007) y Behl *et al.* (2009), también reportan tamaños similares del de 304 pares de bases en ganado Kankrej y Sahiwal.

Las diferencias encontradas en los tamaños de los exones en las diversas investigaciones pueden ser atribuidas a varios factores, entre ellos, el uso de diferentes tamaños en los oligonucleótidos.

6.2. PCR-RFLP.

Una vez amplificados los fragmentos del gen *BoLA-DRB3* exón 2 y ser digeridos por las enzimas de restricción, la evaluación de la electroforesis mostró que los productos de digestión formaron 41 genotipos diferentes (77 individuos heterocigotos y 41 individuos homocigotos) como se muestran en el cuadro 6, compuestos por 27 variantes alélicas diferentes (cuadro 7). Con esto se determinó que el 66% de los individuos evaluados fueron heterocigotos y solo el 34 % fueron homocigotos.

Cuadro 6: Genotipos detectados en este estudio por PCR-RFLP en cruzas de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.

Homocigoto	Número de copias	Heterocigoto	Número de copias
aaa	0	aaa/obb	2
ecc	4	ecc/obb	14
fba	1	fba/oba	4
gea	5	gea/iba	2
haa	2	-----	0
jbd	2	jbd/oba	3
lbb	1	lbb/obb lbb/kbf	2 4
nba	2	-----	0
nbb	0	nbb/obb	2
oab	2	oab/obb	5
obb	3	obd	2
qcc	1	qcc/kbf qcc/oba	1 3
lab	4	lab/obb	7
kbf	2	-	0
ldb	3	ldb/kbf	12
dga	3	dga/obb	2
kac	2	kac	7
lai	2	lai/kbf lai/wbe	2 1
naa	1	naa/nbf	1
nab	1	nab/jbd	1
Homocigotos totales	41	Heterocigotos totales	77

Cuadro 7: Alelos detectados en este estudio bajo la nomenclatura de PCR-RFLP de Van Ejik en cruces de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.

Alelo	DRB3.2 PCR-RFLP	RsaI, BstYI, HaeIII	Número de copias totales
DRB3*0501			
DRB3*0503	*1	aaa	2
DRB3*0201	*7	ecc	18
DRB3*1601			
DRB3*1602	*10	fba	5
DRB3*0901			
DRB3*0902	*11	gea	7
DRB3*1202			
DRB3*1701			
DRB3*1702			
DRB3*3201	*12	haa	2
DRB3*3202			
DRB3*3203			
DRB3*1501			
DRB3*1502	*16	jbd	5
DRB3*2301			
DRB3*2901	*20	lbb	7
DRB3*3601			
DRB3*2703			
DRB3*2705			
DRB3*2706	*23	nba	2
DRB3*2707			
DRB3*0101			
DRB3*0102	*24	nbb	2
DRB3*0601	*26	oab	7
DRB3*0701	*28	obb	5
G E	*30	qcc	5
DRB3*3001			
DRB3*3002	*34	Lab	11
DRB3*25012	*43	kbf	2
N S1	ns	ldb	15
N S2	ns	dag	5
N S3	ns	kac	9
N S4	ns	lai	5
N S5	ns	naa	2
N S6	ns	nab	2
Ns 7	ns	obd	2
Alelos totales			118

Ns: combinación de cortes no reportados por RFLP

6.3 Frecuencias alélicas del gen *BoLA-DRB3.2* por PCR-RFLP.

En este estudio fueron identificados 27 alelos *BoLA-DRB3.2* con un rango de frecuencias de 0.0085 - 0.178 siendo los alelos más frecuentes el 28, el 43 y el 17 con frecuencias que van de 0.178, 0.1017 y 0.0932, respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro 8: Frecuencias alélicas del gen *BoLA-DRB3.2* en cruzas de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.

DRB3.2 PCR- RFLP	RsaI, BstYI HaeIII	Frecuencia alélica observada	Frecuencia acumulada	DRB3.2 PCR- RFLP	RsaI, BstYI HaeIII	Frecuencia alélica observada	Frecuencia acumulada
1	aaa	0.0085	0.0085	33	nbf	0.0042	0.5676
7	ecc	0.0932	0.1017	34	lab	0.0636	0.6312
10	fba	0.0254	0.1271	37	oba	0.0424	0.6736
11	gea	0.0508	0.1779	43	kbf	0.1017	0.7753
12	haa	0.0169	0.1948	49	wbe	0.0042	0.7795
15	iba	0.0085	0.2033	Ns 1	ldb	0.0763	0.8558
16	jbd	0.0339	0.2372	Ns 2	dag	0.0339	0.8897
20	lbb	0.0339	0.2711	Ns 3	kac	0.0466	0.9363
23	nba	0.0169	0.2880	Ns 4	lai	0.0297	0.9660
24	nbb	0.0085	0.2965	Ns 5	naa	0.0127	0.9787
26	oab	0.0381	0.3346	Ns 6	nab	0.0127	0.9914
27	obf	0.0254	0.3600	Ns 7	obd	0.0085	1000
28	obb	0.178	0.5380				
30	qcc	0.0254	0.5634		Total	1000	

Ns: combinación de cortes no reportados por RFLP

La cantidad de alelos encontrados es superior que lo reportado por Castro y Duran, (2006) quienes encontraron 24 alelos por amplificación con PCR y geles de poliacrilamida, encontrando frecuencias alélicas desde 0.02 hasta 0.26 en 140 animales. También hallaron que el alelo más frecuente era el 11; sin embargo, en el presente estudio solo tuvo una frecuencia fue de 0.05. Así mismo, estos valores resultan significativamente más bajos que los reportados por Martínez *et al.* (2005), quienes reportaron 64 alelos en estudios realizados en ganado criollo Blanco Orejinegro, Brahman y cruzas de Blanco Orejinegro con Brahman. Por otro lado, Hernández *et al.* (2015), reporta 41 alelos encontrados en 360 animales donde estudiaron 240 individuos de razas criollas, 60 individuos de razas sintéticas y 60 razas foráneas. Otro estudio

hecho por Zambrano *et al.* (2014), reportan una cantidad similar de 27 alelos, en una población de 99 individuos raza Holstein, ganado criollo Blanco Orejinegro y cruza de Holstein con Blanco Orejinegro, sin embargo, el porcentaje de individuos heterocigotos fue un 79 % superior y homocigotos un 21 % inferior a los obtenidos en este estudio, por su parte Vallejo *et al.* (2014), reportan igualmente 27 alelos diferentes conformando un total de 34 genotipos. Mientras que, Baltian *et al.* (2011), obtuvieron una variación alélica inferior donde detectaron en población de ganado Holstein, conformada por 36 individuos, a 21 alelos del exón 2 del gen *BoLA-DRB3* con un rango de frecuencia de 0.014 a 0.222. Otro estudio por Baltian *et al.* (2016), realizado en 82 animales de la raza Holstein por medio de PCR-RFLP como en el de este estudio en la provincia de La Pampa, Peru, identificaron 17 alelos: *6, *8, *10, *11, *15, *16, *20, *21, 22, *23, *24, *25, *27, *28, *36, y *37, obtuvieron frecuencias que oscilaron entre 0.25 y 0.97. Esto confirma que incluso en poblaciones con baja cantidad de individuos analizados, el gen *BoLA-DRB3.2* muestra un alto polimorfismo.

6.3 Alelos *BoLA-DRB3.2* reportados con asociación de resistencia a patologías de interés en ganado bovino

Los genes del MHC resultan especialmente de interés para algunos criadores de animales e investigadores ya que están vinculados con la resistencia o vulnerabilidad a una amplia variedad de enfermedades. Diversos estudios han investigado la relación entre los alelos del gen *BoLA-DRB3.2* a enfermedades infecciosas.

Los alelos encontrados en este estudio han sido asociados por diferentes trabajos a resistencia a enfermedades infecciosas de interés bovino y a ectoparásitos el cual fue el principal interés de este trabajo: con resistencia a garrapatas los alelos *8, *16, *20, *23, *24 y *27 (Martínez *et al.*, 2006); *23, *26 y *31 asociados con resistencia a Brucelosis (Martínez *et al.*, 2005); Los alelos *11, *23 y *28 con la ausencia de linfocitos persistente (Panei *et al.*, 2009); Los alelos *11 y

*12 con una baja carga proviral del virus de la leucosis bovina (Juliarena *et al.*, 2008) y a mastitis clínica como subclínica los alelos *3, *11, *31 y *33 (Zambrano *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2006). Por otra parte, Baltian *et al.* (2016), reportaron los alelos *22, *23 como susceptibles para leucocis bovina.

6.4 Estadístico genéticos descriptivos.

Mediante el software Cervus, se obtuvo la heterocigosidad observada (Ho), la heterocigosidad esperada (He) e información polimórfica (PIC) de la población general. La (Ho) fue menor que la (He), el valor encontrado para la Ho fue 0.6610, y para la He fue de 0.9267, el PIC fue de 0.9181. Se obtuvo un promedio de Fis para los nueve ranchos, lo que se reflejó en un coeficiente de endogamia (Fis), de 0.2308 ($p < 0.05$) y en una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) de 0.1138 ($p < 0.001$). Los resultados en todas las poblaciones para los alelos del gen *BoLA-DRB3.2* indicó que todos los ranchos exhibieron niveles de polimorfismo de moderados a altos (Cuadro 9).

Cuadro 9: Valores de Equilibrio Hardy - Weinberg, Desviación estándar (S.E), índice Weir & Cockerham (W&C) y estimación de endogamia (Fis).

Población	HWE p-val	S.E.	W&C	Fis
Rancho 1	0.0022	0.0008	0.2981	0.298
Rancho 2	0.0035	0.0013	0.4485	0.448
Rancho 3	0.0314	0.0043	0.1676	0.168
Rancho 4	0.0611	0.0083	0.4167	0.417
Rancho 5	0.0717	0.0065	0.0403	0.04
Rancho 6	0.4942	0.0086	0.0909	0.091
Rancho 7	0.125	0.0063	0.1613	0.161
Rancho 8	0.2153	0.0146	0.1787	0.179
Rancho 9	0.0206	0.0034	0.2755	0.276
promedios	0.1138	0.0060	0.2308	0.2308

Un estudio realizado por Bolaños y Álvarez, (2017), en ganado criollo de Hartón del Valle, reportaron valores de Ho (0.82), menor que la He (0.93), el valor de Fis fue de 0.110 y un HWE de 0.0001, siendo la Ho y Fis superior a la de este estudio, sin embargo, la He, siendo similar al reportado en este estudio, igualmente otra investigación de Hernández *et al.* (2015), con ganado criollo de Hartón del Valle, reportaron una Ho de 0.897, una He de 0.928 y un valor Fis de 0.033.

6.4.1 Frecuencia de cada alelo por rancho. Con la obtención de Fis permitió comparar las frecuencias de cada alelo por rancho muestreado (cuadro 10) esto nos permitió detectar que el alelo 28 se encontró presente en los ranchos muestreados de Mata de caña, Chacaltianguis; Loma Bonita, San Benito Encinal (Loma Bonita); Benemérito Juárez, el Porvenir, Zacate Colorado y el Palmar del municipio de Tuxtepec, excepto en la comunidad de San Juan Rio Manso, San Juan Lalana. El alelo 1 solo estuvo presente en la comunidad de Zacate Colorado. Los alelos *10 y *16, solo se presentaron en la comunidad de San Benito el Encinal. El alelo *12, *49 y Ns 4 solo se encontraron en el rancho 9 en Loma Bonita. Los alelos *15, *33, *54, Ns 5 y Ns 6 solo se encontraron en el rancho 4 en San Juan Rio Manso, San Juan Lalana. El alelo *23 se encontró solo en la comunidad de el Palmar. El alelo Ns 7 se encontró solo en el rancho 5 en Mata de caña de Chacaltianguis, Veracruz. El alelo *7 estuvo presente el rancho 1, 2, 3, 4, 6 y 8. En cuanto al alelo *43 se encontró en seis de los nueve ranchos excepto en los ranchos *4, *7 y *8. Uno de los alelos no reportado por RFL, N S1 estuvo presente en los ranchos *2, *3 y *6. El alelo *11 se encontró en cuatro de los nueve ranchos, estando presente en los ranchos 1, 3, 4 y 5. El alelo *34 se identificó solo en los primeros tres ranchos. El alelo *37 solo en los ranchos 2, 7 y 8. Por su parte el alelo *20 se reporta solo en los ranchos 1 y 5. Por otra parte, los alelos *26, *27 y el no identificado Ns 3 se encontraron solo en los ranchos 8 y 9 de Loma Bonita.

Las frecuencias de los alelos por rancho se muestran en el cuadro 10, donde se observa que en el rancho de San Juan del Rio, San Juan Lalana muestra 5 alelos diferentes que en el resto de los ranchos no se encuentran, esto se deba posiblemente, a la distancia geográfica que tiene con respecto a los demás ranchos muestreados.

Cuadro 10: Valores de las frecuencias de cada alelo DRB3.2 por rancho encontrados en los bovinos doble propósito en la Cuenca del Papaloapan.

Alelo	Rch 1	Rch2	Rch 3	Rch 4	Rch 5	Rch 6	Rch 7	Rch 8	Rch 9	Frcs
*1	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
*7	0.100	0.071	0.067	0.375	0.000	0.136	0.179	0.038	0.000	0.093
*10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	0.077	0.000	0.025
*11	0.133	0.000	0.133	0.125	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.051
*12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.143	0.017
*15	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
*16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.030
*20	0.133	0.000	0.000	0.000	0.143	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034
*23	0.000	0.000	0.133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
*24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.008
*26	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.269	0.071	0.038
*27	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.115	0.107	0.025
*28	0.267	0.143	0.200	0.000	0.214	0.227	0.179	0.154	0.143	0.178
*30	0.100	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025
*33	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004
*34	0.233	0.143	0.133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.064
*37	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.179	0.077	0.000	0.042
*43	0.033	0.143	0.167	0.000	0.321	0.136	0.000	0.000	0.107	0.106
*49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.004
*54	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004
Ns 1	0.000	0.214	0.167	0.000	0.179	0.136	0.000	0.000	0.000	0.081
Ns 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.364	0.000	0.000	0.000	0.034
Ns 3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.269	0.143	0.047
Ns 4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.03
Ns 5	0.000	0.000	0.000	0.188	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013
Ns 6	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004
Ns 7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008

Rch: rancho. Frcs: frecuencia total de cada alelo

6.5 Secuenciación

Una vez lograda la amplificación de los fragmentos del gen *BoLA-DRB3.2* con su correspondiente tamaño de pares de bases, se tomaron 9 alelos amplificados de las muestras que se observaron con mejor calidad y se enviaron al laboratorio del CINVESTAV-Irapuato (LANGEBIO). Las secuencias obtenidas fueron introducidas en un BLASTn de la base de datos oficial IPD-MHC BoLA: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/blast/>. Estas secuencias presentaron una identidad con el segundo exón del gen *BoLA-DRB3* que oscilaron entre 89 % y 99 %, en cuanto al número de pares de bases (bp), estas oscilaron entre 257 y 270 y valores máximos (SCORE) de entre 238 y 334 (Cuadro 11). Estos valores, aunque similares, fueron superiores a los reportados por Villalobos-Cortés y Rita-González, (2018) con un porcentaje de identidad entre 87% y 98 % de pares de bases (bp) de 148 y 239 y valores máximos de 165 y 339 de pb.

Cuadro 11: Valor máximo (score), y porcentaje de identidad (%) de alelos de secuencias obtenidas del gen *BoLA-DRB3.2* en cruza de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.

DRB3.2 PCR- RFLP	RsaI, BstYI HaeIII	ID de acceso	Nombre	Pares de bases	score	% de identidad
Ns 1	ldb	IPDMHCcads:BoLA09870	BoLA-DRB3*002:02	257	326	99 %
7	ecc	IPDMHCcads:BoLA10057	BoLA-DRB3*159:01	269	334	95 %
*16	jbd	IPDMHCcads:BoLA10171	BoLA-DRB3*017:07	267	276	96 %
*34	lab	IPDMHCcads:BoLA10168	BoLA-DRB3*017:05	270	315	95 %
*20	lbb	IPDMHCcads:BoLA09996	BoLA-DRB3*100:08	269	291	96 %
*28	obb	IPDMHCcads:BoLA03110	BoLA-DRB3*007:01	270	325	99 %
*23	nba	IPDMHCcads:BoLA10055	BoLA-DRB3*157:01	269	333	94 %
*34	lab	IPDMHCcads:BoLA10181	BoLA-DRB3*024:33	267	238	90 %
*11	gea	IPDMHCcads:BoLA10178	BoLA-DRB3*107:04	267	325	89 %

```

      10      20      30      40      50      60      70
BoLA-DRB3.2 *Ns1 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAG GG--- GATGCTCACTCTGATGCATTTTCTTACGGGACC
BoLA-DRB3.2 *7 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGTATTCTACGAATATAGTTCTTGGTGCTTTTCTACACGAGAAA
BoLA-DRB3.2 *16 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGTAT ---AGAAGATCATTCTGCATGCTTTGCCACACGAGAGC
BoLA-DRB3.2 *34 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGCAAT ---GTCAGCTCCTGAGGCATTTCTACACGAGAAC
BoLA-DRB3.2 *20 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGTATTC CGGGGATCGTTCTGGGG CATTTCCTGGCGAGAGC
BoLA-DRB3.2 *28 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGTATTC AGGAGTTATTCTTGTG ---CGTTGCGTGACGAGCAC
BoLA-DRB3.2 *23 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGTATTC GGAAACTCATTCCG ATGCTTTGCGTGACGAGAG C
BoLA-DRB3.2 *34.1 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGTAG ---AATGATCATTCTTATGCGTTT CTTACGAGTAC
BoLA-DRB3.2 *11 ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCCTGGAGTATTG CGAAGATCGCTCTGTG ---CTTTTCGTGACGGCA C

      110      120      130      140      150      160      170
BoLA-DRB3.2 *Ns1 ACTATAATGGAGAAGAGATCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTCCGGGGCGGTGACCGAGCTGGGG
BoLA-DRB3.2 *7 T TATAATGGAGAAGAGTTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGGGCGGTGACCGAGCTAGGG
BoLA-DRB3.2 *16 T TTCCATGGAAAAC TCCCGCGGCTTCAACAGCGACTGGGGCGAGTCCAGGCGGTGACCGAGCTGGGG
BoLA-DRB3.2 *34 TCTATCATGGAGAAGAGCGCGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGGGCGGTGACCGAGCTGGGG
BoLA-DRB3.2 *20 T TTC ATGGAGAAC GCTCGCGCGCTTCAACAGCGACTGGGGCGAGTACCGGGCGGTGACCGAGCTAGGG
BoLA-DRB3.2 *28 T TTTAATGGAAAAGAGTTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTCCGGGGCGGTGACCGAGCTAGGG
BoLA-DRB3.2 *23 T TATAATGGAGAAGAGTCCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTCCGGGGCGGTGACCGAGCTGGGG
BoLA-DRB3.2 *34.1 ACTTTAATGGAGAAGAGATCGCGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTCCGGGGCGGTGACCGAGCTGGGG
BoLA-DRB3.2 *11 T TTCCATGGAGAAGAGTTTCGTGCGCTTCGACAGCGACTGGGGCGAGTACCGGGCGGTGACCGAGCTAGGG

      210      220      230      240      250      260      270
BoLA-DRB3.2 *Ns1 GAAGAACATGCTGGAGGAGCAGCGGGCCCGGTGAAC TACTGCTGACAATACTACTACGGCGTGGGTGATT
BoLA-DRB3.2 *7 GGAGA ---TCCTGGAGCGGGCGCGGGCCCGGTGGACACG TACTGCAGACACAAC TACGGGGCGTGGAGA
BoLA-DRB3.2 *16 GAAGGACACCCTGGAGCGGGAGCGGGCCCTATGTGGACACG TACTGCAGACACAAC TACGGGGTCCGGGAGA
BoLA-DRB3.2 *34 GAAGGACATCCTGGAGCGGAAGCGGGCCCGGTGGACACG TACTGCAGACACAAC TACGGGGTCCGTGAGA
BoLA-DRB3.2 *20 GAAGGACTTGCTGGAGGAGAAGCGGGCCCGGTGGACACG TACTGCAGACACAAC TACGGGGTCCGTGAGA
BoLA-DRB3.2 *28 GAAGGACTTCTGGAGGAGAGCGGGCCCGGTGGACAGGTGTGCAGACACAAC TACGGGGTCCGTGAGA
BoLA-DRB3.2 *23 GAAGGACTTCTGGAGCGGAAGCGGGCCCTATGTGGACACG TACTGCAGACACAAC TACGGGGTCCGTGAGA
BoLA-DRB3.2 *34.1 GAAGGTCATGCTGGAGGAGCAGCGGGCCCGGTGAAC TACTGCTGACAATA ---TACGGGGTGGAGATT
BoLA-DRB3.2 *11 GAAGGACATCCTGGAGGAGAAGCGGGCCCTAGGTGGACACG TAGTGCAGACACAAC TACGGGGTCCGTGAGA

```

Figura 7: Secuencias de aminoácidos de 9 alelos del gen *BoLA DRB3.2* identificadas en cruces de ganado para el doble propósito en cuenca del Papaloapan.

7 CONCLUSIONES

La técnica de PCR-RFLP permitió exitosamente identificar los polimorfismos del gen *BoLA-DRB3.2* presentes en los bovinos para el doble propósito en la Cuenca del Papaloapan. También con esta técnica se encontraron 27 variantes alélicas de las 136 reportadas, indicando un polimorfismo adecuado en la población muestreada. Además, se observó una amplia distribución con un valor de H_o de 0.6610 en la población total y valores bajos de F_{is} inferiores a 0.05 entre las poblaciones por rancho como en la población total. Estos valores de diversidad genética pueden atribuirse a las diferentes proporciones raciales de los individuos, ya que en 4 de los 9 ranchos había al menos 3 sementales diferentes.

Se secuenciaron fragmentos del gen *BoLA-DRB3.2* y, según los análisis BLASTn, estos fragmentos mostraron similitudes con secuencias obtenidas en otras regiones del mundo, las cuales están asociadas con la resistencia/susceptibilidad a enfermedades de importancia económica. Esta investigación subraya la importancia de la diversidad genética en la población bovina de la cuenca del Papaloapan estudiada y su potencial impacto en la resistencia a enfermedades. Se encontró que el ganado del rancho 4 perteneciente a la comunidad de San Juan Rio Manso, San Juan Lalana, población que tuvo el mayor número de alelos diferentes, aunque con bajas frecuencias de estos.

Los resultados obtenidos confirman la presencia y el potencial de los alelos BoLA como marcadores moleculares de resistencia a garrapatas y a enfermedades en el ganado, su adecuada variabilidad alélica, sugiere que el *BoLA-DRB3.2* es buen candidato para considerarlo en los criterios de selección de bovinos. Este estudio puede servir como referencia inicial para establecer estudios más especializados y de fondo en los que se pueda evaluar la relación

presencia de alelos de resistencia y susceptibilidad en la prevalencia de enfermedades y parásitos en el ganado de doble propósito de la región.

8 LITERATURA CITADA

- Alkafajy, A., Al-Karagoly, H., and Brujeni, G. N. (2020). Comparison of cattle BoLA-DRB3 typing by PCR-RFLP, direct sequencing, and high-resolution DNA melting curve analysis. *PubMed*, 11(1): 21-26. <https://doi.org/10.30466/vrf.2018.90444.2189>.
- Al-Murrani, S. W. K., Glass, E. J., and Hopkins, J. (2009). BoLA class I charge heterogeneity reflects the expression of more than two loci. *Animal Genetics*, 25 (3):165-172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00105.x>.
- Álvarez, V.; Bonilla, R.; Chacón, I. 2003. Frecuencia relativa de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) en ocho zonas ecológicas de Costa Rica. *Revista Biología Tropical*, 51 (2): 427-434.
- Amills, M., Francino, O., and Sanchez, A. (1995). Nested PCR allows the characterization of TaqI and PstI RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 48 (4): 313-321.
- Amorena, B., and Stone, W. H. (1978). Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science*, 201 (4351):159-160.
- Angarita-Merchán, M., Torres Caicedo, M. I., y Díaz Torres, A. K. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16 (5): 796-807.
- Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*. LE Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds). INECC. México. 517-552.
- Ávila, H. R. V., Godoy, A. V., Severiano, H. J., Gallardo, H. Á., Sánchez, J. F. D. L. T., Aguilar, C. G. G., y Gómez, F. G. (2018). Capítulo: Tendencias y herramientas para el diagnóstico e identificación de microorganismos de importancia pecuaria. *Estado del Arte Sobre Investigación e Innovación Tecnológica en Ganadería Bovina Tropical (Red de Investigación e Innovación Tecnológica para la Ganadería Bovina Tropical)* Ciudad de México, México, 1. (1): 207-224.
- Ballingall, K. T., Luyai, A., Rowlands, G. J., Sales, J., Musoke, A. J., Morzaria, S. P. and McKeever, D. J. (2004). Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3* 2703 and DRB3* 1501 alleles are associated with variation in levels of protection against *Theileria parva* challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. *Infection and immunity*, 72 (5): 2738-2741.

- Baltian, L. R., Follmer, A. V., Peratta, D. L., Schmidt, E. E., Severini, R. A., Borrego, C. Y. Giovambattista, G. (2016). Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 asociados con resistencia/susceptibilidad a leucosis en ganado Holstein de La Pampa. *Ciencia Veterinaria*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/105572>.
- Baltian, L., Ripoli, M. V., Aida, Y., Takeshima, S. N., y Giovambattista, G. (2011). Estimación de las frecuencias alélicas del gen *BoLA-DRB3* en una población de ganado Holstein de La Pampa mediante secuenciación directa. *Ciencia Veterinaria*, 13 (1): 66-69.
- Baltian, L., Ripoli, M. V., y Giovambattista, G. (2022). Estudio de asociación del polimorfismo del gen de clase II BoLA-DQA1 con resistencia/susceptibilidad a mastitis en ganado Holstein de la provincia de La Pampa. *Ciencia Veterinaria*, 24 (1): 8-11.
- Bautista G, C, R. (2010). Inflamación. En: Gutiérrez-Pabello JA (Ed). *Inmunología veterinaria. El manual Moderno*. México. 53-64.
- Bautista-Garfias, C. (2016). Respuesta inmunitaria innata de los bovinos y su papel en la babesiosis (1ra ed.). Libro científico No. 3 del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. 20-30.
- Bensaid, A., Kaushal, A., Baldwin, C. L., Clevers, H., Young, J. R., Kemp, S. J., and Teale, A. J. (1991). Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. *Immuno genetics*, 33(4): 247-254.
- Biegelmeyer, P., Nizoli, L. Q., Cardoso, F. F., and Dionello, N. J. L. (2012). Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Archivos de Zootecnia*, 61 (1): 1-11.
- Bolaños, I., Hernandez, D., y Álvarez, L. (2017). Asociación de los alelos del gen *BoLA-DRB3* con la infección natural de *Babesia* spp en el ganado criollo Hartón del Valle. *Archivos de zootecnia*, 66 (253): 13-120.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Stern, L. J., Gorga, J. C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1995). Human class II MHC molecule HLA-DR1: X-ray structure determined from three crystal forms. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 51 (6): 946-961.

- Canevari, J. T., Mangold, A. J., Guglielmo, A. A., and Nava, S. (2017). Population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in a subtropical subhumid region of Argentina for use in the design of control strategies. *Medical and Veterinary Entomology*, 31 (1): 6-14.
- Castro, S. G., Bravo, E. T., y Duran, C. V. (2006). Polimorfismos de *BoLA-DRB3* en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19 (3): 270-279.
- Cha, R. S., and Thilly, W. G. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Genome Research*. 3 (3): 18-29.
- Chon, J. M. G., Barajas-González, D., De la Vega-Machado, M., Andrea, P. G. M., Pacheco-Hoyos, N., y Varela-Romero, A. (2021). La Ley del Equilibrio Genético y su importancia en la conservación. *Nuestra Tierra*, 18(36): 13-15.
- Contreras Rodríguez, J. H. (2018). Sostenibilidad del genoma de los bovinos de la Estación Experimental Agropecuaria Satipo. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12894/4311>
- Cortés-López, I. G., Arriaga-Jordán, C. M., Rebollar-Rebollar, S., García-Martínez, A., and Albarrán-Portillo, B. (2015). Assessment of the sustainability of dual-purpose farms by the IDEA method in the subtropical area of central Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 47, (1): 1187-1194.
- Cortés-López, N. G., Del Moral, S., y Abad-Zavaleta, J. (2014) Frecuencia alélica del gen Kappa caseína en bovinos de doble propósito de la Cuenca del Papaloapan. XIV Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Querétaro. México.
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., y Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4): 1150-1173.
- Cuevas-Reyes, V., Baca del Moral, J., Cervantes Escoto, F., Espinosa García, J. A., Aguilar Ávila, J., y Loaiza Meza, A. (2013). Factores que determinan el uso de innovaciones tecnológicas en la ganadería de doble propósito en Sinaloa, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 4 (1): 31-46.
- Da Fonseca, R. R., Ureña, I., Afonso, S., Pires, A. E., Jørsboe, E., Chikhi, L., y Ginja, C. (2019). Consequences of breed formation on patterns of genomic diversity and differentiation: the case of highly diverse peripheral Iberian cattle. *BMC genomics*, 20 (1): 1-13.

- Davies, C. J., Andersson, L., Mikko, S., Ellis, S. A., Hensen, E. J., Lewin, H. A., and Russell, G. C. (1997). Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics*, 28 (3): 159-168.
- De Castro, J. J., Cunningham, M. P., Dolan, T. T., Dransfield, R. D., Newson, R. M., and Young, A. S. (1985). Effects on cattle of artificial infestations with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Parasitology*, 90 (1): 21-33.
- Díaz, S., Ripoli, M. V., Peral García, P., y Giovambattista, G. (2005). Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. *Analecta Veterinaria*, 25 (1): 40-52.
- Dynon, K., Varrasso, A., Ficorilli, N., Holloway, S. A., Reubel, G. H., Li, F., ... and Drummer, H. E. (2001). Identification of equine herpesvirus 3 (equine coital exanthema virus), equine gammaherpesviruses 2 and 5, equine adenoviruses 1 and 2, equine arteritis virus and equine rhinitis A virus by polymerase chain reaction. *Australian veterinary journal*, 79(10): 695-702.
- Ellis, SA, Holmes, EC, Staines, KA, Smith, KB, Stear, MJ, McKeever, DJ, ... y Morrison, WI (1999). Variación en el número de genes MHC expresados en diferentes haplotipos de clase I de ganado. *Inmunogénica*, 50 (1): 319-328.
- Eremeeva, M. E., Zambrano, M. L., Anaya, L., Beati, L., Karpathy, S. E., Santos-Silva, M. M., and Aranda, C. A. (2011). *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, mexicali, México. *Journal of medical entomology*, 48 (2): 418-421.
- Esperón, A. A., Hechavarría, I. V. N., y Navarro, L. R. (2013). Introducción de la técnica PCR-RFLP para el diagnóstico de dos mutaciones en el gen VHL. *Medica del Sur*, 11 (3): 361-367.
- Fadul-Pacheco, L., Wattiaux, M. A., Espinoza-Ortega, A., Sánchez-Vera, E., and Arriaga-Jordán, C. M. (2013). Evaluation of Sustainability of Smallholder Dairy Production Systems in the Highlands of Mexico During the Rainy Season. *Agroecology And Sustainable Food Systems*, 37(8): 882-901. <https://doi.org/10.1080/21683565.2013.775990>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2007.) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino. Consultado en febrero 2022. Disponible en: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2003). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. 1-36.

- Farfán, B. M. J. (2015). Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26 (6):788-793.
- Fernández, I. G., Ramírez, J. G. R., Vázquez, A. G., Arvizu, R. U., and Morales, R. A. A. (2008). Polymorphism of locus DRB3. 2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 880-886.
- Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., and Ribeiro, J. M. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*.14(1): 2051.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J., and Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170 (1): 56-63.
- Gasparin, G., Miyata, M., Coutinho, L. L., Martinez, M. L., Teodoro, R. L., Furlong, J., and Regitano, L. C. A. (2007). Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Animal Genetics*, 38 (5): 453-459.
- Gutiérrez-Gil, B., Goyache, F., Fernández, I., Alvarez, I., and Royo, L. J. (2015). Genetic diversity and inbreeding in Spanish beef cattle breeds assessed through pedigree analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 132 (5): 346-354. doi:10.1111/jbg.12138
- Hardy G. H. (1908). Hardy–Weinberg Equilibrium. *Genetics*, 179(3).1143-1150. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.92940>.
- Hartl, D. L., and Clark, A. G. (2007). *Principles of population genetics* (4th ed.). Sinauer Associates.
- Hernández D. Y., Muñoz j. e., y Álvarez, F. (2014). Asociación del locus BOLA-DRB3. 2 con el virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 6 (2): 319-326.
- Hernández Herrera, D. Y., y Muñoz Flórez, J. E. (2015). Diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10 (1). 18-30.
- Hernández, D., Posso, A., Muñoz, J., Giovambattista, G., y Álvarez, L. (2013). Polimorfismos del gen BoLA-DRB3. 2* en ganado criollo colombiano. *Revista MVZ Córdoba*, 18 (1): 3665-3671.

- Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary parasitology*, 137 (2):1-10.
- Kimball, J. W. (2023). Kimball's biology pages. Enzimas de restriccion 5.7. AND unidad 5. Tufts University and Harvard University. Disponible en: <https://espanol.libretexts.org/@go/page/157086>.
- Koppel, R. E. T., Ortiz, O. G. A., Ávila, D. A., Lagunes, L. J., Castañeda, M. O. G., López, G. I., y Calderón, R. R. C. (1999). Manejo de ganado bovino de doble propósito en el trópico. INIFAP. CIRGOC. Libro Técnico, (5), 11-37.
- Koshiishi, Y., Uchiyama, H., Murata-Okubo, M., Tanaka, K., Kameyama, Y., Hirayama, H., and Wada, K. (2021). Development of 49 novel microsatellite markers from Next-generation sequencing data and a robust method for parentage tests in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Gene*, 769, 145238. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145238>.
- Lachance, J. (2009). The consequence is a targeted displacement in allele frequencies, implying deviations from Hardy–Weinberg equilibrium. *Journal of Theoretical Biology*, 261 (4): 570-577.
- Laird, N. M., Y Lange, C. (2011). *The fundamentals of modern statistical genetics*. (167). New York: Springer.
- Lewontin, R. C. (1974). *The genetic basis of evolutionary change*. New York: Columbia University Press. United Kingdon, 1. 346.
- Martín, P. L., Arauz, M. S., y Stanchi, N. O. (2015). Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria. *Analecta Veterinaria*, 35 (1): 26-38.
- Martínez, M. L., Machado, M. A., Nascimento, C. S., Silva, M. V. G. B. Teodoro, R. L., Furlong, J., and Verneque, R. S. (2006). Association of BoLA-DRB3. 2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet. Mol. Res*, 5 (3): 513-524.
- Martínez, R., Burbano, M., Toro, R., Montoya, F., Ariza, F., Tobón, J. I., y Gallego, J. (2005). Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Archivos de Zootecnia*, 54 (206): 349-356.
- Martínez-Velázquez, G., Ríos-Utrera, Á., Palacios-Fránquez, J. A., Vega-Murillo, V. E., y Montaña-Bermúdez, M. (2021). El ganado bovino Criollo Coreño del occidente de México en

- la producción de carne: caracterización, retos y perspectivas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12. 23-38.
- Mayo, O. (2008). A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Research and Human Genetics*, 11. 249-256. doi: 10.1375/twin.11.3.249.
- Mburu, D., and Hanotte, O. (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. Proceedings of the International Livestock Research Institute Biodiversity project. Nairobi, Kenya. 21-27.
- Mpofu, N., Ojango, J. M., y Andersson-Eklund, L. (2011). Quantitative methods to improve the understanding and utilisation of animal genetic resources. AGTR Version 2 Training Module.
- Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K., and SNP Workshop Group. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 19(4), 208-216.
- Muggli-Cockett NE, Stone RT. (1991). Restriction fragment length polymorphisms in bovine major histocompatibility complex class II beta-chain genes using bovine exoncontaining hybridization probes. *Anim Genetics*, 1 (1): 123-136. doi:10.1016/j.tree.2004.01.009.
- Muller, M., Swanepoel, F., and van der Colf, W. (2015). An overview of livestock production and health in developed and developing countries. *Livestock Science*, 178. 57-65. doi:10.1016/j.livsci.2015.05.006.
- Nava S, Mastropaolo M, y Mangold AJ. (2011). Ficha 5: Garrapata común del bovino: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. <https://inta.gob.ar/documentos/ficha-5-garrapata-comun-del-bovino-rhipicephalus-boophilus-microplus>.
- Nava, S., Mastropaolo, M., Guglielmone, A., and Mangold, A. J. (2013). Effect of deforestation and introduction of exotic grasses as livestock forage on the population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in northern Argentina. *Research in veterinary science*, 95 (3): 1046-1054.
- Nomenclature. International Society for Animal Genetics. disponible en: <http://www.projects.roslin.ac.uk/bola/bolahome.html>.
- OIE (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.9. World Organization for Animal Health. ISBN 978-92-9044-718-4.
- orteg, N. G., Del Moral, S., Rueda, J. A., Luna-Palomera, C., Meza-Herrera, C. A., and Abad-Zavaleta, J. (2012). Allelic and genotypic frequency of *kappa casein* gene in double purpose cattle. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15 (1): 47-54.

- Ortega, L., y Ward, R. (2005). El sistema de ganadería de doble propósito: Un sistema eficiente. *Manual de ganadería doble propósito*, 1 (1): 22-26.
- Osterkamp, J., Wahl, U., Schmalfluss, G., and Haas, W. (1999). Host-Odor recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. *Journal of Comparative Physiology*, 185 (1): 59-67.
- Panei, C. J., Suzuki, K., Echeverría, M. G., Serena, M. S., Metz, G. E., and González, E. T. (2009). Association of BoLA-DRB3. 2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected cattle in Argentina. *International Journal of Dairy Science*. (4).
- Perera, C. L., y Acevedo, A. M. (2018). Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*, 40(3).
- Portela, P. M., y Huerta, A. F. (2007). *Genética y Genómica*. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/51873015/genetica_y_genomica_Acuicultura.pdf?1487605706=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DPAULINO_MARTINEZ_PORTELA_ANTONIO_FIGUERA.pdf&Expires=1719608819&Signature=X-FEJHpA4zxqaEW~Cng-moFOTGzZeIACCO0nW9TJ58ieXgL3T~yg9pzY8EP5Lu67ZDU-1EHSRJRWFwBrmo-raeIDA9OubEYt7I2V57IFOVXg2jR0~FGtKWfMvx7lQhBN9G10qibKOPHk022IIUF345zQL7tcQLEc1jReCrHkXZXXRvz~2LDGUqMFphNqjM89xneywvSDYXyLIw3BF1DkTqkMHytd7aapaqA2I23G0HSfovPLwMJRB3mnySGq4YXgpg76Hj73ArrU4Q~Tr46KcmEceJ7~Ot01nAxWaMwg-djPw7e9njQoql1OE6f2E5s2UMwA~8it4fyCWmmqu9aPQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
- Quintanilla, R. E. L., y Bautista-Garfias, C. R. (2019). El control inmunológico: Una alternativa contra garrapatas del ganado bovino. *Ecosistemas Recursos Agropecuarios Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7 (1). <https://doi.org/10.19136/era.a7n1.2263>.
- Raberg, L., Graham, A. L., and Read, A. F. (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364 (1513): 37-49.
- Reck, J., Marks, F. S., Rodríguez, R. O., Souza, U. A., Webster, A., Leite, R. C., and Martins, J. R. (2014). Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(1):59-62.

- Rodríguez Sánchez, I. P. y Barrera Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7 (3).
- Rodríguez-Vivas, R. I., Fernández-Salas, A., and Alonso-Díaz, M. Á. (2012). Resistance of *Rhipicephalus microplus* to amitraz and cypermethrin in tropical cattle farms in Veracruz, Mexico. *Journal of Parasitology*. 98 (5): 1010-1014.
- Román-Ponce, S. I., Ruiz-López, F. D. J., Montaldo, H. H., Rizzi, R., y Román-Ponce, H. (2013). Efectos de cruzamiento para producción de leche y características de crecimiento en bovinos de doble propósito en el trópico húmedo. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 4 (4): 405-416.
- Russel, G. C., Marelllo, K. L., Gallagher, A., McKeever, D. J., and Spooner, R. L. (1994). Amplification and sequencing of expressed DRB second exons from *Bos indicus*. *Immunogenetics*, 39 (1): 432-436.
- Russell, G. C., Smith, J. A., and Oliver, R. A. (2004). Structure of the BoLA-DRB3 gene and promoter. *European Journal of Immunogenetics*, 31 (3): 145-151.
- Sajid, A., Matias, J., Arora, G., Kurokawa, C., DePonte, K., Tang, X., and Fikrig, E. (2021). mRNA vaccination induces tick resistance and prevents transmission of the Lyme disease agent. *Science Translational Medicine*, 13 (620): 9827.
- Salazar Benjumea, R. S., Barahona Rosales, R., Chará Orozco, J. D., y Sánchez Pinzón, M. S. (2015). Productividad y carga parasitaria de bovinos *Bos indicus* X *Bos taurus* en un sistema silvopastoril intensivo en bosque seco tropical. *Tropical and subtropical agroecosystems*, (1): 18.
- Schwaiger, F. W., Weyers, E., Buitkamp, J., Ede, A. J., Crawford, A., and Epplen, J. T. (1994). Interdependent MHC-DRB exon-plus-intron evolution in artiodactyls. *Molecular biology and evolution*, 11 (2): 239-249.
- Seebeck, R. M., Springell, P. H., and O'Kelly, J. C. (1971). Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*) I. Food intake and body weight growth. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24 (2): 373-380.
- Sharif, S., Mallard, B. A., Wilkie, B. N., Sargeant, J. M., Scott, H. M., Dekkers, J. C. M., and 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 (3): 185-193.

- Sharma, A., Tiwari, M., Singh, S. P., Sharma, D., Kumar, S., Sharma, A., and Verma, A. K. (2016). Study of the ABCG2 gene polymorphism in Sahiwal and Hariana cattle by PstI/PCR RFLP assay. *Animal Research*, 6 (1): 475-477. doi:10.5958/2277-940X.2016.00049.8
- Shete, S., Tiwari, H., and Elston, R. C. (2000). On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theoretical population biology*, 57(3), 265-271. doi:10.1006/tpbi.2000.1452.
- Sint, D., Raso, L., and Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*. 3(5):898-905.
- Spickett, A. M., De Klerk, D. G., Enslin, C. B., and Scholtz, M. M. (1989). Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a bushveld region of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, (56): 47.
- Sutherst, R. W., Maywald, G. F., Kerr, J. D., and Stegeman, D. A. (1983). The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34 (3): 317-327.
- Takehima, S. N., and AIDA, Y. (2006). Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*, 77 (2): 138-150.
- Takehima, S., Nakai, Y., Ohta, M., and Aida, Y. (2002). Characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese Shorthorn Cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. *Journal of Dairy Science*, 85 (6): 1630-1632.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2 (2): 70-78.
- Uddin, M. S., y Cheng, Q. (2015). Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*, 12 (1): 195-212. doi: 10.1016/B978-0-08-100068-7.00012-4.
- Urdaneta de Galué, F., Elena Peña, M., Rincón, R., Romero, J., y Rendón-Ortín, M. (2008). Gestión y tecnología en sistemas ganaderos de doble propósito (taurus-indicus). *Revista Científica*, 18 (6): 715-724.

- Vallejo, A. R., Poquioma, V., Yalta, C., and Veli, E. (2014). Polimorfismos del gen *BoLA DRB3*—exón 2 en bovinos criollos peruanos mediante el método SSCP. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*, 4 (1): 29-131.
- Van Eijk, M. J. T., Stewart-Haynes, J. A., and Lewin, H. A. (2009). Extensive polymorphism of the *BOLA-DRB3* gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, 23 (6): 483-496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1992.tb00168>.
- Van Eijk, MJ, Russ, I. y Lewin, HA (1993). Orden de *DRB3*, *DYA* y *PRL* bovina determinado por tipificación de espermatozoides. *Genoma de mamíferos*, 4 (2): 113-118.
- Verissimo, C. J., Nicolau, C. V. J., Cardoso, V. L., and Pinheiro, M. G. (2002). Haircoat characteristics and tick infestation on gyr (zebu) and crossbred (holdstein x gyr) cattle. *Archivos de zootecnia*, 51(195): 389-392.
- Vignal, A., Milán, D., San Cristóbal, M., Eg, and Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, Selection. Evolution*, 34 (1). 275-305. doi: 10.1051/gse:2002009.
- Walker, A. R. (2011). Eradication and control of livestock ticks: biological, economic and social perspectives. *Parasitology*, 138(8), 945–959. doi:10.1017/S0031182011000709
- Weir, B. S., and Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (1): 1358-1370. doi: 10.2307/2408641.
- Wharton, R. H. (1976). Tick-borne livestock diseases and their vectors. 5. Acaricide resistance and alternative methods of tick control, 20 (1): 8-15.
- Woolliams, J., and Toro, M. (2007). What is genetic diversity?. *Utilisation and conservation of farm animal genetic resources. Kor Oldenbroek*, (40): 55-74. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-592-5>.
- Yakubu, A., Salako, A. E., De Donato, M., Takeet, M. I., Peters, S. O., Adefenwa, M. A. and Imumorin, I. G. (2013). Genetic diversity in exon 2 of the major histocompatibility complex class II *DQB1* locus in Nigerian goats. *Biochemical genetics*, 51 (11): 954-966.
- Zambrano, J. C., Echeverri, J., y López-Herrera, A. (2011). Alelos del gen *BoLA DRB3*. 2 están asociados con mastitis en vacas lecheras. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24 (2): 145-156.

Zambrano, J.C., Echeverri, J. Z. y López, A.H. (2009). Asociación de los Alelos del gen *BoLA DRB3.2* con características productivas en vacas del hato Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 22 (3): 448-449.

Zhang, L., Pan, Z., Geng, S., Chen, X., Hu, S., Liu, H., and Liu, X. (2010). Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. *Research in Veterinary Science*, 89 (2): 282-289.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo Quick-DNATM ZYMO®.

1. Se agregaron 400 μ l de Genomic Lysis Buffer a 100 μ l de sangre (4:1). Se mezcló completamente agitando en vórtex de 4 a 6 segundos, luego se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Se transfirió la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de recolección. Se centrifugó a 10,000 x g durante un minuto.
3. Se cambió la columna Zymo-Spin™ IICR a un nuevo tubo de recolección. Se agregaron 200 μ L de DNA Pre-Wash Buffer a la columna de centrifugado. Se centrifugó a 10.000 x g durante un minuto.
4. Se agregaron 500 μ L de g-DNA Wash Buffer a la columna de centrifugado. Se centrifugó a 10,000 x g durante un minuto.

Se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga limpio. Se agregaron ≥ 50 μ L de DNA Elution Buffer (o agua libre de nucleasas) a la columna. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad durante 30 segundos para eluir el ADN. Por último, se almacenó a ≤ -20 °C.

Anexo 2. Descripción del uso de los Programas estadísticos

Excel. Los datos fueron ingresados en Excel, en la primera columna el número de individuo, en la segunda columna el número de muestra, en la tercera columna se identificó la población como “Rancho 1” con la letra “A” hasta el “Rancho 9” con la letra “I”. en la cuarta columna el locus de este estudio el “DRB3.2” debajo de la columna de locus se agregaron los alelos en este caso como se reportan por RFLP. (1, 7, etc.). El archivo de Excel se guardó en formato de texto delimitado por tabulaciones.

Cervus. En el programa Cervus, en la pestaña superior izquierda “Analysis” se seleccionó la opción “Allele Frequency Analysis”, en la ventana emergente en la sección “Genotype file” se adjuntó el archivo de Excel que previamente se había guardado como formato de texto delimitado por tabulaciones. En la misma carpeta que se creó otro archivo de texto en el que el programa Cervus le dará salida a la corrida del análisis. Creado el archivo en la parte derecha de la ventana emergente “Summary output file” y se adjuntó el archivo de texto nuevo que se había creado. Se seleccionaron las opciones Header row y Read locus name, en la opción ID column se puso el valor 1, en la opción first allele in column se puso el valor 4 que fue el número de columna donde coloqué el nombre del alelo BoLA – DRB3.2. En la opción Number of loci, se agregó el valor uno para este caso y se corrió el análisis haciendo clic en el ok.

Corrido el análisis en la pestaña superior izquierda “tools” se seleccionó la opción “Convert Genotype” y se seleccionó la opción “Cervus to Genepop”. Para este estudio al archivo final se le agregó la terminación genepop, para identificarlo como el archivo que leerá Genepop.

Genepop. Una vez convertido el archivo en el programa Cervus para Genepop e incluido en la misma carpeta se abrió Genepop, En la ventana emergente y se introdujo el nombre exacto del archivo. Aparecieron datos como los loci y la población indicando que estaba leyendo el archivo. Se procedió con un enter y se seleccionó la opción 1 para el análisis de Hardy - Weinberg posteriormente se seleccionó la opción 1, se procedió con un enter lo cual arrojó un archivo de texto con terminación D. Regresando al programa Genepop ahora se seleccionó la segunda opción lo cual nos arroja otro formato de texto con terminación E dando enter otra vez se seleccionó la opción 3 arrojando un formato de texto con terminación F.

Fstat. De la misma forma, sobre la carpeta se copió el archivo con terminación genepop y se pegó en la carpeta de Fstat. Primero se convirtió el archivo de Genepop en un formato que pudiera leer el programa Fstat dando clic en la esquina superior izquierda “utilities” y

seleccionando la opción “file conversión” posteriormente se seleccionó la opción Genepop – Fstat. Archivo emergente se guardó en la misma carpeta de Fstat arrojando un archivo en formato (.data). De vuelta en el programa Fstat se seleccionó la opción “file” adjuntando el archivo en formato (.data). Se seleccionaron las opciones “allele frecuencis”, “number of allele”, “Fis” y “Fis pair of simples”, arrojando un archivo de texto con terminación (out).

Anexo 3. Patrones de restricción de las enzimas RsaI, BstYI y HaeIII en el gen BoLA-DRB3.2* (an Ejik *et al.*,1992).

Rsa I					
a	78	54	50	39	33 30
b	111	54	50	39	30
c	111	93	50	30	
d	143	111	30		
e	141	51	50	39	
f	141	54	50	39	
g	141	104	39		
h	111	69	54	50	
i	180	54	50		
j	93	78	63	50	
k	156	78	50		
l	234	50			
m	111	104	69		
n	180	104			
o	284				
p	111	51	50	39	30
q	141	90	50		
r	111	90	50	30	
s	141	93	50		
t	143	141			
u	123	111	50		
v	102	78	54	50	
w	78	69	54	33	
x	104	78	69	33	
y	78	63	54	50	39

BstYI		
a	199	85
b	284	
c	196	85
d	197	87
e	112	87 85

HaeIII			
a	167	65	52
b	219	65	
c	167	65	49
d	190	65	29
e	167	117	
f	167	65	48 4
g	164	65	55
h	167	65	46 6
i	167	113	4

Anexo 4. Determinación de los alelos del gen BoLA-DRB3.2* mediante PCR-RFLP

Alelo	DRB3 PCR- RFLP	RsaI, BstYI, HaeIII	Alelo	DRB3 PCR- RFLP	RsaI, BstYI, HaeIII	Alelo	DRB3 PCR- RFLP	RsaI, BstYI, HaeIII
DRB3*0501	1	aaa	DRB3*1501	16	jbd	DRB3*2704	33	nbf
DRB3*0503	1	aaa	DRB3*1502	16	jbd	DRB3*3001	34	lab
DRB3*1301	2	bba	N S	17	kbb	DRB3*3002	34	lab
DRB3*1001	3	bbb	DRB3*1801	18	lbf	DRB3*2101	35	cbb
DRB3*1002	3	bbb	DRB3*1802	18	lbf	DRB05	36	lba
N S	4	caa	DRB3*2601	19	sbb	DRB07	37	oba
DRB3*3301	5	rcc	DRB3*2301	20	lbb	DRB18	38	bda
DRB3*2201	6	daa	DRB3*2901	20	lbb	N S	39	tba
DRB3*2202	6	daa	DRB3*3601	20	lbb	N S	40	uba
DRB3*0201	7	ecc	DRB3*0801	21	lbe	DRB3*0502	41	aba
DRB3*1201	8	faa	DRB3*1101	22	mba	DRB3*1901	41	aba
DRB3*0301	9	fda	DRB3*2701	23	nba	DRB3*3801	41	aba
DRB3*0302	9	fda	DRB3*2702	23	nba	DRB3*2802	42	hbf
DRB3*1601	10	fba	DRB3*2703	23	nba	DRB3*25012	43	kbf
DRB3*1602	10	fba	DRB3*2705	23	nba	DRB3*25011	44	kbi
DRB3*0901	11	gea	DRB3*2706	23	nba	DRB3*3401	45	sdb
DRB3*0902	11	gea	DRB3*2707	23	nba	DRB3*3402	45	sdb
DRB3*1202	11	gea	DRB3*0101	24	nbb	DRB3*3501	46	vba
DRB3*1701	12	haa	DRB3*0102	24	nbb	DRB3*1703	47	waa
DRB3*1702	12	haa	N S	25	oaa	DRB3*3901	48	wba
DRB3*3201	12	haa	DRB3*0601	26	oab	DRB3*3701	49	wbe
DRB3*3202	12	haa	DRB3*14011	27	obf	DRB3*4001	50	xba
DRB3*3203	12	haa	DRB3*14012	27	obf	DRB3*4201	51	gaa
DRB3*0401	13	hba	DRB3*3101	27	obf	DRB3*0303	52	sda
N S	14	hbb	DRB3*0701	28	obb	DRB3*1902	53	yba
DRB3*20011	15	iba	DRB3*4101	29	pcc	DRB3*4301	54	jdb
DRB3*20012	15	iba	G E	30	qcc			
DRB3*2002	15	iba	DRB3*2801	31	ibf			
DRB3*2003	15	iba	DRB3*2401	32	maa			

Anexo 5. Protocolo de purificación de productos de PCR con Kit de extracción QIAquick.

1. Mezclar 80 μ L de producto de PCR con 240 μ L de buffer QG.
2. Incubar a 50° C por 10 minutos (la mezcla debe tornarse amarilla).
3. Añadir isopropanol (80 μ L) a la mezcla.
4. Colocar la columna en un tubo de recolección y añadir la mezcla, centrifugar por 1 minuto a 17, 000 g. descartar el líquido y colocar la columna en el mismo tubo.
5. Si el ADN se secuenciará, añadir 500 μ L de Buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto. Descartar el líquido y colocar en el mismo tubo.
6. Para lavar, añadir 750 μ L de Buffer PE a la columna y centrifugar por un 1 minuto. Descartar el líquido y colocar el mismo tubo.

Si el ADN será usado en procesos sensibles a sales, dejar reposar la columna de 2-5 minutos más después de agregar el buffer PE. Centrifugar 1 minuto para remover el Buffer residual.

7. Colocar la columna en el tubo de 1.5 mL limpio.
8. Para eluir el ADN añadir 40 μ L de Buffer EB o agua libre de nucleasas en el centro de la membrana y centrifugar 1 minuto.

Para incrementar la concentración del ADN, añadir en dos partes el Buffer EB.

Se puede dejar reposar la columna hasta 4 minutos a temperatura ambiente para incrementar el rendimiento del ADN purificado.

9. Cuantificar en Nanodrop y almacenar a -20 °C hasta su uso.