

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL
GEN BoLA DRB3 – Exón 2 (Bovine
Lymphocyte Antigen) EN BOVINOS CRIOLLOS
PERUANOS (*Bos taurus* Linneaus, 1758)
MEDIANTE EL MÉTODO SSCP (Single Strand
Conformation Polimorphism)**

Tesis para optar por el título profesional de Licenciada
en Biología

Hilda Vanessa Poquioma Hernández

Lima Perú, 2014

DEDICATORIA

A mis adorados padres, Miguel, y Amparo,

Por su infinito apoyo,

Y a mí querida hermana Allison por su incansable alegría.

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer un agradecimiento, principalmente a mi familia, que fue siempre mi estímulo, a mi padre Miguel Alberto Poquioma, por su apoyo incondicional, y por ser guía en mi camino, mostrándome que todo sacrificio y esfuerzo es siempre bien recompensado; a mi madre Amparo Hernández, por creer siempre en mí, lo cual fue un estímulo bastante valioso, estando siempre a mi lado con cada caída durante el desarrollo de éste, mi primer logro cumplido, enseñándome que los sueños se logran si uno realmente se los propone; y a mi pequeña hermana Allison quien me enseñó que la vida se lleva con alegría, y que por más duro que sean los golpes, es cuestión solo de darle vuelta a la página con una sonrisa.

Quiero agradecer también de forma muy especial, a mi directora de tesis Adriana Vallejo, quien fue mi principal mentora en el camino de la ciencia, y quien nunca dudo en absolver mis dudas, paso a paso, mostrándome no solo su gran profesionalismo sino su amistad.

A mi asesor de tesis, Mauricio Gonzales, por su orientación y entrega para el desarrollo de esta investigación.

Asimismo a Ricardo Lengua, quien me acompañó en el desarrollo de este proyecto, y quien supo ser no solo un compañero de buenas y malas, sino también un gran amigo.

A mis compañeros de trabajo Roger Risco, Romina Vía y Rada, Evelyn Díaz, por su compañerismo, y amistad, y del mismo modo al Blgo. Fernando Serna, por su orientación.

A los encargados del área de documentación, Manuel Ccopa, donde recibí apoyo computacional para el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Innovacion Agraria, en especial a la Blga. Pilar García, por permitirme desarrollar mi investigación, en el laboratorio de Biología Molecular y Genómica.

INDICE

INDICE	5
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE CUADROS	9
I. INTRODUCCIÓN	14
II. ANTECEDENTES	17
2.1 Introducción del <i>Bos taurus</i> a sur América	17
2.2 El bovino criollo peruano	19
2.2.1 Vacunos de leche del Perú	23
2.3 Complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen)	24
2.3.1 Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen - BoLA)	25
2.3.2 Presentación de Antígeno	28
2.3.3 Gen BoLA DRB3.....	34
2.4 Técnicas de detección de mutaciones.....	40
2.4.1 Métodos de barrido	41
2.4.2 Métodos de comprobación	45
III. METODOLOGIA.....	49
3.1 Método de colecta del Material Biológico.....	49
3.2 Método de trabajo en laboratorio	53
3.2.1 Extracción y Purificación de Ácidos nucleicos (ADN)	54
3.2.2 Cuantificación de ADN y preparación de diluciones	57
3.2.3 Amplificación del gen DRB3*2.....	58
3.2.4 Electroforesis de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) para determinación de haplotipos mitocondriales	60
3.2.5 Detección de polimorfismos	65
3.2.6 Extracción de ADN a partir de gel de poliacrilamida	66
3.2.7 Amplificación de ADN extraído de poliacrilamida.	67

3.2.8	Preparación de muestra para secuenciamiento y análisis de secuencias	67
3.3	Análisis Bioinformaticos.....	68
3.3.1	Diversidad genética.....	68
3.3.2	Variabilidad genética.....	72
3.3.3	Estructura genético - poblacional.....	75
3.3.4	Distancia genética	76
3.3.5	Arboles Filogenéticos	78
3.3.6	Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	80
3.3.7	Análisis de Redes.....	80
IV.	RESULTADOS	82
4.1	Fase laboratorio	82
4.2	Fase de Análisis de Datos generados	87
4.2.1	Diversidad genética.....	87
4.2.2	Variabilidad Genética.....	103
4.2.3.	Alelos asociados a enfermedad, reportados en la presente investigación.....	115
V.	DISCUSION.....	125
5.1	Utilización de la técnica de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP)	125
5.2	Diversidad genética.....	125
5.3	Variabilidad genética.....	128
VI.	CONCLUSIONES	131
VII.	RECOMENDACIONES.....	132
VIII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	133
IX.	ANEXOS	148

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Modo de sujetar al ganado para el muestreo.	49
Fig 2. Método de control del ganado para muestreo	50
Fig 3: Método de control del ganado para muestreo	50
Fig 4: Mapa de distribución de muestras de bovino criollo analizados	53
Fig 5: Colocación de muestras de pelo en tubos 1.5ml	54
Fig 6: Exposición de muestras de pelo con SDS a 50° para que su disolución	55
Fig 7: Visualización de nube de ADN	56
Fig 8: Descarte de sobrenadante por inversión	57
Fig 9. Cuantificación de ADN en equipos Epoch	58
Fig 10. Preparación de amplificadores	60
Fig 11. Colocación de muestras en termociclador	60
Fig 12. Geles secando tras colocar adherente	61
Fig 13. Geles secando en campana extractora tras colocar repelente	62
Fig 14: Colocación de separadores sobre vidrios grandes	62
Fig 15 Colocación de “sanguche” en soporte	63
Fig 16: Material utilizado para preparación de poliacrilamida líquida	63
Fig 17: Carga de poliacrilamida líquida en vidrios previamente preparados	64
Fig 18: equipo de electroforesis vertical DCode BIO RAD	65
Fig 19. Gel revelado con tinción de plata para detección de genotipos	66
Fig 20. Primer gel de poliacrilamida genotipos detectados	82
Fig 21. Segundo gel de poliacrilamida de genotipos detectados	83
Fig 22. Tercer gel de poliacrilamida de genotipos detectados	83
Fig 23. Cuarto gel de poliacrilamida de genotipos detectados	84
Fig 24: Calidad de ADN de alelos extraídos	85
Fig 25. Presencia de genotipos en las 7 regiones	89
Fig 26. Frecuencia porcentual de genotipos	90
Fig 27. Frecuencia genotípica porcentual de Ancash	91
Fig 28. Frecuencia genotípica porcentual de Apurímac	91
Fig 29. Frecuencia genotípica porcentual de Ayacucho	92
Fig 30 .Frecuencia genotípica porcentual de Huancavelica	92
Fig 31. Frecuencia genotípica porcentual de Junín	92
Fig 32. Frecuencia genotípica porcentual de La Libertad	93

Fig 33. Frecuencia genotípica porcentual de Puno	93
Fig 34. Frecuencia alélica porcentual poblacional	98
Fig 35 Análisis de Coordenadas.	108
Fig 36. Árbol filogenético de la distancia DA de Nei construido por el Método UPGMA	109
Fig 37. Árbol filogenético de la distancia DA de Nei construido por el método Neighbor Joining	110
Fig 38. Árbol filogenético de la distancia DS de Nei construido por el Método UPGMA	110
Fig 39. Árbol filogenético de la distancia DS de Nei construido por el Método Neighbor Joining	110
Fig 40. Árbol filogenético de la distancia filogenética entre los alelos reportados	112
Fig 41. Representación Network de los haplotipos detectados	114

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2. Alelos reportados	36
Cuadro 1. Departamentos, Provincias, y comunidades que fueron muestreadas	51
Cuadro 3. Preparación de PCR I	59
Cuadro 4. Preparación de PCR II	59
Cuadro 5. Método de análisis de data haplotípica (alélica), de varios grupos de poblaciones.	75
Cuadro 6. Genotipos y alelos determinados	86
Cuadro 7. Frecuencia alélica relativa	96
Cuadro 8. Porcentaje de similitud entre alelos reportados y nuevos	99
Cuadro 9. Alelos en estado homocigoto	100
Cuadro 10. Numero de Secuencias(n), Singletons (S), Diversidad genética ($h+SD$), Diversidad nucleotídica ($\pi+SD$) y numero de alelos por región.	103
Cuadro 11. Test de neutralidad, Tajima'D Fu's FS	105
Cuadro 12. Estructuración poblacional	106
Cuadro 13. Distancia D_a (Vertical) y D_s de Nei (Horizontal)	107
Cuadro 14 Enfermedades asociadas a alelos, según enfermedad	121
Cuadro 15. Muestras totales procesadas.	148

RESUMEN

El antígeno leucocitario bovino (BoLA) y algunos de sus alelos han sido identificados y asociados con variedad de enfermedades; sin embargo no hay reportes sobre el estudio de este gen en bovinos criollos peruanos. Con el objetivo de determinar los polimorfismos del gen DRB3 exón 2, un total de 299 bovinos criollos provenientes de las regiones de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huancavelica, Junín, La Libertad y Puno, fueron analizados mediante la técnica de Electroforesis de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) con un posterior proceso de secuenciamiento. Patrones de diversidad y estructuración genética así como análisis filogenéticos fueron conducidos. Los niveles de diversidad genética (π) y haplotípica (h) fueron altos para todas las regiones analizadas así como para la población total ($\pi = 0.921$). Se logró identificar 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. Por otro lado, el alelo *1501 no presentó tan alta frecuencia, pero fue común para todas las poblaciones. No se registró algún tipo de estructuración poblacional (AMOVA) entre las regiones estudiadas, lo que es soportado por las pequeñas distancias genéticas encontradas y los análisis de coordenadas principales. Test de detección de selección natural fueron conducidos, y revelan un posible cuello de botella en las poblaciones analizadas. Análisis filogenéticos muestran agrupaciones similares bajo diferentes metodologías y sitúan a la población de La Libertad en una rama más alejada al resto de las poblaciones. Los resultados obtenidos, soportan una alta diversidad genética para el gen DRB3 exón 2 en poblaciones de bovinos criollos peruanos adaptados a las zonas alto andinas; diversidad que puede ser explicada por los múltiples orígenes de este germoplasma (producto de ganado europeo introducido durante la conquista así como introducción

de nuevo material genético en los últimos 50 años), lo cual constituye información relevante para el establecimiento de programas de mejora genética que eleven la productividad de los criadores de la región.

Palabras clave: Leukocyte antigen, polymorphism, phylogenetic analysis

SUMMARY

The bovine leukocyte antigen (BoLA) and some of its alleles have been identified and associated with a variety of diseases; however there are no reports on the study of this gene in Peruvian Creole cattle. In order to determine polymorphisms DRB3 gene exon 2, 299 Creole cattle from the regions of Ancash , Apurimac , Ayacucho , Huancavelica , Junín , La Libertad and Puno, were analyzed by the technique of electrophoresis detection of polymorphisms single stranded conformational (SSCP) with subsequent sequencing process . Patterns of diversity and genetic structure and phylogenetic analyzes were conducted. The levels of genetic diversity (π) and haplotype (h) were high for all regions and analyzed for the total population ($\pi = 0.921$). We identified 34 different genotypes consisting of 27 alleles, 6 of which are new and 21 previously reported . The alleles * 1801, * 14011 and * 4802 were more frequent in the populations analyzed, being of great importance as reported association mastitis and resistance to ticks. On the other hand, the allele * 1501 presented not as high frequency, but it was common to all populations . Some kind of population structure (AMOVA) among the studied regions were recorded , which is supported by small genetic distances encountered and principal coordinates analysis. Test to detect natural selection were conducted, and reveal a potential bottleneck in the populations analyzed. Phylogenetic analyzes show similar groupings under different methodologies and located in the town of La Libertad in the more remote locations other branch. The results obtained support a high genetic diversity for the DRB3 gene exon 2 in Peruvian Creole cattle populations adapted to the highlands; diversity can be explained by the multiple origins of this germplasm (product of European cattle introduced during the conquest and introduction of new genetic material in the last 50 years), which is relevant information for the establishment of breeding programs that raise productivity of farmers from the region.

Keywords: major histocompatibility complex class II, genetic diversity ,
management and conservation.

I. INTRODUCCIÓN

El bovino criollo peruano, está considerado como raza domesticada autóctona, y es un recurso que cumple con un rol importante en las comunidades campesinas, por ser fuente de alimentación, fuerza de trabajo y de ingresos (por la venta de productos como quesos, leche), entre otros.

Desde su introducción en 1526 con el segundo viaje de Pizarro desde Panamá junto a Almagro, durante la conquista, este rustico animal empezó a ser de gran utilidad para el poblador inca, ya que para entonces los únicos recursos ganadero utilizados eran los camélidos de la zona como la llama, guanaco y vicuña, así como también el cuy.

En la actualidad el Perú cuenta con 5 millones 156 mil 44 cabezas de bovinos criollos (CENSO 2012), habiéndose incrementado en un 14.7% desde el CENSO del 1994(CENSO 2012), siendo la sierra la región que alberga el mayor número de estas, con 2683.3 cabezas (CENSO 2012). Del mismo modo el criollo es el que lleva la delantera en comparación con otras razas como Holstein, Brown Swiss, Gyr/Cebú, y otras razas. Las regiones que lideran la lista son Ancash, Apurímac, Ayacucho y Puno, según el CENSO de 1994, seguidas de Huancavelica, y La Libertad y Junín.

Los diversos ecosistemas a los cuales se han adaptado desde entonces, le dan un gran valor potencial como fuente de genes útiles (genes de resistencia a enfermedades, de rendimiento productivo y reproductivo), y servicios ambientales ya que contribuyen al manejo apropiado de hábitats seminaturales. Estas características lo convierten en un reservorio potencial de germoplasma útil para programas de mejoramiento; desafortunadamente en éstos sistemas existe un perjuicio por los animales criollos, ya que se les considera un recurso marginal que debe

ser sustituido por especies y razas exóticas mejoradas que no necesariamente cuentan con la resistencia que el bovino criollo ha adquirido al naturalizarse, es decir adaptarse, hacerse resistente a las enfermedades de la zona, y habituarse a los diferentes ecosistemas de sur América, desde su llegada con los españoles. Actualmente la escases de conocimiento sobre la riqueza génica, y caracterización molecular de este recurso, origina que los programas sean condicionados a basandose tan solo en cruces con especies mejoradas, lo cual a largo plazo conllevaría a la pérdida o silenciamiento de los genes que hacen atractivo este recurso.

Hablar de la resistencia a enfermedades, es hablar del sistema inmune del bovino criollo peruano, siendo específicamente el complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen, BoLA) el encargado de determinar esta fortaleza, así como también la susceptibilidad que presenta; lo cual debe conocerse, conservarse, y ser una herramienta indispensable en cualquier programa de mejoramiento.

Este complejo se encuentra estructurado de forma similar al complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA); consiste en tres clases de genes (I, II, III), donde la clase II se encuentra centroméricamente hacia la clase III y la clase II hacia el telómero, pero a diferencia del HLA que se encuentra en el cromosoma 6, el BoLA está ubicado en el 23.

Dentro de la clase II, hay una región de especial importancia por contener la región DRB3, la cual es la única que se transcribe activamente, y presenta alto grado de polimorfismo en comparación con muchas especies de vertebrados, habiéndose reportado un total de 130 alelos hasta el momento; atribuyéndose este polimorfismo a alguna forma de overdominancia o selección balanceada.

Para el estudio de genes, existen técnicas que permiten determinar polimorfismos, detectando mutaciones puntuales nos permiten diferenciar

entre alelos, siendo la técnica del polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP), una de las más útiles

La técnica de SSCP es un método que se basa en la conformación de las hebras mono catenaria de una región del ADN, siendo la principal virtud, su alta sensibilidad en la detección (alrededor 80% en condiciones ideales), como por la inversión económica; es capaz de identificar variaciones de un solo nucleótido, en segmentos con tamaño entre 150 a 200 nucleótidos de largo, valiéndose también del secuenciamiento.

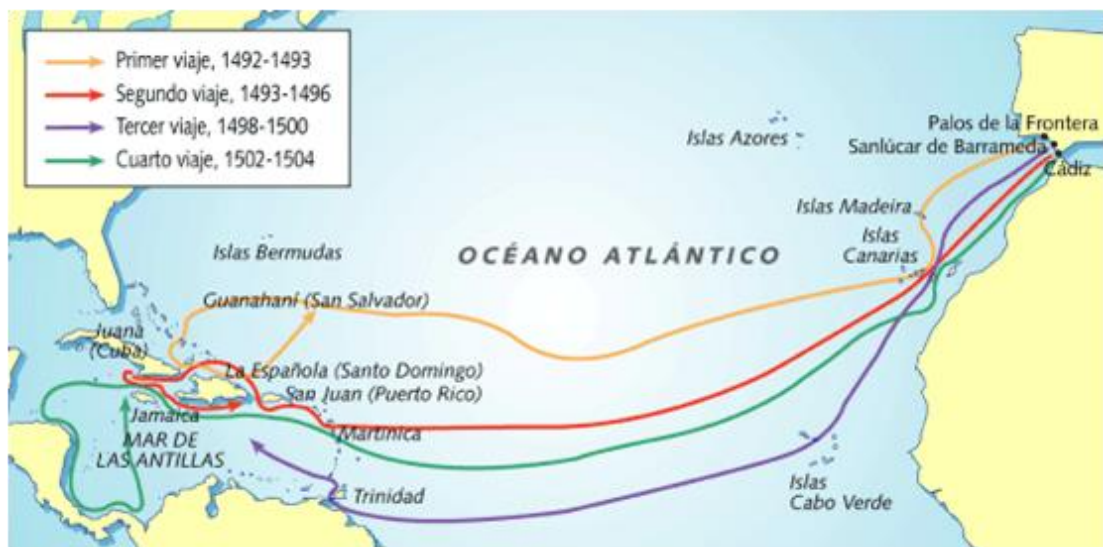
Ante la ausencia de información sobre la diversidad alélica de la región DRB3 en bovino criollo peruano, en la presente investigación se reporta por primera vez el polimorfismo de esta región del complejo mayor de histocompatibilidad en ganado criollo proveniente de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Junín, La Libertad, Huancavelica y Puno, empleando la técnica de SSCP; herramienta que además, se estandarizó para el gen en estudiado, lo que permitió conocer la resistencia y susceptibilidad que presenta al bovino criollo peruano.

II. ANTECEDENTES

2.1 Introducción del *Bos taurus* a sur América

La presencia del ganado bovino criollo, *Bos taurus*, en América latina se remota a la época de la colonización de América. Cuando Cristóbal Colon llegó por segunda vez a América en 1493, trajo consigo los primeros bovinos, los cuales desembarcaron en el Caribe iniciando así su dispersión, con tal éxito que antes de 40 años, en 1524, ya se informó sobre la existencia de bovinos en todos los países de América del Sur; siendo su punto de ingreso, Santa Marta - Colombia, donde formaron el primer núcleo ganadero que después fue distribuido a todo sur América (Casas et al., 1998).

Viajes de Colon a América



Fuente: Serrano, J. Los Viajes de Colon.

Una sub-corriente entró a Venezuela; hacia el sur, Lima constituyó el foco principal de dispersión, desde allí atravesaron Bolivia, Paraguay y Chile hasta alcanzar la República Argentina y Uruguay. Otra corriente llegó desde el Brasil y el propio Río de la Plata se convirtió en un foco importante de dispersión. Desde ahí, América comenzó a poblar su

territorio de bovinos y a introducirlos en sus sistemas ecológicos, generando el equilibrio del momento actual. (Villalobos A. 2009)

La transferencia de tecnología de los españoles permitió utilizar a los bovinos en la producción de leche y carne. Lamentablemente, por circunstancias derivadas de la transculturización, de la desarticulación colonial de la organización social pre-existente, y de las nuevas pautas socioeconómicas introducidas; la tecnología no aceptó la hibridación, ni se absorbió plenamente la mediana tecnología española, ni hubo aportes significativos al mejoramiento zootécnico por parte de un pueblo que aprendía a criar bovinos. Así, el desarrollo zootécnico se redujo al uso de una tecnología mínima y, sobre todo, a la rutina de la crianza

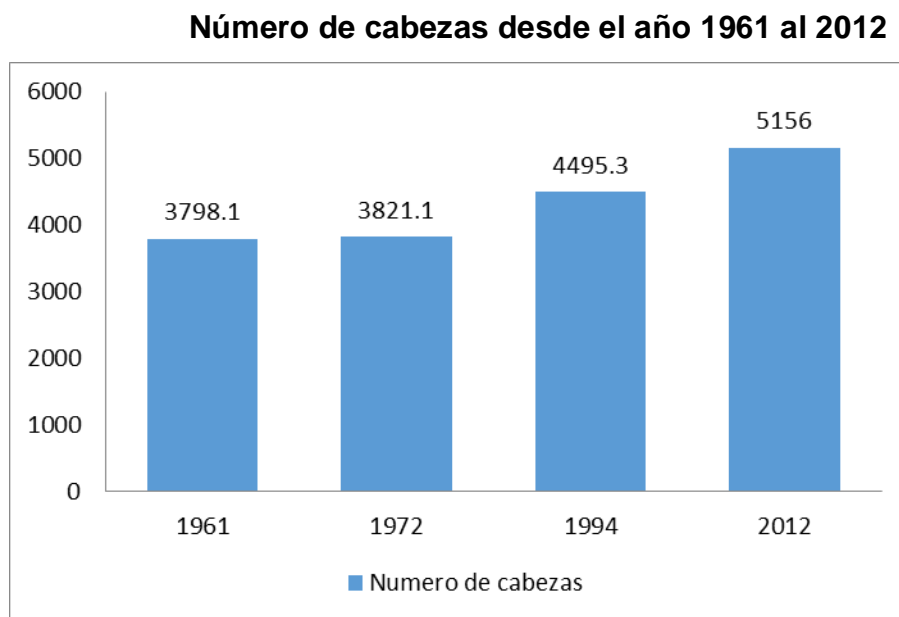
Introducción de Bovinos a América del Sur.



Por estos factores, la selección de los bovinos en América consistió principalmente en su adaptación al nuevo ecosistema. El hombre fue, posiblemente, el que mayor influencia debió ejercer sobre el ecosistema. Una ganadería sin mejores pasturas, hasta hoy, evolucionó adaptándose a pasturas pobres y en ese ejercicio demostró una rusticidad que trajo potencialmente de España. Pero continuó ejerciendo su presión de selección y conservó a los animales más parcos en comer, más resistentes a los embates de las enfermedades y a las condiciones climáticas, y al trabajo duro.

2.2 El bovino criollo peruano

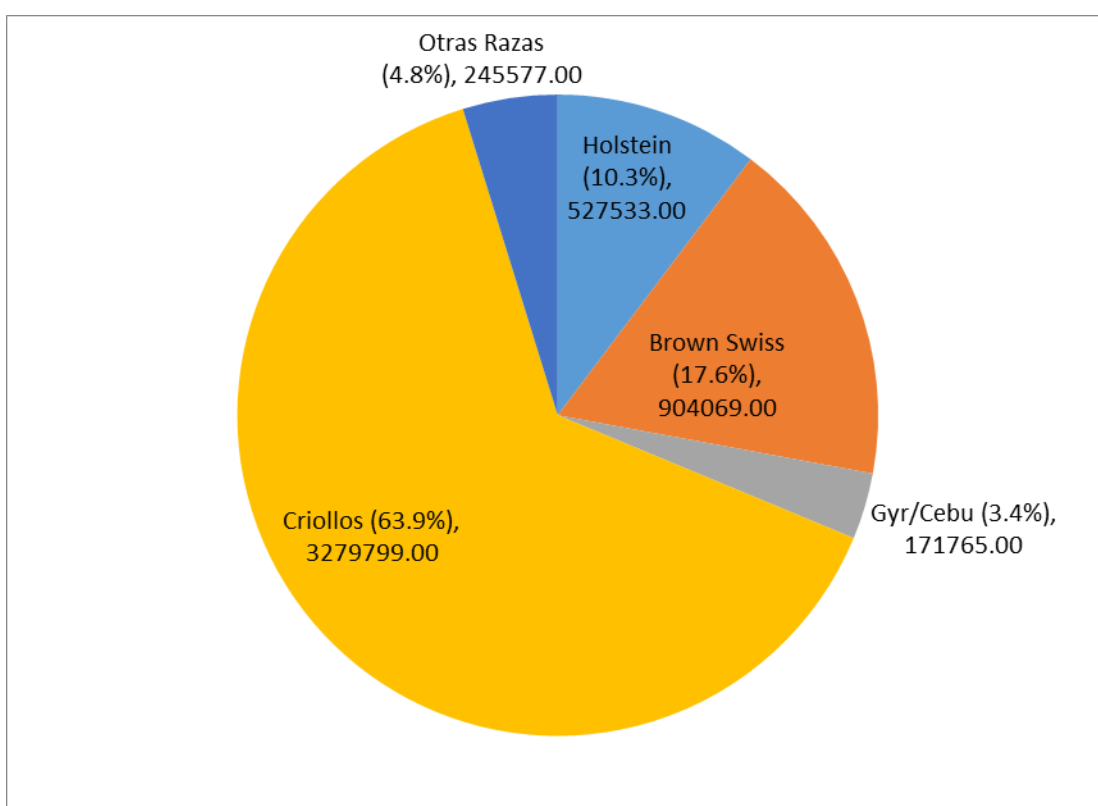
En el Perú, la población de ganado vacuno es de 5 millones 156 mil 44 cabezas, mayor en 14.7% a la población registrada en el Censo Agropecuario de 1994, habiéndose registrado un incremento continuo desde el año 1961.



Fuente. Instituto Nacional de Estadística e Informática IV Censo Nacional Agropecuario 2012

Del ganado Criollo y por razas, predominan los Criollos representando el 63.9%, seguida de la raza Brown Swiss con 17.6%, la Holstein con 10.3%, Gyr/Cebú con 3.4% y otras razas con 4.8% respectivamente; siendo las regiones que albergan el mayor número de ganado bovino Cajamarca, Huancavelica, Apurímac, y Puno, seguido de Ayacucho, Arequipa, Cusco, Moquegua, La Libertad y Ancash.

Número de Cabezas según raza en el año 2012



Fuente. Instituto Nacional de Estadística e Informática IV Censo Nacional Agropecuario 2012

Es decir, la región Sierra es la que alberga el mayor número de cabezas, y en especial de bovinos criollos, con un total de 2'683.300 cabezas, seguido de la selva con 322.300 y finalmente la Costa con 271.200.

**Población de Ganado Vacuno Criollo y por Razas, según Región
Natural, 2012 (Miles)**

Región Natural	Total	Holstein	Brown Swiss	Gyr/Cebú	Otras Razas	Criollos
Costa	612,9	248,8	33,5	37,6	20,2	271,2
Sierra	3774,3	208,3	712,7	18,8	124,7	2683,3
Selva	768,8	70,5	157,9	115,3	100,6	322,3
Total	5156,0	527,5	904,1	171,8	245,6	3276,8

Fuente. Instituto Nacional de Estadística e Informática IV Censo Nacional Agropecuario 2012

A nivel nacional, el consumo per cápita de carnes ha experimentado un aumento. De 48.8 kg/hab/año (2001), en el que la carne de vacuno participa con 5.4 kg/hab/año (11 %), ha pasado a 60.75 kg/hab/año al 2006 (aumento de 24.5%), con un consumo de carne de vacuno de 6.0 kg/hab/año,(11.1% de aumento), manteniéndose aún muy por debajo del promedio de los países andinos (20 kg/hab/año).

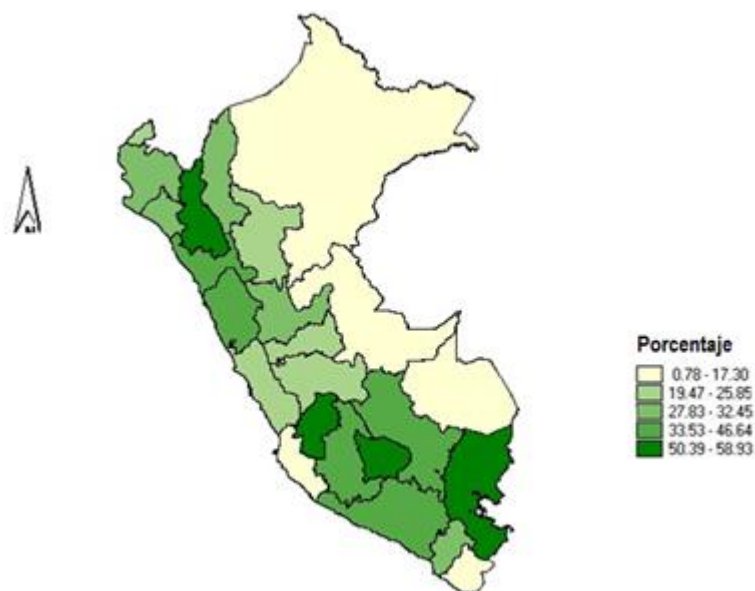
A nivel de costa la producción de carne de vacuno se ha desarrollado sobre la base de animales procedentes de la sierra principalmente, los cuales son llevados a los centros de engorde (engorde intensivo). Estos animales en un alto número de casos deben cumplir con ciertos requisitos en cuanto a su conformación, edad, talla, peso, estado sanitario, grado de mejoramiento genético para lograr un proceso de engorde eficiente hasta el peso de matanza, del mismo los animales de las cuencas lecheras y de la selva, pero en menor proporción. (MINAG 2011)

La producción está dirigida principalmente al mercado local, autoconsumo y al abastecimiento de ganado en pie para centros de engorde. Constituye una importante actividad para la gran los productores de la sierra, y una fuente de ahorro seguro. La mayoría de ganado responde al tipo criollo, con mayor o menor grado de mejora por cruzamiento con otras razas que se difunden regionalmente.

Su alimentación se basa principalmente en los pastos naturales existentes, y también en pastos cultivados de corte y pastoreo, y el aprovechamiento de residuos de cosecha y subproductos agrícolas.

El desarrollo de la actividad es poco tecnificada, con problemas de acceso para una adecuada asistencia técnica, y existencia de problemas sanitarios (muchos de ellos persistentes y crónicos) que merman el aumento de la población y la producción. La crianza de ganado vacuno constituye una actividad económica muy importante no solo para sustento económico de muchas familias y pequeños productores, sino para el país ya que permiten llevar a cabo una crianza económica que abastece de animales para la producción de carne a los principales centros de consumo del país, especialmente a las ciudades ubicadas en la costa, de mayor población.

Mapa de abundancia porcentual de ganado bovino por región



Fuente. Instituto Nacional de Estadística e Informática IV Censo Nacional Agropecuario, con modificación propia.

En la Amazonía peruana los sistemas de producción en general se caracterizan por el empleo de ganado cruzado con diferente grado de mestizaje entre el criollo, cebú y europeo. La alimentación está basada principalmente en el uso de forraje al pastoreo (pasto natural) denominado sistema extensivo, para lo cual se talan y queman extensiones de bosque que luego se siembran. En pocos casos se tienen explotaciones con empleo de pastos cultivados tropicales. El desarrollo de la actividad es complementada con la explotación agrícola u otra actividad económica.

El sistema mixto predomina en pequeñas y medianas explotaciones, cuyos propietarios provienen de la sierra, utilizando ganado cruzado para un doble propósito, alimentándose con pastos cultivados, con o sin suplementos. Los limitantes para el desarrollo ganadero de la Amazonía peruana están dada por su alejamiento a los mercados, falta de vía de comunicación adecuada, uso deficiente de los recursos naturales y la falta de una tecnología adecuada.

2.2.1 Vacunos de leche del Perú

El Perú es uno de los países que consume menos leche per cápita; entre 65 y 70 kilogramos al año. En 1960 era de 67,60 kilos per cápita, en 1970 se incrementó a 75,51 kilos, pero en los años siguientes se redujo hasta 65,92 kilos en 1980; en el 2005 el consumo fue de 60 kilos, y en el 2010 fue de 65,34 kilos al año; mientras que ese mismo año el consumo de leche per cápita más alto fue en Uruguay (291 kilos), seguido de Argentina (220 kilos), Colombia (153 kilos), Brasil (136 kilos), Chile (124 kilos) y Ecuador (85 kilos).

Esto indica que los niveles en la actualidad equivalen al consumo en la década de los 70, donde según la Asociación de Ganaderos Lecheros del Perú (Agalep), el consumo de productos lácteos era principalmente de leche evaporada, un producto obsoleto que fue creado hace más de 70

años por la necesidad de llevar alimentos a los ejércitos a lugares donde no existía energía eléctrica, para lo cual en su momento fue muy eficiente, que hasta la fecha se sigue consumiendo.

De las estadísticas encontradas de la década de los 80 podemos apreciar que mientras la población peruana crecía a un ritmo de 2.4%; la producción Láctea decrecía en 0.66%, reflejándose en un estancamiento del consumo per cápita, por debajo de todos los países sudamericanos a excepción de Bolivia. Para compensar este déficit de producción se importó, hasta 1985 un promedio de 15, 000 TM de leche por año en sus diferentes presentaciones. En el quinquenio 85/90 la importación anual se incrementó hasta llegar a un promedio de 33,032 TM anuales, a pesar de las políticas macroeconómicas, alimentarias y sociales tan diferentes.

Actualmente, la Industria Láctea absorbe el 54% de la producción nacional. El Estado, en cumplimiento de sus Lineamientos de Política, viene promoviendo a través del Ministerio de Agricultura el desarrollo de Cadenas Productivas de leche a nivel nacional en sus distintas Dependencias Regionales, en trabajo concertado con productores, la industria, y los Programas Sociales. (Censo 2012)

2.3 Complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen)

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) del bovino es conocido como Antígenos Leucocítico Bovino (BoLA) y se localiza en el cromosoma 23 y 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 centroméricamente hacia la clase III, y la clase I se ubica hacia el telómero.(Sharif et al., 1998)

Los genes de la clase I codifican proteínas implicadas en el reconocimiento por parte de las células T citotóxicas de las células huésped que han sido infectadas y en la presentación de péptidos a las células citotóxicas T CD8⁺ (Takehima et al., 2006; Tamarin R. 1996).

La región clase II está subdividida en las clases IIa, y IIb, que se encuentran separados por una distancia de 17 centimorgans (Andersson 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 (Takehima et al., 2002). Los genes clase III codifican proteínas de complemento, implicadas en la destrucción de células extrañas (Tamarin R. 1996).

2.3.1 Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine Lymphocyte Antigen - BoLA)

En el ganado, la región clase I, contiene por lo menos 10 genes (Bensaid et al., 1991); según algunos análisis de la secuencia, se han mostrado al menos 4 loci clase I que pueden ser transcritos, y 6 son considerados como loci no clásicos. (Ellis et al., 1999). Los genes clase I son polimórficos, con 28 secuencias identificadas; mientras que con los análisis de sus moléculas (péptidos), usando SDS-PAGE y punto Isoeléctrico (IEF) se muestran una gran expresión de tres loci clase I (Al-Murrani et al., 1994). 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.

Los genes clase II están localizados en dos diferentes regiones del cromosoma 23 del bovino, una llamada clase IIa y la otra, clase IIb separadas por una distancia de 15cM. La clase IIa contiene los genes DR y DQ y la clase IIb los genes DYA, DYB, DMA, DMB, DOB, DOA, TAP1, TAP2, LAPM2 y LMP7 (Takehima 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 y los productos 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) (Takehima 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 parada 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 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).

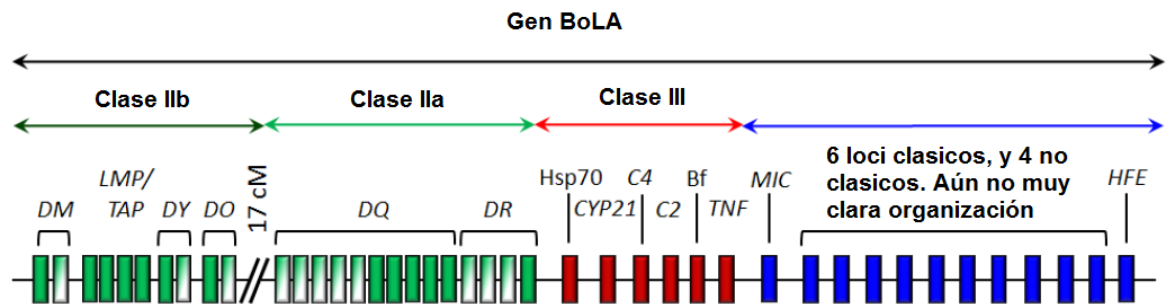
Algunos individuos llevan una sola copia de DQA y DQB, mientras otros tienen haplotipos duplicados. La comparación de secuencias, por southern blot y análisis filogenéticos indican la presencia de cinco genes DQA, de los cuales DQA4 y DQA5 son menos polimórficos que los DQA1, DQA2 y DQA3, con aproximadamente 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 solo se encuentran en los rumiantes, los cuales exhiben altos niveles de polimorfismo y son transcritos en células dendríticas. Los análisis de expresión demostraron la capacidad de los genes DY para trasladar diferentes cadenas polipeptídicas α y β del BoLA clase II (Ballingall et al., 2004).

Los genes DM y DQ solo pueden ser secuenciados usando cebadores derivados de humanos (Niimi et al., 1995). Los genes LMP2 y LMP7 codifican subunidades del 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 factor B (Bf), proteína HSP70, una hidroxylasa 21, el actor 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)

Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA)



2.3.2 Presentación de Antígeno

Para que una proteína extraña sea reconocida por un linfocito T, debe ser degradada en péptidos pequeños que luego tienen que formar complejos con moléculas de clase I y/o II. Esta transformación de las proteínas en péptidos asociados al CMH es denominada "procesamiento antigénico". El que un antígeno sea procesado y presentado junto a una molécula de clase I o una molécula de clase II está determinado por la ruta por la que el antígeno penetra en la célula (por lo tanto podremos distinguir entre "antígeno endógeno" y "antígeno exógeno").

La unión de un péptido a la hendidura de una molécula del CMH carece de la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Una molécula dada del CMH puede unirse selectivamente a una variedad de péptidos diferentes, pero con estructuras similares. Como otras proteínas, las moléculas del CMH se sintetizan en polisomas asociados al Retículo Endoplásmico Rugoso (RER). Las de clase I se unen a los péptidos antigénicos en el RER mientras que la de clase II no.

(Penn et al., 2002)

2.3.2.1 Presentación antigénica del CMH I (antígeno endógeno)

En esta vía se inicia con proteínas intracelulares presentes en el citosol, tanto proteínas procesadas por la misma célula en su metabolismo habitual, proteínas producto de oncogenes, o productos de la síntesis viral en células infectadas o de bacterias intracelulares. Dentro de la célula se encuentra un sistema de marcaje y señalización, similar a la fosforilación, en base a una proteína llamada ubiquitina; en

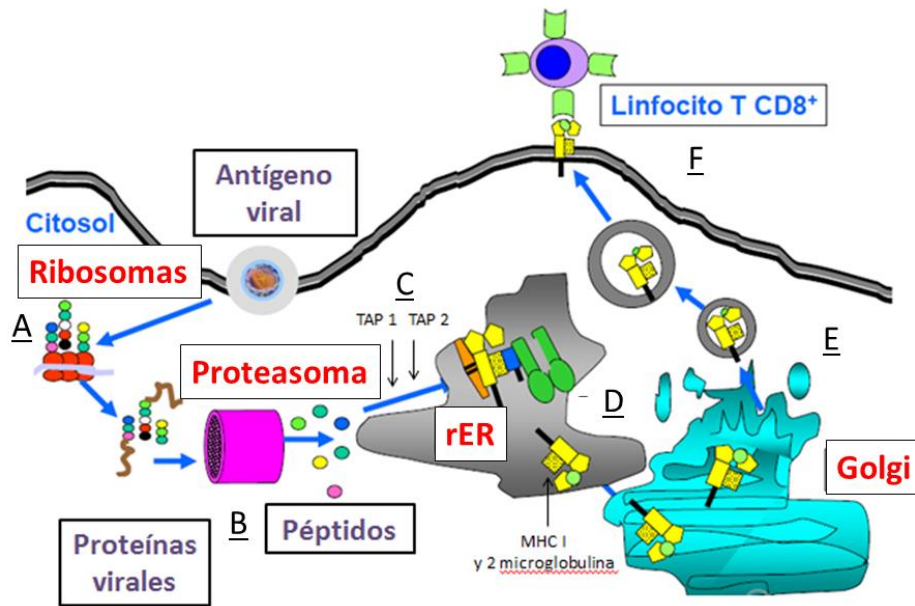
éste caso la ubiquitina se une a secuencias específicas de péptidos y servirá como marca para el siguiente paso.

Una estructura importante en el siguiente paso es un complejo enzimático multiproteico de aproximadamente 700 kD, de forma cilíndrica llamado proteasoma

El proteosoma se compone por dos anillos internos y dos externos con 7 subunidades cada uno, tres de ellas son sitios críticos para la proteólisis, algunas de estas subunidades son codificadas en la región del MHC. Cuando alguna de las proteínas marcadas por ubiquitina ingresa al proteasoma, se degrada a la proteína en los sitios marcados por la ubiquitina, dejando sólo residuos peptídicos, estos residuos son bombeados de forma activa por unas proteínas asociadas al retículo endoplásmico, las proteínas asociadas a transporte (TAP 1 y TAP 2)

Dentro del retículo endoplásmico se sintetizan la cadena del MHC I y la 2 microglobulina, una vez ensamblado es posible la unión con el antígeno y la formación del complejo MHC I/antígeno. Este complejo es transportado mediante tráfico de vesícula desde el retículo endoplásmico, pasando al aparato de Golgi y luego a la superficie de la membrana, donde se fusionará y quedará a disposición para su reconocimiento por los linfocitos CD8 (van Hateren et al., 2010)

Ruta del procesamiento y presentación de antígeno endógeno



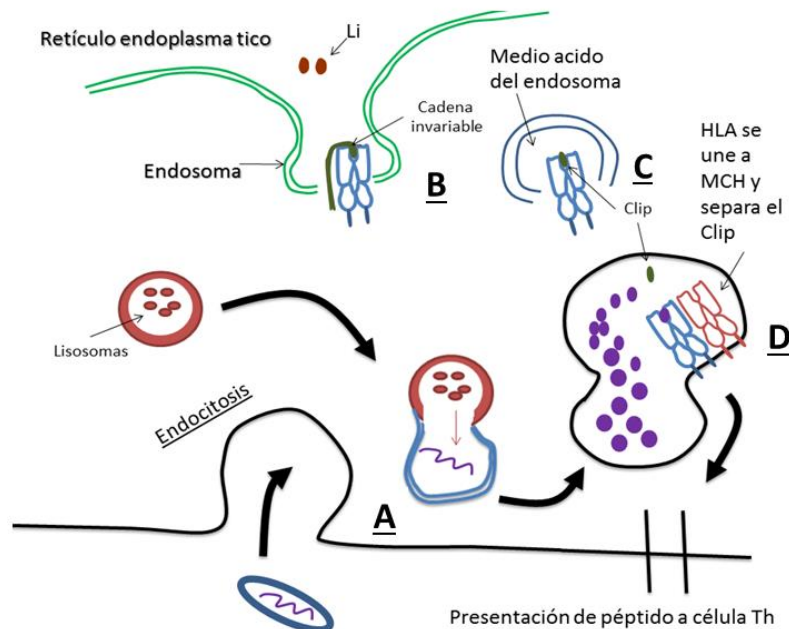
2.3.2.2 Presentación antigénica del CMH II (antígeno exógeno)

Cuando un patógeno exógeno ingresa, éste es fagocitado en la célula, y entra en la célula por endocitosis, tras lo cual un macrófago que presenta lisosomas que contienen un medio ácido, se unen con el endosoma que se integró, formando la célula portadora de antígeno (CPA).

Por otro lado en el retículo endoplasmático se sintetiza la molécula de MCH II, que consiste en dos dominios alfa y dos betas. Una vez sintetizado el sitio de unión, se bloquea por una proteína Li, también conocida como cadena invariable, y bloquea el sitio de unión del MCH para que los péptidos propios no puedan unirse (paso B). Una vez producido esto, el endosoma abandona retículo endoplasmático, y como este presenta medio ácido, la proteína Li, se rompe, dejando un fragmento corto en el sitio de unión llamado CLIP

Los lisosomas dejaron las proteínas del patógeno, quedando pequeños péptidos, esta vesícula se une con el endosoma del MCH. Otra proteína de nombre HLA, se une al MCH, y el CLIP libera, dejando entrar los péptidos del patógeno en el sitio de unión. Ahora, el complejo CMH II, con el péptido específico, sale a la superficie celular, para su encuentro con célula Th. (Holling et al., 2014)

Ruta del procesamiento y presentación de antígeno exógeno



Presentación de péptido a célula Th1

Como la expresión del CMH de clase II está limitada a las CPAs, la expresión de estos complejos está limitada a este tipo de células. Los linfocitos T CD4+ reconocen el antígeno asociado al CMH II, y por ello se refiere a ellos como restringidos a CMH de clase II.

Puesto que las CPAs expresan tanto moléculas de clase I como de clase II, debe existir un mecanismo que evite que las moléculas de clase II se unan al mismo grupo de péptidos que las de clase I. Para ello, al

sintetizarse las moléculas de clase II en el RER, se asocian con otra molécula denominada cadena invariante (Ii) que interacciona con la hendidura de unión al antígeno de la molécula de clase II, y por lo tanto impide la unión de péptidos "endógenos". La cadena Ii es escindida por proteasas, de modo que la molécula de CMH-II queda unida a un fragmento (llamado CLIP), que sigue cubriendo su surco. En algún momento de este proceso la vesícula "ascendente" que contiene CLIP-CMH II se fusiona con una vesícula "descendente" que contiene péptidos procedentes de endocitosis/fagocitosis de antígenos exógenos. Posteriormente se produce el desplazamiento de CLIP y la estabilización de la molécula

2.3.2.3 Reconocimiento de péptido antigénico por parte del linfocitos T colaboradores CD4 y T citotóxicas CD8

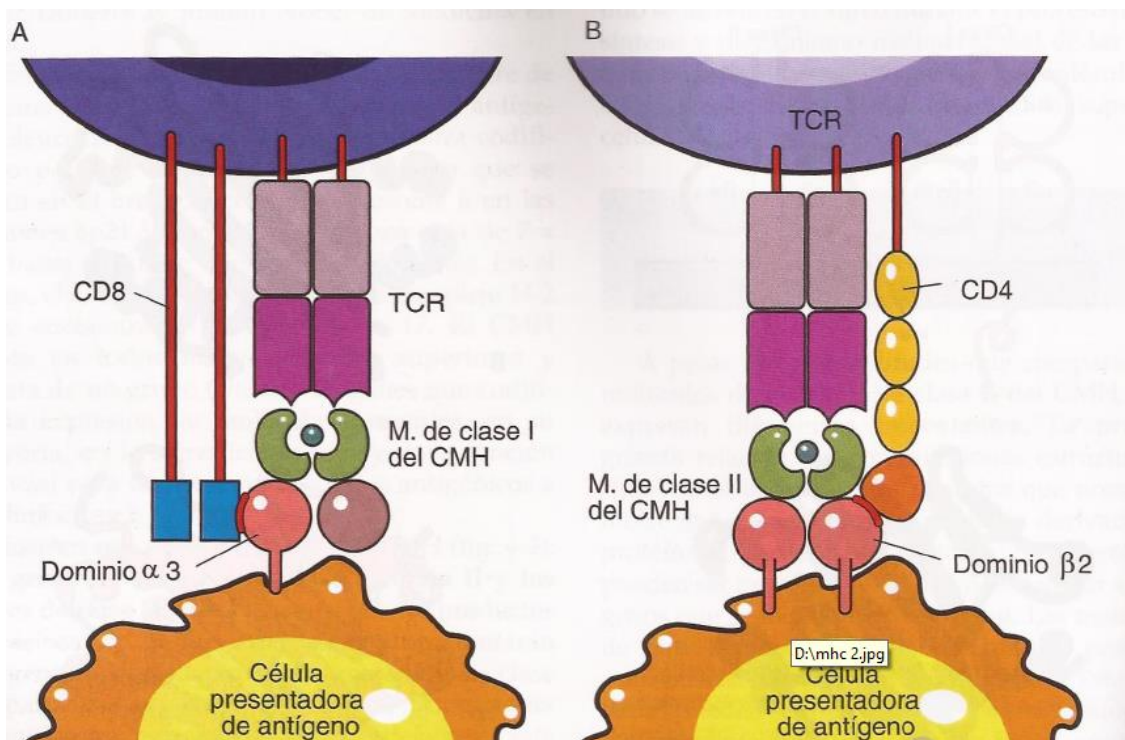
Dependiendo de Antígeno, se liberaran ciertas citoquinas, es así que en caso de reconocimiento de Antígeno endógeno, el linfocito T citotóxico (CT), que circulan a través de todo el cuerpo después de madurar en el timo, con sus receptor TCR(específico a cualquier péptido no celular unido al CMH I), y una molécula de CD8, se unen a la célula presentadora de Antígeno (CPA). Esta unión traerá el disparo por parte del CT al tejido infectado, lo cual será mediado por la interacción directa de moléculas de membrana, señales enviadas por citoquinas, especialmente granzimas que contribuirán a la destrucción específica de ésta.

Por otro lado en el caso de estar ante una célula presentadora de Antígeno exógeno (Macrófago, o Linfocito B), el linfocito LT (ya sea de tipo th1 o th2 respectivamente) se unirá a la CPA, unión que será suficiente para su activación y las moléculas coestimuladoras entrarán en acción: LFA1, CD2 Y CD28 del linfocito T con ICAM 1, LFA3 y CD80 del macrófago; esto hará que éste último entre en un estado en que puede

destruir cualquier bacteria que haya pasado y tras la liberación de Interleucina 1 e interferón Gama, hará que otros macrófagos que no se habían involucrado y otras citoquinas como interleucina 2 estimulen la producción de mas célula T, que se repetirán este proceso.

Un fenómeno similar sucederá en caso estar ante un linfocito B, donde en este caso las moléculas coestimuladoras ICAM1, CD40 y CD80 del LB entrarán en acción con las moléculas LFA 1, CD40 y CD8 del LT, lo que estimulara la activación del linfocito B y el LT liberar citoquinas (Interleucina 4 y 6); lo que originara la división de LB, creando un gran número de celular portadoras de anticuerpos para el Antígeno reconocido. (Broere et al., 2011)

Esquema del reconocimiento del péptido antigénico, por parte del linfocitos T colaboradores CD4 y T citotóxicos CD8



2.3.3 Gen BoLA DRB3

2.3.3.1 Polimorfismo del gen BoLA DRB3

Este gen se encuentra en todos los mamíferos, sin embargo no ha sido estudiado en la misma medida en las diferentes especies. En el ganado bovino presenta un tamaño de 284 pares de bases, habiéndose reportado un total de 130 alelos, sin embargo en ganado equino solo tres secuencias se encuentran en la base de datos de esta región, y 5 del ganado porcino, es decir son bastante carentes las investigaciones en este ganado, más aun en ganado ovino y canino, donde no se encuentran ningún registro.

En el ganado bovino, diferentes autores han estudiado la variabilidad de este gen en distintas razas, tanto criollas como comerciales, detectándose en cada una de ellas diferentes frecuencias alélicas.

Gran número de publicaciones muestran investigaciones utilizando la técnica del RFLP, cuya desventaja radica en la falta de especificidad en cuanto a mutaciones puntuales, habiéndose nombrado en la mayoría de las investigaciones bajo la nomenclatura para ésta, lo que dificulta determinar en algunas ocasiones la secuencia específica, que han reportado.

En cuanto a los bovinos criollos en Sur América, los alelos 11 (presente en Criollo Colombino y Argentino, *18(en Criollo Argentino y Uruguayo), *15, *24, *23 (en criollo Argentino y Mexicano) son los que mostraron frecuencia alélica mayor a 0.005, así mismo los alelos *34, *1, *12, en colombiano, *20, *27, *22, *23, en Argentino, *19, *29 en mexicano, podrían ser considerados como propios de estas regiones ya que se muestran solo en ese ganado criollo respectivamente. (Cuad 2.)

De las razas comerciales, muchos alelos se encuentran compartidos con las criollas, como por ejemplo los alelos alelo *35 y *16, que son característicos de la raza Gyr, según lo reportan Martínez et al., 2005 y

Mota et al., 2002, los cuales también fueron reportados para el BON criollos colombiano y criollo Argentino.

En la raza Holstein se muestra el alelo 16, específico para esta raza, debido a que si se comparten con otras razas criollas, es en menos frecuencia, por otro lado en la raza Shorthorn Japanese, el alelo *9 sería específico para esta raza ya que no se muestra en ningún otra raza con una frecuencia representativa, y finalmente en la raza Jersey los alelos específicos para esta serían el *17. (Cuad. 2)

De forma general el alelo *11 sería un alelo bastante conservado, debido a que se muestra en casi la mayoría de las razas, a excepción de la raza *Aberdeen Angus*, y *Ayrshire*, por lo que aun sería necesario profundizar la presencia de este alelo en esas razas, ya que este se encuentra asociado a enfermedad.

Cuadro 2. Alelos reportados

Ganado	Tamaño de muestra	Numero de Alelos	Heterocigocidad esperado	Alelos con frecuencia mayor a 0.05	Referencia
BON Criollo Colombiano	140	31		DRB3.2*11, 34, 1, 12	Martínez et al., 2005
Saavedreno	125	22	0.91	DRB3.2*16, 36, 8, 11, 27, 39, 7	Ripoli et al, 2004
Criollo Argentino	194	21	0.87	DRB3.2*15, 18, 20, 24, 27	Giovambattista et al., 1996
Criollo Argentino	230	26		DRB3.2*16, 22, 11, 8, 23	Juliaren et al., 2008
Holando Argentino	81	17	0.89	DRB3.2*10, 8, 24, 15	Panei et al, 2009
Criollo Uruguayo	51	22	0.91	DRB3.2*15, 3, 16, 18,	Kelly JE, 2003
Chiguagua Mexicano	Criollo 47	18	0.83	DRB3.2*24, 19, 15	Fernández et al., 2008
Tamaulipas Mexicano	Criollo 51	34	0.92	DRB3.2*23, 24, 39	Tahmoorespur et al., 2007
Sistani Irani	100	19		DRB3.2*34, 15, 44	Sadeghi et al., 2008
Sistani Irani	150	23		DRB3.2*8, 15, 21, 11	Mohammadi et al., 2009
Sistani Irani	65	32		DRB3.2*10, 20, 34,	Behl et al., 2007
Kankrej	50	21		DRB3.2*15, 6, 20, 37, 46	Golijow CD, 1996
Aberdeen Angus	65	16	0.87	DRB3.2*8, 4, 15, 22, 20, 10	Do Nascimento et al., 2006
Gyr Brasileiro	1058	37		DRB3.2*27, 16, 8, 35	Mota et al., 2002

Gyr Brasileiro	28			DRB3.2*35, 5, 31	Machado et al., 2005
Gyr	490	27		DRB3.2*27, 16, 29, 35	Martinez et al., 2005
Gyr	344	20		DRB3.2*16, 3, 23, 20	Martinez et al., 2006
Jersey	172	24	0.895	DRB3.2*10, 15, 17, 21, 36	Gilliespier et al., 1999
Jersey	66	13	0.886	7, 10, 17, 21, 28, 32	Sharif et al., 1998
Holstein	1100	26	0.741	7, 8, 11, 16, 22, 23, 24	Dietz et al., 1997
Holstein	60	14		7, 8, 11, 16, 22, 23, 25	Sharif et al., 1998
Holstein	835	27	0.872	22, 8, 16, 7, 24	Saama et al., 2003
Holstein Canadiense	328			22, 24, 11, 16, 3, 23	Rupp et al., 2007
Holstein Irani	50	27		11, 22, 16, 8	Parnian et al., 2006
Holstein Colombiano	66	27		22, 24, 16, 33, 8	Zambrano et al., 2009
Ayrshire	129	18	0.821	7, 28, 8, 10, 24	Udina et al., 1998
Black Pied	127	21	0.904	22, 24, 11, 16, 18, 23, 8, 27	Urdina et al., 1999
Norwegian Red	523	27		8, 26, 28, 24	Kulberg et al., 2007
Shorthorn Japonés	352	21		8, 9, 21, 30, 33, 26, 24	Takehima et al., 2002
Cebú Braham	22	11		11, 34, 18, 23	Martinez et al., 2005

2.3.3.2 Asociación del BoLA con enfermedades

En cuanto a la infección del virus de leukemia bovina (VLB) en ganado Braham cebú, se reveló que la presencia de los aminoácidos Glu-Arg (en la posición 70-71) que forman el motivo ER, están asociados con la resistencia a linfocitosis persistente (LP), mientras que la presencia de Glu, Arg y Val (en las posiciones 74, 77 y 78) de la cadena BoLA-DR β , están asociados con el desarrollo de tumores. Los alelos que codifican el motivo ER, el *11(0902), *23(2701-2703, 2705-2710), *28(0701, 0702, 0703) (Lewin et al., 1988; Xu et al., 1993) y *20012 (Hernández et al., 2011); por el contrario los alelos *8(1201) (Zanotti et al., 1996; Sulimova et al., 1995), *16 (1501, 1502), *22(1101, 1103, 2403), *24 (0101) (Sulimova et al., 1995 ; Panei et al 2009), y *10(1601) (Miyasaka et al, 2013)

El conteo de células somáticas está asociado con el desarrollo de mastitis; siendo los alelos asociados al aumento de este, el *11(0902) (Rupp et al., 2007; Do Nascimento et al., 2006), *3 (Rupp et al., 2007), *25 (Baltian et al., 2012), *8(1201) (Pashmi et al., 2008) y *31(2801) (Do Nascimento et al., 2006). Así mismo en estudios sobre mastitis en sí, reportan los alelos *7, *11(0902), *18(1801, 1802), *24(0101) (Kulberg et al., 2007), *33(2704, 3102) (Zambrano et al., 2011), *15(4801, 4802), *22(1101,1103), y *51(4201) (Duangjinda et al., 2009), por su asociación con resistencia a la enfermedad, mientras que los alelos *22(1101), *26(0601) (Kulberg et al., 2007), *1(0501, 0502, 0503), *52(0303) (Dungjinda et al., 2009), *23(2701, 2703, 2705-2710) (Baltian., 2012; Abdel et al., 2006), *11(0902) (Ibrahim et al., 2012), y el *8(1201), (Rupp et al., 2007; Zambrano et al., 2011) por su asociación con susceptibilidad; sin embargo en cuanto a en este último alelo, se contradice con lo reportado Pashmi., 2008; donde se reporta para resistencia.

Asociado resistencia a garrapatas están reportados los *18(1801, 1802), *20(2301, 2901 3601), *27(14011, 14012, 1402) en infecciones por *Boophilus microplus* (Martinez et al., 2006), así como también los alelos A, B, C del locus DRB3.2 y BM1815), mientras que el Alelo A del locus DRB31 (Custodio et al., 2011); por otro lado el alelo *4401 se encuentra asociado a resistencia en infecciones causadas por *Amblyomma americanum* (Untalan et al., 2007)

En cuanto a infecciones causadas por protozoarios, el alelo *2703 se mostró presente en animales nacidos tras infección por *Neospora caninum*, y por el contrario en los abortados se reportó la presencia del alelo *1001 (Schwab et al., 2009), lo que podría ser una asociación. Además en tratamientos contra *Theileria parva* (en embriones), aquellos que mostraron resistencia presentaron el alelo *2703, mientras que el *1501, en aquellos infectados.

Se han reportado alelos asociados a resistencia y susceptibilidad en infecciones por bacterias, es así que los alelo *23(2701, 2703, 2705-2710), *31(2801), *26(0601) están reportados por su asociación con resistencia a Brucelosis en bovino criollo colombiano (Martinez et al., 2005), el alelo *11 (0902) en infecciones por *Escherichia coli*, y *16 (1501) asociado a resistencia a *Streptococcus aureus*,; pero por otro lado asociados a susceptibilidad se ha reportado los *24 (0101) en *E. coli* y *11 (0902) en infecciones por *Streptococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, y el *16 (1501) en infecciones por *Staphylococci* (Ibrahim et al., 2012)

Gowane et al (2013) reportó los alelos *1501 y *1801 detectados en bovinos resistentes al virus de patas y hocico (foot-and-mouth, FMDV) tras la vacuna que causa infección en ganado bovino *Bos taurus* y *Bos indicus* terneros de la india de 1 año, ya que es transmitido al pastear; por el contrario los alelos *0701, *1101 y *1103, se detectaron en bovinos que llegaron a infectarse, debido a su asociación a susceptibilidad.

Así como hay alelos asociados a enfermedades, algunos también se encuentran asociados con productividad, es así que el alelo *22 (Pashmi, 2008; Zambrano et al., 2009), *11 (Pashmi., 2008), *22, *36 (Zambrano et al., 2009), se encuentran asociados con el aumento de grasa en leche; por otro lado los alelos *24, *33 (Pashmi, 2008), y *7(Machado et al, 2005) están asociados con el aumento de proteína en leche, mientras que el , alelo *33 (Zambrano et al., 2009b), y *6 (Machado et al., 2005), con la reducción.

2.4 Técnicas de detección de mutaciones.

Para el estudio de un gen, existen diferentes técnicas según a que nivel se desea estudiar, y con qué finalidad.

Generalmente estas técnicas hoy en día se utilizan para el análisis de enfermedades, tanto previo al diagnóstico, como posterior esté, con finalidad de ahondar un poco más en la diferenciación entre dos patógenos similares.

En aquellos casos en que las mutaciones patogénicas pueden estar localizadas a lo largo de toda la secuencia codificante del gen (heterogeneidad alélica fuerte), se deben utilizar métodos "de barrido", que examinan cada exón por separado para detectar simplemente si existe una mutación o no. Estos métodos no identifican el tipo de mutación, pero nos permiten descartar rápidamente todos aquellos exones normales, para centrarnos en el estudio de los exones mutados. En cambio, cuando queremos detectar una mutación concreta, porque ya sabemos que es ésta mutación es la que origina la enfermedad en esta familia, utilizaremos métodos dirigidos a identificar únicamente esa mutación (métodos "de confirmación"). Éstos últimos son quizás los métodos más utilizados en el contexto de un laboratorio diagnóstico, especialmente en aquellas enfermedades que tienen una heterogeneidad

alélica limitada, es decir, enfermedades en las que un pequeño número de mutaciones causan la inmensa mayoría de los casos.

2.4.1 Métodos de barrido

Son utilizados para la detección rápida de mutaciones (sin identificar el tipo concreto de mutación). Estos métodos se basan en la detección de heteroduplex, que se forman por la re asociación lenta de las cadenas tras la desnaturalización del fragmento de ADN. Cuando el fragmento contiene una mutación y se mezcla con un ADN normal, la desnaturalización-re asociación da lugar a moléculas heteroduplex portadoras de un desemparejamiento (mismatch) precisamente en el nucleótido donde está la mutación

2.4.1.1 Polimorfismo de la Conformación de Cadenas Sencillas - *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*

La conformación polimórfica de cadena simple (SSCP) es un método electroforético que permite la detección indirecta de mutaciones y polimorfismos. El principio de este método se basa en que la movilidad electroforética de una molécula en un gel es sensible al tamaño, carga y forma de la molécula. En condiciones no desnaturalizantes las cadenas simples del ADN tienen una estructura plegada determinada por sus interacciones moleculares y por lo tanto por su secuencia (Hayashi, 1991). De esta manera al desnaturalizarse la doble fibra de ADN las cadenas simples tomarán una conformación tridimensional según su secuencia nucleotídica, las cuales se observarán a medida que migren en un gel no desnaturalizante de acrilamida: bis acrilamida. En el análisis de la SSCP, una secuencia mutada es detectada como un cambio de la movilidad en el gel causado por su estructura o conformación alterada (Hayashi, 1993).

La SSCP detecta del 70% al 95% de mutaciones en los productos de PCR de 200pb y de menor tamaño. Si el amplificado es mayor se lo trata con enzimas de restricción para hacerlo más pequeño y poder obtener una mejor definición. Además, se pueden cambiar ciertas condiciones de electroforesis para detectar cambios nucleotídica, estas pueden ser: temperatura, cantidad de glicerol o sucrosa

2.4.1.2 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*

Entre las que destaca TGGE (*Temperatura Gradient Gel Electrophoresis*). Esta técnica se basa en someter una muestra de ADN a una electroforesis en geles de acrilamida con un gradiente desnaturalizante químico o térmico, de manera que la muestra se encuentra con condiciones cada vez más desnaturalizantes a medida que avanza por el gel. Las muestras de ADN son productos de PCR (exones, habitualmente) en cuyo extremo hay una región corta muy rica en citosinas y guaninas (región llamada "clamp" o "pinza" GC), de forma que la temperatura de desnaturalización de esta pequeña región es mayor que la del resto del fragmento. Por tanto, cuando el fragmento va avanzando por el gel, llegará un momento en que se desnaturaliza todo excepto la región del clamp-GC. El resultado es que el fragmento se frena y deja de avanzar por el gel. Cuando la muestra de ADN es un heteroduplex que contiene un desemparejamiento, su punto de desnaturalización será distinto al del fragmento nativo, y por tanto se parará en un punto distinto del gel. Esto se reflejará en la aparición de una banda con distinta migración electroforética

2.4.1.3 Desnaturalización cromatográfica líquida de alta presión (DHPLC)

Se trata de un método que se emplea para el rastreo de mutaciones (ya casi totalmente en desuso debido al auge de la secuenciación), que permite detectar la presencia de variaciones en el ADN aunque no se determinan específicamente cuáles. En este caso, se utiliza la técnica cromatográfica para la detección de heteroduplex de ADN, en lugar de utilizar un gel para correr las moléculas de ácidos nucleicos.

El procedimiento consiste en desnaturalizar (aumentando la temperatura normalmente) una muestra que contenga tanto el ADN problema como un ADN control, que no es más que el mismo ADN problema pero en su versión silvestre o normal (sin mutaciones). Luego se procede a re naturalizar (disminuyendo la temperatura), de manera que aquellas cadenas de ADN que vuelvan a unirse con sus respectivas complementarias (cadena "a" silvestre con cadena "b" silvestre; o bien cadena "a" mutante con cadena "b" mutante) no presentarán diferencia con el estado original; sin embargo, si por ejemplo una cadena "a" silvestre híbrida con una cadena "b" mutante, aquella región (más o menos amplia) en la que exista mutación no complementará, formándose un bucle u horquilla, es decir, una región en la que las bases nitrogenadas no son complementarias y no establecen las uniones características por puentes de hidrógeno en la doble hélice de ADN. Dichas estructuras son los denominados heteroduplex (dúplex de ADN híbridos). Estos heteroduplex migran de forma diferente a los homodúplex en la columna de cromatografía de fase reversa (al igual que lo hacen en un gel de agarosa o acrilamida). La separación se realiza en condiciones desnaturalizantes variables, detectándose las moléculas de ADN midiendo la absorbancia a 260 nm. Esto origina un pico de elución a un tiempo característico. A medida que se incrementan las condiciones desnaturalizantes los heterodúplex migran por delante de los homodúplex, apareciendo los picos correspondientes a heterodúplex antes en el gráfico resultante, el cromatograma. De esta manera, como los heterodúplex se

desnaturalizan a temperaturas distintas a los homodúplex, ambas moléculas dan lugar a picos de elución distintos. (Sivakumaran et al 2003)

2.4.1.4 Rotura de Desemparejamientos (Mismatch Cleavage).

Es un método basado en el hecho de que determinados tratamientos químicos o enzimáticos son capaces de romper un fragmento de ADN específicamente en el punto donde existe un desemparejamiento. Como hemos dicho, los heteroduplex son portadores de un desemparejamiento (mismatch) precisamente en el nucleótido donde está la mutación. Por tanto, el tratamiento con determinadas sustancias romperá el fragmento sólo en el caso de que existan desemparejamientos, de forma que una electroforesis en gel será suficiente para comprobar la presencia de una mutación.

2.4.1.5 Prueba de truncamiento de proteínas - Protein Truncation Test (PTT)

Es un método especialmente dirigido a la detección de mutaciones que crean un codón de parada prematuro y provocan el truncamiento de la proteína. Para llevar a cabo esta prueba, se prepara ADNc mediante RT-PCR (PCR tras transcripción reversa del ARN del paciente) utilizando un cebador que contiene la secuencia del promotor del fago T7 y la secuencia consenso de inicio de la traducción (secuencia de Kozak). Esta construcción permite realizar la transcripción y traducción in vitro, a partir del producto de la RT-PCR. El análisis en un gel de acrilamida de los fragmentos proteicos que resultan de la transcripción/traducción revelará la presencia de una banda correspondiente al tamaño esperado para la secuencia nativa, o bien otras bandas de menor tamaño correspondientes a todas las posibles mutaciones que provoquen un truncamiento del producto proteico (mutaciones sin sentido, los cambios del marco de

lectura y las mutaciones que afectan a las secuencias de ajuste. (Roest P, 1993)

2.4.1.6 Secuenciación.

Las técnicas de secuenciación empleadas actualmente de forma rutinaria están basadas en metodologías publicadas en 1977: el método de Sanger y el de Maxam–Gilbert, siendo el primero el más popular. Ambos se basan en la generación de una población de moléculas marcadas radiactivamente, que representan todos los tamaños y combinaciones posibles. (Ansorge WJ, 2009). El producto de cada una de las cuatro reacciones se somete, en cuatro carriles independientes, a electroforesis en gel de poliacrilamida y se revela siguiendo los métodos clásicos de autorradiografía. Las manchas aparecidas indican las bases presentes en cada posición de la secuencia.

2.4.2 Métodos de comprobación

Son utilizados para detectar de la existencia de una mutación específica

2.4.2.1 Reacción de la cadena polimerasa – Polymerase chain reaction (PCR)

La reacción de la cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Por ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR, por sus siglas en inglés. Esta

conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN duplicarse en millones de partículas viras. El ADNc se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés. (Tamay de Dios. L, 2013).

2.4.2.2 Oligonucleótido específico del Alelo - Allele Specific Oligonucleotide (ASO)

Una técnica bastante utilizada en los primeros años del diagnóstico molecular, aunque hoy en día ha caído en cierto desuso. Se basa en el diseño de sondas específicas para el alelo mutado y para el alelo nativo, utilizando oligonucleótidos. El tamaño de las sondas hace que su T_m (temperatura de desnaturalización) sea lo suficientemente distinta para que —en determinadas condiciones de hibridación— la sonda específica del alelo normal hibride solamente con ADN normal, y la sonda específica del alelo mutado hibride específicamente con ADN genómico que contiene la mutación. El ADN de los pacientes (puede ser tanto ADN genómico como un exón amplificado mediante PCR) se deposita en membranas de nylon haciendo un "dot-blot", y esas membranas se hibridan con cada una de las sondas (oligonucleótidos marcados con radioactividad o con fluorescencia). El análisis de la hibridación de cada sonda permite identificar si la muestra contiene un solo alelo mutado (heterocigoto), dos alelos mutados (homocigoto para la mutación), o ninguno (homocigoto sano). (Castaño et al., 1997)

2.4.2.3 Sistema de Mutación Resistente a la Amplificación - *Amplification Refractory Mutation System (ARMS)*

Está basada en el mismo principio que ASO, es decir, la utilización de oligonucleótidos específicos para la secuencia normal y para la secuencia mutada. La diferencia estriba en que, en el caso del ARMS, estos oligonucleótidos son cebadores de PCR. Se diseñan, por tanto, dos reacciones de PCR que comparten un mismo cebador común pero se diferencian en los cebadores específicos para cada alelo: un cebador amplificará sólo el alelo normal, el otro cebador amplificará sólo el alelo mutado (Moreno, V. 2009). Dada la rapidez y sencillez de la PCR, esta técnica está desplazando cada vez más a la técnica de ASO.

2.4.2.4 Ensayo de Ligación de Oligonucleótidos - *Oligonucleotide Ligation Assay (OLA)*

Se trata de un método algo más laborioso, pero que una vez optimizado permite analizar gran número de muestras con rapidez y fiabilidad. Se basa en la ligación de dos oligonucleótidos, uno de los cuales está marcado con biotina y el otro con una molécula radioactiva o fluorescente. El punto crucial es el diseño de ambos oligonucleótidos a ambos lados de la base mutada. Por ejemplo, un diseño habitual es que ambos oligos hibriden sobre la secuencia normal, de modo que la mutación impida la hibridación de uno de ellos. Como consecuencia, la reacción de ligación sólo será efectiva en presencia de una secuencia normal. Cuando se separan las sondas y se unen por los residuos de biotina a un soporte que contiene estreptavidinas, sólo las moléculas completas (fruto de la ligación de los dos oligos) emitirán la señal correspondiente al marcador (radioactividad o fluorescencia). Por el contrario, el ADN de un sujeto homocigoto para la mutación no dará ninguna señal. En principio, este método también permite detectar los individuos heterocigotos para la mutación, ya que la intensidad de la señal emitida será la mitad de la de un individuo homocigoto normal. El método de OLA permite la

automatización y la cuantificación de la señal cuando se utilizan marcadores fluorescentes, lo que le convierte en un buen método para el análisis de gran cantidad de muestras. (Moreno, V. 2009)

III. METODOLOGIA

3.1 Método de colecta del Material Biológico

Las muestras de Vacunos Criollos que fueron analizadas en el presente trabajo fueron colectadas entre el 2003 y 2011 en las regiones de Puno, Apurímac, Ayacucho, Huancavelica, Junín y Ancash (Fig 1), debido que según el Censo de 1994(INEI 1994), estas regiones mostraron el mayor número de cabezas. Para las colectas se seleccionaron rebaños al azar en cada región y se coordinó con los dueños de los mismos para muestrear un grupo representativo del rebaño, además se prefirió colectar muestras de bovinos adultos procurando que lo individuos seleccionados no estén emparentados.

Fig 1. Modo de sujetar al ganado para el muestreo.



La toma de muestras de folículo piloso se realizó lazando primero al animal seleccionado, y sujetándolo desde la nariz (Fig 1, 2 y 3), para facilitar la extracción; teniéndolo sujeto se procedió al retiro de un mechón de pelo de la cola, tratando de arrancar un mechón de aproximadamente 50 pelos. Para la extracción de sangre, con guantes

quirúrgicos, se ubicó la vena yugular a la altura del cuello, se limpió la zona con alcohol y algodón y con una jeringa de 18mm, con la que se extrajo una alícuota de sangre de aproximadamente 5ml, dentro de los tubos container con anticoagulante EDTA. Tras cada extracción, se rotularon los tubos con los datos del ganado muestreado, colocando nombre del vacuno, edad del animal expresada en cantidad de dientes, rebaño al que pertenece, localidad, provincia, y nombre del dueño, y luego se les tomo su respectivas fotografías. (Cuad 1)

Fig 2. Método de control del ganado para muestreo



Fig 3: Método de control del ganado para muestreo



El muestreo se hizo en la Sierra del Perú, a una altura que oscila entre los 3012 a 6306msnm, debido a que es el hábitat principal de este ganado, siendo Ayacucho, la región de donde se logró obtener el mayor número de muestras y de La Libertad el menor número. (Fig 13)

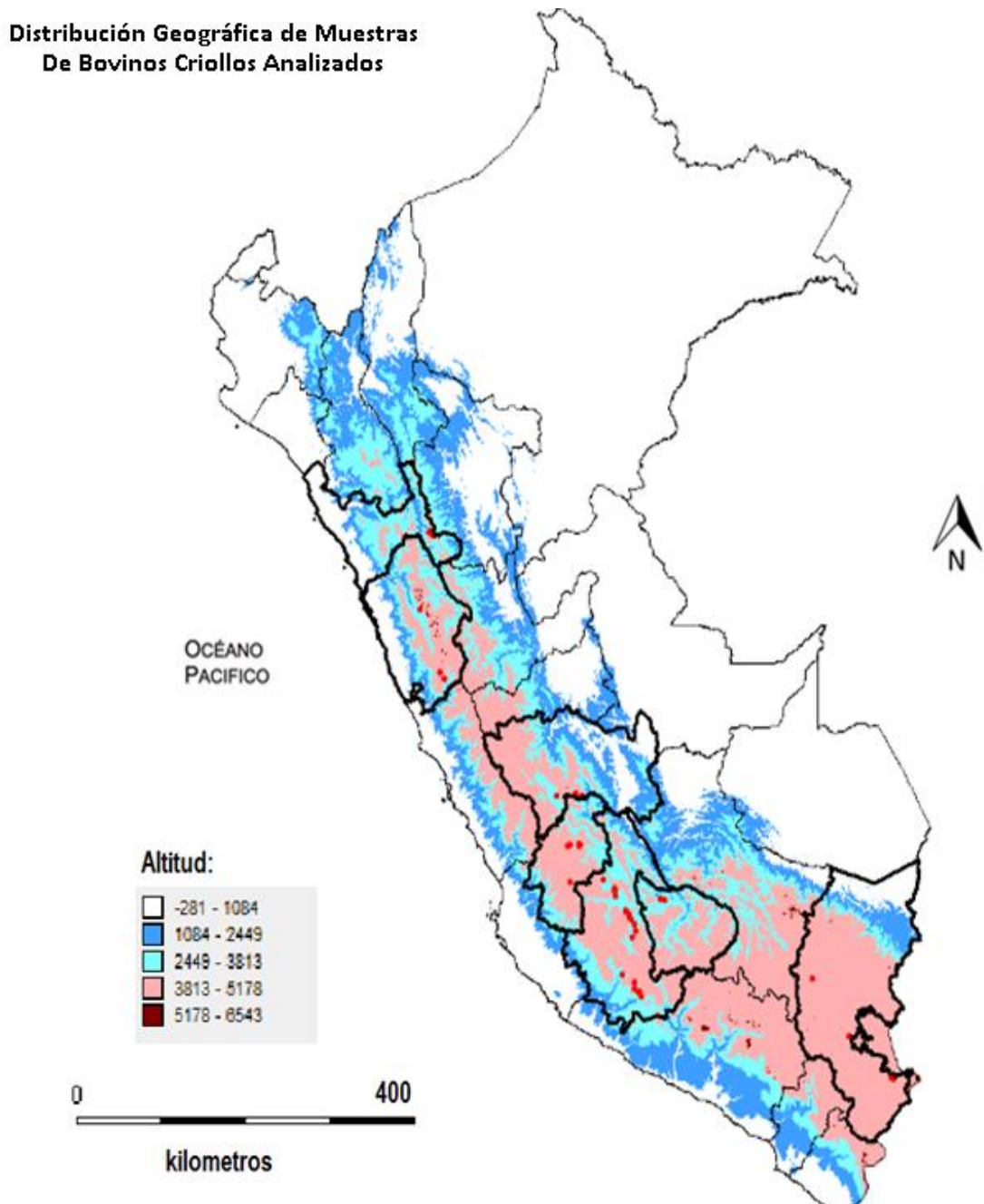
Se recaudó un total de 300 muestras, 45 de Ancash, 28 de Apurímac, 122 de Ayacucho, 40 de Huancavelica, 23 de Junín, 7 de La Libertad, y 34 de Puno; siendo las comunidades más muestreadas Qochapunco, en Ayacucho, y Santa Elena, del departamento de Apurímac. (Cuad 1)

Cuadro 1. Departamentos, Provincias, y comunidades que fueron muestreadas

Departamento	Comunidad	N
Ancash	Mesapampa	9
	Pampa de Lamas Alto	14
	Ticillos	8
	Huascao	14
Apurímac	Ampi	9
	Santa Elena	19
Ayacucho	Pucajasa	6
	Atavi	3
	Atavi-Erusco	11
	Cayara	5
	Chichero	2
	Erusco	6
	Tiquihua	4
	Condorcocha	2
	Qochapullo	41
	Vischaio	1
	Chaviña	5
	Huaca;a	8
	San Andres	5
	Chumpi	2
	Huajipampa	1

	Pucchco	4
	Sihuilla	7
	Chonta	2
	Hutai	7
Huancavelica	Callichico	7
	Cañaypata	10
	Occopampa	5
	Paltamachay	16
	Tacsane	1
	Pillpichcka	8
Junín	Huasapa	6
	Occoro	3
	Panti	8
	Saños Grande	6
La Libertad	Llacubamba	7
Puno	Huacauí	12
	Lampa Grande	9
	Chuquibambilla	6
	Illpa	8
Total		300

Fig 4: Mapa de distribución de muestras de bovino criollo analizados



3.2 Método de trabajo en laboratorio

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Subdirección de Recursos Genéticos

(Sudirge) del Instituto Nacional de Innovación Agraria, en la sede de Lima, y es parte del Proyecto gestión, conservación y uso de los recursos zoo genéticos; así mismo se recibió orientación del Blgo. Mauricio Gonzales en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la Universidad Ricardo Palma.

3.2.1 Extracción y Purificación de Ácidos nucleicos (ADN)

Para la presente investigación se trabajó con ADN extraído de muestras de folículo piloso siguiendo el protocolo modificado de Sambrook et al., 1989.

Para deshacer las fibras de pelo se colocó 40 fibras, cortadas a una distancia de 5 a 10mm del folículo en un tubo de micro centrifuga de 2ml, como se muestra en la Fig 14, y se agregó 750ul de TE 20:5 con 75ul de SDS, tras lo cual se homogenizó usando vortex, y se agregó 20ul de proteinasa K (20ng/ul) dejándose incubar por un lapso de 3 horas a 55°C (Fig 14 y 15)

Fig 5: Colocación de muestras de pelo en tubos 1.5ml



Fig 6: Exposición de muestras de pelo con SDS a 50° para que su disolución



Luego se adicionó 500ul de acetato de potasio 3M y se dejó refrigerar por 10min a -20°C , para luego centrifugar a 14000 rpm por 10min. El sobrenadante se recuperó en un tubo de 1.5ml, el cual fue centrifugado nuevamente a 14000rpm por 3 min y se volvió a recuperar el sobrenadante en un tubo de 2ml que contuvo 800ul de isopropanol helado. Tras homogenizar suavemente por inversión para la formación de Pelet de ADN se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Luego se agregó 200ul de TE 20:5 y 400ul de cloroformo alcohol isoamilico (24:1), homogenizando por un lapso de 1 min en vortex.

Después se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y recuperó el sobrenadante en otro tubo de 1.5ml, al que se le adicionó 200ul de acetato de K 3M, y se agitó en vortex, para luego agregar 500ul de cloroformo alcohol isoamilico (24:1) y mezclar por 1 min en vortex. Luego se centrifugó a 14000 por 7min y se traspasó el sobrenadante a otro tubo de 1.5ml, que fué el tubo definitivo para esa muestra, seguido, se agregó 800ul de etanol absoluto helado y se invirtió suavemente hasta visualizar el algodón de ADN (Fig 7) y se dejó refrigerar a -20°C hasta el día siguiente.

Fig 7: Visualización de nube de ADN



Las muestras refrigeradas fueron centrifugadas a 14000 rpm por 5 min a 10°C y se eliminó el sobrenadante por inversión como se muestra en la Fig 8, cuidando de no votar el pellet, tras lo cual se adicionó 200 ul de TE 20:5 y se mezcló, para luego agregar 8ul de NaCL 5M, y se dejó en vortex por unos segundos.

Se adicionó 800ul de etanol helado, mezclándose por inversión hasta formarse los pellets de ADN, y se dejó a -20°C por 10 min, para luego centrifugar a 14000 por 5 a 10°C, y se eliminó el sobrenadante. Se adiciono 400ul de etanol al 70% helado, y se mezcló suavemente, seguido de una centrifugación a 14000 por 5 min a 10°C, eliminándose el sobrenadante por inversión, este último paso se repitió tres veces, pero al último solo se agregaron 300ul de etanol al 70%.

Luego se adicionó 400ul de etanol absoluto y se centrifugó a 14000 por 5min a 10°C, y se eliminó el sobrenadante por inversión como se aprecia en la Fig 8, después se repitió el mismo paso pero esta vez con 200ul de etanol absoluto. Posteriormente se dejó secar a T^oA por 1 hora, y se

resuspendió en buffer TE 10:1, según el tamaño del pellet, finalmente se dejó almacenar a -20°C hasta posterior uso.

Fig 8: Descarte de sobrenadante por inversión



3.2.2 Cuantificación de ADN y preparación de diluciones

Las muestras de ADN extraídas se cuantificaron en un Sistema Espectrofotómetro Micro-Volúmenes modelo EPOCH de BioTek (Fig 9), obteniéndose los datos de absorbancia a 260nm y 280nm, más el coeficiente 260/280 que nos indicó la pureza del ADN extraído, además de la concentración de ADN en ng/ul. Posteriormente se diluyeron las muestras cuantificadas usando Tris-EDTA 10:1 a pH 8 (Tris HCl 1M, EDTA 5M pH 8) hasta llevarlas a una concentración aproximada de 15 ng/ul, para su posterior amplificación.

Fig 9. Cuantificación de ADN en equipos Epoch



3.2.3 Amplificación del gen DRB3*2

El gen DRB 3 exón 2 del ADN nuclear de las muestras obtenidas fueron amplificada utilizando los primers HL030 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3', HL031 5'-TTAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3', y HL032 5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC -3' (Mota et al., 2002; van Eijk et al., 1993)

Para la preparación del MIX de PCR se trabajó dentro de una campana estéril, para evitar cualquier contaminación, como se muestra en la Fig 10, y 20, y para la amplificación se hizo uso de un termociclador Mastercycler proVapo.protect (Eppendorf), mediante un protocolo de Nested PCR, utilizándose el primer HL030 y HL031 para el PCR I, y el HL030 y HL032 para el PCR II. El Mix PCR I, se preparó con 1ul de Buffer 1X, 0.5ul de Mgcl2 (Apply Biosystem), 0.8ul dNTPs, 0.1ul de Taq (Apply Biosystem), 0.8ul de primers HL030 y 0.8ul de primers HL031 (Apply Biosystem) y 60 ng de DNA, en un volumen vinal de 7ul, como se muestra en el Cuad 2. Para el PCR II se preparó un Mix II con 6.05 de agua libre de nucleasas, 2.5 de Buffer 10x, 1.25 de Mgcl2, 2ul de dNTPs, 2.5 de primers HL031

(Apply Biosystem) y 2.5 de primers HL032 (Apply Biosystem), 0.2ul de Taq 1U(Apply Biosystem), y 8ul de producto de PCR II, como se muestra en el Cuad 3.

Cuadro 3. Preparación de PCR I

PCR I		
Reactivos	Concentración	Cantidad (ul)
Buffer	10x	1
MgCl ₂	2.5mM	0.5
dNTP'S	10mM	0.8
Primer HL030	0.5mM	0.8
Primer HL031	0.5mM	0.8
Taq	1U	0.1
ADN	60ng	6
TOTAL		7

Cuadro 4. Preparación de PCR II

PCR II		
Reactivos	Concentración	Cantidad (ul)
NFW		6
Buffer	10x	2.5
MgCl ₂	2.5mM	1.25
dNTP'S	10mM	2
Primer HL030	0.5mM	2.5
Primer HL031	0.5mM	2.5
Taq	1U	0.2
Producto PCR I	60ng	8.05
TOTAL		25

Fig 10. Preparación de amplificadores

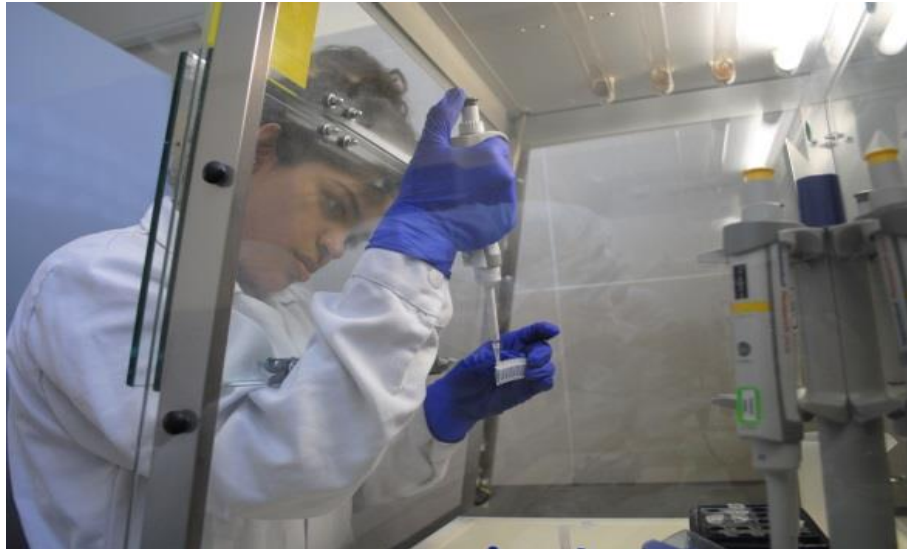


Fig 11. Colocación de muestras en termociclador



3.2.4 Electroforesis de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) para determinación de haplotipos mitocondriales

La electroforesis SSCP se realizó en un equipo de detección de mutaciones de hasta un par de bases, The DCode™ Universal Mutation

System, de BIO-RAD. El procedimiento se hizo de acuerdo a lo indicado en el manual del equipo para la detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (Single-Stranded Conformational Polymorphism, SSCP) con lo cual se buscó encontrar polimorfismos visualizándolos mediante bandas en un gel de poliacrilamida no denaturante al 8%, los cuales se evidenciaron por la migración diferenciada que tengan a causa de sus mutaciones particulares y detectables con este procedimiento.

Para la preparación de los vidrios, primero se lavaron bien los 4 vidrios, tras lo cual se hizo una limpieza con agua MQ y luego con alcohol. Luego de limpiados los vidrios, se colocó un preparado de 1ml de etanol absoluto, 5ul de ácido acético y 3ul de adherente en cada vidrio pequeño (Fig 12), y 250ul de repelente en los vidrios grandes; este último paso se hizo en la campana extractora debido a que el compuesto es toxico; posteriormente los 4 vidrios se dejaron secar por un lapso de 15min. (Fig 13)

Fig 12. Geles secando tras colocar adherente

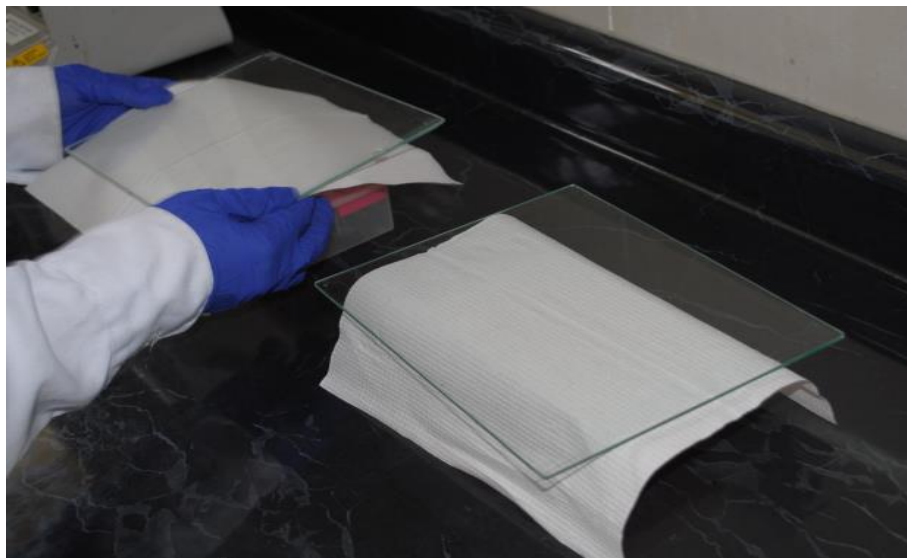
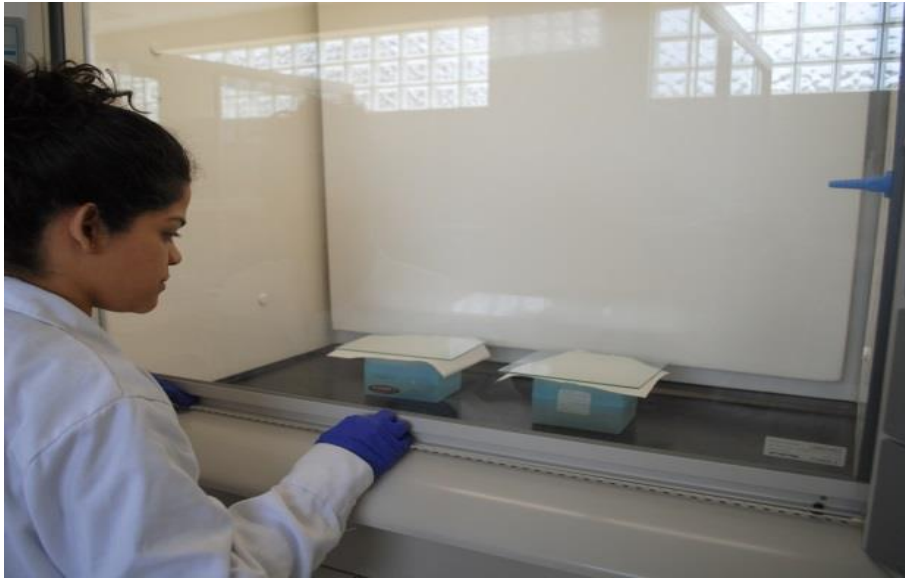


Fig 13. Geles secando en campana extractora tras colocar repelente



Tras colocar adherente y repelente y estando secos, se procedió a hacer el senguiche, para lo cual se colocaron dos separadores a los extremos de cada vidrio grande, y sobre esto el vidrio pequeño, como se muestra en la Fig 14, y luego se aseguraron en un soporte plástico (Fig 15), a fin de evitar el movimiento de éste al momento de la carga de la poliacrilamida líquida.

Fig 14: Colocación de separadores sobre vidrios grandes

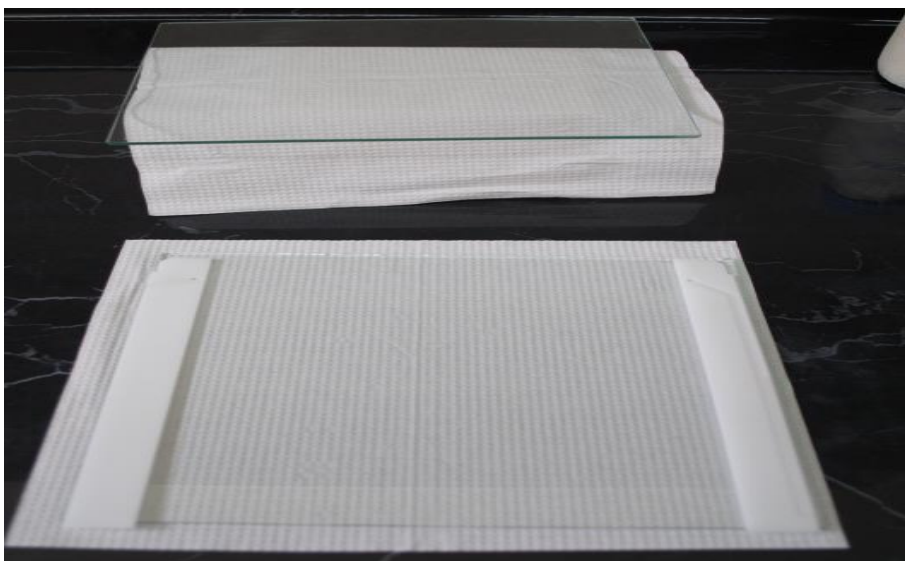
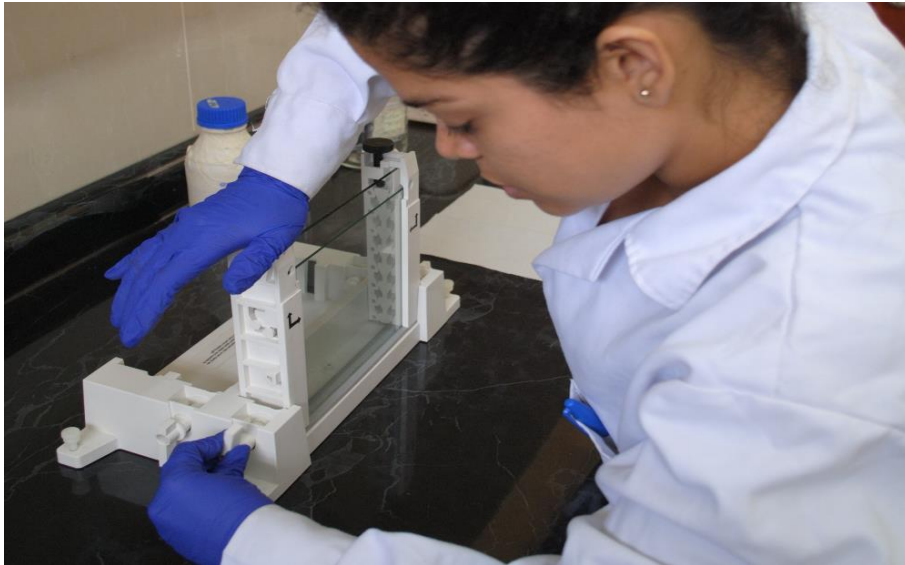
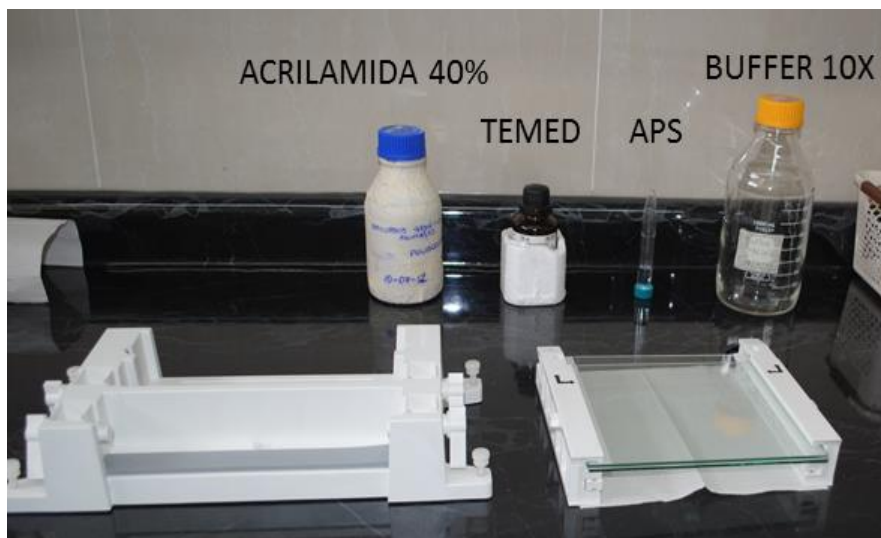


Fig 15 Colocación de “sanguuche” en soporte



Para la preparación de poliacrilamida 8%, en una probeta se agregó 6ml de acrilamida al 40%, 3ml de TBE 10x, 1.5ml de glicerol, y se enraso a 30ml con agua miliQ (Fig 16), se tapó con para film y se mezcló. Luego se colocó la mezcla en un vaso precipitado al que se le agregaron 300ul de APS y 30ul de TEMED mientras se mezclaba, este último paso se hizo de forma rápida para evitar la polimerización del gel a la mitad de los vidrios, ya que la polimerización del preparado en una habitación a 18°C toma 7 minutos (Fig 16), protocolo que fue estandarizado para la presente investigación.

Fig 16: Material utilizado para preparación de poliacrilamida líquida



Para la carga de poliacrilamida líquida, fue necesario contar con un pipetor automático, y una pipeta de vidrio, con lo cual se sirvió desde un extremo de los vidrios de forma rápida pero estable, y evitando formar burbujas, como se muestra en la Fig 17.

Fig 17: Carga de poliacrilamida líquida en vidrios previamente preparados

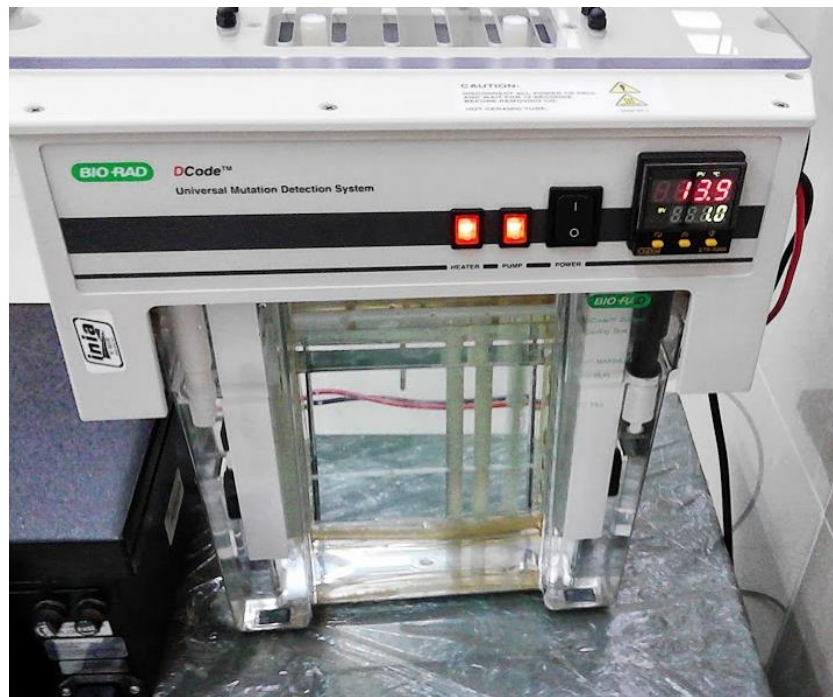


Luego de polimerizado el gel, se colocó en el equipo de electroforesis vertical para detección de mutación DCode Universal Mutation Detection System BIO RAD que se muestra en la Fig 18, la cual se mantuvo en una cámara fría (que está a -3°C), dejándose pre correr por 30 minutos, para luego cargar las muestras denaturadas en cada uno de los pozos que tiene cada gel (16), colocando siempre un ladder que sirvió de guía, y dejándolas correr por 24h a 160V, 33mA, 4Watts, a una temperatura de oscilante entre 4 y 5.5°C . Para la preparación de muestras, se preparó por cada pozo, 7ul de muestra y 5 de ladder Dye, y se denaturó por 5 minutos a 95°C , y pasado ese tiempo se colocó rápidamente en una cubeta fría para su transporte.

Para la visualización de bandas se siguió protocolo de tinción con nitrato de plata que consistió en la fijación del gel con una solución de Alcohol y

ácido acético por un periodo de 10 minutos seguida de una tinción en una solución de nitrato de plata por 15 minutos y finalmente la revelación del gel con una solución con hidróxido de sodio y formaldehído. (Sanguinetti et al., 1994)

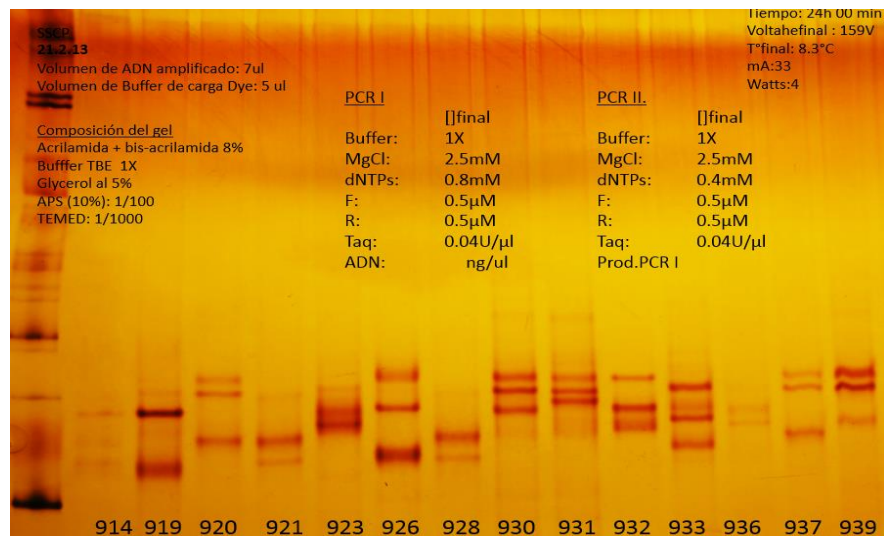
Fig 18: equipo de electroforesis vertical DCode BIO RAD



3.2.5 Detección de polimorfismos

Tras la tinción de los geles, se procedió a detectar los polimorfismos originados por los patrones de bandas o genotipos (Fig 19), los cuales permitieron diferenciar en algunos casos los heterocigotos de los homocigotos.

Fig 19. Gel revelado con tinción de plata para detección de genotipos



3.2.6 Extracción de ADN a partir de gel de poliacrilamida

Para la extracción de ADN a partir de gel de poliacrilamida se siguió la metodología modificada del kit de extracción de ADN a partir de agarosa, para lo cual se cortaron las bandas haciendo uso de un bisturí, colocándolas por separado en tubos de 1.5, las cuales fueron rotuladas para su posterior pesaje. Banda por banda se molió sobre una placa Petri y un mini maso, luego se pasaron los residuos a través de un tubo de 600ul al que se le perforo la base, el cual se colocó dentro de otro tubo de 1.5ul; a fin que sirva de filtro para los trozos grandes de gel de acrilamida. Se dejaron los tubos abiertos en el termobloque por 24 horas a 50°C cubierto con parafilm.

Pasadas las horas indicadas, se centrifugaron los tubos y se extrajo el sobrenadante de cada tubo, los que fueron colocados en otros tubos de 1.5 y se determinó el volumen de sobrenadante obtenido. Luego se le agrego 3 volúmenes de buffer QG (que viene en el kit) por cada 1 volumen de sobrenadante, y se verifico que el color sea amarillo, luego se pasó a columnas con filtro y se colocaron en los tubos colectores, para luego centrifugarse por 1 min. Luego se descartó el contenido del tubo

colector y se les volvió a colocar las columnas; se les agrego 0.75ml de buffer PE y se centrifugó por 1 min para el lavado, luego se descartó el contenido del tubo colector y se volvió a centrifugar por 1 min y se volvió a descarto el tubo colector. Para eludir el ADN de la columna, se colocaron las columnas en tubos de 600ul y se agregó 50 ul de buffer EB y se centrifugó por 1 min; adicionalmente para aumentar la concentración se agregó 30ul nuevamente de buffer EB y se volvió a centrifugar, y se guardaron los tubos a -20°C para su conservación.

3.2.7 Amplificación de ADN extraído de poliacrilamida.

Para la amplificación de ADN, se usaron los primer HL031 y HL032, y solo se hizo uso solo del segundo protocolo de amplificación usado para obtención del GEN completo del DRB3: 94°C por 11 min, luego 10 ciclos de 94°C por 25seg, 60°C por 30seg, 72°C por 30seg; y por ultimo 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 2% expuesto a un voltaje de 100 por 20min.

3.2.8 Preparación de muestra para secuenciamiento y análisis de secuencias

Los productos de PCR de cada alelo extraído, fue colocado en una placa de secuenciamiento (20ul), la cual fue rotulada con el lugar de procedencia y el nombre del gen; así mismo se prepararon 20ul de primers en tubos de 500ul, tanto del primer HL030, como del HL032. Todos los reactivos y productos de PCR fueron embalados, y enviados para ser secuenciados. El equipo usado para secuenciamiento fue el ABI PRISM® 3700.

Se hicieron dos secuenciamientos en la presente investigación, el primero de los cuales con los genotipos completos, y el segundo de ellos, con solo los alelos de los genotipos heterocigotos y los nuevos genotipos encontrados. Tras recibir las secuencias, estas fueron analizadas, con el software SeqScape versión 2.1.1 (Applied Biosystems, Inc.), donde se hizo una corrección cautelosa de las mismas, tratando de evitar el mínimo error posible al momento de corregir alguna base (Fig 20 y comparando con los geles de poliacrilamida obtenidos para detectar los genotipos.

3.3 Análisis Bioinformáticos

3.3.1 Diversidad genética

3.3.1.1 Frecuencias Alélicas

La frecuencia de los alelos representa el impacto de la incidencia de un gen en una población. Los alelos son formas variantes de un gen que se encuentran en la misma posición o locus genético en un cromosoma. En una población las frecuencias alélicas son un reflejo de la diversidad genética, donde cambios en éstas en el tiempo pueden indicar que puede estar afectando la deriva genética o que se han introducido nuevas mutaciones en la población. (Nei, 1973) Para determinarlas, se hizo un conteo de cada alelo en la población total, y se dividió cada dato entre el total de alelos reportados, mediante el programa Populations, 1.2.30 (Langella O, 1999) basándose en una matriz de secuencias, en formato txt.

$$p_j = \frac{A_j}{\sum A}$$

Donde p_j es la frecuencia alélica del alelo j ; A_j , es el número de veces que esta el alelo a , en la población y ΣA , es la sumatoria de todos alelos presentes en el total de la población

3.3.1.2 Frecuencia genotípica

Es la frecuencia de cada uno de los genotipos o polimorfismos posibles que aparecen en una población mendeliana determinada, los cuales son producto de la unión de dos alelos del mismo gen iguales, o dos alelos del mismo gen diferentes.

Para su determinación, se siguió la siguiente equivalencia notable,

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p es la frecuencia alélica de un alelo (ejemplo "j"), q es la frecuencia de otro alelo del mismo gen (ejemplo "y"), la frecuencia genotípica del genotipo JJ es p^2 , la frecuencia del genotipo YY, es q^2 , y la frecuencia del heterocigoto es $2pq$.

En este caso, se trabajó de manera empírica, debido a que no se hayo un programa que permita obtener la frecuencia genotípicas directamente, debido al formato de secuencias con el que se cuenta. (Hallauer et al., 2010)

3.3.1.3 Diversidad genética de secuencias

La diversidad genética se refiere a la variación en el nivel de genes individuales

y proporciona un mecanismo de adaptación para su siempre cambiante medio ambiente. A mayor variación, existe mayor oportunidad de que al menos un grupo de individuos pueda portar la variante alélica adecuada para poder subsistir al nuevo entorno, ya que presentan mayor diversidad

de propiedades fisiológicas (ya sean más resistentes al estrés abiótico que otras, como a temperaturas extremas, eventos de sequía, cambios en la disponibilidad de alimentos o a factores bióticos como enfermedades, plagas y otros (Ramanata et al., 2002), lo que garantizara su reproducción y la existencia de nuevas generaciones, es decir mientras mayor diversidad genética posea una especie, mayor será su capacidad de adaptación a distintas condiciones, por lo que, una especie que exhibe poca diversidad genética es más vulnerable a la extinción.

Hablar de la diversidad genética o Heterocigocidad esperada media no es otra cosa que hablar de la variedad de alelos (población, especie o grupo de especies) (Frankham et al., 2002), de modo que para medir la diversidad genética, es indispensable medir estos últimos parámetros.

La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes y la diversidad nucleotídica es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes. Cuantos más altos sean estos valores más alta es la variabilidad genética de la población. La variabilidad genética puede ser reducida en poblaciones pequeñas y una escasa variabilidad genética disminuye la capacidad de una población para adaptarse a cambios ambientales, generando la disminución de la adecuación de los individuos. Por esto el mantenimiento de las poblaciones requiere la preservación de la variabilidad genética.

La diversidad haplotípica es lo mismo que la Heterocigocidad esperada empleada frecuentemente en estudios de electroforesis de isoenzimas. Tiene poco valor en el análisis de secuencias debido a que cuando se analizan secuencias donde existen diferencias entre haplotipos de una sola base se consideran diferentes por lo que generalmente los valores de H obtenidos de secuencias son altos y no es objetivo compararlos con los valores de H obtenidos a partir de isoenzimas. Si además los valores de H obtenidos a partir de secuencias son cercanos a uno no es posible diferenciar loci o subpoblaciones por lo que esta medida pierde valor para

interpretación biológica. Es importante observar la varianza de H que se ve afectada por el tamaño de muestra de cada subpoblación.

La heterocigosidad esperada (H_e) o diversidad genética de un locus se calcula

mediante la fórmula (Nei, 1973):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Siendo x_i : frecuencia del alelo i y k : número de alelos

La heterocigosidad esperada es equivalente a la heterocigosidad observada cuando las poblaciones se hallan en equilibrio.

La heterocigosidad esperada corregida o no sesgada se calcula para cada combinación locus/población mediante la siguiente ecuación (Nei et al., 1973):

$$H_e = \frac{2n (1 - \sum_{i=1}^K x_i^2)}{(2n - 1)}$$

La diversidad nucleotídica está definida como el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. Definida por la siguiente ecuación (Nei, 1987)

$$\pi = \frac{\sum_{k,j} \pi_{kj}}{nc}$$

Donde nc es el total de comparaciones, π_{kj} es la proporción de nucleótidos diferentes entre dos secuencias i y j .

Otro estimado de la diversidad genética en el nivel nucleotídico es el número de singletons, que se refiere a las mutaciones en un solo individuo.

Tanto para la obtención de diversidad genética como diversidad nucleotídica se hizo uso del programa DNSp v5 (Rozas J, 2009), donde además se obtuvo el número de singletons, que es el número de sitios únicos comparando todas las secuencias, que tiene una variación.

3.3.2 Variabilidad genética

3.3.2.1 Detección de selección natural por poblaciones.

Para detectar si alguno de los alelos fue afectado por la selección natural, se hizo uso del test de Neutralidad, el cual se obtuvo mediante el software Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005), y se basa en dos modelos; modelo neutral y modelo de sitios infinitos, el primero de los cuales fue generado de acuerdo al modelo de coalescencia descrito por Hudson (1990, 1993), que se basa en el modelo estándar de Wright-Fisher y que asume:

Una población diploide con un tamaño constante de N individuos o $2N$ alelos (Donde $N^2 \geq N$).

Donde se dan cruzamientos al azar

No se asumen generaciones

No hay recombinación

Un sitio infinito, con un proceso de tasa mutación neutral, cuyo descendiente difiere del alelo parental por un número de distribución de Poisson de mutación media p .

El modelo de sitios infinitos fue establecido por Kimura (1969, 1973), y Watterson, 1975, siendo las consideraciones las siguientes:

Se asume que las mutaciones son eventos raros

Se asume que las secuencias de ADN son grandes

Las mutaciones multiples en el mismo sitio son eventos extremadamente raros

Por tanto todos los genes son bialelicos.

Para lo cual se usaron varios test. En la presente investigación se aplicaron el Test de Tajima's D (Tajima, 1989), y le test de Fu's (Fu et al., 1997).

3.3.2.1.1 Test de Tajima's D:

En este test es necesario contar con:

El número de sitios segregantes, k

El porcentaje de diversidad por nucleótido, π , la que se haya con la fórmula:

$$\pi = \frac{\sum_{i < j} x_i x_j \delta_{ij}}{N}$$

Donde x_i es la frecuencia de los i holotipos, δ_{ij} es el número de secuencias nucleotídica diferentes entre los holotipos i y j , y N , es el tamaño total de secuencias.

Expectativa de π , θ , la cual se haya mediante:

$$\theta = \frac{k}{\sum_{i=1}^{n-1} 1/j}$$

Con estos estadísticos, el test indica que si la variación de secuencias nucleotídica en los haplotipos estudiado es neutral y la población se encuentra en equilibrio respecto a la deriva y mutación, π y θ

Deben ser estadísticamente indistinguibles uno del otro. En otras palabras

$$D = \pi - \theta$$

Debe ser diferentes de 0. Si se arrojan resultados positivos o negativos, se puede inferir que hay alguna desviación de los supuestos de neutralidad y/o equilibrio.

De modo que si:

$D = 0$: No tenemos ninguna evidencia de cambios en el tamaño de la población o para cualquier patrón particular de selección en el locus

$D < 0$: El tamaño poblacional está en crecimiento, o podemos tener evidencia de selección purificadora en ese locus.

$D > 0$: La población puede haber sufrido un reciente cuello de botella, o podemos tener evidencia de selección balanceada en ese locus

3.3.2.1.2 Fu's FS (Fu 1997)

En este test se sugiere estimar la probabilidad de observar una muestra aleatoria con un número de alelos igual o menor que el valor observado bajo el nivel de observación de diversidad dado y asumiendo que todos los alelos son selectivamente neutrales, si llamamos a esta probabilidad S , entonces:

$$S = \ln\left(\frac{S}{1-S}\right)$$

De modo que si:

F es negativo: Hay evidencia de exceso en el número de alelos, lo que es característico de una población en expansión

F es positivo: Hay evidencia de deficiencia de alelos, lo que es característico de una población que acaba de pasar por un reciente cuello de botella o de una selección balanceada.

3.3.3 Estructura genético - poblacional

El exceso o déficit de heterocigotos, es decir la variabilidad genética total, puede darse entre individuos de la misma subpoblación, entre subpoblaciones y entre individuo referente al total de la población. El análisis AMOVA, nos permite cuantificar de qué manera cada una contribuya a la variabilidad total (Cortes, 2008). En La presente investigación se utilizó el programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005) para determinar la varianza molecular entre individuos, entre subpoblaciones y dentro de las poblaciones.

En este caso se partió de una data haplotípica, de varios grupos de poblaciones, como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Método de análisis de data haplotípica (alélica), de varios grupos de poblaciones.

Fuente de variación	Grados de Libertad	de Suma de cuadrados	de Cuadrados esperados	medios
Entre grupos	G-1	SSD (AG)	$n''\sigma_a^2 + n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$	
Entre poblaciones dentro de los grupos	P-G	SSD (AP/WG)	$n'\sigma_b^2 + \sigma_c^2$	
Dentro de las poblaciones	N-P	SSD (WP)	σ_c^2	
Total	N-1	SSD (T)	σ_T^2	

Donde n 's y los estadísticos F están definidos por:

$$S_G = \sum_{g \in G} \sum_{p \in g} \frac{N_p^2}{N_g}, \quad n = \frac{N - S_G}{p - G}, \quad n' = \frac{S_G - \sum_{p \in g} \frac{N_p^2}{N}}{G - 1}, \quad n'' = \frac{N - \sum_{g \in G} \frac{N_g^2}{N}}{G - 1}$$

$$F_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}, \quad F_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}, \quad \text{y } F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

Los componentes de varianza (σ_i^2) son utilizados para calcular los índices de fijación, análogos a los estadísticos F definidos originalmente por Wright, 1965, que reflejan la correlación de la diversidad a diferentes niveles jerárquicos de división (Slatkin et al., 1995).

La varianza molecular total (σ_i^2) es la suma de las diferencias entre genotipos dentro de una población σ_c^2 , el componente de covarianza entre genotipos en diferentes poblaciones dentro de grupo (σ_b^2) y el componente de covarianza debido a diferencias entre poblaciones (σ_a^2). (Excoffier et al., 1992).

3.3.4 Distancia genética

Los análisis genotípicos de los loci neutrales, son un método importante para describir los patrones de variación genética entre especies, así como también permite inferir los procesos evolutivos que dieron lugar a esos patrones. La frecuencia de cada alelo en cada locus es usualmente diferente en cada población, y la distancia genética son métodos que resumen estas diferencias en una medida global para un par de poblaciones. Generalmente se estima una matriz de distancia entre un grupo de poblaciones, la cual es usualmente visualizada mediante

fonogramas, análisis de componentes principales o aislamientos por parcelas de distancia.

Se han desarrollado varias distancias genéticas, las cuales tienen sus propias propiedades evolutivas, estadísticas, y la relación evolutiva que se infiere a partir de cada distancia puede ser un poco diferente. (Kalinowski, 2002).

En la presente investigación se determinaron, la distancia genética estándar de Nei (1972, 1978), D_s , la distancia de acorde de Nei et al., 1983, D_a , y la distancia de Weir y Weir et al., 1984, mediante el programa MEGA 2.0 (Kumar et al., 2001).

3.3.4.1 Distancia genética estándar de Nei (D_s)

La D_s está definida mediante la siguiente fórmula:

$$D_s = -\ln \left(\frac{J_{XY}}{\sqrt{J_{XX}J_{YY}}} \right)$$

Donde

$$J_{XY} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r X_{ij}Y_{ij}/r, \quad J_{XX} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r X^2_{ij}/r, \quad J_{YY} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r Y^2_{ij}/r$$

Siendo X_{ij} la frecuencia del alelo i en el locus j en la población X , y Y_{ij} la frecuencia del alelo i en el locus j en la población Y . El valor paramétrico de D_s entre dos poblaciones separadas t generaciones es aproximadamente:

$$D_s \approx 2\mu t$$

Donde μt es la tasa de mutación de alelos infinitos en el loci examinado. Esta expresión asume que la fragmentación de la población ancestral ha sido de un tamaño efectivo constante igual al tamaño efectivo de la población ancestral original. Es importante considerar que el valor D_s aumenta linealmente con el tiempo desde 0 a infinito y puede tener valor proporcional a la tasa de mutación.

Cuanto más pequeño el valor de D_s , indica la presencia de flujo de genes entre las 2 poblaciones, o de lo contrario la ausencia de este fenómeno en el presente pero que fueron recientemente de una misma población mayor.

3.3.4.2 Distancia genética de acorde de Nei (D_A)

Esta es una variación de la distancia de Cavalli-Sforza et al., 1967, está establecida por:

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^{m_j} \sqrt{X_{ij}Y_{ij}}$$

Donde X_{ij} es la frecuencia del alelo i en el locus j en la población X , y Y_{ij} es la frecuencia del alelo i en el locus j en la población Y . m_j es el número de alelos en el locus j , y r es el número de loci utilizados.

El valor máximo de D_A es 1, lo que indica ausencia de alelos compartidos.

3.3.5 Árboles Filogenéticos

Los análisis Filogenéticos o árboles evolutivos son las estructuras básicas necesarias para identificar las diferencias entre poblaciones y poder analizarlas desde el punto de vista estadístico.

Un árbol filogenético es una estructura en la que las especies están organizadas en ramas que se unen en razón a su descendencia evolutiva. (HtmI, polygenetics, 1999). Existen diferentes métodos para construir árboles, algunos de ellos basados en métodos fenéticos basados en distancias, o métodos cladísticos basados en caracteres. En este caso se hizo uso de dos métodos fenéticos, el método de grupos de pares no ponderados con la media aritmética (UPGMA) y Neighbor Joining (NJ). (Saitou et al 1987), mediante el programa MEGA 2.0 (Kumar et al., 2001), con bootstrap de 1000 permutaciones, con base en la matriz de distancia de acorde de Nei et al., 1983, Da, y la distancia de Cavalli-Sforza et al., 1967

3.3.5.1 Método UPGMA

Este método emplea un algoritmo de agrupamiento secuencia, donde las relaciones topológicas son identificadas de acuerdo a la similitud, y el árbol filogenético es construido de manera escalonada. Primero es necesario identificar los OTU's (operational taxonomic unit) más similares y se empieza a considerar como un solo OTU compuesto. Subsecuentemente del nuevo grupo de OUT's se identifica el paro que presenta la mayor similaridad, y se continua con este procedimiento hasta obtener un solo OUT's. (Michener, 1957)

3.3.5.2 Método Neighbor Joining

Este método es similar al UPGMA pero en vez de utilizar la distanciar una matriz de distancia evolutiva en pares, toma esa matriz como punto de inicio y construye una matriz de distancia con las tasas corregidas antes de proceder con la unión con los OUT's cercanos. (Elias et al., 2005)

3.3.6 Análisis de coordenadas principales (PCoA)

Es un método que, como el análisis componentes principales (ACP), se basa en una ecuación de valor propio, eigenvalue o autovector, pero que puede utilizar cualquier medida de asociación. Como los ejes ACP, se trazan rectas unas contra otras en un espacio euclidiano, sin embargo en este caso no se producen biplot

El objetivo del PCoA es calcular una matriz de distancia y producir una configuración gráfica en un espacio de pocas dimensiones de Euclides (Típicamente dos o tres), de modo que las distancia entre los puntos en la configuración reflejen la distancia original lo mejor posible, para lo cual se hizo uso del programa Genalex 6.5 (Peakall et al., 2012), con un porcentaje de variación de 73.05 para el eje 1, 26.76 para el eje 2, de 0.20 para el eje 3.

3.3.7 Análisis de Redes

La recombinación de genes, hibridación entre líneas y homoplasias, origina relaciones entre poblaciones que no representan los métodos tradicionales de filogenia basados en árboles bifurcados, donde coexisten los genes descendientes con sus ancestros y los eventos de recombinación pueden producir relaciones reticuladas. Para su representación gráfica se han desarrollados diversos análisis de redes o Network, que tienen en cuenta estos fenómenos a nivel de población y permiten estimar la filogenia y evolución intraespecífica (Posada et al., 2001).

Los haplotipos ancestrales en la población, se pueden evidenciar en estas representaciones, ya que cuando un haplotipo muta no es probable que lo hagan todas las copias del haplotipo o se extingan rápidamente, por tanto un solo haplotipo ancestral da lugar a múltiples descendientes, lo que queda representado como un árbol de haplotipos con multifurcaciones,

donde se evidencian incluso los pasos mutaciones representados en puntos.

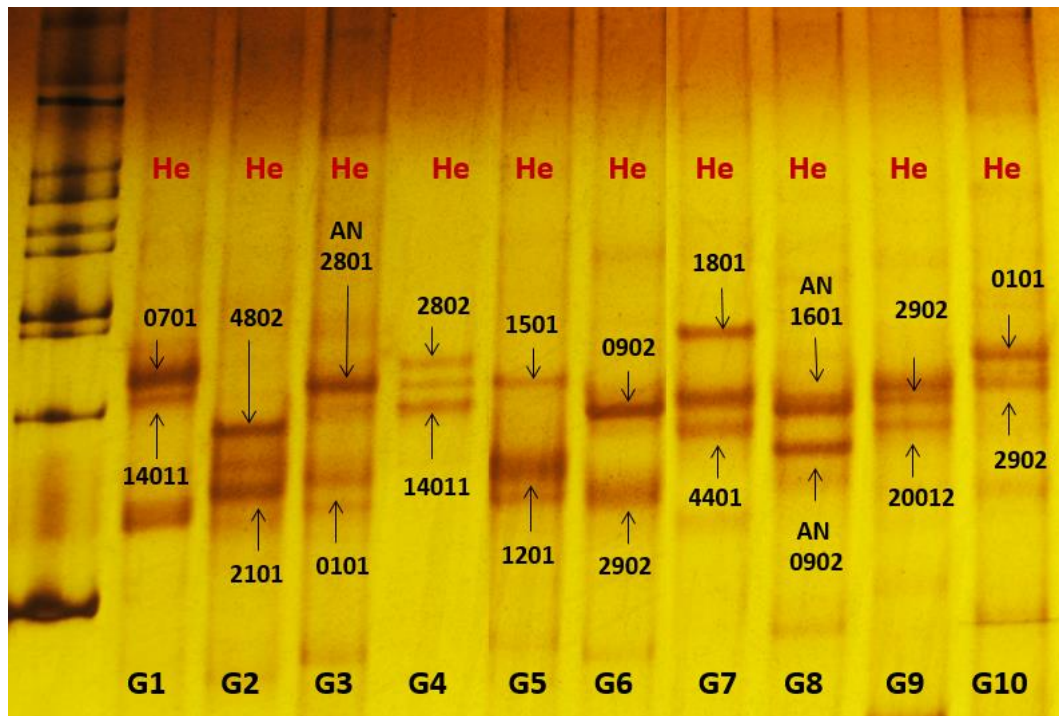
En este caso se hizo uso del programa NETWORK 3.01 (Rohl, 1999), basado en la matriz de haplotipos arrojado por el programa DNSp v5 (Rozas, J. 2009).

IV. RESULTADOS

4.1 Fase laboratorio

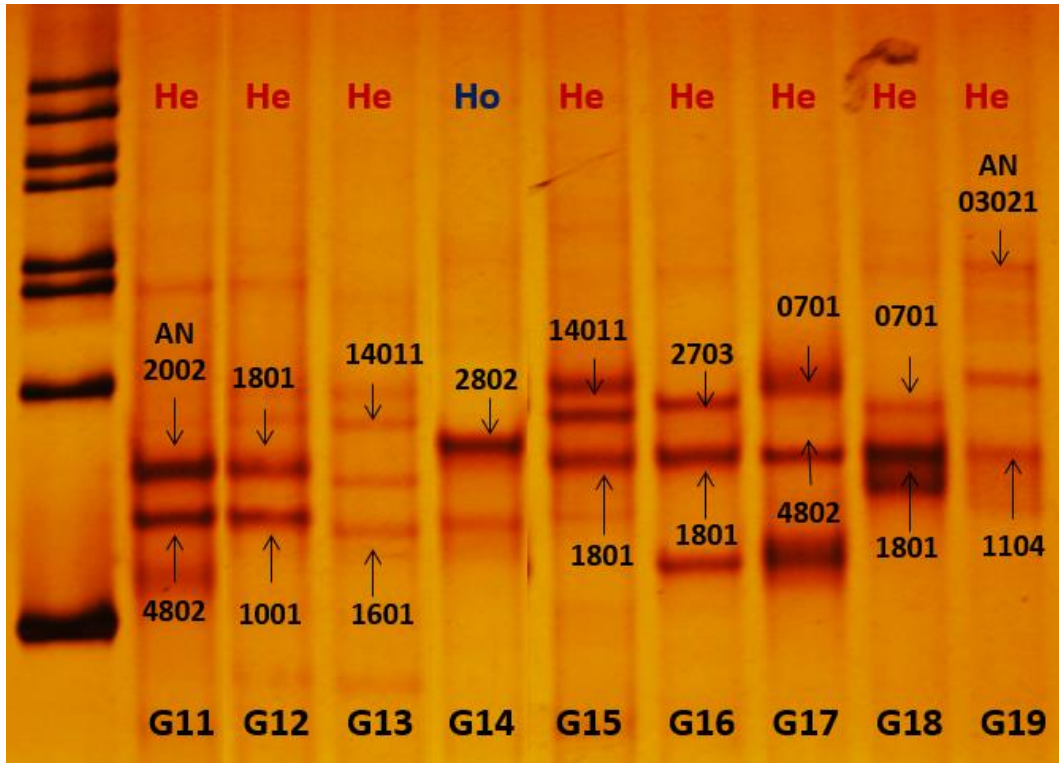
Para la determinación de polimorfismos se hizo uso de la técnica del SSCP, donde mediante geles de poliacrilamida en condiciones estandarizadas para el gen en estudio, y exponiendo a un voltaje de 160V, en una cámara fría, se permitió la migración del ADN extraído, como se muestra desde la Fig 20 a la 23.

Fig 20. Primer gel de poliacrilamida genotipos detectados



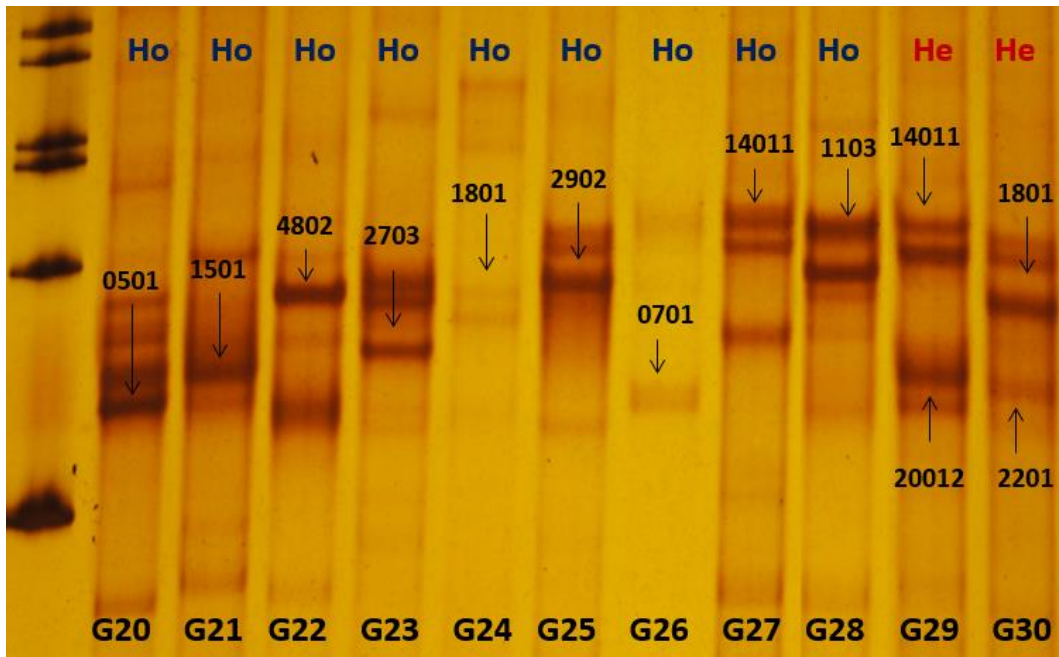
He (Rojo): Estado Heterocigoto, G: Genotipo, AN: alelo nuevo similar al alelo mencionado

Fig 21. Segundo gel de poliacrilamida de genotipos detectados



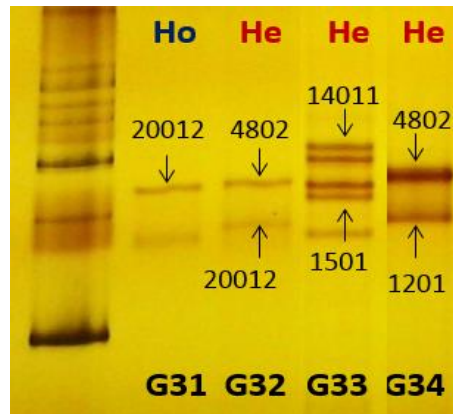
He (Rojo): Estado Heterocigoto, Ho (Azul): Estado homocigoto, G: Genotipo, AN: alelo nuevo similar al alelo mencionado

Fig 22. Tercer gel de poliacrilamida de genotipos detectados



He (Rojo): Estado Heterocigoto, Ho (Azul): Estado homocigoto, G: Genotipo, AN: alelo nuevo similar al alelo mencionado

Fig 23. Cuarto gel de poliacrilamida de genotipos detectados

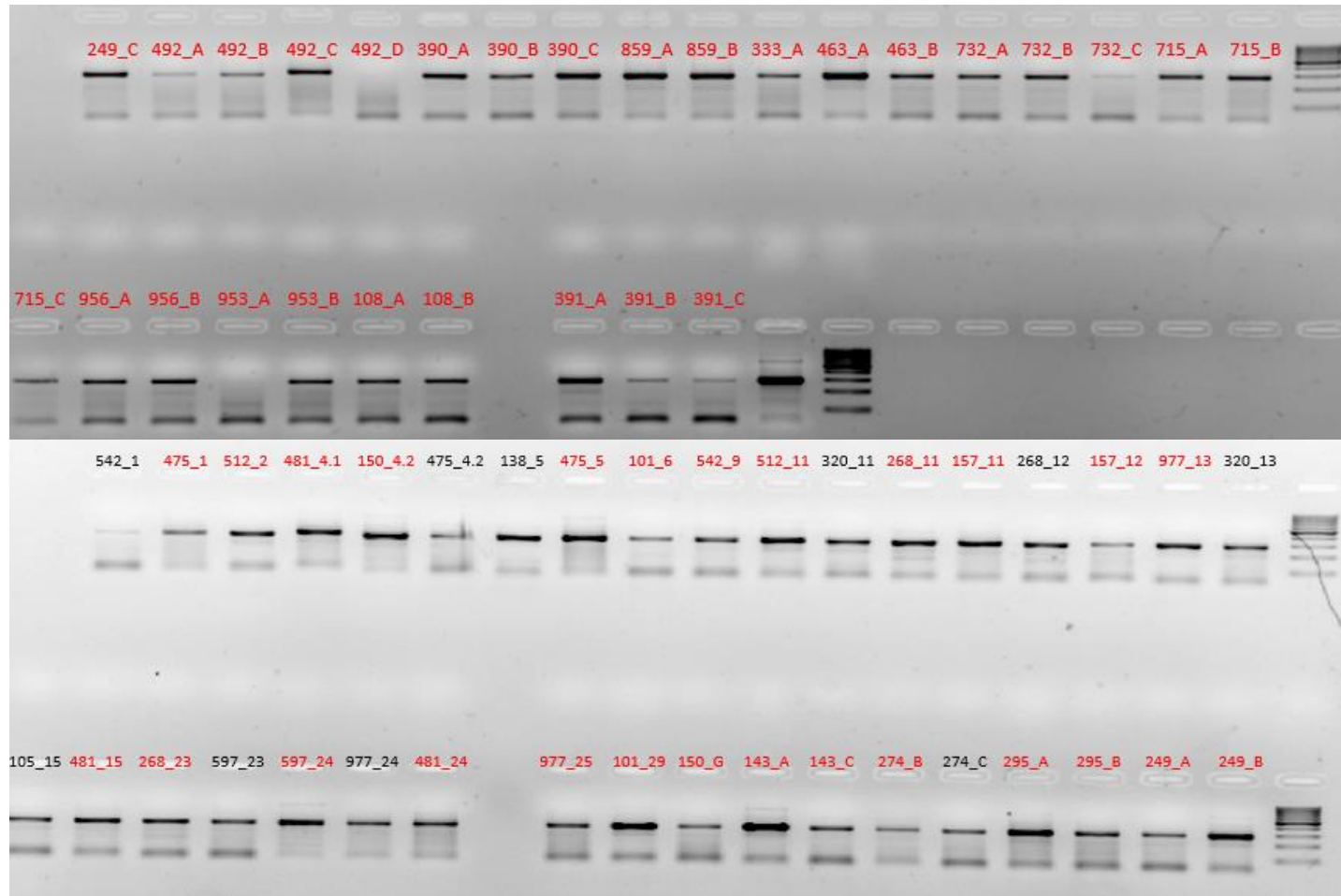


He (Rojo): Estado Heterocigoto, Ho (Azul): Estado homocigoto, G: Genotipo, AN: alelo nuevo similar al alelo mencionado

Para la identificación de genotipos se determinaron los patrones de bandas en el total de las muestras, identificándose 34 genotipos. Debido a la alta resolución de esta técnica, se logró apreciar también las sombras de algunos alelos, lo cual permitió descifrar el estado de los genotipos, estando 23 en estado heterocigoto y 11 en estado homocigoto

Luego de la detección de genotipos se procedió a detectar los alelos comunes en el total de los patrones, registrándose así 52 bandas (Alelos), las cuales fueron extraídas haciendo uso de un bisturí a partir geles consenso que contenían solo los genotipos ya determinados; codificando cada alelo según el número de muestra procedente. Cada uno fue colocando por separado en tubos de 1.5ml, para luego ser procesadas haciendo uso de la metodología modificada para acrilamida, del kit Quiagen de extracción de ADN a partir de gel de agarosa. Finalmente tras la extracción se amplificó el ADN extraído y se confirmó la calidad mediante electroforesis horizontal, en gel de Agarosa al 2%, como se muestra en la Fig 24, para el posterior secuenciamiento.

Fig 24: Calidad de ADN de alelos extraídos



Los códigos en cada carril de agarosa, son los numero de muestras seguidos del alelos extraído del gel de acrilamida. Las muestras en rojo son las que se escogieron para el secuenciamiento.

Tras el secuenciamiento, se hizo un alineamiento con las secuencias de la base de datos NCBI, mediante un blast y se identificaron las secuencias que tenían un 100% de similitud con las secuencias reportadas, a fin de determinar si algunas de éstas ya habían sido estudiadas en otras investigaciones; las que no mostraron similitud con ninguna secuencia, o tuvieron un score muy bajo, fueron consideradas como secuencias nuevas. Tras este procedimiento se hizo un cuadro (Cuad 5) donde se asociaron los alelos encontrados, o determinados como nuevos, con los genotipos.

Cuadro 6. Genotipos y alelos determinados

Genotipo	Alelos	
G1	*0701	*14011
G2	*4802	*2101
G3	*0101	*512-2-AN(2801)
G4	*2802	*14011
G5	*1501	*1201
G6	*2902	*0902
G7	*4401	*1801
G8	*542-9-AN(1601)	*542-pol17-AN(0902)
G9	*20012	*2902
G10	*2902	*0101
G11	*4802	*143-B-AN(2002)
G12	*1801	*1001
G13	*1601	*14011
G14	*2802	
G15	*1801	*14011
G16	*1801	*2703
G17	*4802	*0701
G18	*1801	*1101
G19	*1104	*953-A-AN(03021)

G20	*0501	
G21	*1501	
G22	*4802	
G23	*2703	
G24	*1801	
G25	*2902	
G26	*0701	
G27	*14011	
G28	*1103	
G29	*20012	*14011
G30	*2201	*108-B-AN(1801)
G31	*20012	
G32	*4802	*20012
G33	*1501	*14011
G34	*4802	*1201

Los alelos nuevos se muestran codificados con el número de muestra en este proyecto, seguido del alelo, seguido de AN (alelo nuevo), y entre paréntesis el alelo con el que tiene mayor %de similitud.

4.2 Fase de Análisis de Datos generados

4.2.1 Diversidad genética

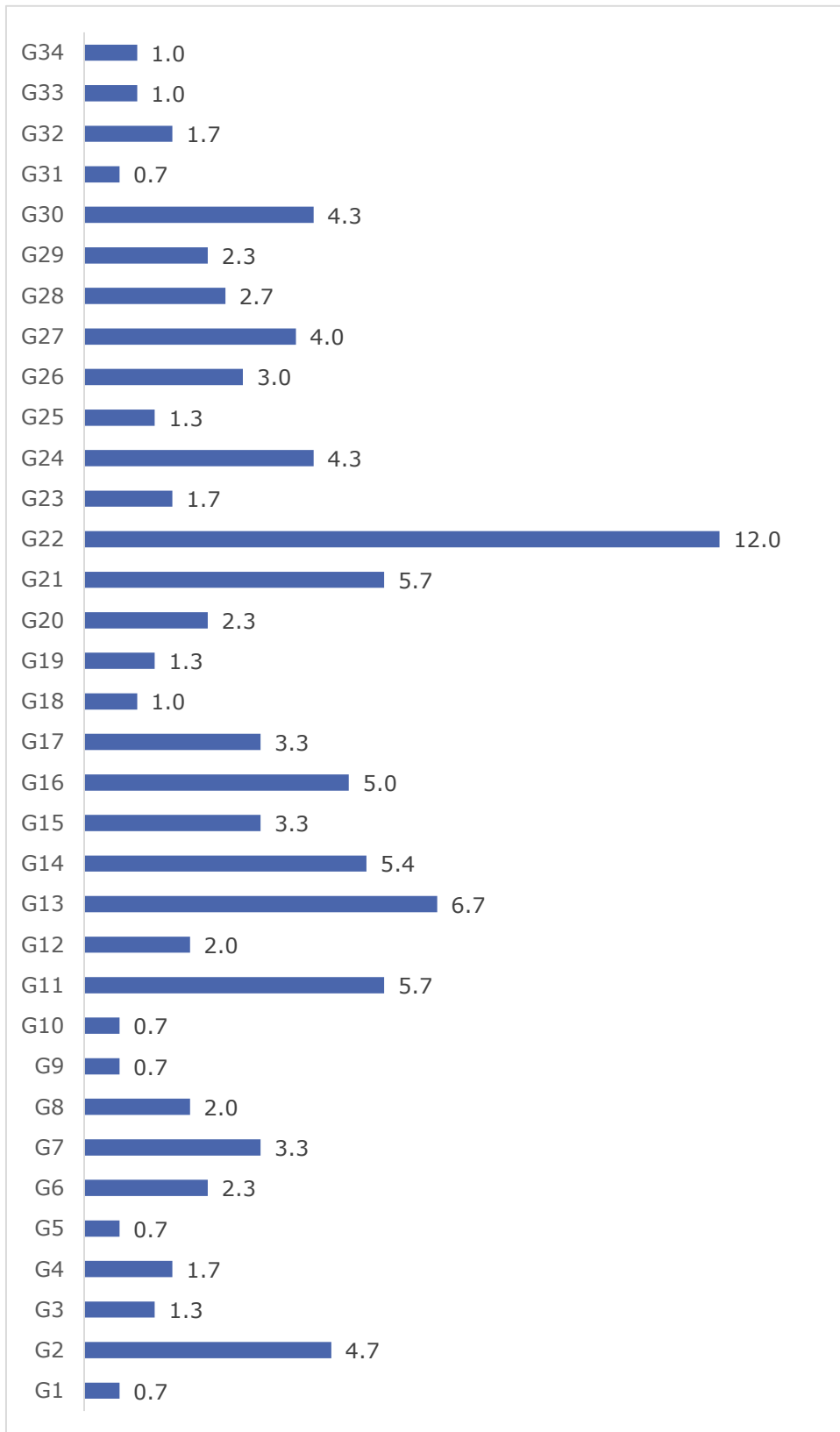
4.2.1.1 Frecuencia genotípica

Del total de genotipos, dos se mostraron exclusivos de la región Ayacucho, el 9 y el 10, mientras que solo el genotipo 13 estuvo presente en todas las regiones, como se muestra en la Fig 25.

Por otro lado el genotipo 22 se mostró con la mayor frecuencia, presentándose en el 4% de la población total, por el contrario los genotipos 31, 10, 9, 5 y 1, tuvieron la menor frecuencia, como se aprecie

en la Fig 26. El rango de frecuencia de la mayoría de los genotipos estuvo entre el 0.3 y 1.9%.

Fig 26. Frecuencia porcentual de genotipos



A nivel de regiones, Ancash mostro al genotipo 22 y 24 con una muy alta presencia (Fig 27), así mismo este último genotipo estuvo con la mayor frecuencia en Apurímac y Ayacucho como se muestra en las Fig 28 y 29).

En Huancavelica, el genotipo 11 fue el más común, seguido del genotipo 13 como se aprecia en la Fig 30; por otro lado Junín mostro al genotipo 2 como el más frecuente, y tanto La Libertad como Huancavelica al genotipo 13, como se muestra en las Fig 31 y 32. Por último Puno mostró el genotipo 14 con mayor frecuencia. (Fig 33)

Fig 27. Frecuencia genotípica porcentual de Ancash

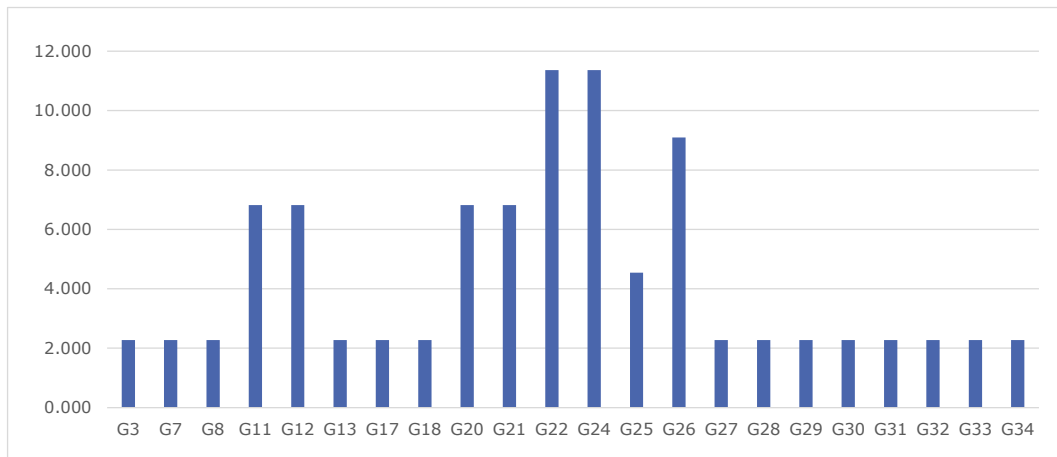


Fig 28. Frecuencia genotípica porcentual de Apurímac

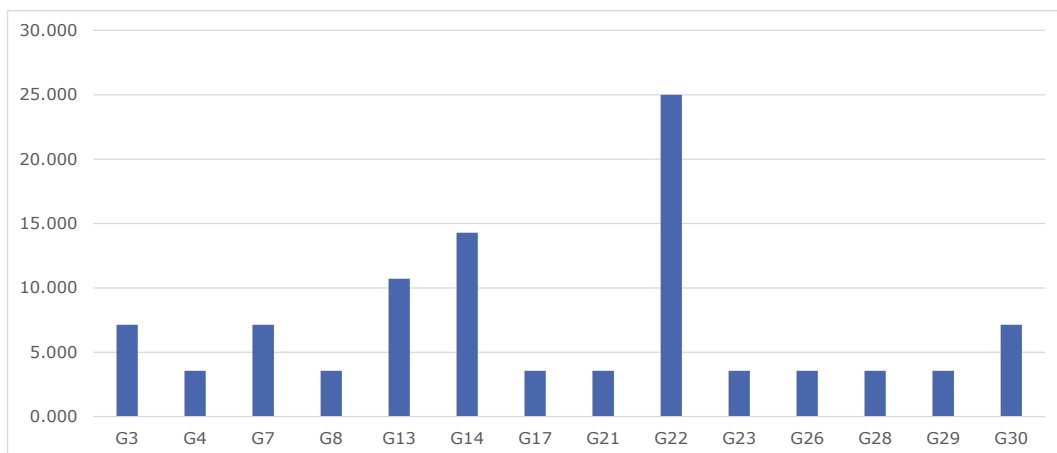


Fig 29. Frecuencia genotípica porcentual de Ayacucho

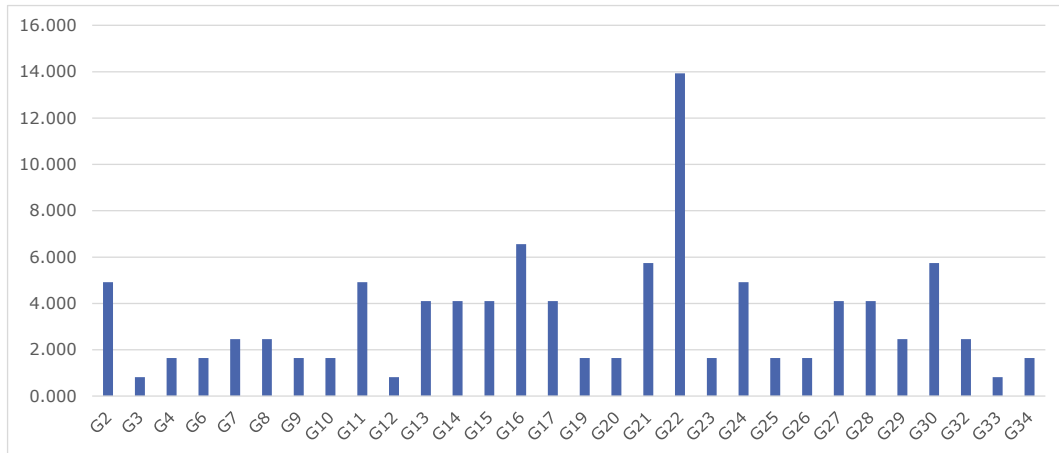


Fig 30 .Frecuencia genotípica porcentual de Huancavelica

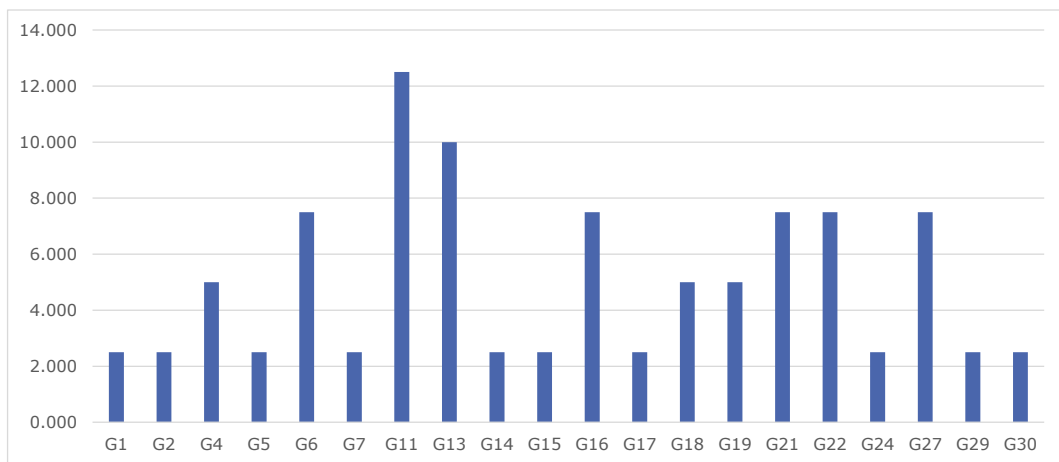


Fig 31. Frecuencia genotípica porcentual de Junín

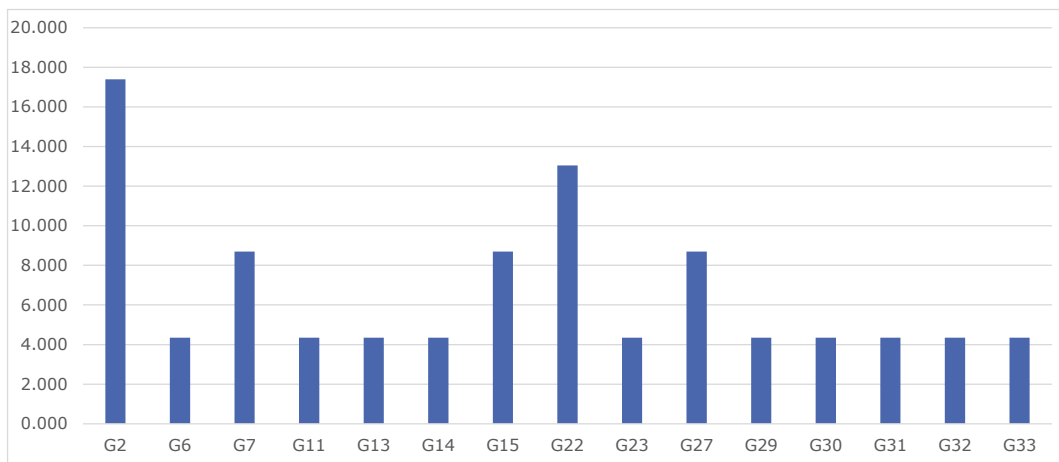


Fig 32. Frecuencia genotípica porcentual de La Libertad

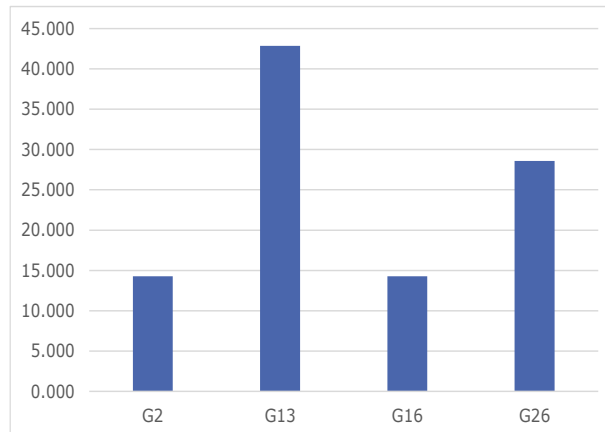
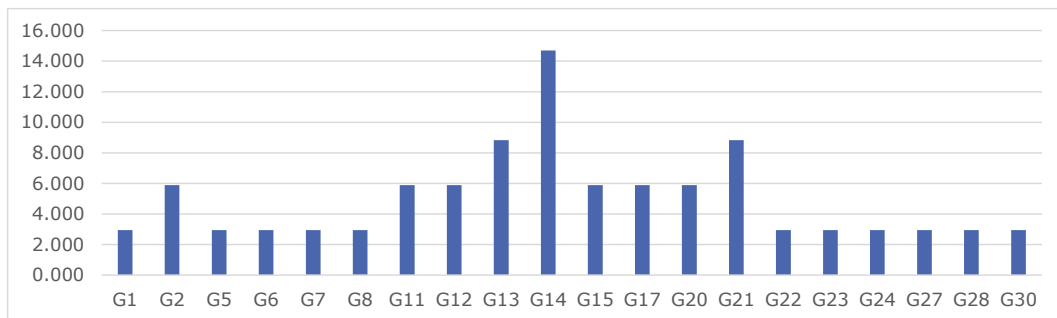


Fig 33. Frecuencia genotípica porcentual de Puno



4.2.1.2 Frecuencia alélica

En la población total se reportaron 471 secuencias y 27 alelos, de los cuales * 4802, *1801, *14011 fueron los que mostraron la mayor frecuencia relativa, con 1.180, 0.121, 0.118 respectivamente, seguidos del *1501 con 0.046; *2802 y *0701 con 0.044; *1601 y *2703 con 0.42; *143-B-A.N(2002) con 0.036; *20012 con 0.033, *2902 con 0.031; *2101 y *4401 con 0.29; *2201 y *108-B-A.N(1801) con 0.027, *1103 con 0.016; *0501, *0902 y *0101 con 0.014 ; *1001, *542-9-A.N(1601) y *542-pol17-A.N(0902) con 0.012; *1201 con 0.010; *1104, *953-A-A.N(03021) y *512-2A.N(2801) con 0.008 y finalmente *1101, con 0.006, siendo el alelos con menor frecuencia absoluta en la población total. (Fig 43 y Cuad 6)

De la región Ancash se reportó un total de 65 secuencias y 22 alelos, de los cuales los *1801 y *4802 fueron los que presentaron mayor frecuencia relativa, con 0.2 y 0.169 respectivamente, seguidos del alelo *0701 con 0.076, *14011 y *1501 con 0.061; *1001, *20012, *0501, *143-B-A.N(2002), *2703, con 0.046, *2902 con 0.030; y los que presentaron la menor frecuencia fueron *0101, *512-2A.N(2801), *1103, *1201, *1101, *4401, *542-9-A.N(1601), *542-P17-A.N(0902), *2201, *108-B-A.N(1801) y *1601 con 0.015 respectivamente. (Cuad 6)

De la región Apurímac se reportó un total de 41 secuencias y 17 alelos, de los cuales el alelo * 4802 fue el que presento mayor frecuencia relativa, con 0.19, seguido de los alelos *14011 y *2802 con 0.121, el alelo *1601 con 0.073, los alelos *1801, *0701, *0101, *512-2A.N(2801)*4401, *2201, *108-B-A.N(1801) con 0.048; y los alelos -1501, *20012, *2703, *1103, *542-9-A.N(1601), *542-P17-A.N(0902) con 0.024, siendo estos últimos los que tuvieron la menor frecuencia. (Cuad 6)

De la región Ayacucho se reportaron 193 secuencias , y 27 alelos, de los cuales el alelo *4802, *1801 y *14011 presentaron la mayor frecuencia relativa con 0.202, 0.119 y 0.108 respectivamente; seguidos del alelo *2703 con 0.051, *1501, *20012, *2902 con 0.041, *2802, *2802, *0701, *2201 y *108-B-A.N(1801) con 0.036, * 143-B-A.N(2002) y *2101 con 0.031, *1601 y *1103 con 0.025, *0101, *4401 con 0.20, *542-9-A.N(1601) y *542-P17-A.N(0902) con 0.015, *0501, *1201, *0902, *1104 y *953-A-A.N(03021) con 0.010, y finalmente * 512-2A.N(2801) y *1001 con 0.005, siendo estos dos últimos los que mostraron la menor frecuencia. (Cuad 6)

De la región Huancavelica se reportó un total de 69 secuencia y 20 alelos, los alelos *14011 y *4802 fueron los que mostraron mayor frecuencia relativa con 0.173 y 0.144, seguido de *1801 con 0.115, *143-B-A.N(2002) con 0.072, *1501 y *1601 con 0.057; *2703, *2902, *2802 y *0902 con 0.043; *0701, *1104, *953-A-A.N(03021) y *1101 con 0.028, y finalmente *20012, *2201, *108-B-A.N(1801), *2101, *4401 y *1201 con 0.014, siendo los que presentaron la menor frecuencia. (Cuad 6)

De la región Junín se reportó un total de 38 secuencias, y 15 alelos, siendo los alelos *4802 y *14011 los que tuvieron la mayor frecuencia relativa con 0.236 y 0.184 respectivamente, seguido de los alelo *1801 y *2101 con 0.105; *20012 con 0.078; *4401 con 0.052, y finalmente *143-B-A.N(2002), *1501, *1601, *2703, *2902, *2802, *0902, *2201 y *108-B-A.N(1801) con 0.026, siendo estos últimos los que tuvieron la menor frecuencia relativa. (Cuad 6)

De la región La Libertad se reportó un total de 12 secuencias y 7 alelos, de los cuales el los alelos con mayor frecuencia relativa fueron *4401 y *1601 con 0.25, seguidos de *0701 con 0.166, y finalmente *0701, *4802, *1801, *2101 y *2703, con 0.083, siendo estos últimos los que tuvieron la menor frecuencia. (Cuad 6)

De la región Puno se reportó un total de 53 secuencias y 21 alelos, de los cuales los alelos *4802 y *14011 fueron los que tuvieron la mayor frecuencia relativa con 0.132, seguidos del *1801 con 0.113; *2802 con *0.094; *1501 con 0.075; *1601 y *0701 con 0.056; *2101, *143-B-A.N(2002), *0501 y *1001 con 0.037 y finalmente *4401, *2703, *2902, *0902, *2201, *108-B-A.N(1801), *1201, *1103, *542-9-A.N(1601) y *542-pol17-A.N(0902) con 0.018, siendo estos últimos los que mostraron la menor frecuencia absoluta. (Cuad 6).

No hubo ningún alelo que se haya mostrado de manera exclusiva en alguna región.

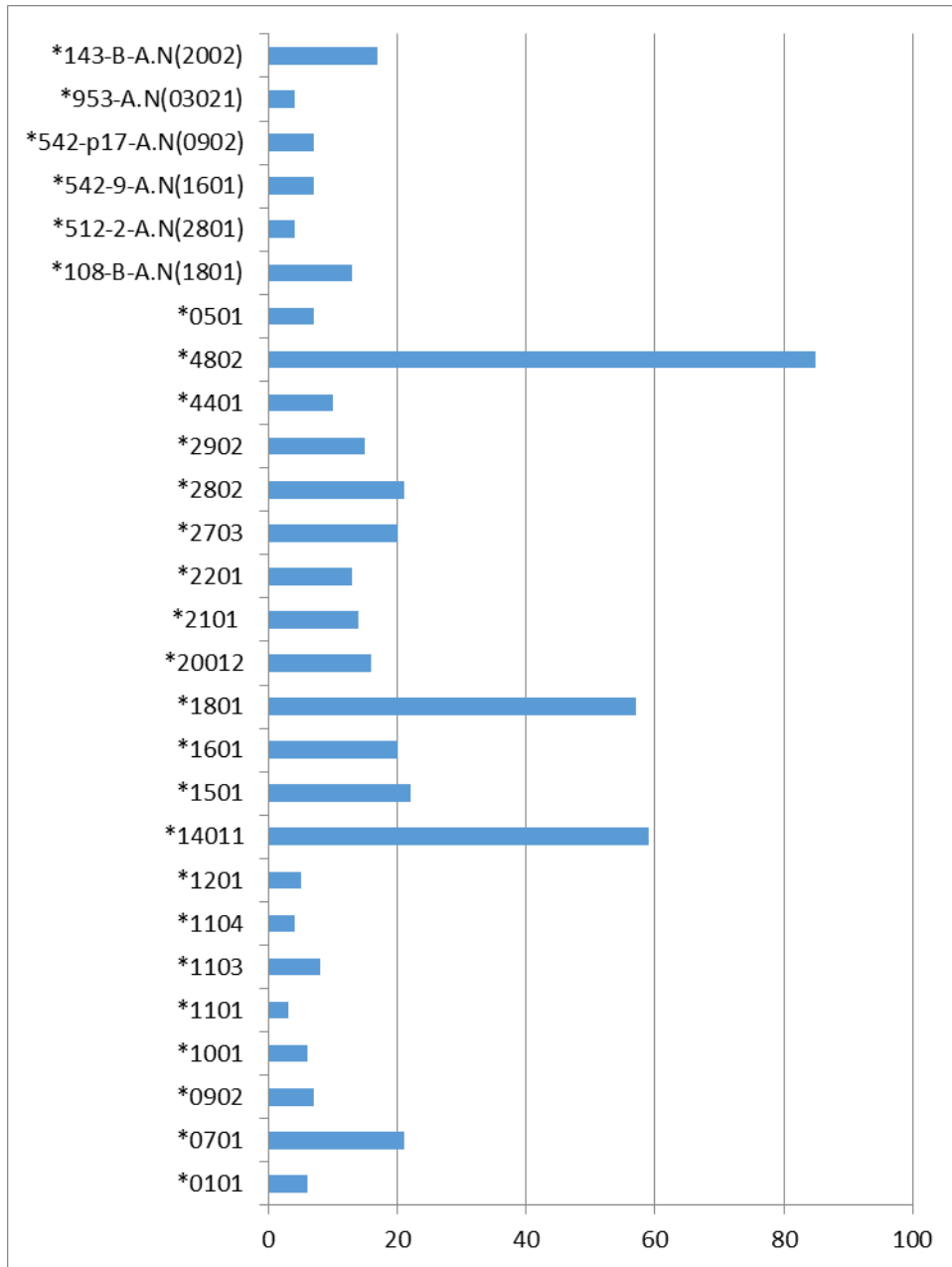
Cuadro 7. Frecuencia alélica relativa

ALELO	Ancash	Apurímac	Ayacucho	Huancavelica	Junín	La Libertad	Puno	TOTAL
*0101	0.015	0.049	0.021					0.015
*0701	0.077	0.049	0.036	0.029		0.167	0.057	0.045
*0902			0.010	0.043	0.026		0.019	0.015
*1001	0.046		0.005				0.038	0.013
*1101	0.015			0.029				0.006
*1103	0.015	0.024	0.026				0.019	0.017
*1104			0.010	0.029				0.008
*1201	0.015		0.010	0.014			0.019	0.011
*14011	0.062	0.122	0.109	0.174	0.184		0.132	0.119
*1501	0.062	0.024	0.041	0.058	0.026		0.075	0.047
*1601	0.015	0.073	0.026	0.058	0.026	0.250	0.057	0.042
*1801	0.200	0.049	0.119	0.116	0.105	0.083	0.113	0.121
*20012	0.046	0.024	0.041	0.014	0.079			0.034
*2101			0.031	0.014	0.105	0.083	0.038	0.030
*2201	0.015	0.049	0.036	0.014	0.026		0.019	0.028
*2703	0.046	0.024	0.052	0.043	0.026	0.083	0.019	0.042
*2802		0.122	0.036	0.043	0.026		0.094	0.045

*2902	0.031		0.041	0.043	0.026		0.019	0.032
*4401	0.015	0.049	0.021	0.014	0.053	0.250	0.019	0.030
*4802	0.169	0.195	0.202	0.145	0.237	0.083	0.132	0.180
*0501	0.046		0.010				0.038	0.015
*108-B-A.N(1801)	0.015	0.049	0.036	0.014	0.026		0.019	0.028
*512-2A.N(2801)	0.015	0.049	0.005					0.008
*542-9-A.N(1601)	0.015	0.024	0.016				0.019	0.013
*542-P17-A.N(0902)	0.015	0.024	0.016				0.019	0.013
*953-A-A.N(03021).			0.010	0.029				0.008
*143-B-A.N(2002)	0.046		0.031	0.072	0.026		0.038	0.036

En rojo: valor mayor, en azul: valor menor, en negritas: valores para frecuencia total de cada alelo.

Fig 34. Frecuencia alélica porcentual poblacional



4.2.1.3 Alelos Nuevos

De los 27 alelos reportados en la presente investigación, 6 fueron reportados como nuevos, los cuales tuvieron alto porcentaje de similitud con algunos alelos reportados en NCBI, mas no lo suficiente para ser considerados como tales; es así que el alelo *512_2 A.N (2801), y el alelo

*2801 presentan un 99% de similitud, siendo la variación una A en la posición 37.

El alelo *542_9 A.N (1601) y el alelo *1601 presentan un 99% de similitud siendo las variaciones C y C en las posiciones 91 y 182 respectivamente.

El alelo *542_pol17- A.N (0902) y el alelo *0902 presentan 95 de similitud siendo la variación una Adenina en la posición 91.

El alelo *953_A_A.N (03021) y el alelo *03021 presentan 99% de similitud, siendo las variaciones G y T en las posiciones 255 y 256 respectivamente.

El alelo 108_B_A.N (1801) y el alelo *1801 presentan un 98% de similitud, siendo las variaciones A, C, T, A y C, en las posiciones 41, 169, 201, 211 y 223 respectivamente.

El alelo *143_B_A.N (2002) y el alelo *2002 presentan un 98% de similitud, siendo las variaciones C, T, A, T y G, en las posiciones 96, 111, 112, 172 y 211 respectivamente. (Cuad 7)

Cuadro 8. Porcentaje de similitud entre alelos reportados y nuevos

Alelos nuevos	Alelos reportados	Porcentaje de similitud
*108-B A.N(1801)	*1801	99
*512-2-A.N(2801)	*2802	99
*542-9-A.N(1601)	*1601	95
*542-17-A.N(0902)	*0902	99
*953-A.N(03021)	*3021	98
*143-B-A.N(2002)	*2002	98

4.2.1.4 Estado Homocigoto de alelos reportados

El estado homocigoto de algunos alelos, garantiza la transmisión de éstos a las próximas generación en caso de encontrarse en dominancia. En el

cuadro 11 se detallan los alelos en estado homocigoto, y la frecuencia de estos por región.

Se puede determinar que los alelos *1801, *4802, y *14011, que son los alelos más frecuentes, también siguen siendo los más frecuentes dentro de los que se encuentran en estado homocigoto, siendo Ayacucho la región que muestra mayor incidencia de alelos en estado homocigoto, como se muestra en el Cuad 8

Cuadro 9. Alelos en estado homocigoto

Alelo en estado homocigoto	Región	Frecuencia Absoluta
*0501	Ancash	3
	Ayacucho	2
	Puno	2
*0701	Ancash	4
	Apuríac	1
	Ayacucho	2
	La Libertad	2
*1103	Ancash	1
	Apurímac	1
	Ayacucho	5
	Puno	1
*14011	Ancash	1
	Ayacucho	5
	Huancavelica	3
	Junín	2
	Puno	1
*1501	Ancash	3
	Apurímac	1
	Ayacucho	7

	Huancavelica	3
	Puno	3
*1801	Ancash	5
	Ayacucho	6
	Huancavelica	1
	Puno	1
*20012	Junín	1
	Ancash	1
*2703	Apurímac	1
	Ayacucho	2
	Junín	1
	Puno	1
*2802	Apurímac	4
	Ayacucho	5
	Huancavelica	1
	Junín	1
	Puno	5
*2902	Ancash	2
	Ayacucho	2
*4802	Ancash	5
	Apurímac	7
	Ayacucho	17
	Huancavelica	3
	Junín	3
	Puno	1

4.2.1.5 Diversidad Genética de secuencias

En la región Ancash se registraron 65 secuencias y 22 alelos en total, presentando 4 posiciones únicas (singletons) en toda la población muestreada en esta región, hubo una alta diversidad genética y nucleotídica, siendo los valores de h y π 0.918 y 0.06565 respectivamente.

En la región Apurímac se registraron 41 secuencias y 17 alelos, y fue la que presento la más alta diversidad genética con 0.929, y una diversidad nucleotídica de 0.064.

La región Ayacucho registro el mayor número de secuencias con 193, y 26 alelos, una diversidad genética de 0.929 y una diversidad nucleotídica de 0.06504.

La región Huancavelica se registraron 69 secuencias y 20 alelos, y una diversidad genética y nucleotídica de 0.925 y 0.06698 respectivamente.

En la región Junín se registraron 38 secuencias y 15 alelos, y fue la región que mostro menor diversidad nucleotídica, con 0.06263, y una diversidad genética también bastante baja, con de 0.896, por el contrario fue la región que mostro mayor número de secuencias con variaciones únicas, con 9 singletons.

En la región La Libertad se registró el menor número de secuencias, ero uno de los más altos número de secuencias con variaciones únicas, una diversidad genética de 0.894 y una diversidad nucleotídica de 0.06722.

La Región Puno registro 53 secuencias y 21 alelos, y numero de diversidad genética y nucleotídica de 0.94 y 0.06818 respectivamente (Cuad 9)

De la misma manera, considerando los datos como una población total, se evidencia una alta diversidad genética, y nucleotídica, lo que podría

deberse a los diferentes cruces a los que se ha sometido al Bovino criollo desde su llegada con los españoles.

Cuadro 10. Numero de Secuencias(n), Singletons (S), Diversidad genética (h+-SD), Diversidad nucleotídica (π +-SD) y numero de alelos por región.

REGION	N	S	N° Alelos	Diversidad genética (h+-SD)	Desv.Stan h	Diversidad nucleotídica (π +-SD)	Desv. Standar π	Alelos / región
Ancash	65	4	22	0.918	0.019	0.06565	0.00183	22
Apurímac	41	4	17	0.929	0.021	0.0641	0.00301	17
Ayacucho	193	1	26	0.920	0.010	0.06504	0.00108	26
Huancavelica	69	2	20	0.925	0.015	0.06698	0.00155	20
Junín	38	9	15	0.896	0.029	0.06263	0.0029	15
La Libertad	12	7	7	0.894	0.063	0.06722	0.00479	7
Puno	53	3	21	0.94	0.014	0.06818	0.00161	21
TOTAL	471	0	27	0.921	0.006	0.06562	0.00063	27

Tamaño de muestra, S: singletons, N°: numero

4.2.2 Variabilidad Genética

4.2.2.1 Detección de selección natural en los alelos y poblaciones.

Para la detección de selección se aplicó el test de neutralidad mediante el test de Tajima's D y Fu's Fs. Con el primero se puede inferir si alguna fuerza de selección actuó sobre los alelos, y sobre la población, según el valor de D; el cual según como se aleje de los supuestos de neutralidad ($D=0$), se podrá determinar la tendencia de la selección que actuó.

Con el segundo es posible determinar el tipo de selección según probabilidad de observar una muestra aleatoria con un numero de alelos igual o menor que el valor observado bajo el nivel de observación de diversidad dado

Se pudo determinar que las 7 regiones mostraron alejarse de los supuestos de neutralidad, siendo los valores del valor de p para el test de Tajima's D 0.983, 0.957, 0.994, 0.992, 0.96, 0.956 y 0.984, de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huancavelica, Junín, La Libertad y Puno respectivamente, lo que permite aducir que hubo un reciente cuello de botella o selección natural de tipo balanceada.

Resultados similares se mostraron con el test Fu's FS, donde los valores de valor de p de FS fueron 0.872, 0.891, 0.958, 0.936, 0.934, 0.952 y 0.841, para Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huancavelica, Junín, La Libertad y Puno respectivamente como se muestra en el Cuad 10, lo que indica deficiencia de alelos, lo que es característico de poblaciones que fueron afectadas por selección natural balanceada.

Considerando la población como una sola, se muestra la misma tendencia ya que arrojó un valor de p de 0.97514 para Tajima'D y 0.912 para FS, pudiéndose interpretar que se debería al cuello de botella sufrido tras su introducción a la zona andina alta del Perú, donde poco fueron los que pasaron a las siguientes generaciones.

Cuadro 11. Test de neutralidad, Tajima'D Fu's FS

Test evaluado	Parámetros	Ancash	Apurímac	Ayacucho	Huancavelica	Junín	La Libertad	Puno	Promedio	Desviación estándar
Test de Tajima'D	Tamaño de la población	65	41	193	69	38	12	53	67.285	58.625
	K	57	53	58	54	52	44	56	53.428	4.685
	π	18.644	18.671	18.472	19.023	17.788	19.090	19.363	18.655	0.550
	Tajima's D	1.855	1.679	2.589	2.304	1.572	1.418	1.961	1.910	0.415
Test Fu's FS	valor de p de Tajima's D	0.983	0.957	0.994	0.992	0.96	0.956	0.984	0.975	0.016
	No de alelos esperados	28.378	21.819	45.493	29.538	20.677	9.506	25.897	25.901	10.923
	FS	3.534	3.310	10.429	5.787	4.228	4.002	2.894	4.884	2.615
	valor de p de FS	0.872	0.891	0.891	0.936	0.934	0.952	0.841	0.912	0.044

4.2.2.2. Estructura genético-poblacional

Para hallar la estructura genético poblacional, fue necesario partir de grupos propuestos previamente, los cuales fueron generados en el programa DNSp; grupos que se plantearon basados en la ubicación geográfica de las poblaciones:

Grupo 1 : La Libertad
Ancash

Grupo2 : Junín
Huancavelica
Ayacucho
Apurímac

Grupo3 : Puno

Con el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA), no se detectó diferencia significativa entre los grupos probados debido a tener un porcentaje de variación bajo a pesar que el Fct mostro evidencia de heterocigoto (-0.00028); tampoco hubo diferencia entra subpoblaciones dentro de los grupos (que son las regiones más cercanas), donde el porcentaje de variación fue bajo, y el Fsc indico poca variabilidad (0.001), solamente se observó una variación significativa entre los individuos dentro de las subpoblaciones donde el porcentaje de variación fue alto, esto certificaría la falta de una estructuración genético-poblacional, como se puede observar en el cuadro 13.

Cuadro 12. Estructuración poblacional

Estructura	Fuente de Variación	de Suma de cuadrados	de Variación (%)	Índice de fijación
Geográfico	Entre grupos	19.811	-0.03	Fct = -0.00028
	Entre subpoblaciones	40.267	0.14	Fsc = 0.00139
	Dentro de poblaciones	4318.056	99.89	Fst = 0.00111
Total	489	4378.134	9.33663	

4.2.2.3. Distancias genéticas entre regiones

Habiéndose detectado que el mayor porcentaje de variación está entre los individuos dentro de las poblaciones, se midieron las distancias entre las regiones mediante el modelo de Distancia genética estándar de Nei (1972, 1978) (D_s) y Distancia genética de acuerdo de Nei et al. (1983) (D_a), para lo cual se utilizó el programa Populations 1.2.32. (Langella, 1999)

Se pudo determinar que hubo mayor distancia genética entre Ayacucho y Ancash, y la mayor distancia entre La Libertad y Ancash, según la distancia D_a de Nei et al., 1983).

Según la distancia D_s de Nei (1972, 1978), la menor distancia se mostró entre Huancavelica y Ayacucho, y la mayor distancia entre La Libertad y Ancash, lo que coincide con los datos arrojados por según el modelo de Distancia genética de acuerdo de Nei, como se muestra en Cuad 12. Esto, sería producto a la presencia de un acervo genético diferentes el que hay en la Libertad, así como también el bajo número de individuos colectados de la zona

Aun así, en ambos casos las distancias son bastante pequeñas como para considerarse la ausencia de flujo de genes entre las regiones.

Cuadro 13. Distancia D_a (Vertical) y D_s de Nei (Horizontal)

	Ancash	Apurímac	Ayacucho	Huancav.	Junín	La Libertad	Puno
Ancash	0	0.0213	0.0047	0.0078	0.0119	0.0390	0.0071
Apurímac	0.0129	0	0.0069	0.0068	0.0054	0.0177	0.0110
Ayacucho	0.0029	0.0043	0	0.0020	0.0027	0.0249	0.0039
Huancavelica	0.0060	0.0043	0.0016	0	0.0052	0.0211	0.0029
Junín	0.0092	0.0043	0.0029	0.0042	0	0.0292	0.0089
La Libertad	0.0252	0.0126	0.0169	0.0144	0.0210	0	0.0189
Puno	0.0049	0.0096	0.0041	0.0044	0.0100	0.0149	0

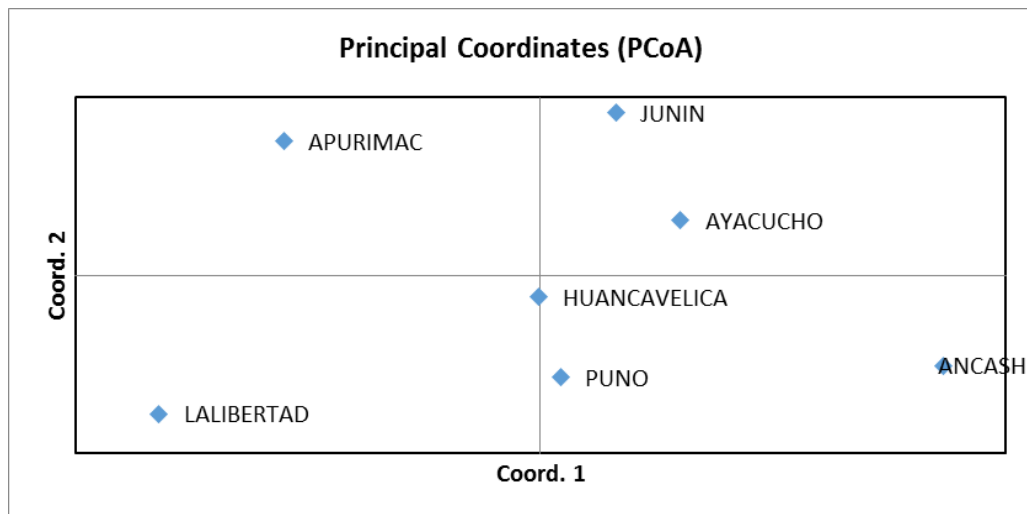
Azul = Valor menor; Rojo = Valor mayo

4.2.2.4. Análisis de coordenadas principales

En la Fig 35 se puede apreciar el análisis de coordenadas principales, donde el porcentaje de variación para el eje 1 es de 73.05, en el eje 2 de 26.76, y en el eje 3 de 020, y el porcentaje de variación acumulada de 73.05, 99.80 y 100.00 respectivamente

Si bien, según los resultados por el AMOVA el mayor porcentaje de variabilidad se presentó entre los individuos dentro de las poblaciones, se pudo determinar distancias entre las regiones, las cuales se aprecian en la Fig 35. A partir de una distancia euclídea, se mostró que entre La Libertad y Ancash y entre La Libertad y Junín, por otro lado la menor distancia se mostraría entre Huancavelica y Puno. Se puede apreciar también que hubo un agrupamiento céntrico entre Huancavelica Puno y Ayacucho.

Fig 35 Análisis de Coordenadas.



4.2.2.5. Arboles Filogenéticos

A partir de las distancias genéticas se construyeron arboles filogenéticos por los métodos de UPGMA y Neighbor Joining, a partir de las distancias genéticas estándar de Nei (1972, 1978) (Ds) y de acorde de Nei., 1983 (Da), que son mostradas desde la Fig 36 a la 47.

En la Fig 37 se muestra la distancia D_a mediante la metodología UPGMA, donde se puede evidenciar dos grandes agrupaciones, primero entre Ancash, Ayacucho y Puno, separado de Apurímac, Huancavelica y Junín; así como también entre Ancash, Ayacucho, Puno, Apurímac, Huancavelica y Junín, y La Libertad, donde se muestra una considerable distancia entre la Región Ancash y La Libertad, lo que contrasta con la distancia geográfica de las mismas; esto se contribuye al bajo número de muestras reportadas en La Libertad; estos datos se corroborarían en la Fig 37 donde se muestra similar distribución bajo la metodología de Neighbor Joining.

En la Fig 38 se muestra la distancia D_s bajo la metodología UPGMA, donde se aprecian también dos grandes agrupaciones, primero entre Ayacucho Huancavelica Puno y Ancash separado de Apurímac y Junín, lo que se muestra diferente en el grafico Neighbor Joining D (Fig 39), esto sería atribuido a la diferencia en el tipo de distancia aplicada; así mismo se ve una segunda agrupación entre Ayacucho, Huancavelica, Puno, Ancash, Apurímac y Junín, de La Libertad, lo que coincidiría con la distancia D_a , lo que como en ese caso también se atribuye al bajo número de muestras reportadas en La Libertad.

Bajo los diferentes estadísticos observados se puede observar una rama, que separa a la libertad del resto de la subpoblaciones, debido a que posee un acervo genético en esta zona, puesto que Cajamarca es una de las zonas que presenta bovinos de razas exóticas.

Fig 36. Árbol filogenético de la distancia D_a de Nei construido por el Método UPGMA

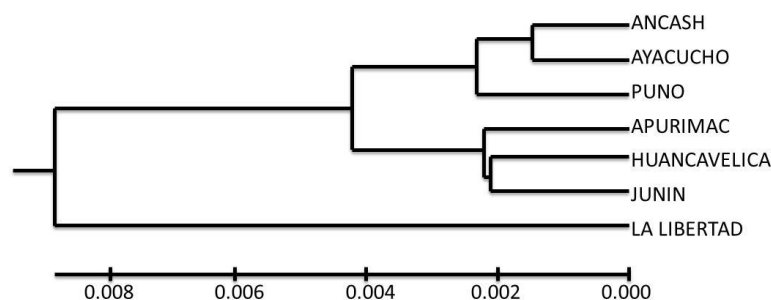


Fig 37. Árbol filogenético de la distancia D_A de Nei construido por el método Neighbor Joining

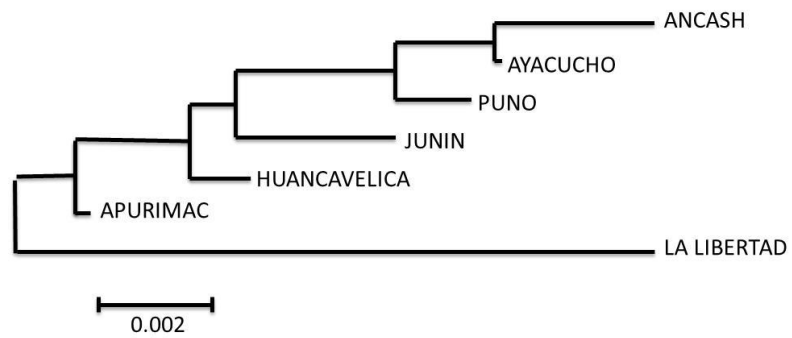


Fig 38. Árbol filogenético de la distancia D_S de Nei construido por el Método UPGMA

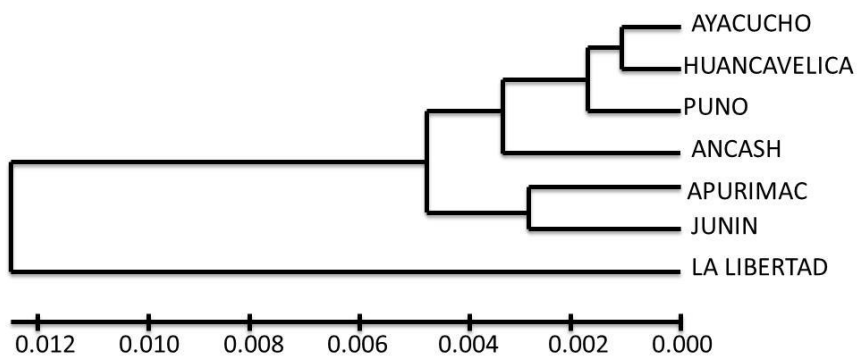
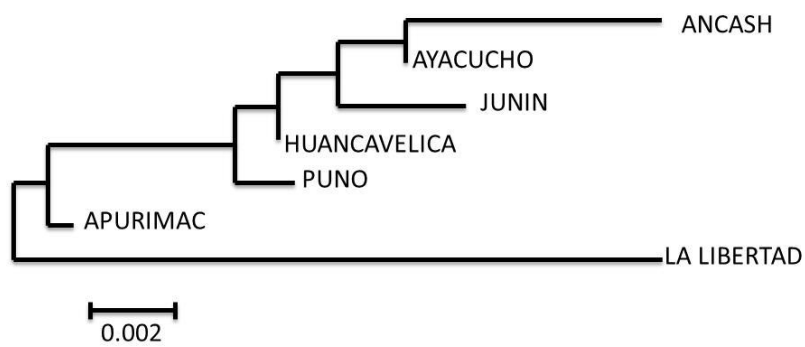


Fig 39. Árbol filogenético de la distancia D_S de Nei construido por el Método Neighbor Joining

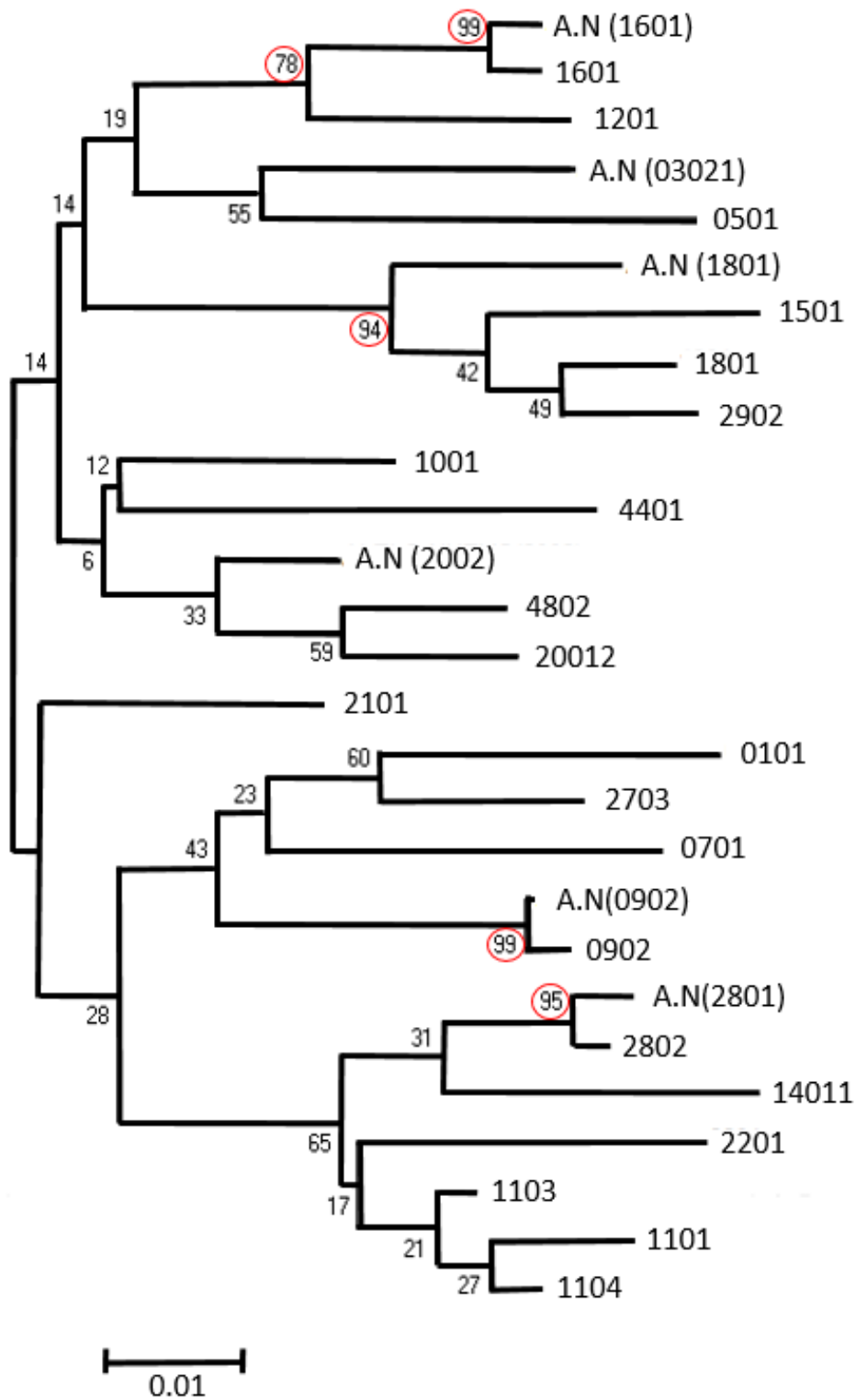


Por otro lado se generó un árbol de distancias a partir de los alelos reportados, basado en el modelo Kimura 2 parámetros. El árbol fue construido basado en una matriz de distancia que se basó en el método de Neighbor Joining de Saitou et al., 1987. Para medir la significancia de las ramas, se calculó un con bootstrap de 50000 replicaciones. El árbol se generó a partir de comparaciones de pares de nucleótidos entre los alelos. (Fig 40)

Según la gráfica se puede evidenciar 5 ramas con alto bootstrap, en primer lugar, entre el alelo *A.N(1601) y el *1601; esta rama se podría considerarse con alta confiabilidad, ya que una rama inmediatamente anterior presenta un bootstrap bastante elevado, con un valor de 78; en segundo lugar la rama que alberga al alelo *A.N (0902) y al *0902; en tercer lugar la rama que une a los alelos *A.N(2801), y *2802 con un valor de bootstrap de 95 , y finalmente *A.N(1801), *1801 y 2902, con 94 de bootstrap.

Como se puede evidenciar los bootstrap más elevados se dan entre los alelos reportados como nuevos y los más similares a ellos, como se detalla también en el cuadro 10, ya que esto confirmaría lo anterior.

Fig 40. Árbol filogenético de la distancia filogenética entre los alelos reportados

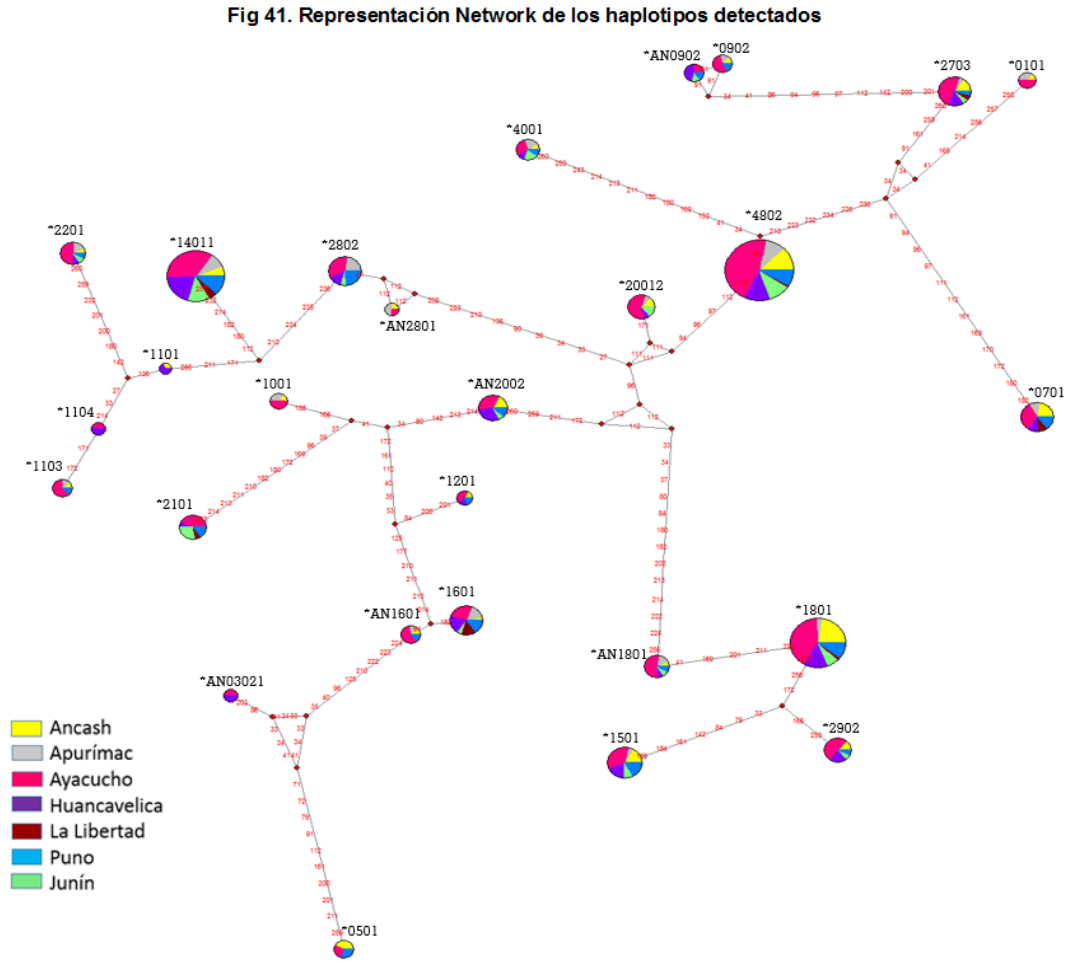


4.2.2.6. Representación Network

Mediante las representaciones Network se pudo detectar las relaciones entre haplotipos, basándose en las variaciones nucleotídica entre estas, pudiéndose detectar un haplotipo ancestral.

En la Fig 41 se puede ver la representación Network de los 27 haplotipos, donde se pudo detectar un haplotipo ancestral, el haplotipo *4802, el cual se encuentra asociados a enfermedad, como se detalla más adelante. A partir de éste, se ve presencia de dos agrupaciones bastante claras que se van ramificando mediante diferentes pasos mutaciones. Así mismo es relevante la presencia del haplotipo *14011 y *1801, que junto con el haplotipo ancestral son los que se muestran en todas las regiones.

Fig 41. Representación Network de los haplotipos detectados



4.2.3. Alelos asociados a enfermedad, reportados en la presente investigación

Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad bovino, tiene importancia principalmente para los criadores, genetistas y mejoradores debido a su asociación con la resistencia y susceptibilidad a enfermedades Producción de leche, crecimiento y respuesta inmune (Takeshima & Aida, 2006). (Cuad 15)

Este proyecto es el primero que reporta los alelos asociados a enfermedades en el bovino criollo peruano, cuyo origen se remonta a las primeras embarcaciones de ganado con la llegada de los españoles, a su naturalización a los diferentes ecosistemas y la infinidad de cruces no controlados.

El pasar de las generaciones y atravesar por diversos fenómenos filogenéticos, y además los manejos artesanales de los pobladores, han hecho de éste, un recurso resistente a diferentes enfermedades propias de la zona donde se han habituado.

El bovino criollo muestreado mostro presentar resistencia a Mastitis clínica, ya que se presencié los alelos *23(que representa a uno de los alelos reportados en esta investigación, 2703) (Yoshida et al., 2012), *15(4802), *22(1101, 1103) (Dungjinda et al., 2008; Yoshida et al, 2012), *24 (0101) (Yoshida et al., 2012), *18(1801), *24(0101) *11(0902) (Kulberg g t et al., 2007) y *16(*1501) (Ibrehim et al.,2012). Así mismo los dos últimos alelos estarían asociado con la disminución de células somáticas (SCC), lo cual esta asociados con la incidencia a mastis, según Sharif et al., 1998; Do Nascimento et al., 2006; y Rup et al., 2008.

Por el contrario también mostro susceptibilidad a la misma enfermedad, ya que se presencié los alelos *22(1101, 1103) (Kulberg g t et al., 2007), *1(0501) (Dungjinda et al., 2008), *11(0902) (Ibrahim et al., 2012), *16(1501)(Yoshida et al, 2012), *23 (*2703)(Sharif et al., 1998; Baltian,

2012), *8(1201)(Rupp et al., 2007; Yoshida et al, 2012); donde los dos últimos fueron reportados por su asociación con el aumento de SCC según Do Nascimento et al., 2006 y Rup et al., 2007 para el *23(*2703) y Pashmi, 2008 para el *8(*1201).

Sin embargo, se pueden apreciar contraposiciones respecto al alelo *23(*2703), que fue asociado a resistencia por Baltian, 2012 en Holstein argentino, y Yoshida et al 2012 en Holstein Japones; pero relacionado con susceptibilidad por Sharif et al., 1998 en bovino canadiense. Así mismo respecto al *22(*1101, *1103), que según Dingjinda et al., 2009 en Holstein x Cebu y Yoshida et al., 2012 en Holstein Japones, estaría asociado con resistencia a mastitis, mientras que Kulbert et al.,2007 lo asocia con susceptibilidad en bovino Rojo noruego.

Pero además respecto al *16(1501), que según Sharif et al.,1998 en bovino canadiense reporto que estaría asociado con la disminución de SCC, lo cual fue confirmado por Yoshida et al.,2012 en su investigación con Holstein japones donde se presencié en bovinos que mostraron resistencia a mastitis.

Y finalmente el *11(*0902), que según Kulbert et al., 2007 estaría asociado con resistencia, según su investigación en bovino noruego rojo, mientras que Ibrahim et al., 2012 reportó lo contrario, en bovino egipcio

Adicionalmente Abdel et al., 2000 logro determinar una asociación entre la susceptibilidad a Mastitis causadas específicamente por *Streptococcus agalactiae*, y el alelo *23(2703). En todas las publicaciones asociadas a esta enfermedad, se trabajó mediante la metodología RFLP, por lo que los alelos citados utilizan la nomenclatura para esta técnica, lo que dificulta en algunos casos determinar específicamente a que alelo se refiere. (Cuad 15)

Otra enfermedad a la que el criollo se encuentra expuesto es a linfocitosis persistente, la cual es causada por el virus de leucosis bovina (BLV),

siendo los alelos asociados a la resistencia, el *11(0902) (Mirsk et al., 1998; Panei et al., 2009; Xu et al., 1993; Sulimova et al., 1995; Miyasaka et al 2013; Juliarema et al., 2008; Forlett et al., 2013; Hernandez,D. 2010; Hernandez et al., 2011), *23(2703) *28(0701)(Panei et al., 2009; Xu et al.,1993; Sulimova et al.,1995) y *15(*20012) (Hernandez et al., 2011), los cuales mediante RFLP fueron determinados. En el caso específico del alelo *1101, se secuencio lo que certifica la autenticidad de éste alelo, el cual también se mostró asociado a resistencia al BLV, según Miyasaka et al 2013; resultado que se contrasta con los arrojados por Panei et al., 2009 y Sulimova et al., 1995, quienes catalogan el alelo *22 que representa los alelos 1101, y 1103 por su asociación a susceptibilidad haciendo uso de RFLP; sin embargo debe profundizarse los estudios ya que puede que el *1103 sea el que este asociado con susceptibilidad a BLV. Así mismo los alelos *24(0101) (Panei et al., 2009; Hernandez, D. 2010), *8(1201), *16(1501) (Sulimova et al., 1995), y específicamente los *1601 (Miyasaka et al., 2013; Hernandez et al., 2011), *42(2802) (Hernandez ,D. 2010) y *1501(Juliarema et al., 2008; Forlett et al., 2013), se encuentran asociados con la susceptibilidad, donde los dos últimos se demostraron en criollos argentinos. (Cuad 15)

Así mismo Untalan et al., 2006 en su investigación con tres rebaños , dos de los cuales formados con un macho producto del cruce de Red Poll x Simentall, y un tercer rebaño que tuvo como macho un Siembrah , los cuales fueron infectados con garrapatas *Amblyomma americanum* ninfas, (causantes de enfermedades como babesiosis, anaplasmosis, teileriosis entre otros) concluyo que el alelos *4401 estaría asociado con la resistencia a ésta, mientras que el alelo *1301 con la susceptibilidad a la misma; alelos que fueron también hallados en este proyecto. Mientras tanto Martinez et al., 2006 determino adicionalmente que los alelos *18(1801) y *27(14011) también reportados en esta investigación, estarían asociados de igual modo asociados con la resistencia a garrapata de la especie *Boophilus microplus*. (Cuad 15)

Entonces, además de reducir la rusticidad ya que su alimentación es a base de sangre, éstas transmite enfermedades como, teileriosis, causada por el parasito *Theileria parva* que causa mortandad, cuyo vector es la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus*; pese a esto, el organismo de este animal muestra haber desarrollado fortaleza a esta enfermedad, es así que en esta investigación se reportó el alelo *2703, cuya presencia se asocia con la resistencia a este parasito, mientras que la presencia del *1501, a la susceptibilidad a este, tras la vacuna contra el agente causal según Ballingall T et al., 2004. (Cuad 15)

Otro agente causal que origina también un aumento de la tasa de mortandad, y cuyo medio de transmisión es el medio ambiente, es el parásito *Neospora caninum*, ya que incrementa el índice de abortos en el ganado bovino, agente cuya resistencia se vio asociada al *1001, en la investigación de Schwab et al., 2009, quien trabajo con madres Holstein Quebec, a quienes se les detecto la presencia de este alelos en las que parieron, y el *2703 en las que abortaron por lo que podría haber alguna asociación con susceptibilidad.

Del mismo modo el virus de patas y hocico (foot-and- mouth - FMDV), causa infecciones en patas y hocico en ganado bovino, ya que es transmitido al pastear, es por eso que Gowane et, al 2013 hicieron una publicación sobre la vacuna trivalente contra este virus, la cual fue aplicada en terneros *Bos taurus* y *Bos indicus* de la india de 1 año. Se reportaron los alelos *1501 por haberse detectado en bovinos resistentes al virus tras la vacuna y los alelos *0701, *1101 y *1103, por haberse detectado en bovinos que llegaron a infectarse; alelos que también fueron presenciados en este proyecto. (Cuad 15)

En esta investigación se pudo apreciar resistencia a bacterias, debió a la presencia del alelo *16(1501), para *Streptococcus aureus*, *11(0902), para *Escherichia coli* (Ibrahim et al., 2012), y *23(2703) para Bruselosis (Martinez et al., 2005).

Por otro lado el criollo mostró susceptibilidad también a bacterias, debido a que se halló el alelo *11(0902), tanto para *Streptococcus aureus*, y *Streptococcus agalactiae*, el alelo *24(0101), para *Escherichia coli*, y *16(1501), para *Staphylococcus* (Ibrahim et al., 2012). (Cuad 15)

Se reportó susceptibilidad a metritis, ya que se apreció el alelo *18, nomenclatura para RFLP, utilizada para el alelo 1802, y 1801, último de los cuales si se evidencio en la población muestreada. Adicionalmente el alelo *22, el cual representa el alelo 1101, y 1103, los cuales también estuvieron presente en criollo peruano, y se encuentran asociados con resistencia a la cojera según Zambrano et al., 2009.

Algunos de los alelos reportados en esta investigación presenta asociación adicional con producción, es así que el alelo *1501, *1601 (Gilliespie et al., 1999), esta asociados con producción de leche (Machado et al., 2005), mientras que el *8(1201), y *22(1101), con aumento de grasa en leche (Zambrano et al., 2009). (Cuad 15)

Si bien se reportaron alelos asociados ya sea a susceptibilidad o a tenacidad, también se presenciaron alelos sin ninguna asociación a la fecha, como el *2101, del que no se encontró ningún reporte que referencie su asociación a ninguna enfermedad o respuesta inmune, sin embargo se mostró con frecuencia mayor a 0.05 en bovino Gyr (Mota et al., 2001; Machado et al., 2005; Martinez et al., 2005). Así mismo el *2201 representado por *06, no se encontró asociación alguna, y finalmente el *1104 y *2902 que fueron los únicos no reportados en la página de IPD CMH

Database.(http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.drb3), pero si se presenció en base de datos de secuencias (NCBI) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_295047463)

Se pudo apreciar que todas las regiones presentan alelos asociados con la resistencia a vectores causantes de Anaplasmosis bovina. Teileriosis, Leucosis bovina enzoótica, que son las principal enfermedades en bovino,

que causan pérdidas en producción, y mortandad, como se reporta en el la lista de enfermedades, aprobada por la Resolución Jefatura N° 271-2008-AG-SENASA

La mayoría de las publicaciones utilizaron RFLP, por lo que utilizan la nomenclatura para esta técnica, esto dificulta determinar a qué alelos específico se refieren, sin embargo se consideraron los alelos que representan al menos uno de los alelos reportados en esta investigación.

Cuadro 14 Enfermedades asociadas a alelos, según enfermedad

Ganado	Enfermedad	Metodología	Resistencia /Aumento	Susceptibilidad disminución	REFERENCIA
<i>Holstein</i>	Linfocitosis persistente	RFLP	DRB3.2*11 (0902, 0901)		Mirskt et al., 1998
<i>Holstein</i> negro japonés	Antígeno Leucocitario bovino (carga proviral)	PCR-secuenc.	DRB3.2*0902, 1101	DRB3.2*1601	Miyasaka et al, 2013
Criollo Argentino	Carga proviral BLV	RFLP	DRB3.2 ISAG0902, ISAG 1701	DRB3.2*16 (ISAG1501)	Juliarena et al., 2008
<i>Holstein</i> argentino	Carga proviral BLV	Real time PCR	DRB3.2*0902	DRB3.2*1501	Forlett, et al 2013
Criollos Colomb. y holstein	Leucosis bovina	RFLP	DRB3.2*21(0801), *37	DRB3.2*6(0601), 42(2802), 13(0401)	Hernandez, 2010
Criollo hartón del valle	Virus de leucosis bovina	PCR-SBT	DRB3.2* 1101, *2709, *20012	DRB3.2*1002, *25011	Hernández et al., 2011
<i>Holando</i> Argentino	Linfocitosis persistente	RFLP	*11(0902), 23(2701, 2703, 2705-2710), *28 (0701-0703), *25	DRB3.2*22(1101), 24(0101)	Panei et al., 2009
<i>Holstein</i>	BLV	RFLP	Motivo ER: *11(0902, 0901), *23(2701-2703, 2705-2710) y *28(0701, 0702, 0703)		Xu et al., 1993
<i>Negro Pied</i>	BLV	RFLP	Motivo ER: *11(0902, 0901), *23(2701-2703, 2705-2710) y *28(0701, 0702, 0703)	*8(1201), *16(1501, 1502), *22(1101, 1103, 2403), 24 (0101)	Sulimova et al., 1995

♂ Red Poll x ♂ Simmental, Simbrah	<i>Amblyomma americanum</i>	microsatelites	DRB3.2*4401 fenotipicamente		Untalan et al., 2006
Gyr	<i>Boophilus microplus</i>	PCR-RFLP	*18(1801, 1802), *20(2301, 2901 3601), *27(14011, 14012, 1402)		Martinez et al., 2006)
<i>B. indicus peruano</i>	B.microplus	Microsatelites	Alelos A, B, C del locus DRB3.2 y BM1815	Alelo A del locus DRB31	Custodio, 2011
Criol colom. (BOM, Cebu Braham)	<i>Dermatobia hominis</i>	PCR-RFLP	DRB3.2*2701, *2801	DRB3.2*0601	Martinez et al., 2005
<i>Braham cebu</i>	Dermatofilosis	RFLP	Presencia de secuencia EIAY, susceptibilidad a A8	Residuos de cerina	Maillard et al., 1999
<i>Quebec Holstein</i>	<i>Neospora caninum</i>	ELISA-genotipeo	en animales que nacieron DRB3.2*1001	En abortados DRB3.2 *2703	Schwab et al.,2009
<i>Bos indicus</i>	Efecto tras vacuna contra <i>Theileria parva</i> (en embriones)	RFLP	DRB3.2*2703	DRB3.2*1501	Ballingall et al., 2004
Gyr Brasileiro	Proteína en leche	PCR-RFLP		DRB3*54(4301)	Do Nascimento et al., 2006
	SCC		DRB3.2*31(2801), 11(0902)	*22 (1101, 1103, 2403)*23 (2701, 2703, 2705-2710)	
<i>Holstein Canadiense</i>	SCC	RFLP	*11(0901, 0902), *3	*22 (1101, 1103, 2403)*23 (2701, 2703,	Rupp et al., 2007
	Mastitis Anticuerpos por Mastitis		3(1001, 1002)	*8(1202)	

Noruego rojo	Mastitis clínica	RFLP	DRB3.2*7, *11(0901, 0902), *18(1801)	DRB3.2*22(1101), 26(0601)	Kulberg et al., 2007
<i>BON x Holstein</i>	Mastitis subclínica	RFLP	*33(2704, 3102)	DRB3.2*8(1201), *14(2006)	Zambrano et al., 2010
<i>Holstein x Zebu</i>	Mastitis clinica	RFLP	DRB3.2*15(4801, 4802), 22(1101,1103), *51 (4201)	DRB3.2*1 (0501, 0502, 0503), *52(0303)	Duangjinda et al., 2008
<i>Holstein argentino</i>	Mastitis SCC		23(2701, 2703, 2705-2710), *25	27	Baltian, 2012
<i>Holstein polaco</i>	Mastitis por Streptococcus agalactiae.	MPT-PCR		*23 (2701, 2703, 2705-2710)	Abdel et al., 2008
<i>Holstein de egipto</i>	Mastitis subclínica	PCR-secuec.	*16(1501)	DRB3.2 *11(0902)	Ibrahim et al., 2012
	Streptococcus aureus		DRB3.2 *16(1501)	DRB3.2 *11(0902)	
	Streptococcus agalactiae			DRB3.2*0902	
	Escherichia coli Staphylococci		DRB3.2 *11(0902)	DRB3.3* 24(0101) *16(1501)	
Bovino canadiense	Reducción de SCC		*16(1501)	*23 (2701, 2703, 2705-2710)	Sharif et al., 1998
<i>Holstein Japones</i>	Patogenos causantes de mastitis	RFLP	*22(1101), *23(2703), *24(*0101)	*8(1201), *16(1501)	Yoshida, 2012
<i>BON Colombiano</i>	Bruselosis	PCR-RFLP	*23(2701, 2703, 2705-2710),31(2801), 26(0601)		Martinez et al., 2005

<i>Holstein</i> Irani	SCC		*8(1201)		Pashmi, 2008
	Grasa en leche		*22(1101 , 1103 , 2403), *11(0901, 0902)		
	Porcentaje proteico		*24 (0101), *33 (2704, 3102)		
<i>Holstein</i> Colombiano	Producción de leche	RFLP		*36	Zambrano et al., 2009
	Producción de proteína en leche			DRB3.2*33(2704, 3102)	
	Producción de grasa en leche		DRB3.2*8(1201), 22(1101), *36		
<i>Gyr</i>	Producción leche	PCR-RFLP	DRB3.2*16(1501), 29(4101)		Machado et a., 2005
	Proteína de leche		*7	DRB3*6(0601)	
<i>BON x Holstein</i> del Hato Paysandú	Metritis	PCR-SBT		*18(1801 , 1802)	Zambrano. J., 2009
	Cojera			22(1101 , 1103 , 2403)	
<i>B.taurus</i> x <i>B.indicus</i> india	Respuesta tras vacuna trivalente contra FMDV	SBT	DRB3.2*0201, *0801, *3201	DRB3.2* 0701 , * 1103 , * 1101	Gowane et al., 2013

Nomenclatura de dos dígitos: RFLP, nomenclatura de 4 dígitos entre paréntesis: alelos en sí, según la base de datos de secuencias del gen DRB3 en bovinos (IPD DATABASE: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>). En rojo: alelos reportados en la presente investigación. Aquella nomenclatura

RFLP que no presenten su equivalente en 4 dígitos, no se encontraron en la web IPD-CMH DATABASE

V. DISCUSION

5.1 Utilización de la técnica de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP)

La estandarización de esta técnica, y la agudeza de la misma, permitieron detectar con poca dificultad los alelos en geles de poliacrilamida. Esta agudeza permitió que mediante un bisturí se extraigan y purifiquen alelos que fueron luego secuenciados, tras lo cual se obtuvieron las secuencias exactas de los alelos encontrados en la población. Por el contrario la técnica de RFLP, si bien nos da patrones, no es una técnica tan sensible como para diferenciar variaciones entre bases, aun así es la más utilizada para el estudio del BoLA en diferentes rebaños, como se evidencia en el cuadro 14, donde la mayoría de los autores hacen uso de esta herramienta. Sin embargo no sería una herramienta útil en cuanto a conocimiento de riqueza alélica asociada a enfermedad, lo que es indispensable para los programas de mejoramiento.

Por otro lado el único limitante que se pudo encontrar en el uso de esta técnica es que en secuencias que variaron en a lo mucho una o dos bases, disminuyo la agudeza de la técnica, ya que se apreciaron bandas gruesas, lo que llevo a confusión, sobre estar ante la presencia de un heterocigoto, u homocigoto, por lo que fue necesario cortar toda la banda en sí, para que se descarte con el secuenciamiento.

5.2 Diversidad genética

Se logró identificar un total de 34 genotipos, producto del juego entre 27 alelos, de los cuales 6 fueron nuevos, ya que no se encontró similitud al

100% con ninguna secuencia reportada en el banco de secuencias (NCBI).

En la población total los alelos que se mostraron con la mayor frecuencia fueron el *4802, *1801, y *14011, con una frecuencia alélica mayor a 0.05 (0.1805, 0.1210 y 0.1189 respectivamente). La presencia de estos alelos es de mucha importancia ya que según Duangjinda et al., 2008 en un estudio con Holstein y Cebu, mediante RFLP, el *4801, que está representado por el *15, que está asociado con la resistencia a mastitis y del mismo modo el alelo *1801, que está representado por el *18, que según Kulberg et al., 2007 determinado en *Norwegian Red*; este último también estaría asociado con la resistencia a *Boophilus microplus* (Martinez et al., 2006 y a susceptibilidad a metritis (Zambrano et al., 2009). Mientras que el *4011 representado por el *27 estaría asociado con resistencia a *Boophilus microplus* (Martinez et al., 2006, en Gyr)

Por otro lado el alelo *2703 y *1601, representados por *23 y *10, si bien no mostraron alta frecuencia como los anteriores, se mostraron en todas las regiones, siendo de gran importancia por haberse reportados por su asociación con enfermedades. El *2703 está asociado con resistencia a linfocitosis persistente (Panei et al., 2009; Xu et al., 1993; Sulimova et al., 1995), a *Theileria parva* tras vacuna contra este parasito (Ballingall et al., 2004), Bruselosis (Martinez et al 2005) y Mastitis (Yoshida, 2012), sin embargo este último resultado se muestra opuesto a los arrojados por Do Nascimento et al., 2006; Rupp et al., 2007; Baltian, 2012), donde reportan este alelos asociado con susceptibilidad a mastitis y aumento de SCC. Por otro lado el *1601 se encuentra reportado por su asociación con susceptibilidad a virus de leucosis bovina (Miyasaka et al., 2013), y por su relación con la producción de leche (Gilliespie et al., 1999)

A pesar que algunos alelos no se encontraron en el total de las regiones, si se mostraron en la mayoría de ella, como el alelos *4401 que se encuentra asociado con resistencia a *Amblyomma americanum* (Untalan et al., 2006), *0701 que está representado por el *28, que está asociado

con resistencia a linfocitosis bovinas (Panei et al., 2009; Xu et al., 1993; Sulimova et al, 1995), y con susceptibilidad al virus de hocico y patas (FMDV) tras una vacuna trivalente (Gowane et al, 2013). El *2802 se encontró asociado con la susceptibilidad a linfocitosis persistente en (Miyasaka et al., 2013); el *20012 mostro asociación con susceptibilidad a BLV (Hernandez et al., 2011), información redundante ya que su asociación fue determinada con criollo colombiano y criollo hartón del valle respectivamente.

Finalmente el alelo 1501 que también estuvo en 6 de las 7 regiones, sería uno de los más importantes ya que estaría asociado a la resistencia de varias enfermedades como Mastitis subclínica y Streptococcus aureus según Ibrahim et al., 2012; procedimientos contra el virus del patas y boca, según Gowane et al 2013, tratamiento contra la Theileria parva según Ballingall et al ., 2004; con la producción de leche según Machado et al., 2005; y a la reducción de la carga proviral según Juliarena et al 2008; pero adicionalmente relacionado con la susceptibilidad al virus de la leucemia bovina según Rup et al., 2007.

De modo que la presencia de estos alelos en el criollo peruano, es de vital importancia ya que garantizara la fortaleza de las siguientes generaciones, por lo que no es un recurso que no debe ser subestimado, sino por el contrario debe ser potenciado y considerado en los programas de mejoramiento. Una herramienta importante para estos programas es partir de conocer las regiones que presentan los alelos de importancia en estado homocigoto; a fin que se trabaje con los animales de la zona. En esta investigación se consideró de importancia, los alelos asociados a resistencia a alguna enfermedad, como el caso del *1103 (representado por el *22 para RFLP) que según Pashmi, 2008 estaría asociado con aumento de grasa en leche, susceptibilidad a mastitis (Dungjinda et al., 2008; Rupp et al., 2007; Do Nascimento et al., 2006), susceptibilidad a BLV (Sulimova et al., 1995), y susceptibilidad a la cojera (Zambrano et al., 2009); y que se encuentra en estado homocigoto en la región de Ancash,

Ayacucho y Puno; el alelo 1801 que según Gowane et al., 2013, estaría presente en tratamiento expuestos a la vacuna contra la enfermedad de patas y boca, así como presente en bovino resistentes a mastitis según Kulberg et al., 2007, en su investigación con Norwegian Red, estando en estado homocigoto en Ancash, Ayacucho, Huancavelica y Puno; el alelo *2703 (representado por el *23 para RFLP) por su asociación con la resistencia a leukemia bovina según Yoshida et al., 2012; Paneti et al., 2009; Xu et al., 1993; Sulimova et al., 1995) y Bruselosis (Martinez et al., 2008), habiéndose reportado en Apurímac, Ayacucho, Junín y Puno; del mismo modo el alelo 4802 por su relación con resistencia a mastitis (Duangjinda et al., 2008), el cual estuvo en todas las regiones menos en La Libertad; y finalmente el 1501 por su asociación con resistencia a *Streptococcus aureus*, y FMDV tras la vacuna trivalente; el cual que se encontró en estado homocigoto en Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huancavelica y Puno.

5.3 Variabilidad genética

Se pudo detectar una elevada diversidad genética, encontrándose rangos de entre 0.894 y 0.929; el encontrar un fenómeno como este en animales domesticados es usualmente atribuido a los cruces a los que ha sido expuesto durante su propagación (Ferguson, 1995; Thonpson, 1985), es decir desde su llegada con los españoles, a esto debe agregarse el manejo artesanal de la mayoría de los criadores, y la falta de investigaciones, lo que originó la subestimación a este bovino.

Así mismo la diversidad nucleotídica se mostró de media a alta, encontrándose un rango desde 0.06263 a 0.6818, lo que podría deberse a que este gen tiene un alto polimorfismo, debido a que pertenece al complejo mayor de histocompatibilidad, el cual debe ser altamente polimórfico para que garantice un sistema inmune resistente medio en que se desenvuelve.

Mediante el test de Tajima'D se pudo interpretar que la población analizada habría pasado por un proceso de cuello de botella ya que los valores de p para este test estuvieron cercanos a 1; lo que se corroboró con el test de Fu's FS, donde los valores estuvieron en un rango de 0.841 y 0.952; valores que mantuvieron en cada región como considerando la población total como una sola. Esto podría deberse a que se produjo este cuello de botella ya que el bovino tras su llegada, fue llevado a la zona alto andina, medio al que no estaba habituado, y donde su sistema inmune no supo en un inicio responder, lo que trajo consigo una reducción de la población, originando criollos más habituados a la zona, con el pasar de las generaciones; aun así sería necesario hacer una siguiente prueba de selección que certifique los resultados obtenidos.

Por otro lado mediante el AMOVA se determinó la falta de una estructuración, lo que lógicamente se debe a que la variante no es a nivel de regiones, ya que la población total es de criollo; y a que si bien han sido manejados por los mismo criadores, este manejo artesanal es el mismo en todas las regiones; de modo que la distancias son mínimas, como se pudo determinar mediante la medición de las distancias de Nei, tanto la de acorde, como la estándar; donde en se muestra siempre a la libertad, más distante, y los arboles UPGMA y Neighbor Joining con una rama apartada. Este último fenómeno podría deberse en primera instancia, por la presencia de un acervo diferente, ya que cercano a esta región se encuentra uno de los hatos de Holstein, en Cajamarca, lo que originaría una marcada diferencia con la población restante. Una segunda hipótesis podría ser el bajo número de individuos muestreados en esta región.

Del mismo modo esta separación se puede evidenciar en el análisis de coordenadas principales donde se ve una notable separación entre las regiones, sin embargo cabe mencionar que es una vista muy cercana de las regiones.

Finalmente se hizo un árbol filogenético, donde se pudo evidenciar que los bootstrap más altos se mostraron entre las ramas que unían los alelos nuevos con los más similares a estos, lo que justificaría los altos bootstrap arrojados.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Se logró estandarizar la técnica de Electroforesis de detección de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) para determinación de haplotipos (en este caso alelos), para el gen DRB3 exón 2.
- Se logró identificar 34 genotipos diferentes, compuestos por 27 alelos, de los cuales 6 son nuevos y 21 previamente reportados.
- Los alelos nuevos encontrados fueron: *108-B-A.N(1801), *512-2A.N(2801), *542-9-A.N(1601), *542-P17-A.N(0902), *953-A-A.N(03021), y *143-B-A.N(2002)
- Los alelos con mayor frecuencia fueron *1801, *4802 y *14011; cada uno de los cuales, estuvieron reportados por su asociación a enfermedades como el virus foot-and-mouthe (Gowane et, al 2013), mastitis (M. Duangjinda, 2008) y resistencia a *Boophilus microplus* (Martinez et al., 2006) respectivamente; lo que indica que el bovino criollo presenta resistencia a estos agentes.
- Los análisis filogenéticos indicaron que los bovinos criollos peruanos habrían pasado por un cuello de botella, lo que cual se habría dado tras su ingreso directo a la zona altoandina peruana, lugar al que con el tiempo logro naturalizarse, así mismo se pudo apreciar un acervo genético diferente, ya que se colectaron muestras de La Libertad que se encuentra próximo al mayor hato de holstein en Peru en Cajamarca.

VII. RECOMENDACIONES

- Para la detección de polimorfismos se logró estandarizar la técnica para extracción de alelos, sin embargo esta técnica presenta algunas dificultades para purificación de bandas a partir de acrilamida, ya que en alelos cuyas diferencias son por muy pocos nucleótidos la técnica no permite detectarlos, viéndose una sola banda, lo que dificulta su extracción con bisturí ya que está basado en la mano del operador y el manejo del bisturí, sería recomendable plantear alguna metodología más exacta para evitar errores; sin embargo la purificación de estas mediante el kit Quiagen para extracción de ADN a partir de agarosa, es bastante satisfactoria.
- Las poblaciones de bovinos, presentan una alta diversidad genética para el gen DRB3; lo cual es importante ya que le dan un valor agregado al germoplasma, y lo presenta como un recurso genético útil para futuros programas de mejora.
- Plantear proyectos que profundicen las investigaciones con los alelos nuevos, a fin de detectar posible asociación con otras enfermedades; ya que serían herramientas a considerar en los programas de mejora.
- Esta investigación es una iniciativa para aplicarse en otros animales domésticos, a fin de seguirse un patrón de mejora basado en riqueza génica y no solo en simples cruces.
- El poco número de muestras de La libertad no permitió conocer de manera más certera el verdadero polimorfismo de la región, por lo que es recomendable que en próximas investigaciones se hagan posteriores estudios con un tamaño poblacional mayor, para esta región.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel K, Sender G, Korwin-Kossakowska A. Public health hazard due to mastitis in dairy cows. *Anim Sci Pap Rep* vol. 25 No 2. 2006; p 73-85
- AL-Murrani SW, Glass EJ, Hopkins J. BoLA class I charge heterogeneity reflects the expression of more than two loci. *Anim Genetics*. 1994; 25: 165–172.
- Amills M, Francino O, Sanchez A. Nested PCR allows the characterization of Taq I and Pst I RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995; 48: 313
- Amorena B, Stone H. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science*. 1978; p 201: 159-160.
- Andresson L, Lunden A, Sigurdardottir S, Davies CJ, Rask L. Linkage relationship in the bovine MHC region: high recombination frequency between class II subregions. *Immunogenetics*. 1988; 27:273-280
- Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. 2009. Assembly: Towards a molecular understanding
- Ballingall .K.T, Luyai A, Rowlands GJ, Sales J, Musoke A, Morzaria SP, McKeever DJ. 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. *INFEC IMMUN* Vol. 72, No. 5. 2004; p 2738–2741

- Baltian L, Ripoli M, Sanfilippo S. Association between BoLA-DRB3 and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. *Mol Biol Rep* 2012; 39:7215-7220
- Bensaid A, Kaushal A, Baldwi C.L, Clevers H, Young J.R, Kemp S.J, Machugh ND, Toye PG, Teale AJ. Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. *Immunogenetics*. 1991; 33: 247–254.
- Broere F, Apasov SG, Sitkovsky M, van Eden W. T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology: 3rd and extended ed.* 2011;p 15-27
- Casas I, Valderrama M. El Bovino Criollo Hartón Del Valle. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira – Asociación Nacional de Criadores de Ganado Hartón del Valle Asohartón. 1998. Pp 60.
- Castaño J, Bilbao R, Calvo B. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (6): Caso clínico: Trastorno molecular en la diabetes insípida central. Análisis de un gen polimórfico: Tipaje HLA. *An Esp Pediatr*. 1997; 47:201-206
- Cavalli-Sforza L.L, Edwards AWF. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am J Hum Genet*. 1967; 19:233–257
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am J Hum Genet*. 1967; 19: 233–257.
- Custodio M, López CF, Arauco F. Alleles of major histocompatibility complex BoLA class II associated with resistance and susceptibility

to *Boophilus microplus* in cattle, Junín, Peru. *Scientia Agropecuaria*. 2011; p2, 131 – 137

- Davies CJ, Andersson L, Ellis SA, Hensen EJ, Lewin H.A, Mikko S, Muggli-Cockett NE, Van der Poel JJ, Russell GC. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1997: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim Genetics*. 1997; 28: 159–168.
- Dietz AB, Detilleux JC, Freeman AE, Kelley DH, Stabel JR, Kehrli ME. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J Dairy Sci*. 1997; 80:400-4005.
- Do Nascimento CS, Machado MA, Martinez ML, Barbosa DA, Silva M.V.G, Martins MFG, Campos AL, Sousa ALA, Teodoro RL, Da Silva RV, Facioni SEG, Aandrade DAO. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology*. 2006; 29(4) 641-647.
- Duangjinda M, Buayai D, Pattarajinda V, Phasuk Y, Katawatin S, Vongpralub T, Chaiyotvittayakul A. Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein x Zebu. *J. Anim. Sci*. 2009; 87:469–476
- Elias I, Lagergren J. Fast Neighbor Joining. L. Caires. ICALP 2005, LNCS 3580. Pp. 1263–1274, 2005.
- Ellis SA, Holmes EC, Staines KA, Smith KB, Stear MJ, Mckeever DJ, Machugh ND, Morrison WI. Variation in the number of expressed MHC genes in different cattle class I haplotypes. *Immunogenetics*. 1999; 50: 319–328.

evolution of the DMA and DMB genes of the bovine major histocompatibility

- Excoffier L, Laval G, Schneider S ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005; 1, 47–50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*. 1992; 131: 479-491
- Fernández IG, Ríos JGR, Gayosso AV, Ulloa RA, Morales RAA. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico. *Genetics and Molecular Biology*. 2008; 31, 4, 880-886.
- Forletti A, Juliarena MA, Ceriani C, Amadio AF, Esteban E, Gutiérrez SE. Identification of cattle carrying alleles associated with resistance and susceptibility to the Bovine Leukemia Virus progression by real-time PCR. *Res Vet Sci* xxx (2013) xxx–xxx.
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD. *Introduction to conservation genetics*. 2002. Cambridge University Press, New York, New York, USA
- Fu, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997; 147: 915-925.
- Gilliespie BE, Jayarao BM, Dowlen HH, Oliver SP. Analysis and frequency of Bovine Lymphocyte Antigen *DRB3.2* alleles in Jersey cows. *J. Dairy Sci*. 1999; 82:2049–2053.

- Giovambattista G, Golijow CD, Dulout FN, Lojo MM. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim. Genet.* 1996; 27:55–56.
- Golijow CD. *Estudio de la reducción de la variabilidad genética por acción de la selección artificial en poblaciones de Bos taurus*, PhD Tesis, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 1996.
- Gowane G, Sharma AK, Sankar M, Narayanan M, Das B, Subramaniam S, Pattnaik B. Association of BoLA DRB3 alleles with variability in immune response among the crossbred cattle vaccinated for foot-and-mouth disease (FMD). *Res Vet Sci.* 2013; 95. Pp 156–163
- Hallauer A, Carena M, Miranda JB. Quantitative Genetics in Maize Breeding, 33 Handbook of Plant Breeding. Springer Science Business Media. 2010.
- Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP. *Hum Mutat.* 1993; 2(5):338-46.
- Hernández DY, Posso AM, Muñoz JE, Giovambattista G, Álvarez la. evaluación de la resistencia genética del ganado criollo hartón del valle al virus de la leucosis bovina. *AICA* 2011; 1 (2011) 169-172
- Hernández DY. Asociación Del Locus *BoLA-DRB3.2* Con El Virus De La Leucosis Bovina En Razas Criollas Y Colombianas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira. 2010.
- Holling TM, Schooten E, van Den Elsten PJ. Function and Regulation of MHC Class II Molecules in T-Lymphocytes: Of Mice and Men. *HUM IMMUNOL* 2004. ; 65, 282–290

- Hudson R. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 1990; 7: 1-44.
- Hudson R. The how and why of generating gene genealogies, in *Mechanisms of Molecular Evolution: Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*, 1993 pp. 23-36. Edited by N. TAKAHASHI & A. G. CLARK. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA
- Ibrahim E, Allam N, Kotb E, El-Rafey, Alaa El-Deen M, Fadlallah M. Sequence-Based Typing-Study on the Relationship Between Subclinical Mastitis and BoLA-DRB3.2* Allelic Polymorphism in Egyptian Cows. *GV an ISI Journal.* 2012; 9 (1): 08-22.
- Juliarena MA, Poli M, Sala L†, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodriguez EM, Marin B, Rodriguez-Dubra C, Esteban EN. Association fo BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Animal genetics.* 2008; 39, 432-438
- Kalinowski ST. Evolutionary and statistical properties of genetic distances. *Mol. Ecol.* 2002; 11:1263-1273.
- Kelly JE. Early detection of bovine leukemia bovine virus in cattle by use of the polymerase chain reactions. *Am J Vet Res.* 1993; 54:205-209.
- Kimura M, Ohta T. The age of a neutral mutant persisting in a finite population. *Genetics.* 1973; 75: 199-5312
- Kimura M, Weiss G. The stepping Stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics.* 1964; 49:561-576

- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*. 2001; 17:1244-1245
- Langella O, Populations, 1.2.30 Copyright (C) , CNRS UPR9034
- Leukemia virus. *J. Immun.* 1999; 151: 6977–6985.
- Lewin HA, Wu MC, Stewart JA, Nolan TJ. Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetic.* . 1988; 27: 338–344.
- Machado MA, Nascimento CS, Martinez ML, Silva MVGB, Campos AL, Teodoro RL, Verneque RS Guimaraes SEF. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.57, n.3. 2005.; p 380-389.
- Maillard JC, Renard C, Chardon P, Chantal Y, Bensaid A. Characterization of 18 new *BoLA-DRB3* alleles. *Anim. Genet.* 1999; 30:200–203.
- Martinez ML, Machado MA, Nascimento CS, Silva M.V.G.B, Teodoro RL, Furlong J, Prata MCA, Campos AL, Guimarães MFM, Azevedo ALS, Pires MFA, Verneque RS. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genetics and Molecular Research*. 2006; 5 (3): 513-524
- Martínez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobon J, Gallego J, Ariza F. Caracterización del locus *BoLA-DRB3* en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch ZootecK*. 2005; 54: 349-356.
- Michener CD, Sokal RR. A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution*. 1957; 11:490–499.

- Mirsky ML, Olimstead C, Da Y, Lewin HA. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistnat cattle. ANIM GENET. 1998; 29, 245-252
- Miyasaka T, Takeshima SN, Jimba M, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsuhashi T. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens*. 2013. ;81 72–82.
- Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer AJ, Mohammadabadi MR, Sulimova GE. Distribution of *BoLA-DRB3* Allelic Frequencies and Identification of a New Allele in the Iranian Cattle Breed Sistani (*Bos indicus*).*Russian Journal of Genetics, Vol. 45, No. 2. 2009; Pp. 198–202.*
- Moreno V, Sifuentes A, Pereyra B. Herramientas para el análisis de la variación genético-molecular. CIENCIA UANL Vol 7, N°2. 2009
- Mota AF, Gabriel JE, Martinez ML, Coutinho LL. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *European Journal of Immunogenetics*. 2002; 29, 223–227.
- Muggli-Cockett NE, Stone RT. Restriction fragment length polymorphisms in bovine major histocompatibility complex class II beta-chain genes using bovine exoncontaining hybridization probes. *Anim Genetics*. 1991; 22: 123– 136.
- Nei M, Roychoudhury A. Testing the neutral mutation hypothesis by distribution fo single locus heterozygosity. *Nature*. 1974; 262: 491-493

- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973; 70: 3321-3323.
- Nei, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 1987.
- Nei. M, Tajima F, Tatenno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J.Mol. Evol.* 1983; 19: 153-170
- Niimi M, Sato M, Tamaki M, Wada Y, Takahara J & Kawanishi K. Induction of Fos protein in the rat hypothalamus elicited by insulin-induced hypoglycemia. *Neuroscience Research*. 1995; 23 361–364
- Panei CJ, Suzuki K, Echeverria MG, Serena MS, Metz GE, Gonzales ET. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *International of Journal of Dairy Science* Vol 4. 2009; p 123-128
- Parnian M, Ghorashi SA, Salehi A, Pashmi M, Mollasalehi MR. Polymorphism of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 in Holstein bulls of Iran using PCR-RFLP. *Iran J Biotech*, Vol. 4, No. 3. 2006; 197-200.
- Pashmi M. Analysis of Relationship between Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles, Somatic Cell Count and milk Traits in Iranian Holstein Population. *Anim. Breed.Genet.* 2008; 0931-2668
- Peakall R, Mouse PES. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: An update. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2012; 28: 2537 – 2539.

- Penn DJ, and Ilmonen P. Major Histocompatibility Complex (MHC). 2005 In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Posada D, Crandal KA. Evaluation of methods of detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 2001; 98 (24) : 137757-13762
- Primo A. El Ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. *Archivos de zootecnia* vol. 41. 1993; 154: 421- 423
- Ramanatha RV, Hodgking T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2002; 68: 1-19
- Ripoli MV, Peral-Garcia P, Dulout FN, Giovambattista G. Polymorphism in the bovine BoLA-DRB3 upstream regulatory regions detected through PCR-SSCP and DNA sequencing. *Gene*. 2004; 339: 71-78.
- Roest PA. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet*. 1993; 2(10):1719-21.
- Rohl A. Phylogenetische Netzwerke. Tesis Doctoral Departamento de Mathematicas, Universidad de Hamburgo, Alemania. 1999
- Rupp R, Hernandez A, Mallard BA. Association of Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) DRB3.2 with Immune Response, Mastitis, and Production and Type Traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci*. 2007; 90:1029–1038
- Russell GC, Mareello KL, Gallagher A, Mckeever DJ, Spooner RL. Amplification and sequencing of expressed DRB second exons from *Bos indicus*. *Immunogenetics*. 1994; 39: 432–436.

- Saama PM, Jacob, J. B, Kehrli ME, Freeman AE, Kelm SC, Kuck AL, Tempelman RJ, Burton JL. Genetic Variation in Bovine Mononuclear Leukocyte Responses to Dexamethasone. *J. Dairy Sci.* 2004; 87:3928–3937.
- Sadeghi B, Nassity MR, Heydarpour M, Shahroudi FE, Mosafer J, Motlagh AS. Characterization of Genetic Polymorphism of the Bovinelymphocyte Antigen DRB3.2 Locus in Sistani Cattle of Irian (Bos indicus). *Biotechnology.* 2008; 7 (2): 333-337.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *MOL BIOL EVOL.* 1987; 4:406-425
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p1659.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, and Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17: 915-919.
- Schwab A, Geary T, Baillargeon P, Schwab A, Fecteau G. Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to *Neospora caninum* and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle. *Vet Parasitol.* 2009; 165, 136–140
- Schwaiger FW, Weyers E, Buitkamp J, Ede AJ, Crawford A, Epplen JT. Interdependent MHC-DRB exon-plus-intron evolution in artiodactyls. *Molecular Biology and Evolution.* 1994; 11(2): 239-249
- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sardeant JM, Scott HM, Dekkers JCM, Leslie KE. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease

and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 1998; 29:185–193.

- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sardeant JM, Scott HM, Dekkers JCM, Leslie KE. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 1998; 29:185–193.
- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN. Characterization of naturally processed and presented peptides associated with bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II DR molecules. *Animal genetic.* 2003; 34: 16-123.
- Sivakumaran TA, Kucheria† , Oefner PJ. Denaturing high performance liquid chromatography in the molecular diagnosis of genetic disorders. *Current Science VOL.* 2003; 84, NO. 3.291-296
- Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics.* 1995; 139, 457-462.
- Spooner L, Leveziel H, Grosclaude F, Oliver FA, Vaiman M. Evidence for possible Major Histocompatibility complex (BLA) in cattle. *Journal of Immunogenetics.* 1978; p5:335-346.
- Sulimova GE, Udina IG, Shaikhaev GO, Zakharov IA. DNA polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in cattle in connection with resistance and susceptibility to leukemia. *Genetika.* 1995; 31(9):1294-9.
- Swarbrick PA, Crawford AM. The red deer (*Cervus elaphus*) contains two expressed major histocompatibility complex class II DQB genes. *Animal Genetics.* 1997; 28: 49.

- Tahmooperspur M, Nassiry MR, Najafi MF, Ghovvati S. Genetic polymorphism at the candidate Gene in Iranian Sistani Cattle (*Bos indicus*). *Pak. J. Biol. Sci.* 2007; 10(19):3368-3373.
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989; 123 (3): 585–95.
- Takeshima SN, Aida Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J.* 2006; 77: 138-150.
- Takeshima SN, Nakai Y, Ohta M, Aida Y. Short communication: Characterization of DRB3 alleles in the MCH of Japanese Shorthorn cattle by Polymerase chain reaction-Sequence-Based-Typing. *J Dairy Sci.* 2002; 85:1630-1632.
- Tamarin, R. Principios de genética. Editorial: Reverté S.A. Barcelona, España. 1996; Pp 607.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion en Discapacidad Vol 2. Num 2.* 2013; Pp 70-78.
- Udina IG, Haramysheva EE, Sulimova GE, Pavlenko SP, Turkova SO, Orlova AR, Ernst LK. Comparative analysis of Ayrshire and Black Pied cattle breeds by histocompatibility markers. *Genetika.* 1998; 34(12):1668–1674.
- Udina IG, Karamysheva EE, Turkova SO, Orlova AR, Sulimova GE. Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire and black pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene Bola-DRB3. *Asian Australas J Anim Sci.* 2008; 21 (4): 465-470.

- Untalam P, Pruett J, Steelman C. Association fo the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to the Lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vet Parasitol.* 2007; 190-195
- Van Eijk MJ Russ I, Lewin HA. Order of bovine DRB3, DYA, and PRL determined by sperm typing. *Mammalian Genome.* 1993; 4: 113–118.
- Van Hateren A, James E, Bailey A, Phillips A, Dalchau N, Elliott T. The cell biology of major histocompatibility complex class I assembly: towards a molecular understanding. *Tissue Antigens.* 2010; 76, 259–275
- Villalobos A. Historia de los Bovinos de Panama y su relación con las poblaciones bovinas de Iberoamérica. *Archivos de Zootecnia* vol.57 num 219. 2009; p 124.
- Watterson GA. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology.* 1975; 7 (2): 256–276.
- Weir B, Cockerham C. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 1984; 38 (6), 1358–1370.
- Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution.* 1965; 19: 395-420
- Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunology.* 1993; 151: 6977–6985.

- Yoshida T, Furuta h, Kondo y, Mukoyama H. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Anim Sci J.* 2012; 83(5):359-66
- Zambrano JC, Echeverri JZ, López AH. Análisis y frecuencias de los alelos del antígeno leucocitario bovino BoLA DRB3.2 en vacas del hato Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* Vol 22. No. 3. 2009.
- Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, Russo S, Lewin HA, van Eijk MJ. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genetics.* 1996; 27(5):337-341.

Webgrafía

- ACHIC 2010. Publicacion de Asociación Chilena de Carnes 18/01/2010. Alemania en busca de una ganadería sin metano. <http://www.achic.cl/noticias.php?id=1411>
- MINAG. 2011. Producción Pecuaria e Industria Avícola 2011. p16 MINAG. 2012 http://dgffs.minag.gob.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=194
- INEI 2012. Resultados Definitivos iV Censo Nacional Agropecuario 2012 <http://peru21.pe/economia/inei-economia-peruana-crecio-629-2012-2117491>
- Rozas J. 2009. DnaSP v5: Website last modified on February 13, 2009 (accessed on December 6, 2011). <http://www.ub.edu/dnasp/>

IX. ANEXOS

Cuadro 15. Muestras totales procesadas.

Código muestra	Sexo	Comunidad	Distrito	Provincia	Región	Polimorfismo	Alelos	
BC-003	♀	Saños Grande	El Tambo	Huancayo	Junín	4	*4802	
BC-009	♀	Saños Grande	El Tambo	Huancayo	Junín	5	*4802	*2101
BC-011	♀	Saños Grande	El Tambo	Huancayo	Junín	41	*1601	*14011
BC-012	♀	Saños Grande	El Tambo	Huancayo	Junín	12	*1801	*4401
BC-016	♂	Saños Grande	El Tambo	Huancayo	Junín	40	*20012	*14011
BC-017	♂	Saños Grande	El Tambo	Huancayo	Junín	27	*1801	*14011
BC-021	♀	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	27	*1801	*14011
BC-080	♀	Chuquibambilla	Ayaviri	Melgar	Puno	27	*1801	*14011
BC-091	♀	Chuquibambilla	Ayaviri	Melgar	Puno	41	*1601	*14011
BC-097	♂	Chuquibambilla	Ayaviri	Melgar	Puno	4	*4802	
BC-100	♂	Chuquibambilla	Ayaviri	Melgar	Puno	1	*0501	
BC-101	♂	Chuquibambilla	Ayaviri	Melgar	Puno	2	*0701	*14011
BC-103	♂	Chuquibambilla	Ayaviri	Melgar	Puno	3	*1501	
BC-104	♀	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	4	*4802	
BC-105	♀	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	5	*4802	*2101
BC-108	♀	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-113	♀	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	24	*14011	
BC-114	♂	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	94	*20012	
BC-124	♀	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	7	*2703	
BC-125	♀	Panti	Pariahuanca	Huancayo	Junín	5	*4802	*2101
BC-129	♀	Occoro	Pariahuanca	Huancayo	Junín	96	*20012	*4802
BC-138	♀	Occoro	Pariahuanca	Huancayo	Junín	5	*4802	*2101
BC-143	♀	Occoro	Pariahuanca	Huancayo	Junín	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-149	♂	Huasapá	Pariahuanca	Huancayo	Junín	10	*2802	

BC-150	♂	Huasapá	Pariahuanca	Huancayo	Junín	11	*0902	*2902
BC-151	♀	Huasapá	Pariahuanca	Huancayo	Junín	4	*4802	
BC-154	♀	Huasapá	Pariahuanca	Huancayo	Junín	77	*1501	*14011
BC-156	♂	Huasapá	Pariahuanca	Huancayo	Junín	24	*14011	
BC-157	♀	Huasapá	Pariahuanca	Huancayo	Junín	12	*1801	*4401
BC-201	♂	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	14	*0101	*512-2-A.N(2801)
BC-203	♀	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	13	*1801	
BC-205	♂	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	15	*2902	
BC-206	♀	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	13	*1801	
BC-207	♀	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	4	*4802	
BC-209	♂	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	20	*0701	
BC-211	♀	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	23	*1801	*1001
BC-212	♀	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	15	*2902	
BC-214	♂	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	13	*1801	
BC-215	♂	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	33	*1103	
BC-216	♀	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	4	*4802	
BC-219	♀	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	20	*0701	
BC-220	♂	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	40	*20012	*14011
BC-221	♂	Huashcao	Mancos	Yungay	Ancash	3	*1501	
BC-230	♀	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	98	*4802	*1201
BC-240	♀	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	18	*1801	*1101
BC-241	♀	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	13	*1801	
BC-245	♂	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	1	*0501	
BC-246	♂	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	3	*1501	
BC-249	♀	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	3	*1501	
BC-250	♀	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	20	*0701	
BC-252	♀	Ticllos	Ticllos	Bolognesi	Ancash	4	*4802	
BC-257	♀	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-260	♀	Mesapmapa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	24	*14011	

BC-268	♀	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	12	*1801	*4401
BC-270	♂	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	94	*20012	
BC-274	♀	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-277	♀	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	20	*0701	
BC-280	♀	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	4	*4802	
BC-281	♀	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	1	*0501	
BC-282	♀	Mesapampa	Chiquian	Bolognesi	Ancash	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-289	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	32	*1801	*2703
BC-295	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	23	*1801	*1001
BC-297	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	4	*4802	
BC-299	♂	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	23	*1801	*1001
BC-300	♂	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	17	*542-9-A.N(1601)	*542-P17-A.N(0902)
BC-301	♂	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	96	*20012	*4802
BC-304	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	13	*1801	
BC-306	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	32	*1801	*2703
BC-307	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	32	*1801	*2703
BC-310	♂	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	1	*0501	
BC-313	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	77	*1501	*14011
BC-314	♀	Pampa de	Chiquian	Bolognesi	Ancash	6	*2201	*108-B-A.N(1801)

		Lampas Alto						
BC-315	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	41	*1601	*14011
BC-316	♀	Pampa de Lampas Alto	Chiquian	Bolognesi	Ancash	16	*4802	*0701
BC-318	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-320	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	26	*2902	*0101
BC-323	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-324	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-328	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	1	*0501	
BC-330	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-331	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	23	*1801	*1001
BC-333	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	13	*1801	
BC-338	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	10	*2802	
BC-342	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	10	*2802	
BC-344	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	14	*0101	*512-2-A.N(2801)
BC-348	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	10	*2802	
BC-349	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	4	*4802	
BC-350	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	5	*4802	*2101
BC-357	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	30	*20012	*2902
BC-358	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	77	*1501	*14011
BC-360	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga		17	*542-9-A.N(1601)	*542-P17-A.N(0902)
BC-362	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	96	*20012	*4802
BC-364	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	24	*14011	
BC-365	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	24	*14011	
BC-366	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	3	*1501	
BC-375	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	40	*20012	*14011
BC-377	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	3	*1501	

BC-379	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	39	*2802	*14011
BC-380	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	27	*1801	*14011
BC-388	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	3	*1501	
BC-389	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	3	*1501	
BC-390	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	27	*1801	*14011
BC-393	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	41	*1601	*14011
BC-397	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	33	*1103	
BC-398	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	96	*20012	*4802
BC-399	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	17	*542-9- A.N(1601)	*542-P17- A.N(0902)
BC-401	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	40	*20012	*14011
BC-402	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	5	*4802	*2101
BC-405	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	17	*542-9- A.N(1601)	*542-P17- A.N(0902)
BC-406	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	96	*20012	*4802
BC-411	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	39	*2802	*14011
BC-415	♂	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-421	♀	EEA Illpa	Paucarcolla	Puno	Puno	10	*2802	
BC-426	♀	EEA Illpa	Paucarcolla	Puno	Puno	13	*1801	
BC-428	♀	EEA Illpa	Paucarcolla	Puno	Puno	5	*4802	*2101
BC-429	♀	EEA Illpa	Paucarcolla	Puno	Puno	5	*4802	*2101
BC-430	♂	EEA Illpa	Paucarcolla	Puno	Puno	41	*1601	*14011
BC-431	♂	EEA Illpa	Paucarcolla	Puno	Puno	16	*4802	*0701
BC-432	♂	EEA Illpa	Paucarcolla	Puno	Puno	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-441	♂	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	23	*1801	*1001
BC-444	♂	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	17	*542-9- A.N(1601)	*542-P17- A.N(0902)
BC-446	♀	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	11	*0902	*2902
BC-449	♂	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	24	*14011	

BC-456	♀	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	3	*1501	
BC-462	♂	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	1	*0501	
BC-463	♂	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	7	*2703	
BC-464	♀	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	23	*1801	*1001
BC-465	♀	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	27	*1801	*14011
BC-468	♀	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	3	*1501	
BC-472	♀	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-473	♀	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	10	*2802	
BC-475	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	30	*20012	*2902
BC-476	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	11	*0902	*2902
BC-478	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	5	*4802	*2101
BC-480	♀	Qochapunco	Vinchos	Huamanga	Ayacucho	13	*1801	
BC-481	♀	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	31	*1501	*1201
BC-484	♀	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	12	*1801	*4401
BC-485	♂	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	10	*2802	
BC-488	♀	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	16	*4802	*0701
BC-489	♀	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	33	*1103	
BC-490	♂	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-492	♂	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	41	*1601	*14011
BC-493	♂	Lampa Grande	Pomata	Chucuito	Puno	10	*2802	
BC-494	♀	Huacani	Pomata	Chucuito	Puno	10	*2802	
BC-504	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	4	*4802	
BC-505	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	41	*1601	*14011
BC-510	♂	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	33	*1103	
BC-512	♂	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	14	*0101	*512-2-A.N(2801)
BC-513	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-516	♂	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	4	*4802	
BC-517	♂	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-518	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	10	*2802	

BC-527	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	4	*4802	
BC-530	♂	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	16	*4802	*0701
BC-536	♂	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	7	*2703	
BC-538	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	12	*1801	*4401
BC-542	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	17	*542-9-A.N(1601)	*542-P17-A.N(0902)
BC-544	♂	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	12	*1801	*4401
BC-545	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	4	*4802	
BC-548	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	4	*4802	
BC-550	♀	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	3	*1501	
BC-556	♂	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	14	*0101	*512-2-A.N(2801)
BC-565	♀	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	41	*1601	*14011
BC-571	♂	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	20	*0701	
BC-587	♀	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	10	*2802	
BC-588	♂	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	4	*4802	
BC-589	♂	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	39	*2802	*14011
BC-590	♂	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	4	*4802	
BC-597	♀	Ampi	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	10	*2802	
BC-600	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	40	*20012	*14011
BC-605	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	41	*1601	*14011
BC-606	♀	Santa Elena	Pacucha	Andahuaylas	Apurimac	10	*2802	
BC-707	♀	Condorcocha	Chiara	Huamanga	Ayacucho	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-709	♀	Condorcocha	Chiara	Huamanga	Ayacucho	27	*1801	*14011
BC-713	♀	Viscachaio	Chiara	Huamanga	Ayacucho	12	*1801	*4401
BC-715	♀	Pucajasa	Pampa cangallo	Cangallo	Ayacucho	16	*4802	*0701
BC-716	♀	Pucajasa	Pampa cangallo	Cangallo	Ayacucho	41	*1601	*14011
BC-717	♀	Pucajasa	Pampa	Cangallo	Ayacucho	16	*4802	*0701

BC-718	♂	Pucajasa	cangallo Pampa cangallo	Cangallo	Ayacucho	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-719	♂	Pucajasa	Pampa cangallo	Cangallo	Ayacucho	16	*4802	*0701
BC-720	♂	Pucajasa	Pampa cangallo	Cangallo	Ayacucho	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-722	♀	Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	16	*4802	*0701
BC-727	♀	Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	37	*1104	*953-A- A.N(03021)
BC-729	♂	Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-732	♂	Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-735	♂	Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	12	*1801	*4401
BC-736	♀	Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	3	*1501	
BC-742	♀	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	17	*542-9- A.N(1601)	*542-P17- A.N(0902)
BC-747	♀	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	1	*0501	
BC-749	♀	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	4	*4802	
BC-751	♀	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	7	*2703	
BC-752	♂	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	98	*4802	*1201
BC-754	♀	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	41	*1601	*14011
BC-755	♂	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	37	*1104	*953-A- A.N(03021)
BC-756	♀	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	15	*2902	
BC-757	♀	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	27	*1801	*14011
BC-758	♂	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	20	*0701	
BC-761	♂	Atavi - Erusco	Cayara	Fajardo	Ayacucho	4	*4802	
BC-765	♂	Atavi	Cayara	Fajardo	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-766	♀	Atavi	Cayara	Fajardo	Ayacucho	4	*4802	

BC-768	♀	Atavi	Cayara	Fajardo	Ayacucho	4	*4802	
BC-773	♂	Cayara	Cayara	Fajardo	Ayacucho	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-783	♂	Cayara	Cayara	Fajardo	Ayacucho	4	*4802	
BC-786	♀	Cayara	Cayara	Fajardo	Ayacucho	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-787	♂	Cayara	Cayara	Fajardo	Ayacucho	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-788	♂	Cayara	Cayara	Fajardo	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-792	♀	Chincheros	Cayara	Fajardo	Ayacucho	5	*4802	*2101
BC-793	♀	Chincheros	Cayara	Fajardo	Ayacucho	24	*14011	
BC-794	♀	Tiquihua	Canaria	Fajardo	Ayacucho	24	*14011	
BC-795	♀	Tiquihua	Canaria	Fajardo	Ayacucho	24	*14011	
BC-798	♀	Tiquihua	Canaria	Fajardo	Ayacucho	32	*1801	*2703
BC-799	♂	Tiquihua	Canaria	Fajardo	Ayacucho	10	*2802	
BC-804	♀	Chonta	Querobamba	Sucre	Ayacucho	33	*1103	
BC-806	♀	Chonta	Querobamba	Sucre	Ayacucho	4	*4802	
BC-808	♀	Tintai	Morcolla	Sucre	Ayacucho	4	*4802	
BC-818	♂	Tintai	Morcolla	Sucre	Ayacucho	20	*0701	
BC-826	♀	Tintai	Morcolla	Sucre	Ayacucho	13	*1801	
BC-828	♂	Tintai	Morcolla	Sucre	Ayacucho	4	*4802	
BC-829	♂	Tintai	Morcolla	Sucre	Ayacucho	33	*1103	
BC-830	♀	Tintai	Morcolla	Sucre	Ayacucho	4	*4802	
BC-831	♂	Tintai	Morcolla	Sucre	Ayacucho	4	*4802	
BC-834	♂	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	13	*1801	
BC-835	♂	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	13	*1801	
BC-836	♀	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	4	*4802	
BC-838	♀	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-847	♀	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	41	*1601	*14011
BC-856	♀	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	38	*0902	*2902
BC-857	♀	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	7	*2703	
BC-859	♀	Huacaña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	5	*4802	*2101

BC-860	♂	San Andres	Puquio	Lucanas	Ayacucho	4	*4802	
BC-861	♀	San Andres	Puquio	Lucanas	Ayacucho	12	*1801	*4401
BC-863	♀	San Andres	Puquio	Lucanas	Ayacucho	13	*1801	
BC-867	♂	San Andres	Puquio	Lucanas	Ayacucho	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-869	♂	San Andres	Puquio	Lucanas	Ayacucho	4	*4802	
BC-870	♂	Chaviña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	3	*1501	
BC-874	♂	Chaviña	Puquio	Lucanas	Ayacucho	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-877	♀	Chaviña	Chaviña	Lucanas	Ayacucho	4	*4802	
BC-879	♀	Chaviña	Chaviña	Lucanas	Ayacucho	16	*4802	*0701
BC-880	♀	Chaviña	Chaviña	Lucanas	Ayacucho	5	*4802	*2101
BC-882	♀	Sihuilla	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-883	♀	Sihuilla	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	27	*1801	*14011
BC-885	♂	Sihuilla	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	33	*1103	
BC-886	♀	Sihuilla	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	10	*2802	
BC-889	♂	Sihuilla	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	3	*1501	
BC-891	♀	Sihuilla	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	15	*2902	
BC-892	♀	Sihuilla	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	41	*1601	*14011
BC-893	♀	Huajipampa	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-896	♀	Chumpi	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	26	*2902	*0101
BC-899	♂	Chumpi	Cora cora	Parinacochas	Ayacucho	40	*20012	*14011
BC-902	♂	Pucchco	Aicar	Parinacochas	Ayacucho	98	*4802	*1201
BC-903	♀	Pucchco	Aicar	Parinacochas	Ayacucho	33	*1103	
BC-904	♂	Pucchco	Aicar	Parinacochas	Ayacucho	4	*4802	
BC-906	♀	Pucchco	Aicar	Parinacochas	Ayacucho	4	*4802	
BC-914	♀	PILLPICHACKA	Pilpichaca	Huaytar	Huancavelica	11	*0902	*2902
BC-919	♂	CALLICHICO	?	?	Huancavelica	41	*1601	*14011
BC-920	♂	CALLICHICO	?	?	Huancavelica	32	*1801	*2703
BC-921	♀	CALLICHICO	?	?	Huancavelica	3	*1501	
BC-923	♀	CALLICHICO	?	?	Huancavelica	18	*1801	*1101

BC-926	♀	CALLICHICO	?	?	Huancavelica	16	*4802	*0701
BC-928	♂	CALLICHICO	?	?	Huancavelica	3	*1501	
BC-930	♀	CALLICHICO	?	?	Huancavelica	27	*1801	*14011
BC-931	♀	TACSANA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	39	*2802	*14011
BC-932	♂	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	31	*1501	*1201
BC-933	♂	OCCOPAMPA	Palca	Huancavelica	Huancavelica	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-936	♀	OCCOPAMPA	Palca	Huancavelica	Huancavelica	10	*2802	
BC-937	♀	OCCOPAMPA	Palca	Huancavelica	Huancavelica	24	*14011	
BC-939	♂	OCCOPAMPA	Palca	Huancavelica	Huancavelica	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-940	♀	OCCOPAMPA	Palca	Huancavelica	Huancavelica	40	*20012	*14011
BC-941	♂	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	3	*1501	
BC-943	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	4	*4802	
BC-944	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	12	*1801	*4401
BC-948	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	5	*4802	*2101
BC-950	♂	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	37	*1104	*953-A-A.N(03021)
BC-952	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	4	*4802	
BC-953	♂	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	37	*1104	*953-A-A.N(03021)
BC-954	♂	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-955	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	6	*2201	*108-B-A.N(1801)
BC-956	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	18	*1801	*1101
BC-959	♂	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	41	*1601	*14011
BC-965	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	38	*0902	*2902
BC-969	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	11	*0902	*2902
BC-970	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-971	♀	PALTAMACHAY	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	24	*14011	
BC-972	♀	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	9	*4802	*143-B-A.N(2002)
BC-973	♂	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	41	*1601	*14011

BC-974	♀	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	13	*1801	
BC-976	♂	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	2	*0701	*14011
BC-977	♀	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	39	*2802	*14011
BC-980	♂	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	4	*4802	
BC-981	♂	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	41	*1601	*14011
BC-982	♂	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	32	*1801	*2703
BC-986	♂	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	24	*14011	
BC-987	♂	CAÑAYPATA	Yauli	Huancavelica	Huancavelica	32	*1801	*2703
BC-1012	♀	Llacubamba	Parcoy	Pataz	La Libertad	41	*1601	*14011
BC-1013	♀	Llacubamba	Parcoy	Pataz	La Libertad	32	*1801	*2703
BC-1014	♂	Llacubamba	Parcoy	Pataz	La Libertad	20	*0701	
BC-1015	♀	Llacubamba	Parcoy	Pataz	La Libertad	41	*1601	*14011
BC-1016	♂	Llacubamba	Parcoy	Pataz	La Libertad	5	*4802	*2101
BC-1019	♀	Llacubamba	Parcoy	Pataz	La Libertad	41	*1601	*14011
BC-1020	♀	Llacubamba	Parcoy	Pataz	La Libertad	20	*0701	