

MARCADORES GENÉTICOS PARA RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS. LOS LOCI DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) COMO GENES CANDIDATOS

S Díaz, MV Ripoli, P. Peral-García, G Giovambattista

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA).
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: Las enfermedades infecciosas en animales domésticos aún permanecen como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con las consecuentes pérdidas productivas, siendo uno de los principales problemas sanitarios en los países en desarrollo. El resultado de la infección puede estar influenciado por factores ambientales, variables propias del patógeno y factores del hospedador. En consecuencia se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a establecer las relaciones entre la probabilidad de adquirir o desarrollar la enfermedad y la constitución genética de los individuos. Los loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad son considerados genes candidatos dado el rol que desempeñan en la respuesta inmune. En este trabajo de revisión se describen las principales estrategias implementadas para detectar el componente genético de la susceptibilidad/resistencia y se detallan las consideraciones generales para la elección del método adecuado. Además, se describen y discuten los principales resultados obtenidos en las diferentes especies de animales domésticos: equinos (sarcoïdítis, hipersensibilidad dérmica a insectos), bovinos (leucosis, mastitis, dermatofilosis), caninos (leishmaniasis) y aves de corral (enfermedad de Marek). Finalmente, se hace una breve mención de estudios de asociación realizados con otros genes candidatos que no pertenecen al MHC y se discute la situación actual y las perspectivas futuras de esta área del conocimiento

Palabras claves: MHC, susceptibilidad/resistencia a enfermedades, animales domésticos, marcadores genéticos.

GENETIC MARKERS FOR SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE TO INFECTIOUS DISEASES IN FARM ANIMALS. MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX (MHC) LOCI AS CANDIDATE GENES

Abstract: Infectious diseases in farm animals are the main cause of morbidity and mortality and because of the consequent productive losses is considered one of the major sanitary problems in developing countries. The outcome of infection can be divided into environment, pathogen and host factors. Several investigations have intended to relate the probability of acquire or develop a disease and the genetic constitution of the individuals. Major Histocompatibility Complex loci are proposed as candidate genes due to their role on the immune system. In this review the principal strategies to detect the genetic component of susceptibility/resistance are described and the general norms to select the accurate method are detailed. Moreover, the main results obtained in different farm animals: equine (sarcoïds, insect dermal hipersensibility), bovine (leukosis, mastitis, dermatophilosis), canine (leishmaniasis) and poultry (Marek's disease) are presented. Finally, a brief description of association studies with other candidate non-MHC genes is mentioned, and the present status and future perspectives are discussed.

Keywords: MHC, susceptibility/resistance to diseases, domestic animals, molecular markers

Fecha de recepción: 13/04/05

Fecha de aprobación: 17/06/05

Dirección para correspondencia: G. Giovambattista. Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, B1900AVW. Argentina.

E-mail: ggiovam@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las enfermedades se relacionan de una forma u otra con los genes. La información codificada por ellos es tan crítica que el cambio en un sólo nucleótido (mutación puntual) del ADN (Ácido Desoxirribonucleico) puede ser suficiente para desencadenar enfermedades hereditarias, hacer a los individuos más o menos vulnerables a padecerlas crónicamente, o ser susceptibles a contraer enfermedades infecciosas.

La probabilidad de contraer enfermedades infecciosas en el mundo desarrollado ha disminuido en los últimos 50 años. Sin embargo, la infección aún permanece como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con la consecuente pérdida productiva. En los países en desarrollo, las enfermedades infecciosas continúan siendo uno de los principales problemas sanitarios. Aunque la mayoría de las infecciones son autolimitantes y confieren morbilidad no significativa en el hospedador, otras pocas tienen una tasa de mortalidad cercana al 100%. En estas últimas, la variación en el resultado de la infección depende en gran medida de las diferencias en la constitución genética de los individuos.

Existen varios factores que pueden influenciar el resultado de la infección y que por conveniencia, se clasifican en variables ambientales, variables propias del patógeno y factores del hospedador. Los factores ambientales pueden incluir, entre otros, la nutrición, las toxinas ambientales y la edad de exposición al patógeno. Por otra parte, aquellas variables derivadas del patógeno generalmente implican factores de virulencia que, por ejemplo, pueden incrementar o atenuar la habilidad de colonización del organismo o aumentar la virulencia a través de la expresión de una toxina. Finalmente, los factores atribuidos al hospedador, a los cuales nos vamos a referir en detalle, implican principalmente la dotación genética del organismo.

En consecuencia, el objetivo del presente trabajo consiste en describir y analizar algunos aspectos de la susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas desde un punto de vista principalmente genético. Por otra parte, se mencionará la metodología estadística y los diseños muestrales comúnmente utilizados para detectar este tipo de asociaciones. Por último, se describirán estudios de asociaciones entre susceptibilidad/resistencia y los genes del MHC en las principales especies de animales domésticos previamente reportados.

Los vertebrados tienen entre 30 y 35 mil genes. Como se mencionó anteriormente, un único cambio o mutación en las bases de ADN que conforman esos genes puede causar una enfermedad o provocar predisposición a padecerla. Las mutaciones que generan variaciones genéticas, alterando el riesgo de ocurrencia de una enfermedad infecciosa, se conocen como genes de susceptibilidad. Los genes de susceptibilidad/resistencia se ponen de manifiesto porque algunas de sus variantes: (i) causan o predisponen el desarrollo de una enfermedad (alelo de susceptibilidad), (ii) presentan mayor incidencia en individuos emparentados, (iii) influyen la edad de ocurrencia y/o la progresión o (iv) ayudan a proteger contra la enfermedad (alelo protector).

La manera en que los cambios o variaciones de los genes pueden determinar que un organismo sea susceptible a desarrollar una enfermedad, o por el contrario, sea resistente a ella, ha sido objeto de numerosos estudios en diversas especies de organismos, principalmente en humanos, animales de laboratorios y animales domésticos (1-18).

Estos estudios han demostrado que las variaciones genéticas que afectan la susceptibilidad/resistencia pueden ocurrir tanto en regiones codificantes como no codificantes. Entre las primeras se encuentran, por ejemplo, los cambios en las regiones de reconocimiento de los antígenos (ARS), que pueden modificar la afinidad antígeno-anticuerpo. Entre las mutaciones en regiones no codificantes pueden mencionarse: (i) las regiones involucradas en el corte y empalme de intrón y exón (*splicing*), las que pueden modificar la funcionalidad de la proteína madura, y (ii) las regiones promotoras implicadas en el control de la transcripción de los genes y que por lo tanto, pueden variar los niveles de expresión.

Con este fin se han utilizado diferentes estrategias para identificar al gen responsable o al conjunto de genes asociados con la resistencia/susceptibilidad a una determinada enfermedad infecciosa.

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA A ENFERMEDADES INFECCIOSAS

En términos generales, la identificación de genes de susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas consiste en la búsqueda de cambios en el ADN o la detección de regiones cromosómicas asociadas. Comúnmente, para identificar las variaciones en el ADN se utilizan Marcadores Genéticos (MG),

representados por genes, fragmentos de genes o secuencias no codificantes, que tienen variantes alternativas o alelos, con frecuencia apreciables en las distintas poblaciones (polimorfismo). Los MG poseen herencia mendeliana simple, y su detección es sencilla y reproducible.

Se han implementado diversas estrategias para detectar susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas. Para la elección del método de estudio se deben tener en cuenta diversas consideraciones generales, a saber:

- Selección de genes que han sido confirmados, propuestos, o que podrían ser considerados como genes candidatos para susceptibilidad/resistencia a enfermedades. Se definen como genes candidatos a aquellos loci que por su función biológica pueden estar involucrados en la determinación de un carácter, por la función de la proteína que codifican o por comparación con genes asociados a enfermedades similares en otras especies.

- Si el MG y un gen involucrado con la susceptibilidad/resistencia se encuentran ligados, ambos tenderán a heredarse juntos. Por lo tanto, la utilidad de un MG consiste en mapear genes o regiones cromosómicas implicadas en el carácter mediante análisis de ligamiento.

- Los grupos sanos y enfermos deben estar definidos por medio de fenotipos claros y robustos, de manera tal de poder diferenciarlos claramente. Para que las diferencias entre sanos y enfermos no se deban a diferencias génicas inherentes a las poblaciones de origen, la selección de los grupos control y enfermo debe realizarse dentro del mismo origen étnico.

En las diferentes razas o familias no siempre se presentan las mismas asociaciones entre marcador y carácter. Por ejemplo, si tenemos en cuenta que el ligamiento entre el carácter y el marcador genético es incompleto, podrían existir en la población diferentes haplotipos marcador/carácter. De este modo, un alelo del marcador podría estar ligado al alelo de susceptibilidad en algunos animales, mientras que en otros estaría ligado a la variante de resistencia. Por lo tanto, los efectos estimados del carácter sobre el rasgo cuantitativo se verán sesgados por efecto de la recombinación.

En términos generales, el estudio de asociación a enfermedades consiste en la identificación de un gen candidato polimórfico y en la comparación de las frecuencias alélicas del

gen entre el grupo afectado y el grupo control.

Estrategias de identificación de genes de susceptibilidad/resistencia a enfermedades

Según el tipo de marcador utilizado existen dos estrategias principales para la identificación de genes involucrados en la determinación de un carácter, tal como es la susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas: (i) rastreo del genoma y (ii) estudio de genes candidatos.

El rastreo del genoma consiste en el mapeo (localización) e identificación de regiones del genoma que estarían asociadas con susceptibilidad/resistencia a una determinada enfermedad infecciosa. Esta estrategia se utiliza para determinar si existen similitudes entre individuos afectados. El rastreo se realiza usualmente con marcadores de tipo microsatélites (secuencias repetitivas en tándem) distribuidos a lo largo de todo un cromosoma o de todo el genoma (19, 20). Luego se realiza el análisis de ligamiento, con el fin de determinar que marcador segrega conjuntamente con el carácter en estudio. Posteriormente, se identifican los genes que presentaron asociación significativa con el carácter dentro de las regiones mapeadas. Esto puede realizarse analizando los genes previamente mapeados en dichas regiones cromosómicas, o mediante estudios de mapeo posicional. El último paso involucra la determinación de cuál de estos genes o mutaciones son causantes de la susceptibilidad/resistencia a la enfermedad infecciosa en estudio.

La segunda estrategia consiste en la selección y estudio de genes candidatos. Estos estudios parten del supuesto de que por su función biológica el gen candidato estaría involucrado en la susceptibilidad/resistencia a una determinada enfermedad infecciosa. La estrategia consiste en asociar los genotipos del gen candidato con el carácter estudiado. De igual modo que en la estrategia de rastreo, el objetivo final consiste en identificar en el gen candidato la mutación causal de la susceptibilidad/resistencia, y de esta forma confirmar al locus como responsable de la asociación.

Una vez determinados los genotipos o haplotipos del gen analizado, el estudio puede conducirse según el caso hacia: (1) el análisis de segregación compleja, el cual simula la segregación de la enfermedad en familias multicásos y compara la probabilidad de diferentes formas de heredar la enfermedad; (2) la

comparación del número observado de alelos compartidos con el número esperado por herencia mendeliana simple, en pares de hermanos enteros; (3) análisis de ligamiento, el cual incorpora los efectos de recombinación en las generaciones anteriores para determinar la localización génica.

Si bien los métodos mencionados son de gran utilidad en la identificación de alelos de susceptibilidad a enfermedades, no son aplicables a todas las enfermedades infecciosas por razones logísticas. Si un gen candidato es identificado a través de estudios de alelos compartidos, análisis de ligamiento o de segregación, la evaluación final requerirá estudios de asociación con la enfermedad cuidadosamente diseñados, a fin de validar la asociación encontrada entre el gen estudiado y la enfermedad en cuestión.

Tanto una estrategia como la otra pueden utilizar diferentes diseños muestrales, tales como: (1) diseño de medio-hermanos (*Paternal half sibs*) o diseño de nietos (*Granddaughter Designs*), (2) líneas endocriadas (modelos murinos), (3) estudios de familias portadoras y (4) análisis poblacionales.

El cruzamiento de medio-hermanos paternos se basa en el estudio de la descendencia de machos heterocigotas para un locus determinado. Teniendo en cuenta el alelo que reciben del padre, las hijas pueden ser clasificadas en dos grupos de medio hermanas paternas (21, 23). Debido a que los alelos correspondientes a un locus marcan las regiones cromosómicas homólogas a las que se encuentran ligados, pueden ser usados en este sentido como MG. Si el marcador se encuentra estrechamente ligado al carácter en estudio, al recibir un alelo determinado del padre las crías heredan simultáneamente una de las dos posibles regiones cromosómicas homólogas que incluyen el carácter. De esta manera, los dos grupos de medias hermanas paternas deberían diferenciarse para el carácter. Por lo dicho anteriormente, sólo serán informativos aquellos machos que sean heterocigotas para ambos loci.

El método denominado "Diseño de Nietas" se basa en la caracterización de los hijos de machos heterocigotas para un determinado marcador. Los hijos se dividen en dos grupos de acuerdo al alelo que hayan recibido del macho. Posteriormente, los son hijos evaluados a partir de la producción de sus respectivas hijas (por ejemplo, mediante los valores de cría).

En el diseño que emplea líneas endocriadas para identificar genes de susceptibilidad a enfermedades se tipifican cepas endocriadas de roedores después de haber estado expuestas a una infección con el fin de obtener fenotipos extremos. Se determina si el fenotipo en particular es dominante o recesivo en los cruzamientos F1 en los cuales todos los individuos son heterocigotas, habiendo heredado un cromosoma de cada una de las cepas parentales endocriadas. Por lo tanto, el fenotipo de la enfermedad debería ser homogéneo. Posteriormente se realizan cruzamientos entre hermanos, o retrocruzamientos con uno de los parentales con el fin de producir cepas con genotipos y fenotipos variables como resultado de la recombinación cromosómica.

Cuando se utiliza el diseño de familias portadoras se considera que en determinadas regiones cromosómicas pueden existir numerosos genes estrechamente ligados, los cuales se transmiten juntos como haplotipos (Figura 1). Como se observa en el esquema, los individuos tienen dos haplotipos (denotados por letras mayúsculas), uno en cada cromosoma homólogo, entonces, un hijo recibe un haplotipo de cada parental y existe una probabilidad del 25% de que dos crías de los mismos parentales hereden el mismo haplotipo. En circunstancias extremadamente raras un padre puede transmitir un haplotipo recombinante a la descendencia. Estas características hacen posible la detección de genes de susceptibilidad/resistencia al analizar los alelos o haplotipos compartidos en los individuos enfermos (haplotipos sombreados).

Numerosos trabajos realizados para mapear marcadores en especies domésticas, han sido realizados dentro de poblaciones de una misma raza, es decir, por Cruzamientos de Poblaciones Segregantes. Sin embargo, cuando poblaciones pertenecientes a diferentes razas difieren para cierto carácter, y por lo tanto para los marcadores, la cruce entre ambos grupos puede resultar de gran utilidad en el mapeo de dichos marcadores (Figura 2).

Beckmann y Soller (24) demostraron que es posible estudiar el ligamiento marcador-carácter siguiendo la cosegregación del marcador y del carácter dentro de cada familia. Para marcadores multialélicos, esta clase de análisis tiene el mismo poder de resolución que la cruce entre líneas puras. A modo de ejemplo pueden citarse el cruzamiento de N'Dama y Zebu para mapear QTLs asociados con resistencia/susceptibilidad a la tripanosomiasis (25, 27).

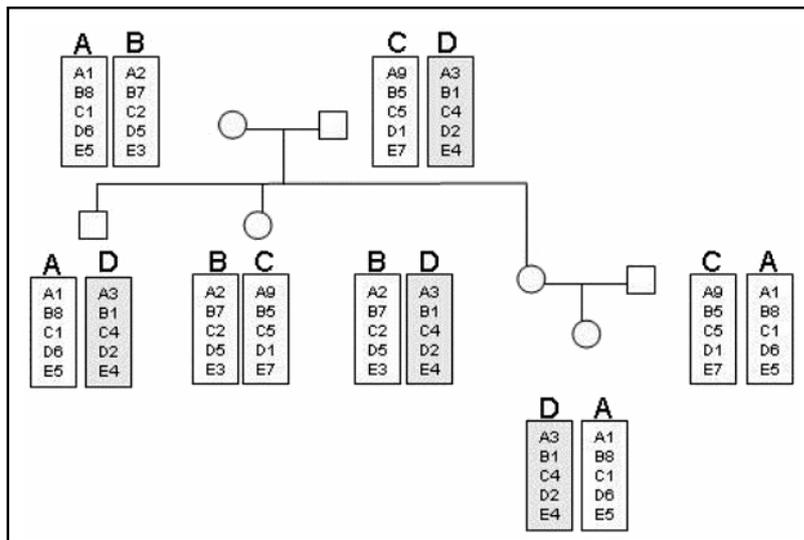


Figura 1. Ejemplo de diseño de familias portadoras para detección de genes de susceptibilidad/resistencia.
 Figure 1. Example of the carrier families design for the detection of resistance/susceptibility genes

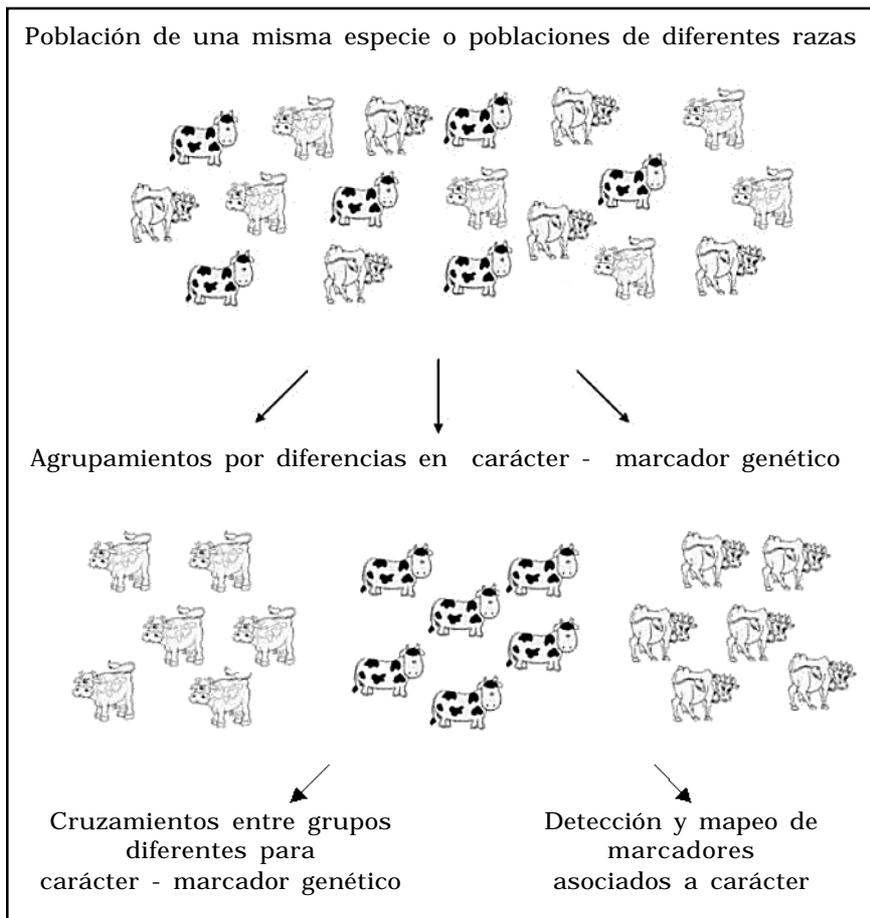


Figura 2. Ejemplo del diseño muestral de Cruzamientos de Poblaciones Segregantes o de Tipificación Selectiva para detección de genes de susceptibilidad/resistencia.
 Figure 2. Example of the segregating populations design or the selective typing for the detection of resistance/susceptibility genes.

Dentro del análisis a nivel de poblaciones se puede aplicar el método de Tipificación Selectiva (*Selective Genotyping*). Este método se basa en realizar cruzamientos en poblaciones que difieren para cierto carácter y por lo tanto para los marcadores genéticos. Se seleccionan aquellos animales que se encuentran en los extremos de la distribución para el carácter de interés, y posteriormente se tipifican los marcadores genéticos (Figura 2). Por lo tanto, la cruce entre diferentes grupos puede resultar útil en el mapeo de los marcadores relacionados a susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas, dado que una diferencia significativa entre las frecuencias génicas de las colas de la distribución (susceptibilidad/resistencia) en la F2 o en la población base puede servir como test para el ligamiento marcador-carácter.

Esta metodología se fundamenta en el hecho de que la selección sobre un carácter podría cambiar las frecuencias génicas en la población segregante. Una diferencia significativa entre las frecuencias génicas de las colas de la distribución (susceptibilidad/resistencia) en la F2 o en la población base puede servir como test para el ligamiento marcador-carácter (28, 29).

Dentro de una raza el mapeo puede realizarse también por el método «Idéntico por Descendencia (*IBD Identical-by-Descent*)». La importancia de esta estrategia radica en que permite mapear, tanto en animales domésticos como en el hombre, los genes causantes de enfermedades genéticas utilizando un número limitado de descendientes afectados que comparten un antecesor común. De esta manera, detectando el segmento cromosómico que comparten los individuos afectados, no es necesario realizar los clásicos cruzamientos utilizados en los análisis de ligamientos, reduciendo el tiempo y costo que requiere aquella estrategia.

Un ejemplo de la utilidad de esta metodología para el mapeo de enfermedades genéticas es la investigación realizada por Charlier y col. (30). Con el fin de localizar el gen causante del pie de mula en la raza bovina Holstein Friesian examinaron el pedigrí de 12 individuos afectados. Utilizando 213 microsatélites, los autores observaron que todos los individuos analizados compartían un mismo segmento del cromosoma 15, el cual provenía de un ancestro común.

En las tablas I y II se detallan los principales métodos empleados y programas de com-

putación disponibles para el análisis de desequilibrio de ligamiento.

LOS GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) COMO CANDIDATOS PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La resistencia genética es un rasgo multigénico, es decir, determinado por muchos genes, entre los cuales se encuentran los que codifican las moléculas que forman parte del sistema inmune.

La diversidad de las proteínas codificadas en el MHC se debe al polimorfismo de los genes que se encuentran en este complejo. Esta diversidad genética sería la responsable de la variación genotípica en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Los loci del MHC desempeñan un rol central en la respuesta inmune, por lo que constituyen genes candidatos para el estudio de asociación entre marcadores genéticos y resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Este complejo consiste en un bloque de ligamiento formado por más de 100 genes involucrados en su mayoría, en la respuesta inmunitaria. Entre ellos podemos nombrar los genes presentadores de antígeno (Clase I y II), los procesadores de antígeno, los del sistema del Complemento (Clase III) y genes relacionados como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF). La variabilidad genética en esta región se ve determinada por un alto número de alelos, presencia de varias copias de cada gen, número variable de genes en los distintos haplotipos y variaciones alélicas en la región de control de la expresión (promotor). En numerosos estudios se ha demostrado que las variaciones en la respuesta inmune dependen tanto de las mutaciones en las regiones promotoras de genes de histocompatibilidad, las cuales modifican los niveles de transcripción, como del polimorfismo en la región de unión al antígeno (*Antigen Recognition Site*, ARS) de las glicoproteínas de Clase I y II, que determinan su afinidad con los antígenos. También, los genes de citoquinas se consideran importantes genes candidatos para investigar susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas, ya que en las especies estudiadas se han identificado polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) asociados a la susceptibilidad/resistencia. Estos altos niveles de polimorfismo han permitido el desarrollo de MG asociados a enfermedades infecciosas para ser utili-

Tabla I. Breve descripción de algunos de los métodos utilizados comúnmente para la estimación de desequilibrio de ligamiento (LD).

Table I. Short description of some of the usual methods employed to estimate linkage disequilibrium (LD).

Método	Características
<i>Transmission Disequilibrium Test</i> (TDT)	Medida más comúnmente usada, no es afectada por estratificación poblacional, usa genotipos parentales heterocigotas.
<i>Haplotype Relative Risk</i> (HRR) "Riesgo relativo"	Estima frecuencias alélicas transmitidas por los genotipos parentales homocigotas y heterocigotas; es útil para muestras de ADN agrupadas. Es sensible a estratificación poblacional.
<i>Multilocus composite likelihood approaches</i>	Utiliza múltiples marcadores incrementando el poder de detección de desequilibrio de ligamiento.
<i>Haplotype segment sharing method</i>	Considera la covarianza entre loci marcadores; sensible a heterogeneidad alélica.

Tabla II. Software disponible para análisis de desequilibrio de ligamiento (LD).

Table II. Available software for linkage disequilibrium (LD) analysis.

Programa	Descripción	Página Web	Referencia
ALLASS	Estimación de LD compuesto para datos multilocus usando la ecuación de Malécot.	http://cedar.genetics.soton.ac.uk/7pub7PROGRAM/ALLAS	(43)
ARLEQUIN	Paquete de análisis genético poblacional que incluye estimación de haplotipos por el algoritmo EM y análisis de LD para pares de loci; estima significancia por método permutación.	http://anthro.unige.ch/arlequin/	(44) (45)
DISEQ	Estimación de desequilibrio multilocus.	ftp://linkage.cpmc.columbia.edu/software/diseq	(46)
DMAP	Estimación de likelihood compuesta para múltiples datos.	http://lib.stat.cmu.edu/-bdevlin/	(47)
ETDT	Usa regresión logística para TDT para marcadores multialélicos	http://www.gene.ucl.ac.uk/dcurtis/software.hym1	(48)
FINEMAP	Estima árboles filogenéticos para enfermedades multilocus y haplotipos normales para inferir localización del gen de la enfermedad.	http://www.stat.cmu.edu/cmu-stats/	(49)
GASSOC	Realiza varios test de asociación, incluyendo TDT para múltiples marcadores.	http://www.mayo.edu/statgen	(50)
GDA	Análisis genético poblacional. Incluye estimación de LD para pares de loci, test de significancia por método de permutación.	http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/	(51)
QTDT	Realiza test de asociación y TDT para rasgos cuantitativos usando método de componentes de varianza.	http://eee.well.ox.ac.uk/ashtma/QTDT	(52)
TDT/S-TDT	TDT y sib-TDT.	http://spielman07.med.upenn.edu/TDT.htm	(53) (54)
TRIMHAP	Análisis de haplotipos compartidos para estimación de localización de genes de enfermedades.	http://www.vipbg.vcu.edu/trimhap	(55)

zados en su control sanitario y erradicación. La mayoría de los estudios de asociaciones con los polimorfismos de los genes de Clase I, Clase II y citoquinas se realizaron en enfermedades humanas y en algunos animales domésticos (1, 18).

EJEMPLOS DE ASOCIACIÓN DE GENES CANDIDATOS DEL MHC CON SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES

Numerosos autores han llevado a cabo estudios de asociación entre genes del MHC y resistencia/susceptibilidad a diversas enfermedades infecciosas, principalmente aquellas responsables de importantes pérdidas económicas. Entre los ejemplos más relevantes podemos citar los siguientes trabajos:

Equinos

Una de las asociaciones más fuertes identificadas en equinos (1, 2) en estudios del MHC equino (ELA, *equine leukocyte antigen*) y la susceptibilidad/resistencia corresponde a la patogénesis del tumor de piel común o sarcoiditis. Estos tumores son de ocurrencia común en caballos y son causados por un virus relacionado al virus del papiloma bovino (BPV).

Las investigaciones realizadas desde la década de 1980 involucraron el análisis de los genes del ELA de Clase I y Clase II en varias razas de caballos. Los resultados determinaron, por una parte, altas frecuencias de alelos ELA-A3 (Clase I) y ELA W13 (Clase II) en caballos afectados con tumores, en comparación a los controles sanos. Por otra parte, entre las diferentes razas analizadas se evidenció distinta incidencia de tumores debido, probablemente, a la distribución diferencial de los alelos entre razas. Sin embargo, la susceptibilidad no se debería solamente a la presencia de los alelos ELA-A3 y ELA W13, sino a una combinación de genes (haplotipo) que acompaña a estos alelos y aún de otros genes ligados al MHC. Dado que estas investigaciones se realizaron mediante determinaciones serológicas, es muy probable que un estudio molecular por genes candidatos revele una asociación aún más estrecha entre determinados alelos y la susceptibilidad a sarcoiditis.

Otros ejemplos son las relaciones entre algunos haplotipos del ELA y la hipersensibilidad dérmica a insectos, la influencia de diferencias antigénicas en la fertilidad, la relación de fenotipos de transferrinas y ELA con el grado de deterioro endometrial en yeguas gestan-

tes (31, 33). Investigaciones de posibles asociaciones entre antígenos de Clase I del MHC y niveles de IgE específicos demostraron una asociación significativa entre ELA-A8 y títulos indetectables de IgE contra las cepas de *Aspergillus fumigatus* rAsp f 7 y rAsp f 8. También, se demostraron asociaciones significativas entre ELA-A1 y altos niveles específicos de IgE, entre ELA-A14 y bajos niveles de IgE, y entre ELA-Be27 y bajos niveles de IgE de *Aspergillus*-específico (12). En un estudio más reciente se demostró, además, la asociación entre tipos de transferrina y la muerte de los potros causada por la infección por *Rhodococcus equi* (15).

Bovinos

La leucosis bovina es una enfermedad de importancia económica y de distribución mundial producida por el virus de la leucosis bovina. El desarrollo de esta enfermedad se encuentra bajo control genético, íntimamente ligado al polimorfismo del MHC bovino, y presenta tres estadios: (1) Producción de anticuerpos contra antígenos virales (seroconversión); (2) Aumento significativo y persistente del número de linfocitos B (linfocitosis persistente); (3) Linfosarcoma.

En 1986, Lewin y Bernoco (3) estudiaron la asociación entre el BoLA (*bovine lymphocyte antigen*) Clase I y la progresión de la enfermedad en un rodeo Sherton californiano (n=117). La tipificación del BoLA Clase I se realizó mediante serología. El estudio se realizó a nivel rodeo y a nivel familia. A nivel rodeo se detectaron 60 vacas seropositivas, y entre ellas, aquellas con el haplotipo BoLA-w8 presentaron aumento de la susceptibilidad y mayor frecuencia de linfocitosis persistente. Los animales con el haplotipo BoLA-DA7 y BoLA-DA6.2 presentaron una menor frecuencia de linfocitosis persistente.

A nivel familia se estudió la segregación alélica en una familia de medio hermanas paternas y se observó que las vacas que heredaron el haplotipo DA 12.3 eran susceptibles a la linfocitosis persistente, mientras que las vacas con el haplotipo DA7 exhibían resistencia a linfocitosis persistente.

En 1996, Zanotti y colaboradores (5) analizaron la influencia del polimorfismo del MHC sobre la progresión subclínica del virus de la leucosis bovina en 2 rodeos italianos de vacas Holstein (n=41). Estos autores estudiaron el BoLA-A por serología, el BoLA-DQ por RFLP y el BoLA-DR por PRC-RFLP. A partir de estos análisis comprobaron que el haplotipo

DQA*12-DQB*12-DRB2*3A-DRB3.2*8 se encontraba asociado a susceptibilidad a la leucosis, mientras que el haplotipo DQA*3A-DQB*3A-DRB2*2A-DRB3.2*11 se asoció con resistencia a la enfermedad.

Por otra parte, el análisis de la secuencia nucleotídica del segundo exón de los alelos DRB3 reveló que los alelos asociados con resistencia presentaban en las posiciones 70 y 71 del dominio b1 del ABS (*Antigen Binding Site*) ácido glutámico y arginina, respectivamente.

Este estudio dejó en evidencia el papel principal del BoLA-DRB3 en la progresión subclínica de la infección con el virus de la leucosis bovina, que estaría dado a nivel de la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T helper.

La enfermedad conocida como Mastitis Bovina es producida principalmente por *Staphylococcus aureus*. Es una de las enfermedades más frecuentes en el ganado bovino lechero y la que ocasiona las mayores pérdidas económicas.

En 1997, Kelm y col (8) estudiaron la relación entre medidas genéticas de mastitis (número de células somáticas, SCS) y parámetros inmunológicos (marcadores moleculares BoLA-DRB3.2) en vacas Holstein de Estados Unidos (n=137). El BoLA-DRB3.2 se analizó por PCR-RFLP (con las enzimas de restricción RsaI, HaeIII y BstYI). El SCS se utilizó como parámetro ya que existe una alta correlación entre la ocurrencia de mastitis y SCS. Los autores encontraron que el alelo DRB3.2*16 se asociaba con SCS elevado, mientras que el DRB3.2*24 se asociaba con SCS bajo. Por otro lado, Dietz y colaboradores (10) también encontraron asociación entre el alelo DRB3.2*16 y SCS alto. Ambos estudios evidenciaron la utilidad de los alelos del BoLA-DRB3 como marcadores de la resistencia/susceptibilidad a mastitis.

Sharif y col. (11) también analizaron la asociación entre los alelos del BoLA-DRB3 y el SCS como medida de mastitis en un rodeo canadiense de vacas Holstein (n=835). Ellos detectaron asociación entre el alelo DRB3.2*16 con bajos SCS, y entre el alelo DRB3.2*23 con casos de mastitis severos.

La discrepancia observada entre los trabajos de Kelm y Dietz, con el de Sharif podría deberse al diseño experimental, a la variable dependiente utilizada (SCS), a la pre-

sencia de distintos patógenos, al background genético, factores ambientales, etc.

Park y colaboradores (17) realizaron uno de los últimos estudios acerca de la posible asociación entre resistencia/susceptibilidad a mastitis producida por *S. aureus* y genes del MHC. Los autores reportaron una estrecha asociación entre el haplotipo de Clase IIa DH24A y susceptibilidad a mastitis, mientras que los haplotipos DH16A y DH08A se encontraron asociados con resistencia a la enfermedad.

La Dermatofilia Bovina es una enfermedad de la piel causada por el patógeno *Dermatophilus congolensis* asociada con la garrapata *Amblyomma variegatum*. Produce importantes pérdidas en la producción y presenta una tasa de mortalidad del 15%.

Maillard y col. (14) analizaron varios loci del MHC bovino para identificar marcadores moleculares asociados con resistencia/susceptibilidad a dermatofilia. Los autores estudiaron dos grupos extremos de animales Brahman zebú de la isla de Martinica no relacionados y en las mismas condiciones ambientales: 61 animales que nunca enfermaron y 62 animales con signos clínicos severos. Los haplotipos DRB3.2*9 y DQB*1804 se encontraron significativamente asociados con alta susceptibilidad a la enfermedad. Esta asociación se validó en otras poblaciones de ganado de la misma raza y en otras razas de otras partes del mundo. A partir de estos resultados se realizó en la isla de Martinica un programa de selección asistida durante el cual se eliminaron los individuos que tenían el haplotipo asociado a susceptibilidad. De esta manera se logró reducir la prevalencia de la enfermedad del 76%, en 1996 a menos del 2%, en el 2001.

En otro tipo de estudio, Acosta-Rodríguez y coautores (18) analizaron la posible participación de los genes del MHC en la infestación con garrapatas *Boophilus microplus* mediante el estudio de microsatélites de Clase II. Las pérdidas causadas por esta garrapata han sido estimadas en cien millones de dólares por año en Australia, y en un billón de dólares por año en América Central y Sudamérica. Los autores reportaron la existencia de asociación entre cuatro microsatélites del BoLA Clase II y susceptibilidad a la infestación con garrapatas *Boophilus microplus*. Este estudio evidenció la participación, al menos parcialmente, de varios alelos de Clase II del BoLA en la susceptibilidad a la infestación con garrapatas.

Ovinos

La parasitosis en el ganado ovino es una de las principales causas de pérdidas económicas. En 1996, Outteridge y colaboradores (6) estudiaron la posible asociación entre los polimorfismos del MHC ovino (OLA, Ovine Leukocyte Antigen) y las variaciones en la resistencia a parásitos intestinales, principalmente nematodos. Para llevar a cabo este estudio los autores se basaron en el hecho que los genes del DRB se encuentran en la región de Clase II del MHC, y en la existencia de una relación inversa entre el nivel de anticuerpos y el número de huevos de parásitos en las heces de este modo la resistencia/susceptibilidad a los parásitos podría ser determinada por el polimorfismo del DRB.

El estudio se realizó en tres familias de ovejas Merino (n=130) de Australia. Los autores tipificaron un microsatélite intrónico estrechamente ligado al exón 2 del DRB ovino mediante PCR y midieron los niveles de anticuerpos contra los parásitos y el número de huevos en la materia fecal. Si bien se encontró asociación entre altos niveles de anticuerpos, bajo número de huevos en materia fecal y polimorfismo del DRB, los autores resaltan la necesidad de realizar estudios adicionales para confirmar las asociaciones observadas.

Caninos

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta a perros, humanos y otros animales causada por el parásito intracelular *Leishmania infantum*. El perro doméstico es el principal reservorio para la infección humana.

Quinnell y colaboradores (16) analizaron la asociación entre los genes del DLA (*Dog Leukocyte Antigen*) Clase II del perro DLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1 y el curso de la enfermedad en perros expuestos a infección natural con *Leishmania infantum* en Brasil. El estudio incluyó 99 perros de la ciudad de Belém (zona no endémica) que fueron llevados a Marajó (zona endémica), y 27 perros nacidos en Marajó.

La tipificación de los genes DLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1 se efectuó por secuenciación directa. La detección del parásito se realizó por PCR a partir de biopsias de médula ósea y se midieron los niveles de IgG. Finalmente, los autores encontraron una asociación significativa entre la presencia del alelo DRB1*01502 y la susceptibilidad a leishmaniasis en perros, pero no se detectaron asociaciones con DQA1 y DQB1.

Aves

La enfermedad de Marek en pollos es causada por un herpes virus. Puede manifestarse en una forma nerviosa (ataca los nervios, especialmente el nervio ciático) o visceral (tumores en hígado, ovario, riñón, bazo y corazón) y produce importantes pérdidas económicas.

En 1997, Kaufman y Salomonsen (9) encontraron una asociación significativa entre el haplotipo B21 de Clase I del MHC del pollo y la resistencia a la enfermedad, mientras que el haplotipo más susceptible fue el B19.

Estado actual de las investigaciones en susceptibilidad/resistencia genética a enfermedades infecciosas en la Argentina

Si bien en la Argentina, esta área del conocimiento no está muy desarrollada, existen actualmente líneas de investigaciones tendientes a caracterizar los genes del MHC de diferentes especies domésticas y a determinar asociaciones entre dichos loci y susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas. Así por ejemplo, en el Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGIBA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, en estudios anteriores se analizó la variabilidad genética de genes del MHC en razas bovinas, equinas y caninas y actualmente se están llevando a cabo investigaciones de las posibles asociaciones entre genes candidatos del MHC y enfermedades tales como demodicosis juvenil generalizada canina y arteritis viral equina (AVE) (36-40). Por otra parte, en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Buenos Aires se están estudiando los genes de MHC de aves de corral (41, 42).

ASOCIACIÓN CON GENES QUE NO PERTENECEN AL MHC

En la respuesta inmune intervienen los productos de numerosos genes, muchos de los cuales no pertenecen al MHC. En los últimos años, varios loci involucrados en la respuesta inmune han sido estudiados con el objeto de determinar su asociación con susceptibilidad/resistencia a determinadas enfermedades infecciosas. A modo de ejemplo, pueden mencionarse el gen que codifica para la proteína 1 de macrófagos asociada a resistencia natural o *Nramp1* (7, 13), los genes para inmunoglobulinas y genes del receptor de células T (3).

PERSPECTIVAS FUTURAS

Si bien los antibióticos son efectivos en el control de varias enfermedades, su uso a lo largo del tiempo puede desarrollar resistencia a la droga por parte de los patógenos. Además, el uso masivo de antibióticos es cada vez menos aceptado por los consumidores, quienes exigen productos libres de residuos.

Otras enfermedades pueden ser controladas a través de la utilización de vacunas. Sin embargo, las vacunas atenuadas, tradicionalmente empleadas, a veces proveen una protección incompleta y en el caso de las vacunas pobremente inactivadas pueden causar la enfermedad que tendrían que prevenir (Roslin Institute, Annual Report 2000-2001, <http://www.roslin.ac.uk/>).

La selección de animales resistentes a enfermedades es posible, pero tradicionalmente los criadores se han concentrado en mejorar los caracteres de producción, por lo que la información acerca de la variación genética en resistencia a enfermedades es limitada.

En los últimos años el crecimiento de la biotecnología está permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias para el control de enfermedades. En este contexto, ya se están utilizando rutinariamente los marcadores moleculares para la selección de animales resistentes a enfermedades. Por otra parte, a través de la tecnología recombinante, se están desarrollando nuevas vacunas basadas en la estructura de las moléculas de reconocimiento y presentadoras de antígenos y en la información obtenida a partir de los estudios de asociación en las diferentes especies estudiadas. Sin embargo, aún es necesario obtener una mejor comprensión de la genética y de la función del sistema inmune del huésped y de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte del patógeno, para que la biología molecular tenga un mayor impacto en el control de las enfermedades animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lazary S, Gerber H, Glatt PA, Straub R. Equine leucocyte antigens in sarcoid-affected horses, *Equine Vet J* 1985; 17 (4): 283-286.
2. Meredith D, Elser AH, Wolf B, Soma LR, Donawick WJ, Lazary S. Equine leukocyte antigens: relationships with sarcoid tumors and laminitis in two pure breeds. *Immunogenetics* 1986; 23 (4): 221-225.
3. Lewin HA, Bernoco D. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Anim Genet* 1986; 17 (3): 197-207.
4. Blattman AN, Hulme DJ, Kinghorn BP, Woolaston RR, Gray GD, Beh KJ. A search for associations between major histocompatibility complex restriction fragment length polymorphism bands and resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Anim Genet* 1993 24 (4): 277-282.
5. 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. *Anim Genet* 1996; 27 (5): 337-341.
6. Outteridge PM, Andersson L, Douch PG, Green RS, Gwakisa PS, Hohenhaus MA, Mikko S. The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: application to nematode parasite resistance. *Immunol Cell Biol* 1996; 74 (4): 330-336.
7. Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG, Templeton JW. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Res.* 1996 6 (10):956-964.
8. Kelm SC, Dettleux JC, Freeman AE, Kehrli ME Jr, Dietz AB, Fox LK, Butler JE, Kasckovics I, Kelley DH. Genetic association between parameters of in-mate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1997; 80 (8):1767-1775.
9. Kaufman J, Salomonsen J. The "minimal essential MHC" revisited: both peptide-binding and cell surface expression level of MHC molecules are polymorphisms selected by pathogens in chickens. *Hereditas* 1997; 127 (1-2): 67-73.
10. Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrli ME Jr. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80 (2):406-412.
11. Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC, 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 (3):185-193.
12. Eder C, Curik I, Brem G, Cramer R, Bodo I, Habe F, Lazary S, Solkner J, Marti E. Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. *Equine Vet J* 2001; 33 (7): 714-720.
13. Matiasovic J, Kubickova S, Musilova P, Rubes J, Horin P. Characterization of the NRAMP1 (SLC11A1) gene in the horse (*Equus caballus* L.). *Eur J Immunogenet* 2002 29 (5): 423-429.
14. Maillard JC, Chantal I, Berthier D, Thevenon S, Sidibe I, Razafindraibe H. Molecular immunogenetics in susceptibility to bovine dermatophilosis: a candidate gene approach and a concrete field application. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 969: 92-96.
15. Mousel MR, Harrison L, Donahue JM, Bailey E. *Rhodococcus equi* and genetic susceptibility: assessing transferrin genotypes from paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15 (5): 470-472.

16. Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 2003; 55 (1):23-28.
17. Park YH, Joo YS, Park JY, Moon JS, Kim SH, Kwon NH, Ahn JS, Davis WC, Davies CJ. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J Vet Sci* 2004; 5 (1): 29-39.
18. Acosta-Rodriguez R, Alonso-Morales R, Balladares S, Flores-Aguilar H, Garcia-Vazquez Z, Gorodezky C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet Parasitol* 2005; 127 (3-4): 313-321.
19. Hill A. Host genetics of infectious diseases: Old and new approaches converge. *Emerging Infectious Diseases*. 1998; 4 (4): 695-697.
20. Thursz M. Genetic susceptibility in infectious diseases. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2000; 17: 253-264.
21. Geldermann H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. 1. Methods. *Theor. Appl. Genet* 1975; 46: 319-330.
22. Geldermann H. Biochemische Aspekte in der Haustier Genetik. 2. Zielrichtungen biochemisch-genetischer Arbeiten in der Haustiergenetik. *Züchtungskunde* 1976; 48: 339-361.
23. Geldermann, H, Piepper U, Roth YB. Effects of marked chromosome sections on milk performance in cattle. *Theor. Appl. Genet* 1985; 70: 138-146.
24. Beckmann, JS, Soller M. Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theor. Applied Genetics* 1988; 76: 228-236.
25. Soller, M, JS Beckmann. Toward and understanding of the genetic basis of trypanotolerance in the N'Dama cattle of West Africa. Consultation Report submitted to FAO, Rome (March, 1987), pp 47.
26. Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja I, Fredholm M, Hansson I, Hkansson J, Lundstrom YK. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 1994; 263: 1771-1774.
27. Hanotte O, Ronin Y, Agaba M, Nilsson P, Gelhaus A, Horstmann R, Sugimoto Y, Kemp S, Gibson J, Korol A, Soller M, Teale A. Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (13): 7443-7448.
28. Stuber CW, Moll RH, Goodman MM, Shaffer HE, Weir BS. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 95: 225.
29. Soller M. Relative power of likelihood-ratio tests and AMOVA for detecting linkage between quantitative traits loci and marker loci. *Genetics* 1990; 126.
30. Charlier G, Farnir F, Berzi P, Vanmanshoven P, Brouwers B, Vromans H, Georges M. Identity-by-descent mapping of recessive traits in livestock: application to map the bovine syndactyly locus to chromosome 15. *Genome Res* 1996; 6: 580-589.
31. Brostrom H, Fahlbrink E, Dubath ML, Lazary S. Association between equine leucocyte antigens (ELA) and equine sarcoid tumors in the population of Swedish half-breds and some of their families. *Vet Immunol Immunopathol* 1988; 19 (3-4): 215-223.
32. Weitkamp LR, Kenney RM, Bailey E, MacCluer JW, Brown JS, Blanchard TL, Sertich PL, Love CC, Hunt PR. Pathological changes of the mare endometrium and genotypes for transferrin and ELA. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 44: 275-282.
33. Antczack DF. The Major Histocompatibility Complex of the Horse. 1992. *Equine Infectious Diseases VI*. Pag. 99.
34. Giovambattista G, Golijow CD, Dulout FN, Lojo MM. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim Genet* 1996; 27 (1): 55-56.
35. Diaz S, Giovambattista G, Dulout FN, Peral-Garcia P. Genetic variation of the second exon of ELA-DRB genes in Argentine Creole horses. *Anim Genet* 2001; 32 (5): 257-63.
36. Ripoli MV, Diaz S, Peral-Garcia P, Giovambattista G. Nucleotide sequence of the upstream regulatory region of BoLA-DRB. *Eur J Immunogenet*. 2002; 29(6):537-40.
37. Villegas-Castagnasso EE, Diaz S, Giovambattista G, Dulout FN, Peral-Garcia P. Analysis of ELA-DQB exon 2 polymorphism in Argentine Creole horses by PCR-RFLP and PCR-SSCP. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50 (6): 280-285.
38. 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.
39. Ripoli MV, Liron JP, De Luca JC, Rojas F, Dulout FN, Giovambattista G. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreno Creole dairy cattle. *Biochem Genet* 2004; 42 (7-8): 231-240.
40. Diaz S, Giovambattista G, Peral-Garcia P. Polymorphisms of the upstream regulatory region of the major histocompatibility complex DRB genes in domestic horses. *Int J Immunogenet* 2005; 32 (2): 91-98.
41. Goto RM, Afanassieff M, Ha J, Iglesias GM, Ewald SJ, Briles WE, Miller MM. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. *Poult Sci* 2002 81 (12): 1832-1841.

S. Diaz y col.

42. Iglesias GM, Soria LA, Goto RM, Jar AM, Miquel MC, Lopez OJ, Miller MM. Genotypic variability at the major histocompatibility complex (B and Rfp-Y) in Camperos broiler chickens. *Anim Genet* 2003; 34 (2): 88-95.
43. Collins A, Morton NE. Mapping a disease locus by allelic association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 95 (4): 1741-1745.
44. Schneider S, Roessli D, Excoffier, L. Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis Ver 2.000. 1997. University of Geneva: Geneva, Switzerland.
45. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*. 1996; 76:377-83.
46. Terwilliger JD. A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am J Hum Genet* 1995; 56 (3): 777-787.
47. Devlin B, Risch N, K Roeder. Disequilibrium mapping: composite likelihood for pairwise disequilibrium. *Genomics* 1996; 36 (1): 1-16.
48. Sham PC, Curtis D. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet* 1995; 59: 323-336.
49. Lam JC, Roeder K, Devlin B. Haplotype fine mapping by evolutionary trees. *Am J Hum Genet* 2000; 66 (2): 659-673.
50. Schaid DJ. General score tests for associations of genetic markers with disease using cases and their parents. *Genet Epidemiol* 1996; 13 (5): 423-449.
51. Weir BS. Genetic data analysis II. Sinauer, Sunderland, Mass, 1996.
52. Abecasis GR, Cookson WO, Cardon LR. Pedigree tests of transmission disequilibrium. *Eur J Hum Genet* 2000; 8 (7): 545-551.
53. Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59 (5): 983-989.
54. Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1998; 62 (2): 450-458.
55. MacLean CJ, Martin RB, Sham PC, Wang H, Straub RE, Kendler KS. The trimmed-haplotype test for linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 2000; 66 (3):1062-1075.