



Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

Polimorfismos de la Región Promotora Proximal del Gen BoLA-DRB3 y su Asociación con la Resistencia/Susceptibilidad a Leucosis y Mastitis en Ganado Holstein de la Provincia de La Pampa.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN - Aplicada

BÁSICA: Consiste en trabajos experimentales o teóricos que se emprenden principalmente para obtener nuevos conocimientos acerca de los fundamentos de fenómenos y hechos observables, sin prever en darles ninguna aplicación o utilización determinada o específica.

APLICADA: Consiste también en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero fundamentalmente dirigidos hacia un objetivo práctico específico.

DESARROLLO EXPERIMENTAL: Consiste en trabajos sistemáticos basados en los conocimientos existentes, derivados de la investigación y/o la experiencia práctica, dirigidos a la producción de nuevos materiales, productos y dispositivos; al establecimiento de nuevos procesos, sistemas y servicios, o a la mejora substancial de los ya existentes, es decir, producir una tecnología.

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. ÁREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS:

Dpto de Producción; Dpto de Ciencias Básicas- FCV- UNLPam

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

IGEVET- CONICET, FCV- UNLP

2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)

2.3.1 . INTEGRANTES

Apellido y Nombres	Título Académico	Categoría Inves. t.	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicac.	Tiempo de dedicac. h/Sem	Firma
-Giovambattista Guillermo	-Dr en Cs Nat.	II	D	IGEVET-CCT, UNLP	Exclusiva	12 hs al mes	
-Baltian Laura Rosana	-Lic. en Biología	V	CD- I	Genética y Mejoramiento Animal	Exclusiva	20 hs	
-Ripoli María Verónica	Dra en Cs Nat.	III	A-I	IGEVET-CCT; UNLP	Exclusiva	12 hs al mes	
-Schmidt Enrique	PHD	IV	A	Genética y Mejoramiento Animal	Simple	2 horas	
-Peratta Delia	MV	V	AI	Genética y Mejoramiento Animal	Exclusiva	10 hs	
-San Filippo Susana	Prof. de Inglés	V	A I	Inglés	Semiexclusiva	4hs	
-Alvarez Rubianes Nicolás	MSc	IV	A	Inmunología Especial	Simple	2hs	
-Follmer Ana	estudiante		AI			4hs	

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.2. TESISISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac Hs./Sem.

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesisista		

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prórroga)

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2011 **FINALIZACIÓN:** 31 / 12/ 2014.....

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

La Región Regulatoria Proximal (URR) de los genes de Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es altamente conservada en mamíferos. Ha sido estudiada en humanos, ratones, equinos y bovinos, donde se describieron un gran número de polimorfismos de la URR en los genes de DQB y DRB. Dichos polimorfismos pueden tener como consecuencia diferencias en la expresión alélica y/o especificidad en tejidos de moléculas de Clases II afectando el nivel transcripcional y por lo tanto la respuesta inmune. El objetivo general del presente estudio consiste en asociar los polimorfismos de la región URR del gen DRB3 del MHC de bovinos, definidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) y Secuenciación Directa (PCR- SBT), con la resistencia/susceptibilidad a mastitis y leucosis en vacas Holstein de Provincia de La Pampa. Se basará en un diseño caso/control, para lo cual, los animales serán agrupados en tres categorías según el recuento de células somáticas en la leche (bajo, alto, mastitis clínica) y en tres grupos según el recuento linfocitario de sangre (normal, leucocitosis, presencia de tumores).

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES**5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA**

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 (Díaz et al 2010).

La mastitis y la leucosis *bovina enzoótica (LBE)* son enfermedades que afectan a la industria lechera, que es un segmento grande y dinámico de la economía ganadera de muchas naciones.

La primera es una importante enfermedad multifactorial que culmina con distintos niveles de inflamación de la glándula mamaria del ganado lechero, la que conduce a un decrecimiento en la producción y a un aumento en los costos por cuidados veterinarios (Ashwell et al., 1996). Es importante resaltar que en la Argentina, las usinas lecheras premian o castigan a los productores del área según el registro de células somáticas (RCS) presentes en la leche. Dentro de las células somáticas se encuentra un grupo de células perteneciente al sistema inmunitario. Por lo tanto, un número alto de éstas en la ubre indica la existencia de una infección, casi siempre causada por bacterias de la mastitis (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*). La mastitis daña el tejido secretor de leche y lo substituye con el tiempo por tejido cicatrizal. La ubre está conformada por cuartos y aquel que posee mastitis produce menos leche, y constituye la principal fuente de infección para vacas sanas.

La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad del ganado bovino adulto causada por el retrovirus de la leucemia bovina (BLV). El ganado puede infectarse a cualquier edad, incluida la fase embrionaria. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero un porcentaje del ganado mayor de 3 años ($\approx 30\%$) desarrolla linfocitosis persistente y una pequeña proporción tumores (linfosarcomas) en varios órganos internos (Martinez et al., 2005). También se ha registrado infección natural en búfalos y ovejas. Los síntomas clínicos, cuando se presentan, dependen de los órganos afectados. El ganado con linfosarcomas casi siempre muere súbitamente, en semanas o en meses después de la aparición de los síntomas clínicos. La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente está determinada genéticamente, y quizá también el desarrollo del propio tumor. Se demostró que los rodeos infectados con BLV presentaban menor producción láctea (2,5-3% a nivel poblacional) y un aumento en la tasa de pérdidas selectivas, así como una mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa, del tipo de la mastitis, diarrea y neumonía, pero el efecto sobre la fertilidad fue escaso (Emanuelsson et al 1992).

Los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) son de importancia para los criadores de animales y genetistas porque juegan un rol central en la respuesta inmune, y han sido asociados con resistencia/susceptibilidad a una amplia cantidad de enfermedades. En bovinos, el MHC se denomina Antígeno Leucocítico Bovino (BoLA) y se encuentra localizado en el cromosoma 23 (Amorena y Stone, 1978; Spooner, 1978).

Diferentes autores han asociado los polimorfismos presentes en los genes del BoLA con caracteres productivos como producción de leche, proteínas y grasa en leche, y crecimiento (Machado et al., 2005; Do nascimento et al., 2006; Zambrano et al., 2009b) y con enfermedades infecciosas (Lin et al., 1993; Xu et al., 1993; Dietz et al., 1997b; Mirsky, 1998; Aida et al., 2001, Martínez et al., 2005; Martínez et al., 2006; Castro et al., 2006; Do nascimento et al., 2006; Juliarena et al., 2008; Panei et al., 2009). Entre las enfermedades infecciosas estudiadas pueden mencionarse la brucelosis, mastitis, leucosis, dermatofilosis, y ectoparasitosis, las que han sido asociadas principalmente a los polimorfismos presentes en el segundo exón del gen de clase II BoLA-DRB3 (Takeshima & Aida, 2006; Díaz et al., 2010).

La región regulatoria proximal (URR) de los genes de Clase II del MHC es altamente conservada en mamíferos, y ha sido estudiada en humanos, ratones, equinos y bovinos, entre otros. Esta región de aproximadamente 200 pares de base (pb) está localizada corriente arriba de la iniciación de la transcripción, e incluye de 5´ a 3´ los motivos regulatorios TATA y W, X, Y, CCAAT (Ripoli et al., 2002). Se han descritos un gran número de polimorfismos en dicha región en los genes de Clase II DQB y DRB del MHC. Algunos de estos polimorfismos se ubicaron en los motivos regulatorios (cajas X1 y CCAAT), mientras que otros se observaron entre las cajas de consenso (Singal et al., 1993^a; Reischstetter et al., 1994; Singal and Qiu, 1994; Cowell et al., 1998; Mitchinson and Roes, 2002).

Sin embargo, el efecto de estos polimorfismos sobre la resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas no han sido aún estudiados en animales domésticos.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Desde hace más de 15 años, el grupo de animales domésticos del IGEVET ha estudiado ininterrumpidamente la estructura y variabilidad genética del Complejo Principal de Histocompatibilidad en bovinos, equinos y perros. Durante ese período se describió la variabilidad genética de genes de clase II en estas especies, se describieron las regiones polimórficas de genes DRB en equinos y bovinos. Además, se llevaron a cabo estudios de asociación con enfermedades infecciosas, autoinmunes, y caracteres de producción en bovinos, equinos y perros. Por otra parte, se realizaron proyectos de colaboración en esta temática con grupos nacionales e internacionales, como por ejemplo el Instituto Riken del Japón. Estos estudios resultaron en la publicación de numerosos artículos científicos en revistas nacionales e internacionales, capítulos de libros, presentaciones a reuniones científicas y Tesis Doctorales. Desde hace algunos años se está trabajando en colaboración junto a la cátedra de Genética y Mejoramiento Animal de la Facultad de Veterinarias de la

Universidad Nacional de La Pampa en el estudio de las susceptibilidad/resistencia a mastitis en ganado Holstein.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Díaz S, Ripoli MV, Peral García P, Giovambattista G. Genética de Animales Domésticos. Capítulo 9. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Editorial: Inter-Médica, 2010. Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina. ISBN: 978-950-555-378-5. 272 pp.

- Giovambattista G., C. D. Golijow, F. N. Dulout, M. M. Lojo. 1996. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Animal Genetics* 27:55-56. ISSN 0268-91146, Blackwell.
- Peral García P., C.D. Golijow, G. Giovambattista, M.M. Lojo, F.N. Dulout. 1999. Analysis of ELA-DRB exón 2 polymorphism by PCR-RFLP. *Journal of Equine Science* 10 (1):13-16. ISSN 1340-3516, The Japanese Society of Equine Science.
- Giovambattista G., M.V. Ripoli, P. Peral García, J.L. Bouzat. 2001 Indigennous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: The Argentine Creole Cattle. *Animal Genetics* 32: 240-247. ISSN 0268-91146, Blackwell.
- Díaz S., G. Giovambattista, F.N. Dulout, P. Peral García. 2001. Genetic variation of the second exon of ELA-DRB genes in Argentine Creole horses. *Animal Genetics* 32: 257-263. ISSN 0268-91146, Blackwell.
- Ripoli M V, S Díaz, P Peral-García, G Giovambattista. 2002. Nucleotide sequence of the upstream regulatory region of the BoLA-DRB. *European Journal of Immunogenetics* 29: 537-540. ISSN 0960-7420, Blackwell.
- Martínez R.D., G. Giovambattista, M.V. Ripoli, J.C. De Luca, F. N. Dulout. 2003. Patagonian Argentine Creole cattle polymorphism: comparison with North-West populations of this breed. *Research in Veterinary Science* 74(3): 287-290. ISSN 0034-5288, Elsevier.
- Villegas-Castagnasso E.E., Diaz S., Giovambattista G., Dulout F.N., Peral-Garcia P. 2003. 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.* 50(6):280-285. ISSN 0931-184X, Blackwell.
- Ripoli M. V., J. P. Lirón, J. C. De Luca, F. Rojas, F. N. Dulout, G. Giovambattista. 2004. Gene Frequency Distribution of the BoLA-DRB3 in the Dairy “Saavedreño” Creole Cattle. *Biochemical Genetics* 42 (7/8): 231-240. ISSN 0006-2928, Kluwer.

- Ripoli M. V., P. Peral-García, F. N. Dulout, G. Giovambattista. 2004. Polymorphism in the Bovine *BoLA-DRB3* Upstream Regulatory Regions detected through PCR-SSSP and DNA sequencing. *Gene* 339:71-78. ISSN 0378-1119, Elsevier.
- Díaz, S., Giovambattista, G. and Peral-García, P. 2005. Structure and polymorphism of the upstream regulatory region of the Major Histocompatibility Complex *DRB* genes in domestic horses. *International Journal of Immunogenetics* 32: 91-98. ISSN 0960-7420, Blackwell.
- Ripoli, M.V., E.E. Villegas Castagnasso, P. Peral García, G. Giovambattista. 2005. New polymorphisms for the BoLA-DRB3 upstream regulatory region. *Tissue Antigens* 66(2):136-137. ISSN 0001-2815. International Booksellers Publishers.
- Díaz S., G. Echeverría, V. It, D.M. Posik, A. Rogberg-Muñoz, P. Peral-García, J.L. Vega-Pla, G. Giovambattista. 2008. Development of an ELA-DRA gene typing method based on pyrosequencing technology. *Tissue Antigens*, 72(5):464-8. ISSN: 0001-2815 Wiley-Blackwell Publishing.
- It V., L. Barrientos, J. López Gappa, D. Posik, S. Diaz, C. Golijow, G. Giovambattista. 2010. Association of canine juvenile generalized demodicosis with the Dog Leukocyte Antigen System (DLA). *Tissue Antigens*, 76 (1): 67-70. ISSN: 0001-2815 Wiley-Blackwell Publishing.
- Giovambattista G., M.V. Ripoli, C.D. Golijow, M. Sánchez Mera, F.N. Dulout. 1997. Evaluación De La Población De Ganado Bovino Criollo Argentino De La Estación Zootécnica Subtropical Arroyo Del Medio (Provincia De Jujuy) Mediante La Utilización Del Marcador Genético Molecular *BoLA-DRB3*. *Analecta Veterinaria* XVII (3):26-30. ISSN 1514-2590, Facultad de Cs. Veterinarias. UNLP.
- Bouzat J.L., G. Giovambattista, C.D. Golijow, F.N. Dulout, M.M. Lojo. 1998. Genética de la conservación de razas autóctonas: El ganado Criollo Argentino. *Interciencia* 23(3):151-157. ISSN 0378-1844, Asociación Interciencia, Caracas Venezuela.
- Giovambattista G., S. Díaz, M.V. Ripoli, P. Peral García, F.N. Dulout. 2003. *Msp I* restriction evidence extensive polymorphism in the exon 2 of *BoLA-DRB3* gene. *Basic and Applied Genetics* XV(2): 63-67. ISSN 1666-0390, Sociedad Argentina de Genética.
- Lirón J.P., S. Díaz, M.V. Ripoli, J. L. Bouzat, P. Peral-García, G. Giovambattista. 2004. DNA Sequence Assignment to the *BoLA-DRB3.2*17* PCR-RFLP allele. *Basic and Applied Genetics* XVI (1/2):19-20. ISSN 1666-0390, Sociedad Argentina de Genética.
- Díaz S., Ripoli M.V., Peral-García P., Giovambattista G. 2005. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Los loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) como genes candidatos. *Analecta Veterinaria* 25 (1): 40-52. ISSN 0365-5148, Facultad de Cs. Veterinarias. UNLP.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Se describieron un gran número de polimorfismos en la región regulatoria proximal (URR) en los genes de Clase II DQB y DRB del MHC en humanos, ratones, bovinos y equinos.

Las variaciones en la respuesta inmune (y por lo tanto la resistencia o susceptibilidad a un patógeno) puede estar determinada, entre otros factores, por la afinidad entre la capacidad de reconocimiento y presentación de los antígenos y los niveles de expresión de los genes del MHC. Las variaciones entre la afinidad entre el antígeno y la molécula presentadora pueden ser consecuencia de polimorfismos en la región de reconocimiento del antígeno (segundo exón) en los de clase I y II, los cuales han sido estudiados en numerosos estudios de asociación.

Hipótesis:

Los polimorfismos presentes en el URR de estos genes pueden tener como consecuencia diferencias en la expresión alélica, inductibilidad y/o especificidad en tejidos de moléculas de clases II afectando el nivel transcripcional, y por lo tanto la respuesta inmune.

Objetivo

El objetivo general del presente estudio consiste en asociar los polimorfismos de la región URR del BoLA-DRB3, definidos mediante la técnica de secuenciación directa (PCR-SBT), con la resistencia/susceptibilidad a mastitis (evaluada a través del registro de células somáticas) y leucosis en vacas Holstein de Provincia de La Pampa. Dicho objetivo general incluye los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar los alelos del URR-BoLA-DRB3 presentes en la población de estudio y determinar sus frecuencias génicas.
2. Determinar las fases de ligamiento (haplotipos) entre los polimorfismos presentes en el promotor y en el segundo exón de dicho gen.
3. Determinar el riesgo relativo a desarrollar mastitis y/o leucocitosis de cada uno de los alelos detectados.
4. Determinar el riesgo relativo a desarrollar mastitis y/o leucocitosis de cada uno de los haplotipos detectados.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

Materiales y Métodos

Población en estudio.

Se analizarán 150 vacas lecheras de un tambo comercial de la raza Holstein ubicado en la provincia de La Pampa.

Diseño experimental.

El presente estudio se basará en un diseño caso/control para determinar la resistencia/susceptibilidad a mastitis y a leucosis aportada por los diferentes alelos de URR-BoLA-DRB3, y por los haplotipos URR-exón 2. Para lo cual, los animales serán agrupados en tres categorías según el recuento de células somáticas en la leche (Bajo, alto, mastitis clínica) y en tres grupos según el recuento linfocitario de sangre (normal, leucocitosis, presencia de tumores).

Toma de muestra.

Para detectar el VLB a cada animal se le realizará:

Muestra 1- Análisis de suero: de cada individuo se extraerán 5 ml de sangre para efectuar la detección de anticuerpos en muestras aisladas o conjuntas de suero mediante un inmunoensayo de bloqueo - ELISA.

Muestra 2- Análisis de sangre entera: la misma será depositada en tubos con anticoagulante y serán almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Muestra 3- Análisis de sangre entera: Se utilizará para determinar la formula linfocitaria y la presencia de células anormales con el fin de detectar animales con linfocitosis persistente. Este análisis se repetirá tres veces a lo largo del año para confirmar el status sanitario de cada animal.

Registro de Datos

De cada animal se registrarán mensualmente durante el desarrollo del proyecto los siguientes datos genealógicos, sanitarios y de producción:

- Número de identificación del animal.
- Fecha de nacimiento.
- Progenitores.
- Número de células somáticas.
- Registro de mastitis clínica o tumores.
- Producción en litros de leche
- Datos de porcentaje de grasa
- Datos de porcentaje de proteínas.

Extracción del ADN.

El ADN genómico se extraerá a partir de las muestras de sangre mediante la técnica de DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Genotipificación:

Los fragmentos de ADN se amplificarán mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers y la condiciones descritas por Ripoli et al. (2004). Los polimorfismos serán analizados mediante la técnica de Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y de Secuenciación Directa (PCR-SBT). Para ésta última técnica, los productos de amplificación serán purificados y secuenciados en un secuenciador automático de tecnología capilar MegaBace 1000 (GE Healthcare, USA). A partir de un análisis comparativo entre las secuencias obtenidas y las reportadas, llevado a cabo a través de los programas Chromas Lite, DNAMAN y el algoritmo BLAST, se detectarán los polimorfismos presentes.

Métodos estadísticos

Se estimarán las frecuencias génicas y genotípicas en la población analizada. El equilibrio de Hardy-Weinberg se determinará, en base al método Exacto (Guo y Thompson, 1992) y el test exacto de Fisher. La diversidad genética de los marcadores estudiados se estimará mediante los índices de heterocigosidad esperada y número de alelos. Los parámetros poblacionales mencionados y la diversidad nucleotídica (Π) será calculada mediante los algoritmos implementados en el programa Arlequin (Excoffier y col. 2005) y Genepop (Raymond y Rousset, 1995; Schneider et. al., 2000). La reconstrucción de las fase de ligamiento de los haplotipos de los Polimorfismos de secuencia única (SNPs) detectados en cada gen se realizará mediante el programa PHASE v 2.1.1 (Li y Stephens 2003).

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Los resultados obtenidos en este proyecto permitirán conocer la variabilidad genética presente en la Región Regulatoria Proximal del Gen DRB3 (URR-DRB3) en poblaciones de Bovinos lecheros de la provincia de La Pampa. Además contribuirá a aumentar nuestros conocimientos acerca de los factores genéticos involucrados en la resistencia/susceptibilidad a la leucosis y mastitis. Por otra parte, el estudio redundará en el desarrollo y puesta apunto de metodologías de tipificación a nivel molecular que podrán ser usados a corto plazo en programas de selección. Como consecuencia de esto es esperable obtener un aumento en la resistencia a la leucosis y mastitis en los bovinos lecheros de La Pampa,

lo que permitirá reducir la incidencia de dichas enfermedades y por lo tanto los costos sanitarios.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	SEMESTRES							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Toma de muestra	X	X	X	X	X			
Registro de datos de producción y sanitarios	X	X	X	X	X	X	X	
Detección de BLV	X	X	X	X	X			
Análisis linfocitario	X	X	X	X	X			
Genotipificación		X	X	X	X	X		
Asociación con mastitis y leucosis		X	X	X	X	X	X	
Análisis estadístico			X	X	X	X	X	X
Convalidación de los resultados preliminares					X	X	X	X
Publicación de los resultados					X	X	X	X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

La facultad de Ciencias Veterinarias cuenta con un laboratorio de Genética Molecular. El mismo dispone de un Termociclador para amplificación de ADN, un equipo de electroforésis y otro de revelado de geles. El mismo se ha ido completando con la compra de equipamiento menor como también de insumos.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

La secuenciación Directa (SBT) se realizará en el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET- CONICET) de la FCV; UNLP, que posee un laboratorio de genética Molecular y Secuenciación de ADN. Este laboratorio cuenta con equipamiento de alta tecnología como un secuenciador automático de tecnología capilar MegaBace 1000 (GE Healthcare, USA) y un pirosecuenciador (Biotage).

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

El uso de bienes no existentes en la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLPam, se efectuarán en el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVEV-CCT), de FCV, UNLP; lo cual está justificado debido a que se trata de un equipamiento de alta complejidad y alto costo, cuya adquisición excede los límites de este proyecto. Es habitual que estos equipamientos mayores sean compartidos por varias instituciones a modo de *facility*.

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

La provincia de La Pampa, a través del Ministerio de la Producción, ha establecido a la actividad ganadera como una de las líneas estratégicas para el crecimiento regional. Es por ello que, como parte de su plan de acción, ha financiado proyectos de investigación y transferencia de tecnología que intentan reforzar el vínculo entre el sector productivo y el sector universitario.

Tal como ha acontecido con otros proyectos llevados adelante por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam, se ha solicitado financiamiento adicional para el desarrollo y concreción del presente proyecto.

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual) *

Equipamiento e infraestructura	0,00
Bienes de consumo	23398,00
Bibliografía	300,00
Viajes	7450,00
Personal de apoyo	0,00
Otros (asistencia a congresos)	4500,00
TOTAL	\$ 35648,00

* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Aida, Y. Influence of host genetic differences on leukemogenesis induced bovine leukemia virus. *AIDS Res Human Retroviruses* 2001; 17, S12.
- Arestrup FM, Jensen NE. Analysis of associations between major histocompatibility complex BoLA class I haplotypes and subclinical mastitis of dairy cows. *J Dairy Sci.*1995; 78, 1684-1692.

- Altschul S. F., Madden T.L., Schaffer A. A, Zhang J, Miller W & Lipman D, J Gapped BLAST and PSI-BLAST : A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997. 25, 3389-402.
- Amorena B, Stone W. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science* 1978; 201: 159–160.
- Arita T. Mastitis in cattle. *Clinical Diagnosis and Treatment*. Tokyo: Tikusan, 1991: 1-26.
- Aswell, M. S., Rexroad C.E., Miller R.H. y Vanraden P.M. 1996. Mapping economic trait loci for somatic cell score in Holstein cattle using microsatellites markers and selective genotyping. *Animal Genetics*. 1996. 27:235- 42.
- Boldman, K. G., L. A. Kriese, L. D. Van Vleck, C. P. Van Tassel, and S. D. Kachman.. A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances [Draft]. U.S. 1995. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Castro GS, Trujillo EB, Duran CV. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Rev Col Cienc Pec* 2006; Vol. 19:3: 270-279.
- Coffey EM, Vinson WE, Pearson RE. Somatic cell counts and infection rates for cows of varying somatic cell count in initial test of first lactation. *J Dairy Sci*. 1986 Feb; 69(2):552-5.
- Coffey EM, Vinson WE, Pearson RE. Potential of somatic cell concentration in milk as a sire selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 1986 Aug; 69(8):2163-72.
- Cotter PF, Taylor RL Jr, Abplanalp H. Differential resistance to *Staphylococcus aureus* challenge in major histocompatibility (B) complex congenic lines. *Poult Sci*. 1992 Nov;71(11):1873-8.
- Cowell, L.G., Kepler, T.B., Janitz, M., Lauster, R., Mitchinson, N.A.. The distribution of variation in regulatory gene segments, as present in MHC Class II promoters. *Genome Res*. 1998;8, 124–134.
- Deckert-Schluter M, Schluter D, Schmidt D, Schwendemann G, Wiestler OD, Hof H. *Toxoplasma encephalitis* in congenic B10 and BALB mice: impact of genetic factors on the immune response. *Infect Immun*. 1994 Jan;62(1):221-8.
- Díaz S, Ripoli MV, Peral García P, Giovambattista G. *Genética de Animales Domésticos*. Capítulo 9. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Ed: InterMédica, 2010. Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina. ISBN: 978-950-555-378-5. 272 pp.
- Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrl 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.
- Dietz A B; Detilleux JC; Freeman A E, Kelley D H, Stabel JR, Kehrl M E. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J Dairy Sci*. 1997b; 80:400-4005.
- Do Nascimento CS, Machado MA, Martinez ML, Barbosa Da Silva MVG, Martins MFG, Campos AL, Sousa ALA, Teodoro RL, Da Silva RV, Fancioni SEG, Andarade 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.
- Dube S, Dolcini G, Abbott, Mehta S, Dube D, Gutierrez S, Ceriani C, Esteban E, Ferrer, J, Poesz B. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology*, 2000; 277(2), 379-386.

- Emanuelson U, Danell B, Philipsson J. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J Dairy Sci.* 1988 Feb;71(2):467-76.
- Emanuelson U, Olsson T, Mattila T, Astrom G, Holmberg O. Effects of parity and stage of lactation on adenosine triphosphate, somatic cell count and antitrypsin content in cows' milk. *J Dairy Res.* 1988 Feb;55(1):49-55.
- Emanuelsson U, Scherling K & Pettersson H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet.Med.* 1992; 12, 121–131.
- Esteban EN, Thorn RM & Ferer JF. Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the Bovine Leukemia Virus. *Cancer Esearch* 1985^a; 45,3225-3230.
- Esteban EN, Thorn, RM & Ferer, JF. An Amplified Immunoperoxidase Assay to Detect Bovine Leukemia Virus Expression: Development and Comparison with other Assays. *Cancer Research* 45 1985 ^b: 3231-3235.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integred software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online.* 2005; 1:47-50.
- Giovambattista Guillermo y Peral-García. *Genética de Animales Domésticos. Capítulo 9. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos.* Díaz S, Ripolli MV, Peral García P, Giovambattista G, Editorial: Inter-Médica, 2010. Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina. ISBN: 978-950-555-378-5. 272 pp.
- Guo, S. W. & Thompson, E. A., Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992;48: 361-372.
- Ilmonem P, Penn DJ, Damjanovich K, Morrinson L, Ghotbi L, Pttis WK. Major histocompatibility complex heterozygosity reduces fitness in experimentally infected mice. *Genetics.* 2007; 176; 2501-8.
- Inchausti D., Tagle E.C. *Bovinotecnia.* Ed. El Ateneo. 492 pp. 1980.
- Juliarena MA, Poli, M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodriguez EM, Mariño B, Rodriguez-Dubra C, Esteban EN. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gen. *Animal Genetics,* 2008;39:432-438.
- Juliarena MA, Ceriani C, Dube S, Poli M, Gutierrez S, Dolcini G, Sala L, Poiesz B, Esteban, EN (submitted). Virologic differences between bovine leukemia virus-infected low proviral load cattle sicriminated by the presence or absence of BoLA-DRB3.2 *0902 allele. *J Dairy Sci.* 2009; 92(1) 375-81.
- Kelm S, Dettleux A, Freeman A, Kehrli J, Dietz A. Fox L. Butler J, Kasckovics I, and Kelly D. Genetic Association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 1997; 80:1767-1775.
- Kulberg S, Heringstad B, Guttersrud OA, Olsaker I. Study on the association BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red Cows. *Y Anim Breed Genet.* 2007; 124:201-7.
- Larsen B, Jensen NE, Madsen P, Nielsen SM, Klastrup O, Madsen PS. Association of the M blood group system with bovine mastitis. *Anim Blood Groups Biochem Genet.* 1985;16(3):165-73.
- Li N., Stephens, M. Modelling linkage disequilibrium, and identifying recombination hotspots using SNP data. *Genetics,* 2003; 165. 2213-33.

- Lie O, Solbu H, Larsen HJ, Spooner RL. Possible association of antibody responses to human serum albumin and (T,G)-A-L with the bovine major histocompatibility complex (BoLA). *Vet Immunol Immunopathol.* 1986 Apr;11(4):333-50.
- Lunden A, Sigurdardottir S, Edfors-Lilja I, Danell B, Rendel J, Andersson L. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values. *Anim Genet.* 1990;21(3):221-32.
- Machado MA, Nascimento CS, Martinez ML, Silva MVGB, Campos AL, Teodoro R L; Verneque RS; Guimaraes SEF. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2005; v.57, n.3, p.380-389.
- 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.
- Martinez ML, Machado MA, Nascimento CS, Silva MVGB, Teodoro RL; Furlong J, Prata MCA, Campos AL, Guimaraes 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.
- Mejdell CM, Lie O, Solbu H, Arnet EF, Spooner RL. Association of major histocompatibility complex antigens (BoLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis, ketosis and fertility in Norwegian cattle. *Anim Genet.* 1994 Apr;25(2):99-104.
- Mitchinson NA, Roes, J. Patterned variation in murine MHC promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 99 (16), 10561– 10566.
- Mirsky M.L, Olmstead C, Da Y, Lewin H.A. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Animal Genetics* 1998; 29(4):245-252.
- Noordhuizen JPT., Wooldrik H, Vos ML. van Lipzig F. & van Meurs G.K. The potencial use of cell count linear scores in veterinary herd health and production control on dairy farms. *Veterinary Quarterly Review* 1987; 9, 60.
- Oddgeirsson O, Simpson SP, Morgan AL, Ross DS, Spooner RL. Relationship between the bovine major histocompatibility complex (BoLA), erythrocyte markers and susceptibility to mastitis in Icelandic cattle. *Anim Genet.* 1988;19(1):11-6.
- 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.* 2009.
- 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.
- Penn DJ, Damjamovich K, Potts WK. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11260-4.
- Reichstetter S, Krellner PH, Meenzen CM, Kalden JR, Wassmuth R. Comparative analysis of sequence variability in the upstream regulatory region of the HLA-QB1 gene. *Immunogenetics* 1994;39(3):207-12.
- Ripoli MV, Diaz S, Peral Garcia P, Giovambattista G. Nucleotide sequence of the upstream regulatory region of BoLA- DRB3. *J. Immunogenet* 2002 Eur; 29, 537-40.
- Ripoli MV, Peral Garcia P.; Dulout FN, Giovambattista G. Polymorphism in the bovine BoLA-DRB3 upstream regulatory regions detected through PCR- SSCP and DNA secuencing. *Gene.* 2004 sep 15; 339: 71-8.
- Ripoli MV, Villegas-Castagnasso EE, Peral-Garcia P, Giovambattista G. New polymorphisms for the BoLA-DRB3 upstream regulatory region. *Tissue Antigens.* 2005 Aug; 66(2):136-7.

- 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. *Journal Dairy Sci.* 2007; 90:1029-38.
- Singal DP, Qiu X, D'Souza M, Sood SK. Polymorphism in the stream regulatory regions of HLA-DRB genes. *Immunogenetics* 1993a;37, 143– 147.
- Singal DP, Qiu X.. Polymorphism in the upstream regulatory regions and level of expression of HLA-DRB genes. 1994 *Mol. Immunol.* 31, 1117–1120.
- Schat KA, Taylor RL Jr, Briles WE. Resistance to Marek's disease in chickens with recombinant haplotypes to the major histocompatibility (B) complex. *Poult Sci.* 1994 Apr; 73(4):502-8.
- Schneider S, y col .Arlequin version 2000. A Software for Population Genetic Data Analysis. University of Geneva ,Switzerland.
- Schutz MM, VanRaden PM, Wiggans GR, Norman HD. Standardization of lactation means of somatic cell scores for calculation of genetic evaluations. *J Dairy Sci.* 1995 Aug; 78(8):1843-54.
- Schutz MM, Vanraden PM, Wiggans GR. Genetic variation in lactation means of somatic cell II DQA1 scores for six breeds of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1994 Jan; 77(1):284-93.
- Schutz MM. Genetic evaluation of somatic cell scores for United States dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1994 Jul;77(7):2113-29. Review.
- Sharif S, Mallard BA, Sargeant JM. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000 Oct 31; 76(3-4):231-8.
- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN. Characterization of naturally processed and presented peptides associated with bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II DR molecules. *Anim Genet.* 2003 Apr; 34(2):116-23.
- Sharif S, Mallard JM, Sargeant. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2000;76: 231-238.
- Shook GE, Schutz MM. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *J Dairy Sci.* 1994 Feb;77(2):648-58. Review.
- Simpson SP, Oddgeirsson O, Jonmundsson JV, Oliver RA. Associations between the bovine major histocompatibility complex (BoLA) and milk production in Icelandic dairy cattle. *J Dairy Res.* 1990 Nov; 57(4):437-40.
- Spooner RL, Leveziel H, Grosclaude F, Oliver RA; Vaiman M. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *Journal of Immunogenetics* 1978;5: 325– 346.
- Takeshima SN, Ikegami M, Morita M, Nakai Y, Aida Y. Identification of new cattle BoLA DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics.* 2001;53: 74-81.
- Takeshima SN; Matsumoto Y; Chen S; Yoshido T, Mukoyama H; Aida Y. Evidence for cattle major histocompatibility complex BoLA class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by *Streptococcus* and *Escherichia* species. *Journal Tissue Antigens.* 2008; 72(6):525-31.
- Takeshima SN, Matsumoto Y, Aida Y. Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence- based typing method for genotyping cattle's major histocompatibility complex class II DRB3 (Short communication). *J Dairy Sci.* 2009 Jun;92 (6): 2965 -70.

- Thompson JD, Higgins D.G & Gibson T.J CLUSTAL W :improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994;22, 4673-80.
- Ting, J.P.Y. & Trowsdale, J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, 109; 2002 21.
- Van Eijk MJ, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet.* 1992; 23(6):483-96.
- Weller JL, Saran A, Zeliger Y. Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 1992 Sep; 75(9):2532-40.
- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC, Leslie KE. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) with production traits in Canadian dairy cattle. *Anim Genet.* 1999 Apr; 30(2):157-60.
- Takeshima SN, Ikegami M, Morita M, Nakai Y, Otha M, Aida Y. Identificación of new cattle BoLA-DRB3 alleles by Sequence-based typing. *Immunogenetics* 2001 53:74-81.
- Takeshima SN, Nakai Y, Otha M, Aida Y. Caracterización of DRB3 alleles in the MHC of Japanese shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing (short communication). *Journal of Dairy Science* 2002;85, 1630-1632.
- Takeshima SN, Saitou N, Morita M, Inoko H, Aida Y. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. 2003. *Gene* 316, 111-118.
- Takeshima SN, Aida Y- Structure function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim. Sci. J.* 2006; 77(2):138-50.
- Takeshima SN, Matsumoto Y, Aida Y. Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex class II DRB3. *J. Dairy Sci.* 2008 TBC: 1-6.
- 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 Immunol.* 1993 Dec;151(12):6977-85.
- Zambrano JC, Echeverri JZ, López AH. Asociación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 con características productivas en vacas del hato Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* 2009b. Vol 22. No. 3.
- Zambrano JC, Echeverri JZ, López AH. Asociación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 con mastitis clínica y mastitis subclínica en vacas del hato Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* 2009c Vol 22. No. 3.