



TITULO:

Estudio de asociación entre alelos del gen BoLA-DRB3.2 con rasgos de producción lechera y mastitis evaluada por CCS en ganado Holstein de la región Pampeana

INTEGRANTES	FIRMA
Baltian, Laura	
Schmidt Enrique	
Peratta Delia	
Remirez Pablo	
Palezza Jorge	
Orozco Johana	
Patrilla Juliana	



Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO:

Estudio de asociación entre polimorfismos de alelos del gen BoLA-DRB3.2 con rasgos de producción lechera y mastitis evaluada por CCS en ganado Holando Argentino de la región Pampeana

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN Aplicada -

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. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS

Departamento de Producción Animal FCV UNLPam

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

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 Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Baltian, Laura	Dra.	III	D	Genética y Mej Animal	Prof. Adj E	20 h
Schmidt Enrique	PHD	III	I	Genética y Mej Animal	Prof. Titul S	4h
Peratta Delia	MV	III	I	Genética y Mej Animal	JTP SE	6
Remirez Pablo	Ing. Electr.	V	I	Bioestadística	AY 1ª E	4h
Palezza Jorge	Ing. Electr.	V	I	Bioestadística	Prof Adj SE	4h
Orozco Johana	Estudiante	-	Al	Genética y Mej Animal	Estudiante	5h
Patrilla Juliana	Adscripto	-	Al	Genética y Mej Animal	Estudiante	5h

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, Al: 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.

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

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2018 **FINALIZACIÓN:** 31 / 12/2021

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

Los alelos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (BoLA) han sido asociados con resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas. La mastitis es una enfermedad del ganado lechero que disminuye la producción e incrementa los costos sanitarios. El número de glóbulos blancos por mililitro de leche, conocido como conteo de células somáticas (CCS) es indicador de mastitis. El objetivo general es detectar asociaciones entre marcadores genéticos del gen BoLA- DRB3.2 con resistencia/ susceptibilidad a mastitis medida a través del CCS y rasgos de producción en leche de ganado Holstein de la región Pampeana. La asociación entre mastitis y alelos del BoLA -DRB3.2 se basará en un estudio caso/control. La población de ganado (N=250) será dividida en dos grupos de acuerdo con el número de CCS: 1) < 250.000 células/mililitros y 2) ≥ 250.000 cel/ml. Se registrarán mensualmente los datos de producción para cada lactancia. Los marcadores BoLA-DRB3 se tipificarán por PCR-RFLP y PCR-SBT. El test exacto de Fisher y Odds Ratio de Woolf-Haldane se utilizarán para estudiar la asociación entre el CCS y las variantes alélicas. Para asociar rasgos productivos se realizará un modelo lineal mixto de sustitución de genes. Los resultados permitirán comprender mejor el rol de los alelos del gen DRB3 en la producción lechera y asesorar a los productores.

4.1 Palabras claves: (de 4 a 6): mastitis /CCS/ rasgos productivos/Gen DRB3/

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras)

The bovine leukocyte antigen (BoLA) alleles have been linked to variation in resistance/susceptibility to infectious diseases. Mastitis is a disease of dairy cattle which reduces yield and increases the costs of production. The somatic cell count (SCC) is the number of white blood cells per milliliter of milk and it is used as a mastitis indicator. The object of this study is to detect significant associations between BoLA genetic markers and SCC as an indicator of resistance/susceptibility to mastitis and productive traits in milk of the Holstein cattle population of Pampean region. The association between mastitis and BoLA alleles will be evaluated using a case-control study design. The cattle population (N= 250) will be divided into two groups according to SCC: 1) < 250,000 cells/ml and

2) $\geq 250,000$ cells/ml. Production data will be recorded monthly for each lactation. The BoLA-DRB3 alleles will be typed by PCR-RFLP and PCR-SBT. Fisher's exact test and Woolf-Haldane Odds Ratio will be applied to study the association between SCC and BoLA allelic variants. To associate productive traits, a mixed linear model of gene substitution will be performed. The results will allow a better understanding of the role of the DRB3 gene alleles in dairy production and advise producers.

4.3. Key words: (de 4 a 6): mastitis/SCC/ productive traits/Gene DRB3

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

55.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

La mastitis es una enfermedad infecciosa que acarrea grandes costos veterinarios, además de la merma en los rindes económicos. Esta enfermedad es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que daña el tejido secretor de leche y lo substituye con el tiempo por tejido cicatrizal (Philipot y Nickerson, 1992).

En la mayoría de los casos ocurre como consecuencia de infecciones causadas por distintos microorganismos, especialmente bacterias y con menos frecuencia debido a traumatismos, lesiones e irritaciones de origen químico.

Como consecuencia se produce una acumulación de glóbulos blancos en la leche que tratan de contener la multiplicación de los microorganismos causantes de la mastitis. Estos glóbulos blancos, junto a células epiteliales del tejido productor de leche, constituyen lo que se conoce como células somáticas que es un indicador del estatus de salud, a nivel de la ubre (Heeschen, 2005).

La presencia de la enfermedad conduce a producir menos leche y además se produce la congestión capilar, edematización del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares. También existe alteración de la permeabilidad capilar que produce cambios en la composición de la leche. Algunos de éstos son: disminución de la cantidad y la calidad de caseína sintetizada, disminución de la grasa butirosa, disminución de la lactosa, aumento de la concentración de sodio, aumento de los cloruros, aumento de las proteínas del suero sanguíneo, aumento de enzimas y aumento de las células somáticas (Chaves, 2010).

En las últimas décadas los programas preventivos de mastitis y de calidad de leche que se llevan a cabo en los tambos tienen como objetivo la producción de leche de óptima calidad en su composición y deben proceder de vacas sanas y bien alimentadas, con la máxima calidad higiénica posible y sin la presencia de sustancias adulterantes de ningún tipo (Chaves, 2010).

Es por ésta razón que ha aumentado el interés, no sólo en seleccionar a favor de una alta producción y calidad lechera (litros de leche, cantidad y porcentaje de grasa y proteínas), sino también seleccionar a favor de un bajo CCS. Los rasgos para salud tienen baja heredabilidad y limitada cantidad de datos, por lo tanto, dificultan el potencial para el mejoramiento genético por métodos tradicionales (Rupp et al, 2007).

El rendimiento lechero por vaca se ha duplicado en los últimos tiempos y además de mastitis, trajo como consecuencia problemas de fertilidad y de trastornos metabólicos (Oltenu et al., 2010).

Durante muchos años los objetivos para la crianza de ganado lechero estuvieron focalizados principalmente en aumentar la producción, sin tener en cuenta los rasgos de salud tales como susceptibilidad/ resistencia a enfermedades infecciosas.

Varios estudios demuestran que la resistencia a enfermedades infecciosas está genéticamente determinada y los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (Antczak, 1992; Chardon, 1999), tienen un rol importante en este sentido, siendo de interés para los criadores de animales y genetistas por su importancia en la respuesta inmunitaria. Además, se asociaron 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, crecimiento (Machado et al., 2005; Do Nascimento et al., 2006; Zambrano et al., 2009b; Rupp et al., 2007; Pashmi et al., 2009) y con enfermedades infecciosas (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; Baltian et al., 2012; Yoshida et al., 2012; Baltian et al., 2014; Baltian et al., 2016). 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 y Aida, 2006; Díaz et al., 2010).

La infección puede estar influenciada por varios factores: por variables ambientales, variables propias del patógeno y factores del hospedador. Las variables ambientales pueden incluir, el estado reproductivo y nutricional, la edad de exposición al patógeno y la presencia de toxinas ambientales. Las variables derivadas del patógeno generalmente implican factores de virulencia y los factores atribuidos al hospedador implican principalmente la dotación genética del organismo, dado que en toda población existen diferencias individuales en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Díaz et al., 2010).

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 algunos animales domésticos (Blattman et al., 1993; Outteridge et al., 1996; Dietz et al., 1997; Eder et al., 2001; Maillard et al., 2002; Park et al., 2004, Acosta et al., 2005; Baltian et al., 2014).

Por lo tanto, en estos últimos años es de interés para los productores lecheros seleccionar para resistencia genética a enfermedades infecciosas en la industria lechera.

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 10 años, en la cátedra de Genética y Mejoramiento se viene estudiando la estructura y variabilidad genética del Complejo Principal de Histocompatibilidad en bovinos. Durante ese período se describió la variabilidad genética de genes de clase II, como el DRB3, DQA1 y la región promotora proximal (URR) del gen DRB3.2.

Se describieron las regiones polimórficas y se llevaron a cabo estudios de asociación con enfermedades infecciosas, tales como mastitis y leucosis. Estos estudios resultaron en la publicación de artículos científicos en revistas nacionales e internacionales, presentaciones a reuniones científicas, becarios de grado y una Tesis Doctoral. Estos estudios se realizaron con la colaboración de personal del laboratorio de animales domésticos IGEVET-CONICET, UNLP.

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

Proyectos

-Asociación Genética entre Loci de Histocompatibilidad de Clase II y Número de Células Somáticas en Leche de Ganado Holstein de la provincia de La Pampa". 2006-2009. Res- 014/2006.

-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. (2011-2014). Resol: 007/2011.

- Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP: Asociación Genética entre Loci de Histocompatibilidad de Clase II y Número de Células Somáticas en Leche de Ganado Holstein de la provincia de La Pampa". Tesista: Laura R. Baltian- (2009-2014).

Publicaciones

-Baltian, L.R.; Follmer, A.V.; Peratta, D.L.; Schmidt, E.E.; Severini, R.A.; Delbonis, S.; Borrego, C.; Alvarez Rubianez, N.; Ripoli, M.V.; Giovambattista, G. 2016. **Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 asociados con resistencia / susceptibilidad a leucosis en ganado Holstein de La Pampa. Revista Ciencia Veterinaria. 18 (1):9-28.**

-Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Giovambattista, G. 2014. **Determinación de los motivos aminoácidos presentes en los sitios de unión a los antígenos de los alelos del gen BoLA-DRB3 en una población Holstein de La Pampa y su asociación con mastitis. Ciencia Veterinaria. 16: 9- 23.**

- Baltian LR, Ripoli MV; Giovambattista G. 2014. Tema: "Asociación de cambios aminoacídicos del gen DRB3 y mastitis mediante conteo de células somáticas. XLIII Congreso Argentino de Genética. En carácter de asistente y expositor: modalidad póster . 19 al 21 de octubre de 2014. San Carlos de Bariloche. Argentina.
- Gosczyński, D.; Ripoli, M.V.; Takeshima, S.; Baltian, L.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2014. **Haplotype determination of the upstream regulatory region and the second exon of the BoLA-DRB3 gene in Holstein cattle.** Tissue Antigens. 83(3):180-183. DOI: 10.1111/tan.12293.
- Baltian, L.R.; Follmer, A.V.; Delbonis, S.; Borrego, C.; Ripoli, M.V.; Schmidt, E.; Peratta, D.L.; Alvarez Rubianes, N.; Giovambattista, G. 2013. **Asociación de polimorfismos del exón 2 del gen DRB3 del MHC bovino con resistencia susceptibilidad a Leucosis en una población Holstein de La Pampa.** ISBN 978-950-863-207-4.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.; Schmidt, E.E.; Peratta, D.; Sanfilippo, S.; Alvarez Rubianes, N.; Follmer, A.; Giovambattista, G. 2012. **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.** Jornada de Ciencia y Técnica 2012. "Proyectar y comunicar. Estrategias para la investigación en la UNLPam". 18 de octubre. General Pico, UNLPam. ISBN 978-950-863-139-8.
- Ripoli María Verónica, Shin-nosuke Takeshima, Laura Baltian, Yoko Aida Guillermo Giovambattista. 2012. **Haplotype determination of upstream regulatory región and the second exón of bovine DRB3 gene.** Major Histocompatibility Complex. Official journal of japanese Society for Histocompatibility an Inmunogenetics. Vol. 19 N° 2. Tokio, Japón. ISSN 21869995
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Sanfilippo, S.; Takeshima, S.N; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2012. **Association Between BoLA-DRB3 and Somatic Cell Count in Holstein Cattle from Argentina.** Mol Biol Rep.39:7215-7220. DOI: 10.1007/s11033-012-1526-y. Springer ISSN 0301-4851.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Takeshima, S.N.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2011. **Estimación de las frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3 en una población de ganado Holstein de La Pampa mediante Secuenciación Directa.** Ciencia Veterinaria. 13(1). 65-67. ISSN: 1515-1883.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Schmidt, E.E.; Peratta, D.L; Sanfilippo, S.B.; Alvarez Rubianes, N.; Giovambattista, G. 2011. **Polimorfismos de la región promotora proximal del Gen BoLA DRB3 y su asociación con la resistencia/ suceptibilidad a leucosis y mastitis en ganado Holstein de la Provincia de La Pampa.** VII jornada de Ciencia y Técnica. General Pico. ISSN 1853-9750.
- Baltian, L.R. et al. 2010. **Asociación Genética entre Loci de Histocompatibilidad de Clase II y Número de Células Somáticas en Leche de Ganado Holstein de La provincia de La Pampa.** Jornada de Ciencia y Técnica. Santa Rosa. ISBN 978-950-863-139-8.
- Baltian L. et al.. 2010. "Polimorfismo del Gen BoLA- DRB3 en Ganado Holstein de La Pampa y su relación con Mastitis y recuento de Células Somáticas en Leche". XIV Congreso Latinoamericano de Genética ALAG 2010. En carácter de asistente y expositor, modalidad póster. Viña del Mar, Chile, 1-5 de octubre 2010.
- Baltian, L.R.; Catanesi, C.I.; Ripoli, M.V.; Schmidt, E.; Peratta, D.; Sanfillipo, S.; Fuentes, M.B.; Giovambattista, G. 2009. **Asociación Genética entre Loci de Histocompatibilidad de Clase II y Número de Células Somáticas en Leche de Ganado Holstein de La provincia de La Pampa.** Memorias de la 6ta Jornada de Ciencia y Técnica. FCV, UNLPam. ISSN: 1852 -5725.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

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

PROBLEMA CIENTÍFICO

Durante muchos años los objetivos para la crianza de ganado lechero estuvieron focalizados principalmente en aumentar la producción y se han ignorado los rasgos de salud tales como susceptibilidad/ resistencia a enfermedades. Los rasgos para salud tienen baja heredabilidad y limitada cantidad de datos, por lo tanto, dificultan el potencial para el mejoramiento genético por métodos tradicionales.

Varios estudios demuestran que la resistencia a enfermedades infecciosas está genéticamente determinada por lo tanto en estos últimos años es de interés definir marcadores genéticos e inmunológicos que puedan ser usados para seleccionar y así mejorar la resistencia a enfermedades infecciosas en la industria lechera.

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 inmunitaria y han sido asociados con resistencia/susceptibilidad a una amplia cantidad de enfermedades autoinmunes e infecciosas. Por esto los loci del BoLA constituyen los principales genes candidatos para el estudio de asociación entre marcadores genéticos y resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas, entre ellas la mastitis.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las asociaciones de los alelos del exón 2 del gen BoLA- DRB3 con rasgos de producción y CCS en leche como un indicador de ocurrencia de mastitis en ganado Holando Argentino de la región Pampeana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar los polimorfismos presentes en el locus de Clase II BoLA-DRB3.2 en la población en estudio.
- b) Analizar la asociación entre el CCS y los alelos del locus de Clase II BoLA-DRB3.2.
- c) Asociar datos de producción de litros de leche, porcentaje de grasa y proteína y los alelos del locus de Clase II BoLA-DRB3.2.

HIPOTESIS

Los polimorfismos de estos genes determinan la diversidad de las proteínas codificadas en la respuesta inmunitaria y tendría como consecuencia la variación genotípica en la resistencia/susceptibilidad.

RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto permitirán conocer la variabilidad genética presente en el gen DRB3.2 en las poblaciones de bovinos lecheros analizados.

Además, contribuirá a aumentar nuestros conocimientos acerca de los factores genéticos involucrados en la resistencia / susceptibilidad a la mastitis y a la influencia de ésta en los rasgos productivos.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS Y TÉCNICAS

1- Toma de muestras

El estudio experimental se llevará a cabo en animales de la raza Holando Argentino pertenecientes a tres tambos de la región pampeana.

Se extraerán 5 ml de sangre entera a 200 animales. Será conservada con anticoagulante y a -20°C hasta su utilización.

Se registrarán mensualmente los conteos de células somáticas y los registros de producción tales como litros de leche, porcentaje de grasa en leche y porcentaje de proteínas a lo largo de toda lactancia durante cuatro años.

Además, se registrarán datos de fechas de nacimientos, número de lactancias, intervalos entre partos, edades en los partos, estación del año, presencia de mastitis y datos de su genealogía.

2- Diseño experimental

El presente estudio se basará en un estudio caso/control en el que se identificarán alelos de susceptibilidad/resistencia correspondiente al exón 2 del gen BoLA-DRB3. La identificación se realizará a través de la búsqueda de cambios en el ADN tanto en el grupo caso como en el control.

El grupo caso estará representado por individuos con conteos de células somáticas mayor o igual a 250.000 por mililitro de leche (CCS \geq 250.000 cel/mil) y también incluirá animales que sufrieron mastitis al menos dos veces. El grupo control tendrá individuos con registro de células somáticas menor a 250.000 por mililitro de leche (CCS <250.000 cel/mil).

3- Extracción de ADN

El ADN genómico se extraerá a partir de muestras de sangre entera mediante la técnica de Wizard® Genomic DNA (promega Corporation, USA), según las indicaciones del proveedor.

4- Genotipificación

El estudio de los polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 se realizará mediante dos técnicas: Reacción en cadena de la polimerasa y análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y secuenciación directa (PCR-SBT).

La caracterización de los alelos del locus BoLA-DRB3 se llevará a cabo por el método de PCR anidado-RFLP descrito por van Eijk et al (1992 a). Dicha técnica consiste en la amplificación de una secuencia de ADN de 284pb (exón 2 del gen BoLA-DRB3) y la posterior digestión de los productos de PCR con las enzimas de restricción Rsa I, Bsty I y Hae III.

La técnica de Secuenciación Directa (PCR-SBT) que se empleará para genotipar los alelos del gen BoLA-DRB3 será la descrita por Takeshima et al., (2009).

5- Métodos estadísticos

La estimación de las frecuencias génicas y el número de alelos se realizarán por conteo directo. El test exacto de Fisher y Odds Ratio de Woolf-Haldane se utilizará para estudiar la asociación entre el CCS y las variantes alélicas.

Se utilizará un Modelo Lineal Mixto para evaluar los efectos fijos y efectos aleatorios del rodeo. Se evaluará edad a las pariciones, estación meteorológica anual, genealogía, año de recolección de datos, el CCS como indicadores de mastitis y los efectos de los alelos del gen BoLA DRB3.2 sobre los distintos rasgos productivos.

Se utilizará el modelo lineal mixto porque tienen en cuenta la estructura agregada de los datos en distintos niveles o clases que pueden estar ordenados o no jerárquicamente, en donde se combinan los efectos fijos y aleatorios. Los efectos, es decir la influencia de las variables explicativas sobre la respuesta, se miden a través de distintos parámetros de los modelos.

Si los valores que pueden tener la variable explicativa son informativos y su número está fijado de antemano estamos ante lo que se denomina “efectos fijos”, que asumen que tales valores son independientes entre observaciones. Y si ante los valores de la variable identificativos pueden encontrarse otros porque el estudio se repite en diferentes circunstancias (año, ubicación geográfica) se los denomina “efectos aleatorios”, en los que se asume que existe una relación entre las observaciones realizadas en la misma clase.

El Modelo Lineal Mixto se plantea de acuerdo con la siguiente ecuación $\vec{Y} = \vec{X} \cdot \vec{\beta} + \vec{\alpha} + \vec{\varepsilon}$ donde, \vec{Y} : es el vector respuesta y estima el conteo de células somáticas, producción de leche, porcentaje de grasa y proteínas. $\vec{\beta}$: es el vector coeficiente de regresión de efectos aleatorios. \vec{X} : es el vector de efectos fijos $\vec{\alpha}$: es el vector de ordenada al origen de efectos aleatorios. $\vec{\varepsilon}$: es el vector de error aleatorio.

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 el gen DRB3.2 en las poblaciones de bovinos lecheros analizados.

Además, contribuirá a aumentar nuestros conocimientos acerca de los factores genéticos involucrados en la resistencia / susceptibilidad a mastitis y a la influencia de ésta en los rasgos productivos.

Por otra parte, el estudio redundará en el desarrollo y puesta a punto de metodologías de tipificación a nivel molecular que podrán ser usados a corto plazo en programas de selección.

Las mejoras en la salud del ganado lechero han sido reivindicados internacionalmente y han aumentado los requisitos de los consumidores y de los productores del área.

También hay necesidades de bajar costos en producción por uso de drogas, por pérdidas de producción y tasa de reemplazo por lo tanto este estudio permitirá reducir la incidencia de la enfermedad y los costos sanitarios.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

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

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 electroforesis 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

Para la secuenciación Directa (SBT) se solicitará un servicio externo para lo cual se previeron los gastos dentro del presupuesto.

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 un laboratorio externo, lo cual está justificado debido a que el secuenciador es 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:

Por el momento no se tiene otra fuente de financiación. Se prevee seguir buscando colaboración.

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

Equipamiento e infraestructura	0,00
Bienes de consumo (material descartable, drogas y reactivos)	90.000\$
Servicios adquiridos (secuenciación)	40.000\$
Bibliografía	
Personal de apoyo	0,00
Viajes y asistencia a congresos	20.000\$
TOTAL	150000 \$
Presupuesto Estimado Anual:	
1° año: \$ 40.000	
2° año: \$ 40.000	
3° año: \$ 35.000	
4° año: \$ 35.000	

* 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

- Acosta-Rodriguez, R.; Alonso-Morales, R.; Balladares, S.; Flores-Aguilar, H.; Garcia-Vazquez, Z.; Gorodezky, C. 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet Parasitol.* 127 (3-4):313-321.
- Aida, Y. 2001. Influence of host genetic differences on leukemogenesis induced bovine leukemia virus. *AIDS. Research and Human Retroviruses.* 17: 812.
- Amorena, B.; Stone, W. 1978. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science* 201: 159–160.
- Antczak DF. 1992. The Major histocompatibility Complex of the horse. In *Equine Infectious Diseases VI, "Proceedings of the Sixth International Conference" 7th-11th 1991 july.* Cambridge UK (Plowright, W., Rosedale, P.D., and Wade, J.F., eds.), R&W Publications (Newmarket) Ltd. p. 99-112.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Takeshima, S.N.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2011. Estimación de frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3 en una población de ganado Holstein de La Pampa mediante secuenciación directa. *Ciencia Veterinaria.* 13: 65-67.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Takeshima, S.N.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2011. Estimación de las frecuencias alélicas del gen BoLA-DRB3 en una población de ganado Holstein de La Pampa mediante Secuenciación Directa. *Ciencia Veterinaria.* 13(1). 65-67. ISSN: 1515-1883.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Sanfilippo, S.; Takeshima, S.N.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2012. Association Between BoLA-DRB3 and Somatic Cell Count in Holstein Cattle from Argentina. *Mol. Biol. Rep.* 39: 7215-7220.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.; Schmidt, E.E.; Peratta, D.; Sanfilippo, S.; Alvarez Rubianes, N.; Follmer, A.; Giovambattista, G. 2012. 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. *Jornada de Ciencia y Técnica 2012. "Proyectar y comunicar. Estrategias para la investigación en la UNLPam".* 18 de octubre. General Pico, UNLPam. ISBN 978-950-863-139-8.
- Baltian, L.R.; Follmer, A.V.; Delbonis, S.; Borrego, C.; Ripoli, M.V.; Schmidt, E.; Peratta, D.L.; Alvarez Rubianes, N.; Giovambattista, G. 2013. Asociación de polimorfismos del exón 2 del gen DRB3 del MHC bovino con resistencia susceptibilidad a Leucosis en una población Holstein de La Pampa. ISBN 978-950-863-207-4.
- Baltian, L.R.; Ripoli, M.V.; Giovambattista, G. 2014. Determinación de los motivos aminoacídicos presentes en los sitios de unión a los antígenos de los alelos del gen BoLA-DRB3 en una población Holstein de La Pampa y su asociación con mastitis. *Ciencia Veterinaria.* 16: 9-23.
- Baltian LR, Ripoli MV; Giovambattista G. 2014. Tema: "Asociación de cambios aminoacídicos del gen DRB3 y mastitis mediante conteo de células somáticas. XLIII Congreso Argentino de Genética. En carácter de asistente y expositor: modalidad póster . 19 al 21 de octubre de 2014. San Carlos de Bariloche. Argentina.
- Baltian, L.R.; Follmer, A.V.; Peratta, D.L.; Schmidth, E.E.; Severini, R.A.; Delbonis, S.; Borrego, C.; Alvarez Rubianez, N.; Ripoli, M.V.; Giovambattista, G. 2016. Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 asociados con resistencia/ susceptibilidad a leucosis en ganado Holstein de La Pampa. *Ciencia Veterinaria.* 18: 9-28.
- Blattman, A.N.; Hulme, D.J.; Kinghorn, B.P.; Woolaston, R.R.; Gray, G.D.; Beh, K.J. 1993. A search for associations between major histocompatibility complex restriction fragment length polymorphism bands and resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Anim Genet.* 24 (4):277-282.
- Castro, G.S.; Trujillo, E.B.; Durán, C.V. 2006. Polimorfismos del gen BoLA-DRB3 en el bovino sintético colombiano Lucerna y asociación con conteo de células somáticas y mastitis. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19 (3): 270-279.
- Chaves, J. 2010. *Sistemas de producción lechera de Argentina y Cuba. Calidad de leche y mastitis bovina.* Buenos Aires.
- Chardon P, Renard C, y Vaiman M. 1999. The Major Histocompatibility Complex in swine. *Immunol Rev.* 167:179-192

- Díaz, S.; Ripoli, M.V.; Peral García, P.; Giovambattista, G. 2010. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. En Giovambattista, G.; Peral García, P. *Genética de Animales Domésticos*. 1° Ed. Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter-Médica. p. 157-178.
- Dietz, A.B.; Detilleux, J.C.; Freeman, A.E.; Kelley, D.H.; Stabel, J.R.; Kehrl, M.E. 1997b. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 80: 400-405.
- Do Nascimento, C.S.; Machado, M.A; Martinez, M.L.; Barbosa Da Silva, M.V.G, Martins Guimarães, M.F.; Campos, A.L.; Sousa Azevedo, A.L.; Teodoro, R.L.; Da Silva Verneque, R.; Fancioni Guimarães, S.E.; Andrade Oliveira, D.A. 2006. 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*). *Genet Mol Biol.* 29 (4):641-647.
- Eder, C.; Curik, I.; Brem, G; Cramer, R; Bodo, I.; Habe, F.; Lazary, S.; Solkner, J.; Marti, E. 2001. Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. *Equine Vet J.* 33 (7): 714-720.
- Goszczynski, D.; Ripoli, M.V.; Takeshima, S.; Baltian, L.; Aida, Y.; Giovambattista, G. 2014. Haplotype determination of the upstream regulatory region and the second exon of the BoLA-DRB3 gene in Holstein cattle. *Tissue Antigens.* 83(3):180-183. DOI: 10.1111/tan.12293
- Heeschen, H.W. Somatic Cells as an Indicator of Milk Hygiene : Scientific Basis and The EU Approach. In NMC 44th Annual Meeting Proceedings. Orlando Florida, USA. 2005; 52–72.
- Juliarena, M.A.; Poli M.; Sala, L.; Ceriani, C.; Gutiérrez, S.M.; Dolcini, G.; Rodríguez, E.M.; Mariño, B.; Rodríguez Dubra, C.; Esteban, E.N. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim. Genet.* 39: 432-438.
- Machado, M.A.; Nascimento, C.S.; Martínez, M.L.; Silva, M.V.G.B.; Campos, A.L.; Teodoro, R. L.; Verneque, R.S.; Guimarães, S.E.F. 2005. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. *Arq. Bras. Med Vet Zootec.* 57:380-389
- Maillard, J.C.; Chantal, I.; Berthier, D.; Thevenon, S.; Sidibe, I.; Razafindraibe, H. 2002. Molecular immunogenetics in susceptibility to bovine dermatophilosis: a candidate gene approach and a concrete field application. *Ann N Y Acad Sci.* 969: 92-96.
- Martínez, R.; Toro, R.; Montoya, F.; Burbano, M.; Tobon, J.; Gallego, J.; Ariza, F. 2005. Caracterización del locus BoLA-DRB3 en ganado criollo Colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch Zootec.* 54: 349-356.
- Martinez, M.L.; Machado, M.A; Nascimento, C.S.; Silva, M.V.G.B.; Teodoro, R.L.; urlong, J.; Prata, M.C.A.; Campos, A.L.; Guimaraes, M.F.M.; Azevedo, A.L.S.; Pires, M.F.A.; Verneque, R.S. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet Mol Res.* 5 (3): 513-524.
- Mirsky, M.L.; Olmstead, C.; Da, Y.; Lewin, H.A. 1998. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Anim Genet.* 29(4):245-252.
- Oltenu, P.A.; Broom, D.M. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare.* 19(S): 39-49 ISSN 0962-7286.
- Outteridge, P.M.; Andersson, L.; Douch, P.G; Green, R.S.; Gwakisa, P.S; Hohenhaus, M.A.; Mikko, S. 1996. The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: application to nematode parasite resistance. *Immunol Cell Biol.* 74 (4): 330-336.
- Park, Y.H.; Joo, Y.S.; Park, J.Y.; Moon, J.S.; Kim, S.H.; Kwon, N.H.; Ahn, J.S.; Davis, W.C.; Davies, C.J. 2004. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis resistant and susceptible cows. *J Vet Sci.* 5 (1):29-39.
- Pani, C.J.; Suzuki, K.; Echeverria, M.G.; Serena, M.S.; Metz, G.E.; Gonzalez, E.T. 2009. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with resistance and susceptibility to persistent lymphocytosis in BLV infected Cattle Argentina. *Internac. Dairy J.* 4: 123-128.

- Pashmi, M.; Qanbari, S.; Ghorashi, S.A, Sharifi, A.R, Simianer, H. 2009a. Analysis of relationship between bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. *J Anim Breed Genet.* 126:296-303.
- Philpot WN, Nickerson SC. Mastitis. 1992. El contra ataque. Babson Brothers Co. Baton Rouge. EUA.
- Ripoli María Verónica, Shin-nosuke Takeshima, Laura Baltian, Yoko Aida Guillermo Giovambattista. 2012. Haplotype determination of upstream regulatory región and the second exón of bovine DRB3 gene. Major Histocompatibility Complex. Oficial journal of japanese Society for Histocompatibility an Immunogenetics. Vol. 19 N° 2. Tokio, Japón. ISSN 21869995.
- Rupp, R.; Hernandez, A.; Mallard, B.A. 2007. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci.* 90:1029-1038.
- Spooner, R.L.; Leveziel, H.; Grosclaude, F.; Oliver, R.A.; Vaiman, M. 1978. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *J. Immunogenet.* 5: 325-346.
- Takeshima, S.N.; Aida, Y. 2006. Structure function and disease susceptibility of the bovine mayor histocompatibility complex. *Anim. Sci. J.* 77: 138-150.
- Takeshima, S.N.; Matsumoto, Y.; Aida, Y. 2009. Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence- based typing method for genotyping cattles major histocompatibility complex clase II BRB3 (Short communication). *J Dairy Sci.* Jun; 92 (6): 2965 -70.
- Van Eijk, M.J.; Stewart Haynes, J.A.; Lewin, H.A. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.* 23(6):483-496.
- [Xu, A.](#); [van Eijk, M.J.](#); [Park, C.](#); [Lewin, H.A.](#) 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* 151(12): 6977-6985
- Yoshida, T.; Furuta, H.; Kondo, Y.; Mukoyama, H. 2012. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Anim Sci J.* 83(5):359-366.
- Zambrano, J.C.; Echeverri, J.Z.; López, A.H. 2009b. Asociación de los alelos del gen BoLA DRB3.2 con características productivas en vacas del ható Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Colom. Cien. Pecu.* Vol 22. No. 3.