



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA GENÉTICA A LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DE ARTERITIS EQUINA (AVE)**

**MEDIANTE EL ESTUDIO DE GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) EQUINO**

Med.Vet. Paula Belén Kalemkerian

Directora: Dra. María Gabriela Echeverría

Codirectora: Dra. Silvina Díaz

Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N Dulout”

Miembros del jurado

Dra. Gabriela Iglesias

Dra. Magdalena Rambeaud

Dra. Mariana Kienast

Año 2014

Reconocimientos y Agradecimientos

El presente trabajo sólo fue posible gracias a la dirección, apoyo y guía de mis directoras, Dra. María Gabriela Echeverría y Dra. Silvina Díaz.

La tesista y directoras expresan su reconocimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, especialmente al Laboratorio de Virología y al Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” IGEVET (ex CIGEBA).

Este trabajo de Tesis Doctoral fue financiado por el proyecto PICT2004 N° 20769 “Asociación entre Loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad y Resistencia/Susceptibilidad a la Infección por el Virus de Arteritis Equina” de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, FONCYT.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

- KALEMKERIAN P.; METZ G.; PERAL GARCÍA P.; LÓPEZ- CAPPÀ J.; ECHEVERRÍA M.; GIOVAMBATTISTA G.; DÍAZ S. (2011) Eca20 microsatellite polymorphisms in equine viral arteritis-infected horses from Argentina. *Tissue Antigens* 78: 281-284.

- KALEMKERIAN P.; METZ G.; PERAL GARCÍA P.; ECHEVERRÍA M.; GIOVAMBATTISTA G., DÍAZ S. (2012) ELA-DRA polymorphisms are not associated to equine arteritis virus infection in horses from Argentina. *Research in Veterinary Sciences* 93: 1271- 1273.

Indice de contenidos

	página
Resumen	1
Abstract	3
1- Introducción	5
1-1. Susceptibilidad genética a enfermedades infecciosas	5
1-2. Genes candidatos para el estudio de resistencia/susceptibilidad genética: los loci del MHC	10
1-2.1. Genes de la región de Clase I	13
1-2.2. Genes de la región de Clase II	14
ELA-DRA	16
ELA-DQA	17
ELA-DQB	18
ELA-DRB	18
1-2.3. Genes de la región de Clase III	19
TNF-α	19
1-2.4. Microsatélites ligados al MHC	20
1-3. Arteritis Viral Equina (AVE)	21
2- Hipótesis	26
3- Objetivos	27
3-1. Objetivo general	27
3-2. Objetivos específicos	27
4- Materiales y Métodos	29
4-1. Material animal y extracción de ADN genómico	29
4-2. Tipificación de marcadores de tipo microsatélites (STRs)	30
4-3. Tipificación de genes estructurales	32

4-3.1. Detección de SNPs por pirosecuenciación	36
4-4. Análisis estadístico	40
4-4.1. Análisis poblacional	40
4-4.2. Análisis de asociación	40
5- Resultados y Discusión	42
5-1. Ubicación de los marcadores en el mapa del Eca20	42
5-2. Detección y Análisis del Polimorfismo de los marcadores del Eca20	43
5-2.1. Microsatélites (Marcadores STRs)	43
5-2.2. ELA-DRA (ELA de Clase II)	47
5-2.3. TNF- α (ELA de Clase III)	51
5-3. Análisis de asociación	55
5-3.1. Análisis de Asociación con los Marcadores del ELA	55
5-3.2. Análisis de Asociación con el gen ELA-DRA	58
5-3.3. Análisis de Asociación con el gen TNF- α	61
5-3.4. Haplotipos	63
6 - Conclusiones	65
7 - Bibliografía	68

Indice de tablas y figuras

	página
Tabla 1	31
Tabla 2	33
Tabla 3	35
Tabla 4	47
Tabla 5	50
Tabla 6	52
Tabla 7	55
Tabla 8	56
Tabla 9	59
Tabla 10	60
Tabla 11	62
Figura 1	12
Figura 2	37
Figura 3	38
Figura 4	39
Figura 5	43
Figura 6	44
Figura 7	48
Figura 8	49
Figura 9	52
Figura 10	54

Abreviaturas y símbolos

AVE: arteritis viral equina
dNTPs: dinucleótidos trifosfatos
ECA: o Eca
EDTA: ácido etil diamin tetra acético
ELA: *equine lymphocyte antigen*
EVA: *equine viral arteritis*
He: hipótesis esperada
HLA: *human lymphocyte antigen*
Ho: hipótesis observada
HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg
LD: desequilibrio de ligamiento
Mb: mega bases
µg: microgramos
µM: micromol
MHC: *major histocompatibility antigen*
ml: mililitro
Mm: milimoles
Na: número de alelos
OR: *odds ratio*
Pb: pares de bases
PBS: *peptide binding site*
PCR: *polymerase chain reaction*
PPi: pirofosfato
RFLP: *restriction fragment length polymorphism*
RR: riesgo relativo
SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Animal
SNP: *single nucleotide polymorphism*
SSCP: *single strand conformation polymorphism*
STR: *single tandem repeat*
TNFα: *tumor necrosis factor alpha*
VAE: virus de arteritis equina

DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA GENÉTICA A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE ARTERITIS EQUINA (AVE) MEDIANTE EL ESTUDIO DE GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) EQUINO

Palabras claves: Susceptibilidad genética, Complejo Mayor de Histocompatibilidad, Arteritis Viral Equina

Resumen

Las enfermedades infecciosas son resultado de una interacción compleja entre el agente patógeno infeccioso, condiciones del medio ambiente y factores dependientes del hospedador. La arteritis viral equina (AVE) es una enfermedad que afecta a los equinos y puede producir enfermedad subclínica, signos respiratorios o abortos, en la cual entre un 10 y 70% de los padrillos infectados pueden convertirse en portadores persistentes. Esta diferencia de susceptibilidad a la infección podría explicarse por diferencias en la constitución genética. Los estudios de asociación genética permiten detectar los genes involucrados mediante la comparación de variantes génicas en los individuos infectados y no infectados. Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, según sus siglas en inglés) son los principales candidatos para estos estudios de asociación, dado que codifican proteínas que desempeñan una función en la respuesta inmune innata y adaptativa. El objetivo del trabajo consistió en identificar posibles asociaciones entre genes del MHC equino y resistencia/susceptibilidad a la infección por el virus de arteritis equina. Se

seleccionaron muestras de sangre y suero de equinos previamente clasificados como seronegativos o seropositivos a AVE. Se tipificaron los genes ELA-DRA y TNF- α y los marcadores microsatélites Lex52, UM011 y TKY008, localizados en el MHC equino. Se estimaron las frecuencias génicas y genotípicas y se construyeron los mapas de desequilibrio de ligamiento para determinar haplotipos. La comparación de frecuencias y la estimación de asociación realizada por el denominado "odds ratio" en los grupos seropositivo y seronegativo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los caballos infectados y no infectados y no se pudo establecer asociación entre la condición serológica y los polimorfismos estudiados. No obstante, algunas combinaciones genotípicas y haplotípicas mostraron diferencias en la incidencia entre ambos grupos, por lo que los resultados no son concluyentes y debería extenderse el tamaño de la muestra y genotipificar marcadores y/o genes adicionales para determinar el origen de las diferencias de susceptibilidad observadas.

DETERMINATION OF SUSCEPTIBILITY / RESISTANCE GENE INFECTION OF EQUINE ARTERITIS VIRUS THROUGH THE STUDY OF EQUINE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX (MHC) GENES

Key words: Genetic susceptibility, Major histocompatibility complex, equine viral arteritis

Abstract

Infectious diseases are the result of a complex interaction between the infectious pathogen, environmental conditions and host-dependent factors. Several susceptibility differences could be found among individuals of the same population, exposed to the same infectious agent that could be explained by genetic differences. Equine viral arteritis (EVA) is a disease that affects horses causing a systemic infection with variable symptoms, from subclinical infection to respiratory distress and abortions. Between 10 to 70% of the infected stallions can become persistent carriers and spread the virus through the semen. This difference in susceptibility to infection could be explained by differences in genetic constitution. The genetic association studies allow detecting genes involved in the disease by comparing gene variants in infected and uninfected individuals. The genes of the Major Histocompatibility Complex (MHC) are prime candidates for these association studies, given that they encode proteins that play a role in innate and adaptive immune responses. The aim of the study was to identify possible associations between equine MHC genes and resistance / susceptibility to infection with equine arteritis virus. Blood and serum samples from horses previously classified as seronegative or seropositive to EVA were selected. ELA-DRA and TNF- α genes

and microsatellite markers Lex52, UM011 and TKY008, located in the equine MHC were typed. Gene and genotype frequencies were estimated and linkage disequilibrium maps were constructed to determine haplotypes. Comparison of frequencies and odds ratio in EAV-positive and EAV-negative groups showed no statistically significant differences between infected and uninfected horses and could not be established association between serological status and polymorphisms studied. However, certain genotypic and haplotype combinations showed differences in incidence between the two groups, so the results are not conclusive and should extend the sample size and genotyping additional markers and/or other genes to determine the origin of the observed differences in susceptibility.

1- Introducción

1-1. Susceptibilidad genética a enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son resultado de una interacción compleja entre el agente patógeno infeccioso (microorganismo), condiciones del medio ambiente y factores dependientes del hospedador. Cuando se analiza una determinada enfermedad infecciosa en una población expuesta al mismo agente infeccioso se suelen hallar diferencias de susceptibilidad en los distintos individuos, que en parte pueden explicarse por diferencias genéticas (Hill, 1999; Thursz, 2000; Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005; Clementi y Di Gianantonio, 2006).

Se ha demostrado en distintas especies que la variación individual en la constitución genética influye marcadamente en el curso de varias enfermedades causadas por microorganismos infecciosos (Hill, 1999), por lo que resulta de suma importancia identificar aquellos genes que influyen en la evolución de la enfermedad. Se denominan genes de susceptibilidad a aquellos genes que presentan mutaciones que generan variaciones que alteran el riesgo de ocurrencia de una enfermedad infecciosa (Díaz y col., 2005). Estas mutaciones pueden ocurrir en regiones codificantes de los genes, por ejemplo cambios en las regiones de reconocimiento de antígenos que afectan la interacción antígeno-anticuerpo, mutaciones en genes que regulan la expresión de otros genes, o en regiones no codificantes, como las que intervienen en el corte y empalme de intrón y exón (*splicing*), o las regiones promotoras, que controlan la transcripción de los genes y de esta manera modifican sus

niveles de expresión (Díaz y col., 2005).

Sin embargo, la mayoría de las enfermedades infecciosas suceden como consecuencia de la interacción de caracteres genéticos complejos, por lo que cada variante genética individual tiene sólo un efecto modesto y es a través de la interacción de estas distintas variantes como se determina el resultado de la infección (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005), y en estos casos, el riesgo se mide de manera probabilística (Salas y Carracedo, 2007).

Existen distintas maneras de analizar el componente genético del hospedador que contribuyen a determinar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Hill, 1998; 1999) las que en términos generales consisten en metodologías para localizar las variantes genéticas que influyen el riesgo de enfermedad empleando estrategias de identificación de genes involucrados en la determinación de susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas (Díaz y col., 2005).

Uno de ellos es el denominado “Rastreo de genoma”; mediante este método se realiza una búsqueda en todo el genoma a través de la cual se localizan y luego identifican genes principales que afectan la susceptibilidad o resistencia. Consiste en un análisis de ligamiento inicial, seguido por un estudio de asociación para la identificación del gen (Hill, 1998). Se seleccionan marcadores genéticos altamente variables, generalmente de tipo microsatélite (secuencias repetidas en tándem), distribuidos en todo el genoma o en un cromosoma determinado y se realiza un análisis de ligamiento para identificar el o los marcadores que estén relacionados con la susceptibilidad a la enfermedad (Díaz y col., 2005). De esta manera, se localiza (mapea) la región cromosómica asociada a susceptibilidad (Hill, 1999). A continuación se realiza un estudio de asociación para identificar los genes que

segregan en forma conjunta con el marcador y posteriormente se determina cuáles de ellos, según su función, podrían influir en la susceptibilidad/resistencia a la enfermedad en cuestión (Hill, 1999).

Este método permite que genes desconocidos puedan ser mapeados e identificados sin información previa acerca de su función (Hill, 1999). Requiere el estudio de muchas familias con hermanos afectados para obtener una evidencia sólida de ligamiento, pero en el caso de enfermedades infecciosas poligénicas, presenta menor poder para la detección que los estudios de asociación (Hill, 1998). El poder estadístico de este método es generalmente menor que en el estudio de tipo caso-control (Hill, 1999). En casos en los que la susceptibilidad a una enfermedad depende de gran número de genes con pequeño efecto aditivo, puede no detectarse por el análisis de ligamiento. Sin embargo, permite mediante el rastreo del genoma, orientar la búsqueda hacia genes de susceptibilidad con mayor influencia o aquellos genes de mayor interés biológico (Hill, 1999).

El análisis de ligamiento resulta sumamente útil en casos de enfermedades debidas a un único gen, pero también se ha aplicado a rasgos complejos. Es más exitoso con tamaños de muestras grandes y en mapeos con alta densidad de marcadores (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005). Brindan más información los escaneos de ligamiento de Polimorfismo de Nucleótido Simple (o SNPs por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), u otros sets de marcadores de genotipo definido que los escaneos tradicionales de microsatélites de 10 centiMorgan. Sin embargo, los estudios de asociación son más populares debido a que el ligamiento puede ser menos efectivo para identificar variantes comunes con efectos modestos (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005).

Otro método es el denominado “Estudio de asociación genética”, en el cual se

determinan y comparan frecuencias génicas o genotípicas de genes candidatos en individuos que presentan la enfermedad y en casos control o no afectados (Hill, 1998; 1999; Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005). Los estudios de caracteres dicotómicos en individuos no emparentados implican el test de frecuencias génicas o genotípicas entre individuos afectados contra no afectados mediante un test chi cuadrado o similar (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005).

Los genes candidatos deben presentar variantes que en la transcripción resulten en un cambio de aminoácido; los SNPs que implican sustitución de aminoácidos son más probables de ser deletéreos o beneficiosos evolutivamente y por lo tanto más probables de ser variantes funcionales que contribuyen a una enfermedad común (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005) y se seleccionan considerando aquellos que podrían tener una función en la fisiopatología e inmunología de la enfermedad de interés, lo que podría influir en la susceptibilidad/resistencia a esa enfermedad (Hill, 1999; Díaz y col., 2005).

El tipo más frecuente de variación genética es el SNP, que consiste en la sustitución de un único nucleótido en una secuencia determinada de ADN. Generalmente son bialélicos y presentan una baja tasa mutacional. La mayoría de estas variantes se encuentran en regiones no codificantes, pero aquellas que se localizan en un gen o en una región regulatoria podrían modificar la función de la proteína codificada por él, y por lo tanto podrían tener un rol en la susceptibilidad a enfermedades. Estas características hacen que los SNPs sean muy útiles como marcadores genéticos (Díaz y col., 2005).

También se utilizan para estos estudios SNPs localizados en regiones no exónicas conservadas en las distintas especies y que podrían pertenecer a secuencias regulatorias funcionalmente importantes (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005). Se requieren tamaños de

muestras grandes, en particular para los casos en que los genes son multialélicos o si presenta alelos poco frecuentes (Hill, 1999).

Puede analizarse la asociación con enfermedad en cada marcador de manera individual o en haplotipos de múltiples marcadores. El uso de los haplotipos es útil cuando los marcadores no tienen efecto detectable si se consideran individualmente, y permite testear simultáneamente muchas variantes causales, pero deben tener una fuerte interacción cuando están en *cis*. Además pueden testearse los haplotipos debido a que pueden estar próximos a marcadores causales no tipificados (Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005).

Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, según sus siglas en inglés) han sido los principales genes candidatos para estos estudios, habiéndose establecido asociaciones en varias enfermedades infecciosas en el hombre y en distintas especies animales: HLA-DR2 se asoció con susceptibilidad a tuberculosis y lepra, HLA-B53 se asoció con resistencia a malaria (de Vries y col, 1976; Singh y col., 1983).

Sin embargo, su utilidad es limitada, dado que se logran detectar sólo aquellas asociaciones fuertes y si existe heterogeneidad geográfica o racial en estos genes podría resultar en asociaciones falso-positivas o falso-negativas (Hill, 1998; 1999).

Una vez determinados los genotipos o haplotipos del gen analizado el estudio puede conducirse hacia:

- a) Análisis de segregación compleja que analiza la segregación de la enfermedad en familias multicasos y compara la probabilidad de diferentes formas de heredar la enfermedad (Díaz y col., 2005). Este modelo simula la transmisión

- de la enfermedad en familias donde se presentan múltiples casos y compara la probabilidad de heredar la enfermedad por diferentes vías (Hill, 1998);
- b) La comparación del número observado de alelos compartidos con el número esperado por herencia mendeliana simple, en pares de hermanos enteros (Díaz y col., 2005);
 - c) El análisis de ligamiento, el que incorpora los efectos de recombinación en las generaciones anteriores para determinar la localización génica (Díaz y col., 2005);
 - d) Estudio de ligamiento genético, busca la segregación conjunta de un marcador genético con enfermedad en familias (Hill, 1999).

Una aproximación alternativa para guiar la selección de marcadores en el gen o región de interés es el desequilibrio de ligamiento (LD por sus siglas en inglés *linkage disequilibrium*). Es posible determinar patrones de LD y luego seleccionar una fracción de SNPs que indiquen (o etiqueten) la mayoría de las restantes variantes.

1-2. Genes candidatos para el estudio de resistencia/susceptibilidad genética: los loci del MHC.

Los principales genes candidatos para los estudios de asociación con enfermedades infecciosas son aquellos que codifican proteínas que intervienen en la respuesta inmune innata y adaptativa. El MHC equino, denominado ELA (*Equine Lymphocyte Antigen*, por sus

siglas en inglés) (Marti y col., 1996; Bailey y col., 2000), es una región de alrededor de 4Mb localizada en el cromosoma 20 -Eca20- que agrupa genes que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa. La estructura es similar a la de otras especies, pero de secuencia inversa con relación al centrómero (Ansari y col., 1988; Mäkinen y col., 1989; Bailey y col., 2000; Gustafson Seabury, 2005; Tizard, 2009).

La función principal de las moléculas glucoproteicas codificadas por los genes del MHC es actuar como receptores que unen y presentan antígenos procesados en el interior de las células a las células efectoras del sistema inmune, principalmente linfocitos T, que reconocen esos antígenos mediante sus receptores y dan inicio a la respuesta inmune adquirida (Tizard, 2009). Cada alelo codifica para una molécula que puede unirse a diferentes péptidos antigénicos, debido a que el lugar de unión al antígeno es relativamente inespecífico, pero aquellas moléculas extrañas que no puedan ubicarse en el surco de una molécula del MHC no estimulan la inmunidad adquirida (Tizard, 2009). De esta forma, los alelos del MHC determinan la resistencia o susceptibilidad a las enfermedades infecciosas; cuanto más variado sea el MHC de un animal, podrá responder a más antígenos. Por esta razón, los individuos heterocigotas para el MHC tienen mejor capacidad para sobrevivir a las enfermedades infecciosas que los homocigotas. El elevado polimorfismo de algunos loci permitiría una protección a la población en su conjunto (Tizard, 2009).

El MHC presenta una organización genética particular, que se conserva en distintas especies. Una de las características es su agrupación en tres regiones no solapadas, denominadas Clase I, Clase II y Clase III -Figura 1- (Gustafson Seabury, 2005).

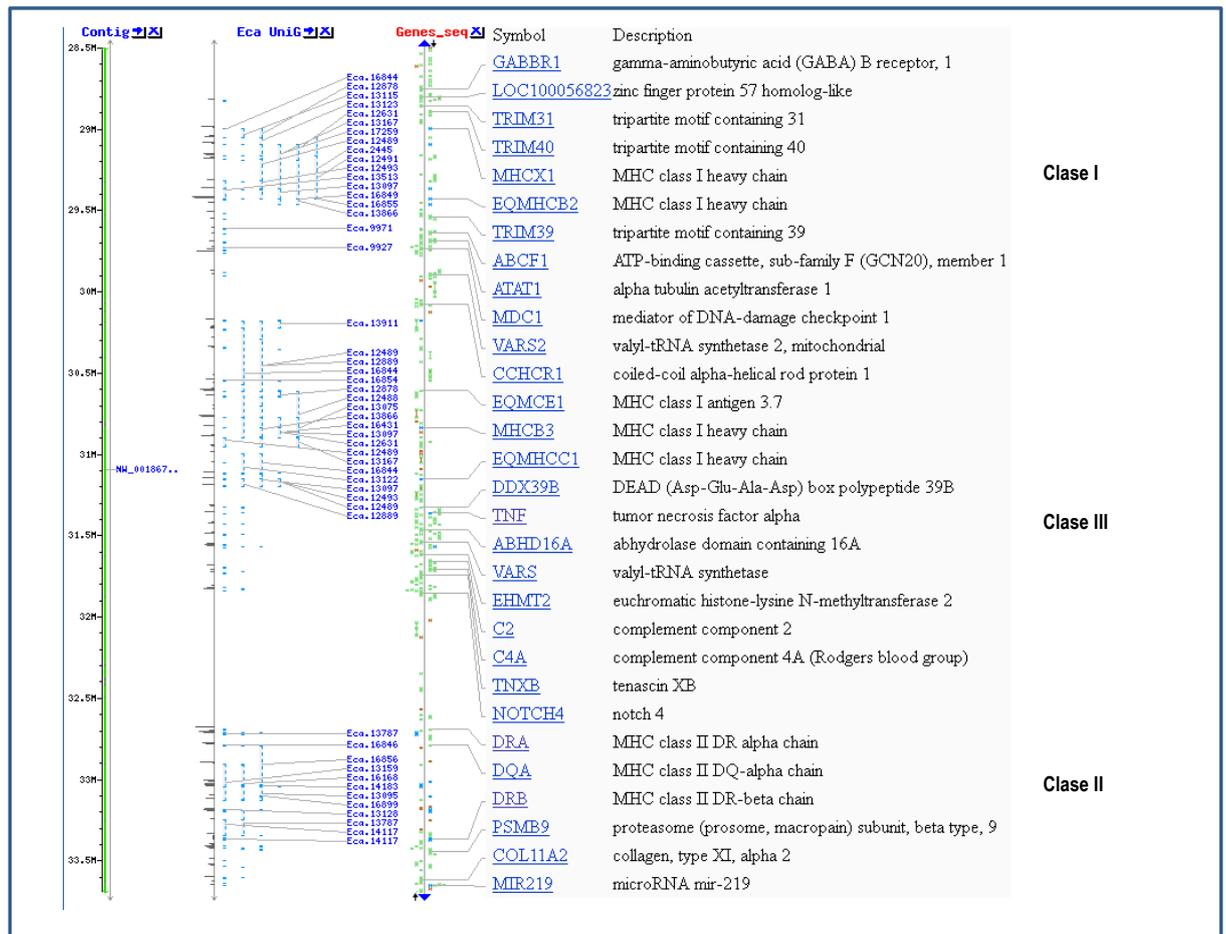


Figura 1. Mapa parcial del cromosoma 20 (Eca20) mostrando el Complejo Principal de Histocompatibilidad equino (ELA). En la figura se muestra la región comprendida entre 28,500K – 33,700K. Se indican a la derecha las ubicaciones de los genes agrupados en Clase I, Clase II y Clase III. Nota: este mapa esta actualizado al 05/11/14. La información contenida en el genoma del caballo fue publicada en 2009 (fuente: GenBank www.ncbi.gov.ar).

1-2.1. Genes de la región de Clase I

La región Clase I codifica moléculas formadas por dos cadenas glucoproteicas unidas: alfa, inserta en la membrana celular, y beta microglobulina, más pequeña, que no cruza la membrana (Marti y col., 1996), codificada por un gen no localizado dentro del MHC (Tallmadge y col., 2003). Esta región, a su vez, se clasifica en subregiones Ia (clásica), Ib, Ic y Id. La región Ia es altamente polimórfica. Consta de cinco dominios (segmentos), de los cuales tres son extracelulares, uno es transmembrana y el otro dominio es citoplasmático. El mayor grado de polimorfismo se encuentra en los dominios extracelulares 1 y 2 de la cadena alfa, donde se localiza el sitio de unión al antígeno. Se expresan en la mayoría de las células nucleadas del organismo (Janeway y col., 2001; Tizard, 2009). En caballos también se expresan en una subpoblación de células trofoblásticas (Marti y col., 1996). Su función es presentar péptidos derivados de proteínas intracelulares (principalmente procedentes de virus o bacterias que viven en el citoplasma de la célula infectada) a los linfocitos T CD8+ citotóxicos (Janeway y col., 2001; Gustafson Seabury, 2005). Las regiones Ib, Ic y Id presentan menor polimorfismo que la región Ia y se desconocen sus funciones específicas (Gustafson Seabury, 2005). Los loci Clase Id se localizan en un cromosoma diferente al del cluster del MHC (Tizard, 2009). No todos los loci Clase I son funcionales, muchos son pseudogenes y fragmentos de genes que no se expresan (Gustafson Seabury, 2005; Tizard, 2009).

Los genes del MHC Clase I y Clase II son codominantes y presentan un alto grado de polimorfismo dentro de la secuencia de nucleótidos que codifican la región de unión a péptido de la proteína respectiva. Esto permitiría unir y presentar un mayor rango de

péptidos antigénicos a las células T. Por lo tanto, la heterocigosis dentro del sitio de unión al antígeno podría potencialmente proteger al individuo de un espectro más amplio de organismos patógenos (Gustafson Seabury, 2005). En estas regiones, el número de loci es variable, pero no todos son funcionales, sino que algunos son pseudogenes o fragmentos génicos que no se expresan (Tizard, 2009), pero participan en la generación de diversidad en los genes funcionales a través de la conversión de genes interlocus (Gustafson Seabury, 2005; Tizard, 2009).

El polimorfismo de estos genes se ha caracterizado mediante la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (o RFLP por sus siglas en Inglés, *Restriction fragment length polymorphism*), por lo que se identificaron alrededor de 20 y 30 genes y pseudogenes ELA Clase I (Barbis y col., 1994; Ellis y col., 1995; Carpenter y col., 2001; Gustafson Seabury, 2005). El primer locus identificado se denominó ELA-A y demostró incluir 17 alelos, que se designaron A1-A10, A14, A15, A19. Provisoriamente se agregaron W16, W17, W18 y W20 y posteriormente se hallaron los loci ELA-B y ELA-C, menos polimórficos (Bailey y col., 2000).

1-2.2. Genes de la región de Clase II

Los genes Clase II funcionales codifican las glicoproteínas de superficie celular alfa y beta, similares a las moléculas de Clase I, que forman un heterodímero (Gustafson Seabury, 2005). Las dos cadenas tienen dos dominios extracelulares, un péptido de conexión, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (Tizard, 2009). A estas cadenas se asocia posteriormente una tercera, denominada gama o cadena invariable (Ii), no

polimórfica, que ocupa el sitio de unión al antígeno estabilizando la molécula, hasta que se une el péptido antigénico (Gustafson Seabury, 2005). Los dominios 1 de ambas cadenas configuran un surco que actúa como sitio de unión al antígeno. El polimorfismo en los genes resulta en variaciones en los aminoácidos que forman los lados del surco (Tizard, 2009), lo que determina cambios de configuración que permite que se unan distintos antígenos. Las moléculas de Clase II del MHC se expresan constitutivamente en células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) y, en caballos y algunas otras especies, también en linfocitos T en reposo (CD4+ y CD8+) (Marti y col., 1996; Gustafson Seabury, 2005; Tizard, 2009). Existen cinco grupos ortólogos de genes Clase II conservados en los mamíferos: DP, DM, DO, DQ y DR. Gen Ortólogo es aquel que deriva de un único ancestro y no ha experimentado reorganizaciones importantes durante la evolución (Tizard, 2009). Los loci DP, DQ y DR se denominan genes de Clase II clásicos y codifican receptores que presentan antígenos peptídicos derivados de antígenos extracelulares extraños fagocitados a los linfocitos T CD4+. Los loci DO y DM son Clase II no clásicos y están involucrados en la carga de péptidos a las moléculas de Clase II (Janeway y col., 2001; Gustafson Seabury, 2005).

En los genes funcionales del MHC de Clase II, el exón 2 codifica aminoácidos asociados con sitios de unión peptídica (PBS por sus siglas en inglés *Peptide Binding Site*) en el primer dominio de la molécula (Brown y col., 1993). Previamente, los genes DRA fueron catalogados como conservados en la mayoría de las especies de mamíferos (Ellis y Ballingal, 1999). Los polimorfismos de secuencia del gen DRA se observaron en *water buffalo* (Sena y col., 2003) y macacos (de Groot y col., 2004). En *Equidae*, el polimorfismo extensivo se reportó en diversas especies (Albright-Fraser y col., 1996; Brown y col., 2004; Díaz y col.,

2008; Janova y col., 2009; Kamath y Getz, 2011), en las que se detectaron 17 alelos, 4 de ellos exclusivos de las razas de caballos domésticos.

ELA-DRA

Es un único locus que codifica la cadena alfa del receptor DR (Luis y col., 2005). A diferencia de otras especies, el locus DRA es polimórfico en el caballo. El segundo exón, que codifica para la región de unión al antígeno, es el más variable. Presenta al menos 17 alelos (Janova y col., 2009) en especies del género *Equus* filogenéticamente relacionadas, incluyendo el caballo doméstico (*E. caballus*). En distintas razas de caballos se hallaron cinco alelos (Bailey y col., 2000): DRA*0101, DRA*0201 y DRA*0301 (antes denominados DRA(2) 1, 2 y 3, respectivamente) (Marti y col., 1996; Bailey y col., 2000), detectados mediante Polimorfismos de Conformación de Cadena Simple (SSCP por sus siglas en inglés, *Single Strand Conformation Polymorphsim*) y confirmados por secuenciación de ADN (Albright-Fraser y col., 1996; Luis y col., 2005), y mediante pirosecuenciación (Díaz y col., 2008); ELA-DRA*JBH11, hallado mediante análisis de conformación de cadena y confirmación por secuenciación (Brown y col., 2004) y DRA*Hld105, detectado por secuenciación (Arbanasic y col., 2009). De estos alelos, DRA*0101 también fue hallado en otras especies del género *Equus* (*E. asinus* y *E. hemionus*) (Albright-Fraser y col., 1996), si bien no pudo confirmarse en un estudio posterior (Brown y col., 2004). La mayoría de los alelos se diferencian por cambios de una única base, y resultan en sustituciones de aminoácidos en la región putativa de unión al antígeno de la molécula (Albright-Fraser y col., 1996), con la excepción del alelo ELA-DRA*JBH11, que comparte la misma secuencia de aminoácidos que los alelos especie-

específicos ELA-DRA*JBZ185 (*E. hemionus/E. boehmi*), ELA-DRA*JBH45 y ELA-DRA*0501 (*E. asinus*). También el último alelo hallado, DRA*Hld105, comparte la misma secuencia de aminoácidos que el alelo DRA*JBD3, específico de burros (Arbanasic y col., 2009). Estos polimorfismos podrían afectar la capacidad de unión al antígeno del receptor DR (Albright-Fraser y col., 1996). La identificación de los alelos ELA-DRA se basa en los polimorfismos del exón 2, dado que las restantes secuencias del gen están altamente conservadas. La nomenclatura revisada recientemente identifica a los alelos del exón 2 del locus ELA-DRA (Andersson y col., 2012), más frecuentes como *ELA-DRA*1*, *ELA-DRA*2* y *ELA-DRA*3* (Num. Acc. JN035631, JN035630 y JN035629, respectivamente).

ELA-DQA

La primera secuencia del gen DQA de caballos fue reportada por Szalai y col., 1994, y se denominó posteriormente DQA*0101 (Fraser y Bailey, 1998). El segundo exón de DQA, que codifica para el dominio de unión al antígeno de la molécula, presenta elevado polimorfismo (Marti y col., 1996). Se describieron 24 alelos en el género *Equus*, determinados mediante SSCP y confirmados por secuenciación (Fraser y Bailey, 1998), y posteriormente se detectaron 13 nuevos alelos mediante secuenciación (Janova y col., 2009). De estos alelos, 14 se encuentran en el caballo, denominados DQA*0201-1501 (Fraser y Bailey, 1998) y DQA*1901-2401 (Bailey y col., 2000). El alelo DQA*0501 también se halló en caballos Przewalski. Los alelos DQA*1601, *1701 y *1801 resultaron especie específicos de onagro, asno silvestre somalí y asno doméstico, respectivamente (Fraser y Bailey, 1998).

Se halló evidencia de un segundo locus DQA, detectado por SSCP (Fraser y Bailey, 1998) y luego confirmado mediante análisis Southern blot (Gustafson Seabury, 2005). La mayoría de los alelos reportados pertenece a un mismo locus en el cromosoma 20, pero en individuos que presentan un tercer patrón de bandas, este siempre corresponde al alelo DQA*1301, que pertenecería a un segundo locus no ligado al MHC, dado que se hereda junto con otros dos alelos DQA. Estaría localizado en el cromosoma 5, en lugar del cromosoma 20 donde se encuentra el MHC (Fraser y Bailey, 1998; Bailey y col., 2000).

ELA-DQB

El análisis del segundo exón de ELA-DQB reveló que comprende 13 alelos pertenecientes a un mismo locus (Bailey y col., 2000). Los estudios posteriores realizados mediante la técnica de SSCP y Southern blot de los clones BAC de Clase II evidenciaron que existirían al menos dos loci ELA-DQB (Gustafson Seabury, 2005) y que los mismos se transcriben (Horin y Matiasovic, 2002). Actualmente el mapa de la región de Clase II muestra la existencia de al menos cinco genes DQB.

ELA-DRB

El gen DRB Codifica la cadena beta del heterodímero receptor DR (Brown y col., 1993). De manera similar a otras especies, en el caballo existen al menos tres loci DRB, confirmados mediante hibridización por Southern blot (Gustafson Seabury, 2005). Los primeros estudios previos (Fraser y Bailey, 1996; Hedrick y col., 1999) indicaban la presencia

de al menos 11 alelos pertenecientes a 2 o 3 loci (Bailey y col., 2000). Investigando otras razas y especies, Hedrick y col., (1999) describieron dos genes DRB en caballos andaluces y Przewalski y Díaz y col., (2001) describieron al menos tres loci DRB en caballos Criollo Argentino. Esta diferencia en el número de genes DRB en distintas razas podría deberse a diferencias entre haplotipos MHC (Gustafson Seabury, 2005). Actualmente el mapa de la región de Clase II muestra la existencia de cinco genes DRB (Figura 1), tres se transcriben y dos son pseudogenes.

1-2.3. Genes de la región de Clase III

Los genes de Clase III del MHC, localizados entre las regiones Clase I y II (Gustafson Seabury, 2005), codifican proteínas con distintas funciones, la mayoría relacionadas con la inmunidad innata, como factores de complemento C4, C2 y B, y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa, por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor*), linfotóxina alfa y algunos receptores de las células *natural killer*, entre otras (Tizard, 2009). Esta región se encuentra muy conservada entre las especies mamíferas en cuanto a contenido de genes y su ordenamiento (Gustafson Seabury, 2005).

TNF- α

Esta es una citoquina proinflamatoria sintetizada principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos (también por mastocitos, células endoteliales y fibroblastos). Estimula los cambios en las células endoteliales y su liberación local es responsable de los

signos cardinales de la inflamación (de Kossodo y col., 1992; Ksontini y col., 1998; Tizard, 2009). Es un mediador fundamental en la respuesta inmune del huésped contra infecciones bacterianas, virales, fúngicas o parasitarias. Promueve la adherencia, migración y activación de neutrófilos en el foco de infección y aumenta en ellos la capacidad de destrucción de microorganismos. Estimula la fagocitosis en macrófagos, aumenta la producción de oxidantes y amplifica la respuesta inflamatoria promoviendo la síntesis de otras citoquinas. Puede además inducir apoptosis en algunas líneas celulares tumorales y en células infectadas por virus (Moldawer, 2003; Tizard, 2009).

El gen que codifica para el TNF- α comprende 2.581 pares de bases (pb) en el cromosoma 20 equino (Eca20-LOC100033834 - NC_009163.2 posición 31358611.31361395), y en su organización posee cuatro exones (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=100033834) (Su y col., 1991). Los SNPs reportados (Matiasovic y col., 2002) se localizan en la región 5'UTR (promotor), y su posición se determinó en SNP₋₉₅ C/T, SNP₋₈₉ C/T, y en SNP₋₈₅ T/C con respecto a la base +1 (A) del sitio de inicio de la transcripción. Los rastreos de variabilidad realizados en caballos y burros mostraron frecuencias diferenciales además de LD, por lo que se pudieron identificar combinaciones haplotípicas en las razas y especies equinas estudiadas (Brown y col., 2006).

1-2.4. Microsatélites ligados al MHC

La alta diversidad de los genes de Clase I y Clase II del MHC de los vertebrados es un rasgo clave en la función que desempeñan en la presentación de antígenos en el sistema

inmune (Hughes y Nei, 1993). Sin embargo, en equinos la asignación de haplotipos del MHC a individuos continúa siendo un reto a pesar de los avances tecnológicos y del conocimiento del genoma equino. Los principales reportes en caballo doméstico corresponden a los haplotipos de los genes de Clase I (Tseng y col., 2010), basados inicialmente en los Talleres internacionales establecidos para identificar las especificidades serológicas para el ELA desde la década de 1980 (Lazary y col., 1988). La falta de descripciones completas de haplotipos equinos del MHC de Clase II y la falta de métodos específicos para haplotipos como en otras especies, determinan que la genotipificación basada en microsatélites del MHC (conocido por su sigla en inglés STR, *Single Tandem Repeat*) sea de utilidad para la tipificación indirecta (Kalemkerian y col., 2011). Dado que se utilizan microsatélites localizados dentro de, o cercanos a genes candidatos de interés, los STR pueden además aportar información acerca de la variabilidad genética y la estructura de la población, y puede ser también una estrategia valiosa para conocer los procesos de selección y evolutivos relacionados con la historia de las razas equinas. Para los propósitos de tipificación, los microsatélites también son herramientas valiosas porque exhiben alto número de alelos (polimorfismo) y de heterocigosis (Meagher y Potts, 1997; Tseng y col., 2010).

1-3. Arteritis Viral Equina (AVE)

Es una enfermedad distribuida en todo el mundo que afecta a los equinos (caballos, burros y mulas), producida por un virus envuelto con ARN de cadena simple y sentido positivo, miembro prototipo de la familia *Arteriviridae*. Se caracteriza por infectar principalmente células endoteliales, macrófagos y miocitos de vasos sanguíneos, y produce

necrosis de las paredes de las arterias de pequeño y mediano calibre (Carter y Wise, 2006).

El virus se disemina a través de excreciones y secreciones, incluyendo semen. La placenta, tejidos y líquidos de los fetos abortados infectados contienen también grandes cantidades de virus (Blood y Radostits, 1992). Se transmite por contacto directo o indirecto. La vía de contagio respiratoria es más común en animales jóvenes y la vía reproductiva es más común en adultos. La transmisión ocurre principalmente cuando los caballos se congregan en ventas, carreras y exposiciones, por tal razón los brotes frecuentemente se asocian con los hipódromos (Carter y Wise 2006; Echeverría y col., 2007; Metz y col., 2008).

Un alto porcentaje de los padrillos infectados pueden convertirse en portadores persistentes asintomáticos y diseminar el virus a través del semen durante períodos prolongados, el cual es infectante durante la reproducción natural o inclusive mediante inseminación artificial. Esta característica permite que se perpetúe la infección dentro de la población (Blood y Radostits, 1992; Del Piero, 2000; Carter y Wise, 2006).

La mayoría de las infecciones son subclínicas. Sin embargo y de acuerdo a la virulencia de la cepa y del estado del animal, pueden aparecer diversos signos clínicos que pueden ser muy variables. Con mayor frecuencia se presentan fiebre, anorexia, depresión, congestión e inflamación de mucosas nasal y conjuntival acompañadas por rinorrea y epífora y edema en párpados, extremidades y regiones declive, que puede extenderse hasta el prepucio y escroto. Otros signos menos frecuentes son erupciones cutáneas, rigidez al andar e inflamación de glándulas sexuales accesorias masculinas. En potrillos, y ocasionalmente en adultos, puede tener una evolución fatal caracterizada por disnea y distress respiratorio severo debidos a edema pulmonar, derrame pleural y neumonía (Blood y Radostits, 1992; Del Piero, 2000; Carter y Wise, 2006).

En yeguas preñadas puede producir abortos (Blood y Radostits, 1992; Carter y Wise, 2006; Del Piero, 2000) ocasionados por una miometritis necrotizante, que suele ocurrir entre los días 160 y 300 de gestación y de 12 a 30 días después de la exposición al virus. No hay signos premonitorios de aborto ni de retención placentaria.

El diagnóstico se realiza sobre la base del aislamiento del virus en cultivos celulares a partir de hisopados nasales u oculares (conjuntivales), sangre entera con anticoagulante, suero, tejidos fetales y semen de padrillos. Otra herramienta de diagnóstico importante es la seroconversión, es decir, la demostración del aumento significativo de anticuerpos específicos en suero entre las etapas aguda y convaleciente, medidos mediante el test de virusneutralización (Del Piero, 2000; Carter y Wise, 2006).

La condición de portador persistente de algunos padrillos determina restricciones para su uso como reproductores y para el movimiento nacional e internacional de animales y semen. Además, la inexistencia de tratamientos específicos y la facilidad de transmisión del virus, cuando se congregan caballos en eventos deportivos y exposiciones, determinan la importancia de la detección y erradicación de la enfermedad.

En la Argentina se detectaron por primera vez caballos con anticuerpos contra AVE en el año 1984 (Nosetto y col., 1984), sin embargo, el virus no había sido implicado en casos clínicos de enfermedad respiratoria ni se había detectado el virus en muestras de material de aborto o hisopados nasales (Echeverría y col., 2003). El siguiente reporte de la presencia viral ocurrió en 1998, cuando se detectaron animales con anticuerpos AVE positivos en dos establecimientos de cría de caballos de deporte que realizaban inseminación artificial con semen importado (Barrandeguy, 2010). Los haras involucrados fueron intervenidos por SENASA; se prohibió el movimiento de animales y se llevó a cabo un seguimiento serológico

desde los años 2001 a 2003, que reveló una alta prevalencia de la infección en esos establecimientos.

En el año 2001 se logró el aislamiento del virus a partir de una muestra de semen de un padrillo importado que se hallaba en el período de cuarentena obligatoria previa a la introducción al país. Este fue el primer reporte de aislamiento de AVE en Sudamérica (Echeverría y col., 2003).

A pesar de las medidas de vigilancia epidemiológica impuestas por SENASA, en el año 2010 se produjo el primer brote de la enfermedad clínica en la Argentina. Se aisló AVE de muestras de fetos abortados y de placentas, y de tejidos de un potrillo muerto con signos respiratorios. Del rastreo del origen de la enfermedad, surgió que estos animales se habrían infectado por vía respiratoria, ya que se hallaban alojados junto con yeguas seropositivas a AVE que habían sido inseminadas con semen importado de Holanda, del que se aisló el virus (Barrandeguy, 2010). Otros establecimientos utilizaron el mismo semen y todas las yeguas inseminadas resultaron seropositivas. El movimiento de animales en período de incubación o con infección subclínica y la exposición por vía respiratoria permitieron que se diseminara la infección (Barrandeguy, 2010).

Es escaso el conocimiento acerca de la respuesta inmune ante AVE. Se considera que en equinos los anticuerpos neutralizantes contra AVE desempeñan un importante rol en la inmunidad dado que su aparición en suero coincide con la recuperación clínica y la restricción de la excreción del virus. Además, se encontró que la transferencia pasiva de anticuerpos por calostro de yeguas inmunes a las crías, modera o evita la arteritis viral (McCollum, 1976). Sin embargo, el estudio realizado por Castillo Olivares y colaboradores (2003) sugiere que la actividad citolítica de las células T está restringida genéticamente,

aunque no se pudo determinar el genotipo de MHC de Clase I de los animales utilizados en el estudio. Además, otro estudio concluye que la infección con AVE resulta en la activación celular e incremento en la transcripción de los genes que codifican mediadores proinflamatorios, incluyendo interleuquinas y $TNF\alpha$, (Balasuriya y MacLachlan, 2004). Este estudio evidencia que las citoquinas son producidas por células infectadas por el virus, y que presumiblemente son críticas en la determinación del resultado de la infección.

Dado que hasta el momento no estaba permitida la vacunación y que ha habido escasos reportes de la presencia del virus en nuestro país, la población equina argentina no ha tenido contactos previos con el virus, por lo que es "ignorante" inmunológicamente y, por lo tanto, altamente susceptible (Barrandeguy, 2010). Sin embargo, en ninguno de los casos, la prevalencia alcanza a la totalidad de los animales, lo cual sugiere que existen diferencias individuales en la susceptibilidad a la infección. Esta variación individual en la respuesta a la infección, en parte, puede ser explicada por factores genéticos, por lo que es de suma importancia identificar los genes involucrados.

2- Hipótesis

Las variaciones individuales en la resistencia/susceptibilidad ante las infecciones virales estarían asociadas a determinados haplotipos del MHC.

3- Objetivos

Debido a que numerosos estudios demuestran asociaciones entre los haplotipos del MHC y susceptibilidad a enfermedades infecciosas, o presencia de alelos “protectores” frente a determinados agentes infecciosos en animales domésticos, se propone

3-1. Objetivo general

Identificar posibles asociaciones entre genes y/o haplotipos del MHC y resistencia/susceptibilidad a la infección por el Virus de Arteritis Equina (VAE), que brindará herramientas para seleccionar linajes resistentes con el fin de realizar control sanitario y prevención de la infección por el VAE, que podrían ser aplicables a otras enfermedades infecciosas equinas.

3-2. Objetivos específicos

1. Seleccionar la población de animales seropositivos y seronegativos a AVE para el estudio.
2. Detectar y analizar la variabilidad genética de genes candidatos del MHC en poblaciones equinas locales con incidencia de AVE.
3. Identificar haplotipos del ELA en las poblaciones analizadas.
4. Analizar la asociación a nivel de los alelos/haplotipos del ELA y la susceptibilidad/resistencia a la enfermedad.

5. Identificar los motivos aminoacídicos en los alelos asociados a susceptibilidad/resistencia genética para determinar la interacción con los péptidos virales.
6. Establecer métodos predictivos para la evaluación del riesgo de infección ante AVE mediante marcadores genéticos del MHC.
7. Desarrollar y aplicar métodos de tipificación genética de mediana y alta resolución que permitan predecir a nivel poblacional la resistencia/susceptibilidad a la infección.

4- Materiales y Métodos

4-1. Material animal y extracción de ADN genómico

Se seleccionaron 180 muestras de sangre o suero de equinos de la raza Silla Argentino, del banco de muestras de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Dichas muestras procedentes de dos establecimientos situados, uno en la provincia de Córdoba y el otro en la provincia de Buenos Aires, habían sido previamente diagnosticados como seropositivos o seronegativos a la infección por AVE en dicha Cátedra, por el método de virusneutralización.

Las muestras seleccionadas se procesaron para extraer el ADN genómico mediante los métodos de DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) y extracción orgánica con fenol-cloroformo (Sambrook y col., 1989).

El método DNAzol para aislamiento de ADN se basa en el uso de una solución de detergente de iso-tiocianato de guanidina que desnaturaliza las proteínas, hidroliza el ARN y permite la posterior precipitación selectiva del ADN genómico con etanol (Sambrook y col., 1989; Chomczynski y col., 1997).

El método de extracción de ADN mediante solventes orgánicos consiste en la lisis de células de la muestra con un buffer de lisis (10mM Tris-Cl, 0,1mM EDTA, pH 8.0, 0,5% SDS, 20µg/ml RNAsa pancreática libre de DNAsa). En la modificación del protocolo utilizada se empleó un agente quelante, EDTA (ácido etilen diaminotetra acético) que secuestra cationes bivalentes para inactivar DNAsas calcio dependientes. La purificación de los ácidos nucleicos

se realizó luego por extracciones sucesivas de fases con solventes orgánicos y por la posterior precipitación por el agregado de etanol (Sambrook y col., 1989).

Se comprobó la extracción de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 1% p/v, buffer TBE 0,5X (45mM Tris-Cl, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,01µg/ml) y se observaron bajo luz ultravioleta. Se determinó la concentración en la muestra mediante un patrón de concentración de ADN. Finalmente, el ADN extraído se usó como molde para la reacción de amplificación por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (o PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*).

Para el estudio de asociación se seleccionaron marcadores microsatélites y de genes estructurales localizados en la región 20q14-22 (cromosoma 20), donde mapea el MHC equino (ELA).

4-2. Tipificación de marcadores microsatélites (STRs)

Se seleccionaron 3 loci microsatélites en el cromosoma 20 equino (Eca 20) ligados al ELA: *LEX52*, *UM011* y *TKY08*. Se incluyó además el microsatélite *VHL 20*, localizado en el cromosoma 30, como marcador de segregación independiente (Tabla 1). Inicialmente, los STRs se seleccionaron de acuerdo a la información presente en la base de datos (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/mapping/common/intro2.pl?BASE=horse>). Ya iniciado este trabajo se publicó el primer ensamble del Genoma Equino, por lo que pudo determinarse la posición exacta de cada marcador dentro del Eca20 (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts-GRS:NW_001867389) mediante el análisis con el

algoritmo de búsqueda Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la tipificación de los marcadores de tipo microsatélite (STRs).

STRs en Eca20					
	na	rango (pb)		Cebador 5' – 3'	colorante
LEX052	7	196-225	F	ggAACggAAgAgTgTAgTTTT	Fam
			R	CATTTATTCATCAGCGATTTG	
UM011	8	150-180	F	TgAAAgTAGAAAgggATgTgg	Fam
			R	TCTCAGAGCAGAAGTCCTG	
TKY08	5	142-150	F	TTCACTTgTgCATgAAgCTg	Fam
			R	GTTCCCAATGTGTGAGGAAT	
VHL20	9	86-105	F	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG	Fam
			R	AACTCAGGGAGAATCTTCTCAG	

Para la tipificación molecular se diseñó un sistema “multiplex” para la amplificación conjunta de los microsatélites mediante PCR. La mezcla para amplificación se preparó en un volumen total de 12,5 µl, con 3 µl de ADN y las siguientes concentraciones finales de reactivos: Buffer de PCR 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl₂ 2,5 mM, 100µM de cada dNTP, 0,8 µM de los cebadores Lex52 y TKY08, 0,6 µM de UM011 y 0,28 µM de VHL20 (marcados con colorante fluorescente FAM) y 0,2 U de *Taq* DNA Polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador MJ Research PTC 100 (Watertown, Massachusetts, EE. UU.). Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos, con un ciclo final de extensión a 72°C durante 15 minutos.

El producto amplificado se verificó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida 6% no desnaturizante, con *loading dye xylene-cyanol y bromophenol blue*, en buffer TBE 1x (90mM Tris-Cl, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA, pH 8). El gel se tiñó con bromuro de etidio (0,01µg/ml) y se observó en un transiluminador de luz UV.

Los fragmentos de PCR obtenidos se separaron mediante electroforesis capilar en el equipo de secuenciación automatizada MegaBACE 1000 (GE Health Care). Para la lectura y asignación de genotipos para cada uno de los animales se utilizó el programa Fragment Profiler version 1.2 (MegaBACE Build 1.2.0311.2500, Amersham Biosciences, 2003).

4-3. Tipificación de genes estructurales

La detección de SNPs ha sido utilizada para caracterizar secuencias alélicas, identificar haplotipos y analizar niveles de expresión en los genes del MHC. Para este estudio se seleccionaron los genes del MHC: ELA-DRA, ELA-DQA y el gen que codifica para el TNF- α . La elección se basó en la función de este gen en la respuesta inmune, polimorfismo y reportes previos que documentan la existencia de asociación con enfermedades en otras especies (Hughes y col., 1994).

Los ensayos realizados para la tipificación del gen ELA-DQA por PCR y posterior detección con SSCP, demostraron que los productos obtenidos eran inespecíficos y muy probablemente provenientes de varios genes DQA. Esta metodología se basa en la desnaturización del producto de PCR, que sembrado en un gel de poliacrilamida en bajas concentraciones y con temperatura controlada, permite la formación de conformaciones alternativas de las cadenas. Estas conformaciones dependen de la secuencia de la misma,

por lo tanto se espera que las diferencias alélicas debidos a cambios de secuencia, se vean reflejadas en la conformación y por lo tanto, en la velocidad de migración en la electroforesis en gel, que dará como resultado diferentes patrones de migración para cada secuencia alélica.

La revisión bibliográfica y la disponibilidad de la secuencia del genoma revelaron que existen múltiples genes DQA en el ELA, algunos de los cuales podrían ser pseudogenes. Por estos motivos se decidió optimizar y priorizar la detección a mediana escala de los marcadores con una sola copia génica, de mayor utilidad para el objetivo de este trabajo.

La tipificación del exón 2 del gen ELA-DRA se realizó, en un principio, mediante PCR-SSCP (Tabla 2). Cada genotipo resultó en un patrón específico, diferente de las demás variantes. Por esta metodología se detectaron 3 alelos del exón 2, y la identidad de cada alelo se confirmó mediante secuenciación de los productos de PCR que mostraban patrones de SSCP diferentes, provenientes de caballos con distintos genotipos.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la tipificación del exón 2 de ELA-DRA.

Molde de PCR	cebador	secuencia
249	DRABE1-biot DRABe2	5'- GGATCCAGGCTGAGTTCTATCTG-3' 5'- GGCTTAAGAGTGTTGTTGGAGCGCTT-3'
Pirosecuenciación		
SNP ₁₄₀ , SNP ₁₄₄	DRA-int	5'- GAGCCTCAAAGCTGG-3'

La tipificación y asignación de alelos de DRA se realizó mediante pirosecuenciación, basada en la técnica propuesta por Díaz y col., 2008. Se amplificó el exón 2 con los cebadores DRA-Be1 biotinilado y DRA-Be2. La mezcla para PCR contenía 2 μ l de ADN, en un volumen total de mezcla de PCR de 25 μ l, con las siguientes concentraciones finales: Buffer PCR (Invitrogen, Carlsbad, California) 1x, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada uno de los dNTPs, 0,5 U *Taq* Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, California). La concentración final de la mezcla de cebadores se redujo a 0,11 μ M. El programa de amplificación, realizado en un termociclador MJ *mini gradient* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hércules, California), consistió en un paso de desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de un ciclo de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, *annealing* de 30 segundos a 58°C y uno de extensión de 30 segundos a 72°C, repetido 45 veces, y un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Para la asignación de genotipos de TNF- α se diseñó una estrategia de secuenciación por PCR-pirosecuenciación, que involucra la detección de los 3 SNPs en la región del promotor. Se diseñaron cebadores (TNFa-F2 y TNF P1R1) para generar un fragmento de 320 pb que involucra desde el promotor proximal y el inicio del primer exón del gen TNF- α . La amplificación se realizó en dos rondas (PCR anidada), para aumentar la especificidad y la cantidad de producto de PCR para la reacción posterior de pirosecuenciación (Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la tipificación del promotor de TNF- α .

Molde de PCR	cebador	secuencia
320	TNF α -F2	5'-gCCAggAgAgAgAgAAgCAA-3'
	TNF-P1R	5'-CgATCACCCCAAAGTgCAG-3'
197	TNF Ex1R (biot)	5'-CTCCTCTgCCAgCTCCAC-3'
Pirosecuenciación		
SNPs _{-95, -89 y -85}	TNFprom-int	5'-gAAATAACCTCTCagA-3'

La primera reacción se realizó en un volumen total de 25 μ l con 3 μ l de ADN y las siguientes concentraciones finales: Buffer PCR 1x (Invitrogen, Carlsbad, California), MgCl₂ 2mM, dNTP 2 mM cada uno, 0,4 μ M de cada primer y 0,1 μ l de *Taq* Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, California (5U/ μ l)). El ciclado se llevó a cabo en el termociclador Axygen MaxyGene gradient thermal cyler (Fisher Biotec Pty Ltd, Australia). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido por 20 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, *annealing* a 58°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

La segunda reacción implicó la amplificación de un segmento de 197 pb comprendido dentro del segmento inicial de 320 pb, para lo cual se utilizaron los *primers forward* TNF α _F2 y *reverse* TNF-Ex1Rbiot biotinilado para llevar a cabo posteriormente la pirosecuenciación. La reacción incluyó Buffer PCR 1x (Invitrogen, Carlsbad, California), MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 2 mM cada uno, 0,4 μ M de cada primer y 0,12 μ l de *Taq* Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad,

California) (5U/ μ l) y 1 μ l del producto de PCR de la primer reacción como molde, en un volumen final de 30 μ l.

Esta reacción se llevó a cabo en el mismo ciclador con una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, *annealing* de 45 segundos a 60°C y 45 segundos a 72°C, con un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos. El resultado de esta segunda reacción se verificó mediante electroforesis en gel de acrilamida, tinción con bromuro de etidio y observación bajo luz UV.

4-3.1. Detección de SNPs por Pirosecuenciación

El producto biotinilado derivado de las reacciones de PCR de DRA y TNF- α , respectivamente se utilizó como molde para Pirosecuenciación™. La Pirosecuenciación™ (Figura 2) es una técnica de secuenciación de ADN en tiempo real que se basa en la detección del pirofosfato (PPi) liberado durante la síntesis de ADN (Ronaghi y col., 1998; Ronaghi, 2001). El PPi liberado como resultado de la incorporación de nucleótidos por la enzima ADN polimerasa inicia una cascada de reacciones enzimáticas que dan como resultado final luz visible que puede ser detectada por una cámara CCD (por sus siglas en Inglés *Charge Coupled Device*, es decir, Dispositivo de Carga Acoplada) y es traducida como un pico en el pirograma™. A medida que el proceso de incorporación de nucleótidos continúa, se construye la cadena de ADN y se puede determinar la secuencia a partir del pirograma (Díaz y col., 2008).

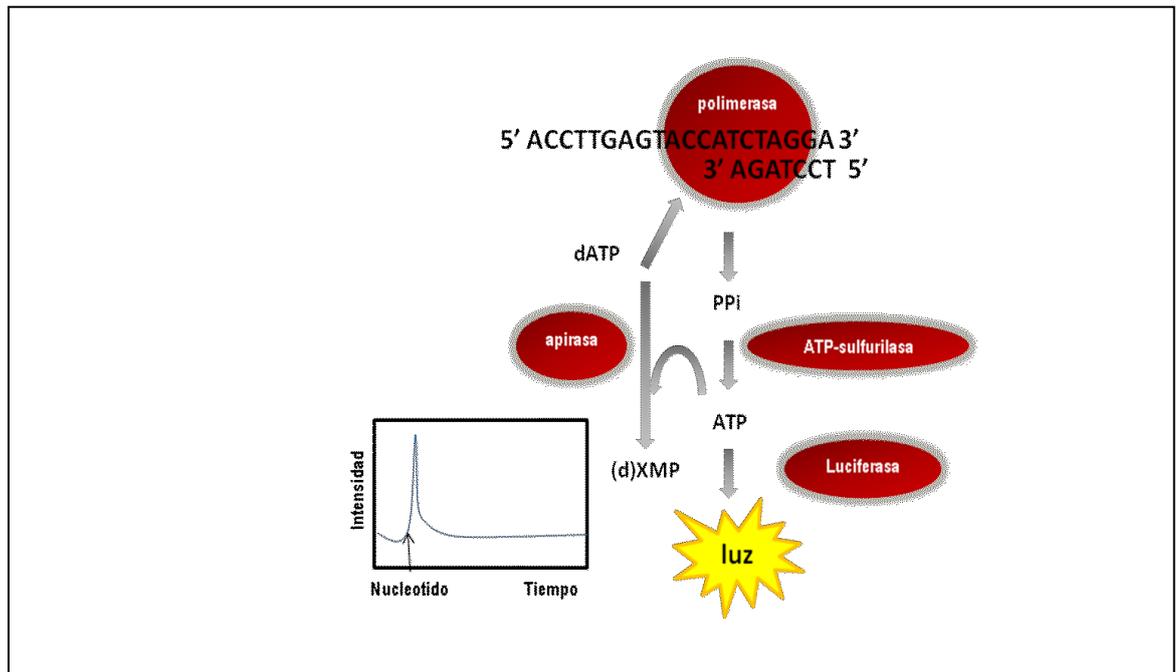


Figura 2. Representación esquemática de la cascada de reacciones enzimáticas que tienen lugar en la Pirosecuenciación. El ADN molde con el primer se coloca en la fosa de una placa. Los nucleótidos se van dispensando de a uno, y la incorporación se continúa usando las enzimas ATP-sulfurilasa y luciferasa. Los nucleótidos son degradados continuamente por una enzima permitiendo el agregado del nucleótido siguiente.

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo en el equipo PyroMark Prep Workstation (Biotage AB, Uppsala, Suecia). Para la reacción de Pirosecuenciación se utilizaron los reactivos del kit Pyro Gold Reagent Kit (Biotage, AB, Uppsala, Suecia) y un *primer* interno de secuenciación específico para cada uno de los marcadores, DRA y TNF- α , a una concentración de 0,3 μ M. Las muestras purificadas se tipificaron en placa (x96) en el equipo PSQTM96 System (Biotage AB, Uppsala, Suecia) y se utilizó el programa de Pirosecuenciación para la asignación de genotipos para cada marcador.

A continuación se presenta la representación esquemática de los diseños

experimentales utilizados para la pirosecuenciación de los alelos del exón 2 del gen ELA-DRA (Figura 3) y el promotor del gen TNF- α (Figura 4).

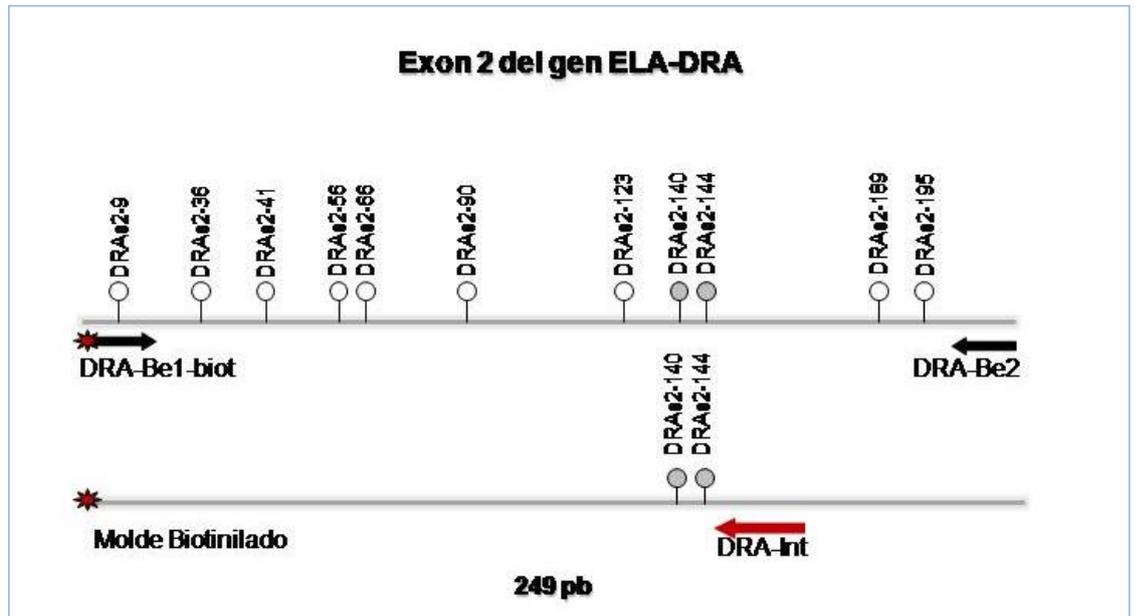


Figura 3. Diseño experimental para pirosecuenciar el exón 2 del gen ELA-DRA. Las flechas negras representan los cebadores utilizados para generar el producto de PCR, uno de los que está marcado con biotina para el siguiente paso de purificación. La flecha roja representa el cebador interno utilizado para pirosecuenciar a partir de la cadena simple purificada. Los círculos sombreados representan los SNPs del promotor de TNF- α .

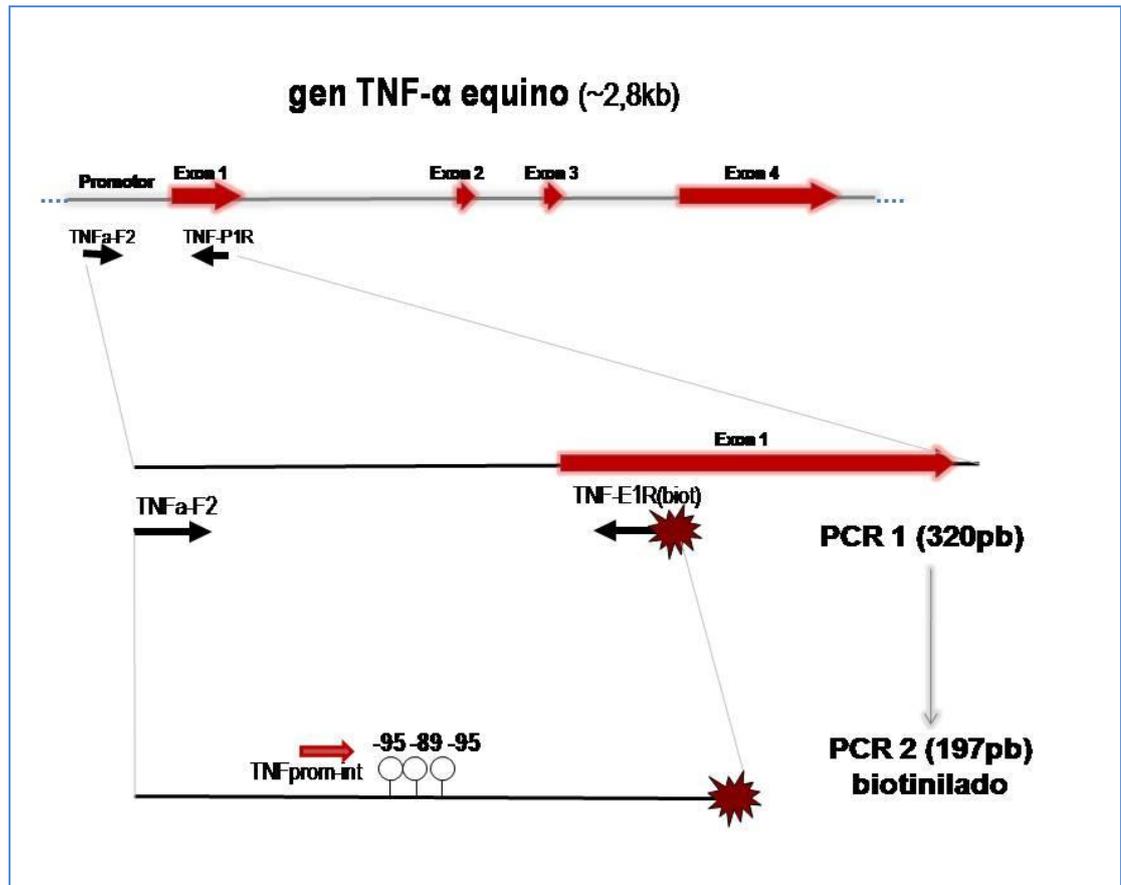


Figura 4. Diseño experimental para pirosecuenciar el promotor del TNF- α . Las flechas negras representan los cebadores utilizados para generar el producto de PCR; el *primer reverse* está marcado con biotina para obtener producto de cadena simple en el siguiente paso de purificación. La flecha roja representa el cebador interno utilizado para pirosecuenciar a partir de la cadena simple purificada. Los círculos representan los SNPs del promotor de TNF- α .

4-4. Análisis estadístico

4-4.1. Análisis poblacional

Se estimaron las frecuencias génicas y genotípicas para cada marcador mediante conteo directo de alelos y genotipos y se compararon las frecuencias halladas en los grupos seropositivo y seronegativo a AVE mediante el test de chi cuadrado.

Para realizar el análisis estadístico se utilizaron los programas de análisis poblacional Arlequín versión 3.11 (Excoffier y Slatkin, 1998) y Genepop (Rousset, 2008). Para cada marcador se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigosis esperada (h_e), heterocigosis observada (h_o), número de alelos (n_a) y equilibrio de Hardy–Weinberg (HWE) por medio de la estimación de valores de $-P$ del Test Exacto de Probabilidad por el método de *Markov chain method*, usando el software GENEPOP 4.0, disponible en <ftp://ftp.cefe.cnrs-mop.fr/genepop/>, tanto en el grupo caso (AVE-positivos), como en el grupo control (AVE-negativos).

La distribución de los haplotipos de TNF- α se realizó utilizando el programa PHASE (Stephens y Donnelly, 2003).

4-4.2. Análisis de asociación

La asociación entre los genes candidatos y/o marcadores ligados y la progresión y persistencia de AVE se estimó por separado para cada loci y para los haplotipos, utilizando tabla de contingencia 2X2 para estimar el riesgo relativo (RR) mediante “odds ratio” (OR) de

la progresión y persistencia de AVE para cada genotipo o haplotipo, según Woolf (1955). La probabilidad de OR se estimará mediante el Test Exacto de Fisher (Bland y Altman, 2000) - <http://www.hutchon.net/ConfidOR.htm>;
<http://www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form.html>). El LD entre los marcadores del ELA y las frecuencias haplotípicas se evaluó utilizando el algoritmo de Markov-Chain o el Test Exacto de Fisher, incluidos en el programa Genepop.

5- Resultados y Discusión

5-1. Ubicación de los marcadores en el mapa del Eca20

El diseño experimental y la selección de los marcadores moleculares de este trabajo de tesis se realizaron antes de la publicación del primer ensamble de la secuencia del Genoma Equino (Horse Genome Project - <http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/>). Por este motivo, y a partir de la disponibilidad de la información del genoma, se realizó una búsqueda Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en las bases de datos públicas para localizar la ubicación física de los marcadores STRs. El algoritmo Blast realiza una búsqueda de la secuencia/marcador enfrentados a las secuencias genómicas de referencia en Eca20. Esto permitió localizar la posición exacta de los marcadores utilizados para el análisis, cuyos resultados se detallan a continuación.

El STR LEX52 (numero de acceso AF075654) se localizó fuera de la región del ELA (posición 13.654.145–13.654.348 pb). El STR TKY08 (Acceso AB048319) se ubicó dentro de la región de Clase I del ELA, precisamente dentro del gen de Clase I 9.2 (Genebank L100056062; posición 29.338.442–29.338.586 pb). Finalmente, la secuencia de UM011 (número de acceso AF195130) se localizó en la región de Clase II del ELA, dentro de un intrón del gen *ELA-DMA* (Genebank L100061035; posición 33.510.120–33.510.287 pb). El mapa esquemático de los microsatélites en relación a estos genes se muestra en la Figura 5.

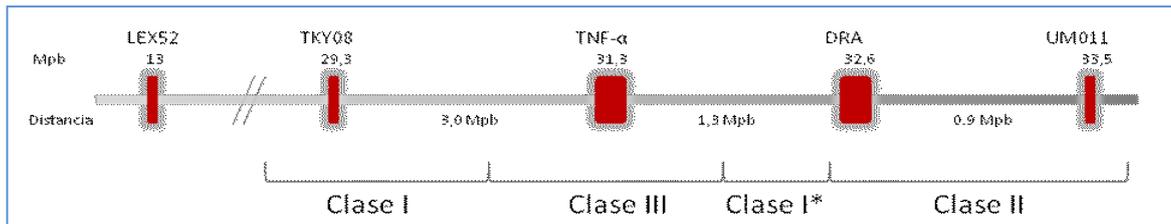


Figura 5. Representación esquemática de la región del Eca20 que muestra la ubicación de los marcadores utilizados en el estudio. Las posiciones de los marcadores se indican en Mpb (pares de bases x 1000), así como la distancia entre los mismos.

5-2. Detección y Análisis del Polimorfismo de los marcadores del Eca20

5-2.1. Microsatélites (Marcadores STRs)

Se logró la amplificación de los marcadores microsatélites y de los genes estructurales mediante los métodos descritos. En la Figura 6 se muestran los perfiles detectados para los diferentes genotipos homocigotas y heterocigotas de los microsatélites UM011 y TKY08.

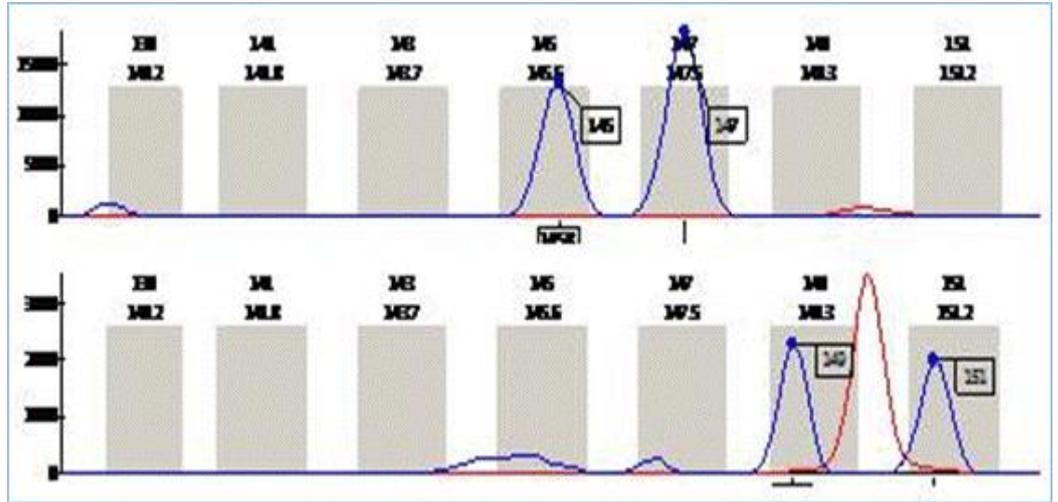


Figura 6a. Polimorfismos del microsatélite TKY08; se muestran los genotipos de los diferentes alelos.

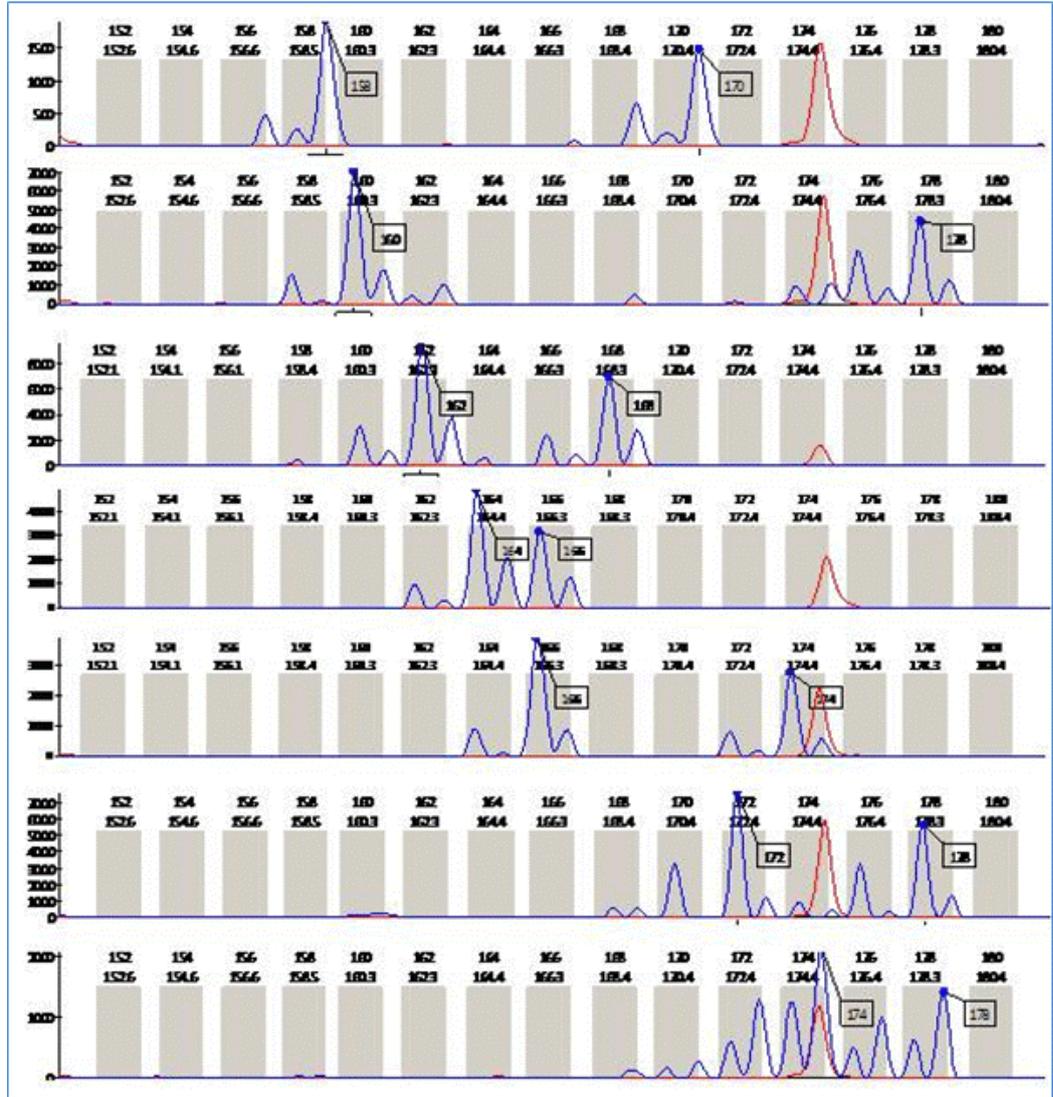


Figura 6b. Polimorfismos del STR UM011; se muestran los genotipos de los diferentes alelos.

La estimación de las frecuencias génicas y genotípicas demostró que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en su distribución en los marcadores analizados, entre las subpoblaciones de caballos infectados con AVE en comparación con los controles (Tabla 4).

Los p -valores resultantes obtenidos para h_o , h_e , n_a y HWE se resumen en la Tabla 4. El LD estimado no mostró valores significativos, como se espera de la distancia de los pares de marcadores considerados ($p > 0.05$). Las frecuencias alélicas en los caballos AVE-positivos comparados con los caballos del grupo control no mostró diferencias significativas ($p = 0,0781$). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en algunos pocos alelos particulares. Sobre la base del test exacto, cinco de doce tests HWE mostraron desviaciones significativas: UM011 en el grupo positivo y en la muestra total, y TKY08 en ambos grupos, debido a un incremento significativo de individuos homocigotas. Varios estudios han mostrado que la heterocigosis confiere una ventaja selectiva en contra de las enfermedades infecciosas (Hraber y col., 2007; Takeshima y col., 2008). Los resultados obtenidos muestran un incremento en el desequilibrio de homocigotas en el grupo caso con respecto al grupo control en TKY08.

Tabla 4. Estimación de la diferenciación génica, equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), número de alelos (n_a), heterocigosis esperada (h_e) y observada (h_o) en los caballos de los grupos AVE-infectados y AVE-no infectados. Los valores significativos de p ($p < 0.05$) se indican en negrita.

	AVE +				AVE -				Diferenciación génica	HWE
	h_e	h_o	n_a	HWE	h_e	h_o	n_a	HWE	p valor	
UM011	0.78	0.69	10	0.0030	0.81	0.77	10	0.0962	0.5999	0.0027
TKY08	0.69	0.24	6	0.0000	0.65	0.32	6	0.0000	0.0687	<0,0001
LEX52	0.74	0.72	11	0.2543	0.69	0.75	9	0.7135	0.1911	0.4912
VHL20	0.79	0.77	9	0.7490	0.75	0.60	9	0.0357	0.1078	0.1237
Todos									0.0781	0,0000

5-2.2. ELA-DRA (ELA de Clase II)

La tipificación del exón 2 del gen ELA-DRA se realizó, en un principio, mediante PCR-SSCP (ver Materiales y Métodos). Cada genotipo resultó en un patrón específico, diferente de las demás variantes. Por esta metodología se detectaron 3 alelos del exón 2, y la identidad de cada alelo se confirmó mediante secuenciación de los productos de PCR que mostraban patrones de SSCP diferentes, provenientes de caballos con distintos genotipos. Los patrones detectados por esta técnica se muestran en la Figura 7, donde se indican los individuos heterocigotas y homocigotas para los tres alelos DRA; estos se designaron como DRA-A, DRA-B y DRA-C.

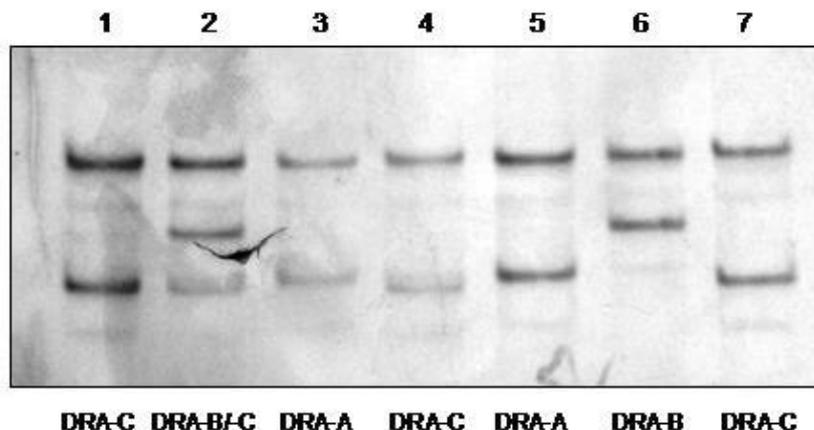


Figura 7. Patrones de SSCP obtenidos por amplificación del exón 2 del gen ELA-DRA, correspondientes a los tres alelos reportados para el locus.

Posteriormente, se seleccionaron caballos con diferentes genotipos (DRA-A, DRA-B y DRA-C), los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron. Las secuencias obtenidas se alinearon y se compararon las posiciones de nucleótidos conservadas y las posiciones variables. El análisis de las secuencias reveló que cada variante de SSCP se correspondía con un alelo de secuencia diferente (*ELA-DRA*0101*, *ELA-DRA*0201* y *ELA-DRA*0301*). Entre estas últimas, se determinaron aquellas que permitieran distinguir entre los diferentes alelos reportados hasta ese momento. Mediante la metodología de Pirosecuenciación (Díaz y col., 2008) se detectaron específicamente los dos SNPs que diferenciaban los tres alelos. La visualización y análisis de los pirogramas obtenidos en los animales analizados para el gen ELA-DRA permitió detectar un total de 6 genotipos diferentes. Cada genotipo resultó en un patrón específico, diferente de las demás variantes. En la Figura 8 se muestran los genotipos

homocigotas (a-c) y heterocigotas (d-f).

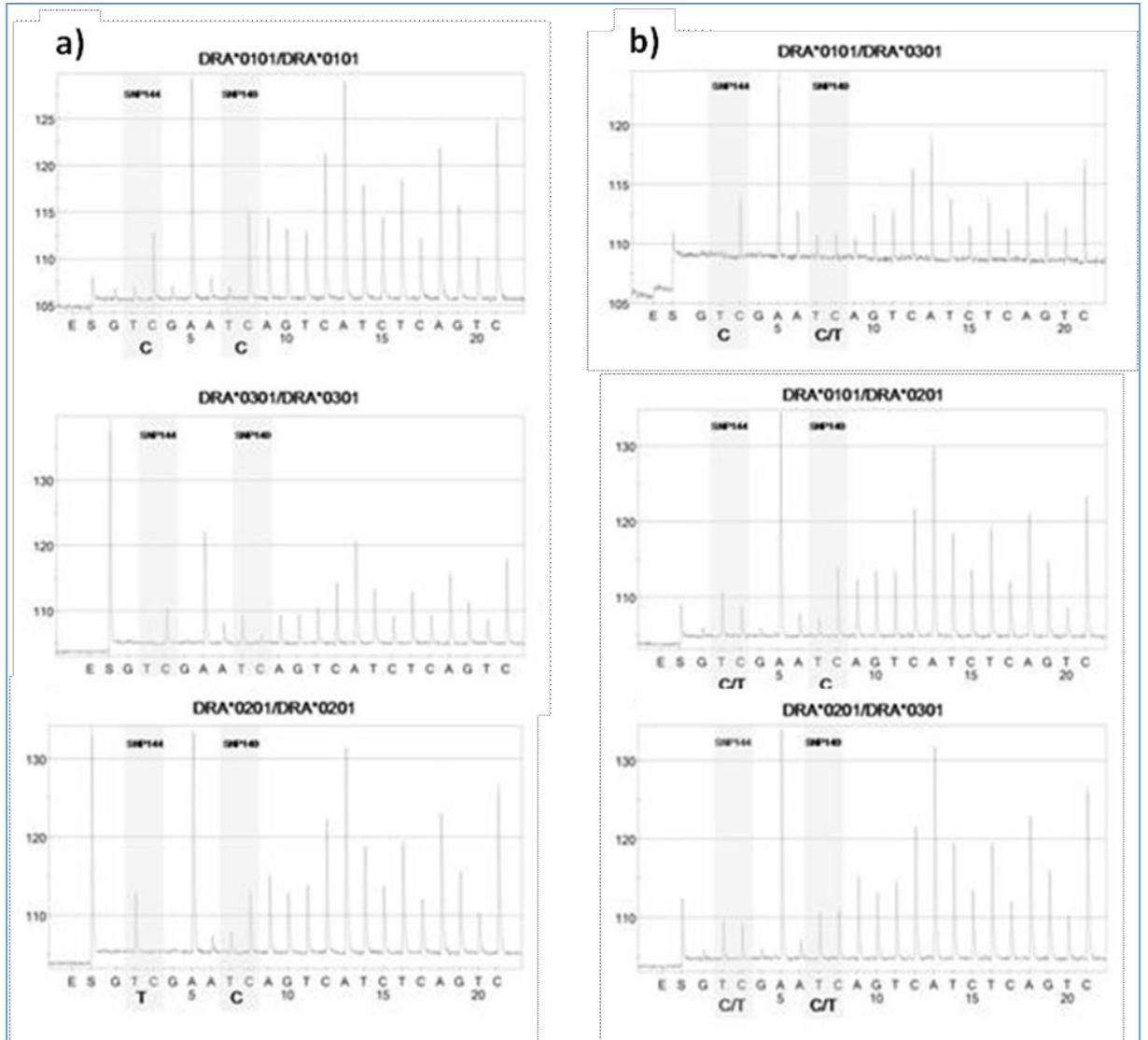


Figura 8. Pirogramas de los genotipos homocigotas (a) y heterocigotas (b) de los tres alelos del gen ELA-DRA. El orden de adición de los nucleótidos se indica en la parte inferior de la figura, y el genotipo se indica en la parte superior. Las barras sombreadas representan los SNPs detectados.

Con el propósito de comparar y caracterizar las frecuencias génicas y genotípicas del gen ELA-DRA se compararon las frecuencias reportadas en caballos de otras razas, resultados que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Frecuencias alélicas del exón 2 de *ELA-DRA* en razas de caballos domésticos. Se analizaron otras razas con propósitos comparativos al momento de validar la metodología de detección de los polimorfismos. (He: heterocigosis esperada; *: alelo no detectado con la metodología empleada en este estudio; nd: no determinado).

Raza (n)	Frecuencias alélicas ELA-DRA				He	Referencia
	0101	0201	0301	JBH11*		
Sangre Pura de Carrera (8)	0.57	0.21	0.21	-	0.63	Díaz y col., 2008
Criollo Argentino (8)	0.62	0.19	0.19	-	0.58	Díaz y col., 2008
Silla Argentino (133)	0.49	0.28	0.23	-	0.63	Esta Tesis
Paso Peruano Argentino (10)	0.65	0.30	0.05	-	0.51	Díaz y col., 2008
Arabe (10)	0.85	0.15	-	-	0.27	Díaz y col., 2008
Cuarto de Milla (3)	0.50	0.50	-	-	0.60	Díaz y col., 2008
Razas Españolas Puras (8)	0.75	0.19	0.63	-	0.43	Díaz y col., 2008
Razas Españolas Nativas (11)	0.64	0.37	-	-	0.49	Díaz y col., 2008

5-2.3. TNF- α (ELA de Clase III)

En primera instancia (Materiales y Métodos), se secuenció la región comprendida entre el promotor del gen TNF- α y el primer exón (~700 pb). A partir de los datos de secuencias y de la información reportada en la base de datos Genbank (Tabla 6), se diseñó una metodología basada en Pirosecuenciación (Figura 9) para los SNPs SNP₋₉₅, SNP₋₈₉ y SNP₋₈₅, localizados en la región del promotor.

Estudios previos (Matiasovic y col., 2002; Horin y col., 2004; Brown y col., 2006) describieron polimorfismos en la región del promotor del gen TNF- α en caballos de varias razas y otras especies equinas (cebras, burros). Sobre la base de esta información se diseñó la técnica de detección por medio de Pirosecuenciación, como se indica en la Tabla 6 y Figura 9, la que permite diferenciar los diferentes haplotipos descritos hasta el momento. Dada la distribución de las variaciones de secuencia detectadas entre razas, hasta el presente la "C" en la posición -89 solo fue detectada en combinaciones heterocigotas y en otras especies no *E. caballus*. Sin embargo, se incluyó en la técnica de detección para verificar si existía polimorfismo en esta región en 122 caballos de Silla Argentino.

Tabla 6. SNPs del promotor del gen TNF- α descritos en diversas razas equinas. La numeración indica la posición en la secuencia de referencia con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1). El método utilizado permite diferenciar los haplotipos detectando las bases alternativas en las posiciones -95, -89 y -85.

Alelo	Acc. No.	nd	-95	-89	-85	Referencia
		T/G	C/T	C/T	C/T	
TNFa	M64087					Matiasovic y col., 2002
TNFaA	AF349560	-	C	T	T	Matiasovic y col., 2002
TNFaB	AF349558	G	T	T	C	Horin y col., 2004
TNFaC	AF349559	-	C	T	C	Horin y col., 2004
TNFa1	AM050395	G	C	T	C	Brown y col., 2006
TNFa2	AM050396	G	C	T	T	Brown y col., 2006
TNFa3	AM050397	T	T	C	C	Brown y col., 2006
TNFa4	AM050398	T	C	T	C	Brown y col., 2006
TNFa5	AM050399	T	T	T	C	Brown y col., 2006
TNFa6	AM050400	G	C	C	T	Brown y col., 2006

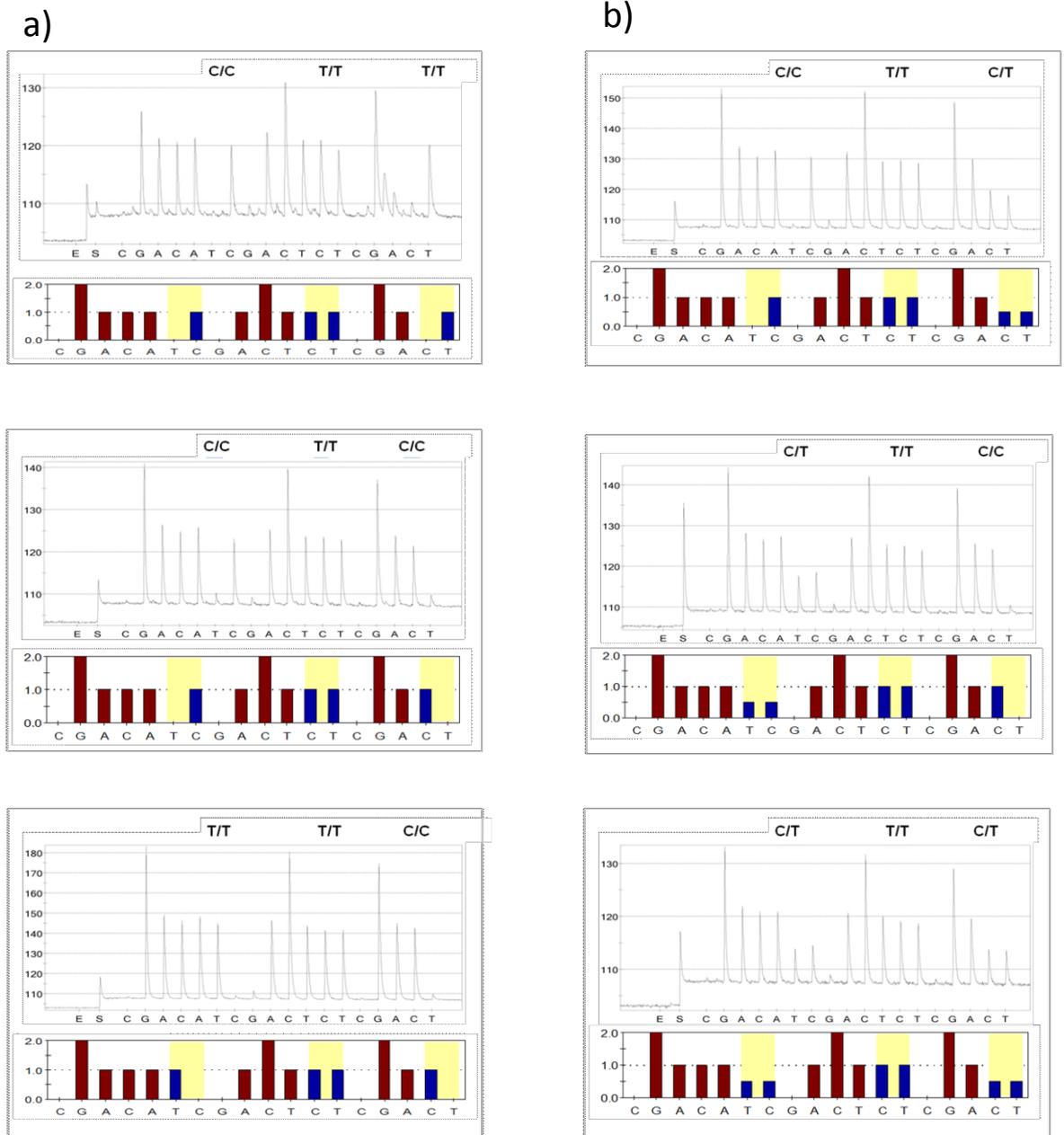


Figura 9. Alineamiento de las secuencias reportadas para el promotor de TNF- α . Las barras sombreadas representan los SNPs detectados y la flecha roja la secuencia del primer interno de pirosecuenciación.

En la Figura 10 se indican los haplotipos detectados en los animales analizados, donde los SNP₋₈₅ y SNP₋₉₅ resultaron polimórficos (Tabla 7). En el SNP₋₈₉ se detectó la base T a excepción de dos caballos, que presentaron el genotipo SNP_{-95C/T} SNP_{-89C/C} SNP_{-85C/C} y SNP_{-95C/C} SNP_{-89C/T} SNP_{-85C/C}. Dado el reducido número de caballos con este genotipo no se incluyeron el análisis de asociación.

La visualización y análisis de los pirogramas obtenidos en los 122 animales analizados para el gen TNF- α permitió detectar un total de 4 genotipos diferentes. Cada genotipo resultó en un patrón específico, diferente de las demás variantes. Dado que los tres SNPs detectados comprenden una extensión de 11 pb, las diferentes combinaciones de las bases en cada posición permiten definir un haplotipo del promotor de TNF- α . En la Figura 10 se muestran los haplotipos homocigotas y heterocigotas. El orden de adición de los nucleótidos se indica en la parte inferior de la Figura 10, y el haplotipo se indica en la parte superior. Los tres SNPs (posiciones -85, -89 y -95 del promotor de TNF- α) se detectan en forma clara y precisa.

Figura 10. Pirogramas que ilustran los diferentes genotipos del promotor del gen TNF- α . El histograma corresponde a la predicción de cada genotipo, esperada sobre la base de la secuencia de referencia conocida para la región del promotor secuenciada. Los genotipos homocigotas (a), definen los haplotipos correspondientes, y los genotipos heterocigotas (b) definen para combinaciones haplotípicas diferentes. El orden de adición de los nucleótidos se indica en la parte inferior de la figura, y el genotipo se indica en la parte superior. Las barras sombreadas representan los SNPs detectados.



En la Tabla 7 se muestran los haplotipos hallados con el programa PHASE, mediante conteo y mejor reconstrucción de combinaciones haplotípicas, sobre la base de estimación de las frecuencias poblacionales.

Tabla 7. SNPs del promotor del gen TNF- α detectados en la población total de caballos de la raza Silla Argentino analizados en este estudio. Los haplotipos se indican con la base observada en cada una de las posiciones de referencia (posición en la secuencia con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1). Las frecuencias de los haplotipos fueron estimadas mediante el programa PHASE.

haplotipo (-95, -89, -85)	Frecuencia	S.E	N observado
CTC	0.322	0.007668	76
CTT	0.497	0.007668	124
TTC	0.153	0.007668	40
TTT	0.027	0.007668	4
			244

5-3. Análisis de asociación

5-3.1. Análisis de Asociación con los Marcadores del ELA

El análisis de asociación se realizó siguiendo el modelo caso-control. Se evaluaron las diferencias entre los grupos infectado con AVE y control mediante el test exacto de Fisher y el cálculo del OR como estimador del RR. El OR se utiliza como estimador de riesgo en estudios de caso-control en los que el cálculo de RR no es apropiado. Un valor de OR <1

indica protección, mientras que un OR >1 indica riesgo incrementado. Se consideraron significativos los p -valores menores a 0,05. Las estimaciones se realizaron para cada uno de los marcadores genéticos analizados, así como para las combinaciones haplotípicas TNF/ELADRA/UM011.

El análisis de asociación de los microsatélites mediante el cálculo del test exacto de Fisher y el OR, mostró valores significativos para algunos alelos en particular cuando se compararon los caballos infectados y control (Tabla 8). Se observó OR significativo mayor a 1 en el alelo TKY08-151 (OR = 2.227; P = 0.007). Un efecto similar aunque menor se observó con el alelo LEX52-206 (P = 0.057, OR = 1.5). En contraste, UM011-174, TKY08-145 y LEX52-204 mostraron valores significativos menores a 1. La tabla 8 muestra alelos comunes con valores OR significativos. El alelo VHL20-M mostró un valor significativo de OR menor a 1 ($p=0.001$).

Tabla 8 Asociación entre alelos de microsatélites en caballos infectados (seropositivos) y no infectados (seronegativos) con AVE (OR, *odds ratio*; CI, intervalo de confianza). Se consideró el valor $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

Locus/alelo	Seronegativos (N=61)	Seropositivos (N=105)	OR	95% CI	valor p
UM011-174	0.107	0.052	0.463	0.201-1.069	0.033
TKY08-145	0.450	0.287	0.493	0.297-0.816	0.004
TKY08-151	0.160	0.298	2.227	1.199-4.137	0.007
LEX52-204	0.508	0.414	0.685	0.437-1.072	0.022
LEX52-206	0.213	0.291	1.511	0.893-2.557	0.057
VHL20-M	0.365	0.209	0.461	0.282-0.754	0.001

La proporción de individuos AVE-positivos y negativos no fue independiente del establecimiento de procedencia (Chi-cuadrado con corrección de Yates para tabla de contingencia 2×2 , $\chi^2 = 9.47$, $p = 0.0021$); el porcentaje de AVE-positivos fue significativamente mayor en BA (91/130, 70%) que en CO (14/35, 40%).

El análisis de asociación calculado con el test exacto de Fisher y el OR mostró valores significativos para algunos alelos cuando se compararon los caballos AVE-positivos y los negativos. Un valor de OR significativo, mayor a 1 se observó con el alelo TKY08-151 (OR = 2.227; $p = 0.007$). Un valor similar se observó con el alelo LEX52-206 (OR = 1.5, $p = 0.057$). En contraste, los alelos UM011-174, TKY08-145 y LEX52-204 mostraron valores significativos menores a 1, sugiriendo un efecto protector putativo según la condición serológica. En la Tabla 8 se describen los alelos con valores de OR significativos. Luego de aplicar las correcciones de Bonferroni, permanecieron significativos los p-valores de los alelos TKY08-151, TKY08-145 y VHL20-M.

Dado que la respuesta inmune a antígenos virales es mediada por células T CD8+ citotóxicas, y es dependiente de la presencia de moléculas del MHC de Clase I, y que el reconocimiento de los motivos peptídicos por el sistema es altamente específico para determinados alelos del MHC, no es sorprendente que la presencia de ciertos alelos de Clase I o marcadores ligados (ej. TKY08), puedan estar significativamente asociados con susceptibilidad o resistencia a una infección viral tal como AVE (Nolan y col., 2006).

Aunque no se pudieron detectar distintos grupos de caballos en términos de resistencia/susceptibilidad a la infección por AVE, los resultados sugieren que algunos alelos STR podrían estar asociados con la resistencia/susceptibilidad genética a AVE. El locus TKY08 se localiza dentro de un intrón de la secuencia del gen de Clase I del MHC 9.2. La

caracterización del haplotipo de Clase I en estos grupos podría resultar muy informativa en un futuro estudio de asociación con esta u otras enfermedades infecciosas.

De forma interesante, el alelo VHL20-M mostró un valor significativo menor a 1 ($p = 0.001$). Aún cuando este STR no está ligado al ELA, la búsqueda de genes en la cercanía de la secuencia del STR VHL20 en el cromosoma Eca30, permitió ubicar al gen de la enzima Ubch7 (*ubiquitin-conjugating- LOC100058286*) como el locus más cercano. Si bien aún no hay evidencia experimental en caballos, varias líneas de información señalan el rol de la ubiquitinación en la regulación de la expresión del MHC de Clase I (Bartee y col., 2004; van Wijk y Timmers, 2010), haciendo de esta familia proteica candidatos muy interesantes para estudiar su rol en la expresión de superficie de las moléculas del MHC de Clase I.

Dado que algunas asociaciones genéticas postuladas muestran OR moderados y significancia estadística fronteriza, los resultados no pueden establecerse como concluyentes. En futuros experimentos, se podría extender el tamaño de la muestra para verificar las asociaciones estadísticas descriptas.

Además, se podrían estudiar marcadores adicionales de tipo STR o SNPs, así como la composición haplotípica de esta región particular del ELA. Los polimorfismos hallados corresponden a STRs localizados en secuencias intrónicas o no codificantes, por lo tanto no se esperan efectos funcionales directos. Sin embargo, la localización intragénica de UM011 y TKY08 y los p valores significativos de algunos alelos dirigen nuestra atención a los loci ELA-DMA y los genes 2 de Clase I como candidatos para análisis de asociación.

5-3.2. Análisis de Asociación con el gen ELA-DRA

Se detectaron tres de los cuatro alelos DRA (ELA-Eqca-DRA*0101, ELA-Eqca-DRA*0201 y Eqca-DRA*0301) tanto en AVE-positivos como en AVE-negativos (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencias alélicas de ELA-DRA y análisis de asociación en los grupos de caballos AVE+ y AVE-.

Alelo	Seropositivos (N=84)	Seronegativos (N=49)	OR	95% CI	valor p
DRA*0101	0,476	0,520	0,84	0,509-1,380	-
DRA*0201	0,292	0,255*	1,20	0,685-2,111	0,093
DRA*0301	0,232	0,225	1,04	0,576-1,893	0,119

* $p < 0.05$ considerado estadísticamente significativo para aquellos con alelo vs aquellos sin alelo

El análisis de asociación no mostró valores significativos para los alelos ELA-DRA (valores p , 0,093 y 0,119). El desequilibrio de HWE solo se observó en los caballos AVE-positivos ($p = 0,0002$), en tanto que las estimaciones de h_e , así como las de h_o no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos (Tabla 10).

Tabla 10. Diferenciación génica y genotípica en los grupos de caballos AVE+ y AVE-.

Locus/alelo	AVE - (N=49)	AVE + (N=84)
he	0,62	0,64
ho	0,59	0,76
HWE (FIS - <i>p</i> valor)	0,124	0,0002 ^b
Diferenciación génica		0,777 ^a
Diferenciación genotípica		0,745 ^a

Nota: Número de individuos (N). ^a *p* valor de la diferenciación génica y genotípica para cada población tomada de a pares (test exacto G). ^b el *p* <0.05 considerado estadísticamente significativo

Las comparaciones entre grupos por medio de los test de diferenciación génica y genotípica tampoco evidenciaron diferencias significativas (*p*-valores, 0,788 y 0,745). A través de infecciones experimentales, Castillo-Olivares y col., (2003) sugirieron que VAE restringe el mecanismo genético de la actividad citolítica. Dado que la respuesta inmune de las células T es dependiente de la presentación y procesamiento antigénico, el polimorfismo del MHC, así como el reconocimiento de las células T, las moléculas de Clase II podrían contribuir con determinantes de restricción para el reconocimiento antígeno-específico de las células T de los epitopes procesados. Muchos factores podrían subyacer a las causas de pérdida de asociación observada entre los polimorfismos del ELA-DRA y la infección de AVE. En primera instancia, solamente ocurren seis cambios en los alelos del DRA, cuatro de ellos dentro de las regiones PBS. Dos SNPs que están presentes en los tres alelos detectados producen cambios no sinónimos en PBS 47 (R/H) y 49 (A/T). Estas diferencias entre los alelos

de DRA podrían no ser suficientes para afectar la estructura del bolsillo de interacción con los péptidos, y por lo tanto, su afinidad por los péptidos antigénicos que podrían causar una modificación de la respuesta inmune (Kalemkerian y col., 2012).

Los modelos de selección aplicados a las secuencias del exón 2 de DRA han revelado signos de selección limitada, con el sitio aminoacídico 49 más fuertemente seleccionado que el sitio 47 (Janova y col., 2009).

Nuestra investigación se concentró en determinar la relevancia de los polimorfismos de genes candidatos específicos del ELA con la resistencia/susceptibilidad a AVE, y la resistencia definida como la presencia de virus, por esta razón no se puede descartar el rol del locus DRA en la progresión de la enfermedad. Dado que la estrategia utilizada no incluye un análisis amplio de genoma de los polimorfismos, no es sorprendente que la variabilidad de otros genes distintos a los que se localizan en el MHC podrían también estar influenciando la respuesta a AVE y contribuyendo a la susceptibilidad a la enfermedad. No se evidenció la heterogeneidad poblacional en la falta de asociación con DRA y la condición serológica a AVE. Este tipo de estructura de población podría permitir una identificación más sencilla de asociaciones débiles entre variables genéticas y resistencia/susceptibilidad.

Del mismo modo, podría inferirse que mientras una asociación no es significativa en nuestra población de caballos Silla Argentino, esto podría no ser el caso para otra población de una raza diferente (Kalemkerian y col., 2012).

5-3.3. Análisis de Asociación con el gen TNF- α

Se compararon las frecuencias alélicas entre los seronegativos y seropositivos mediante la prueba de chi cuadrado, no hallándose diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0,93182685$). Se estimaron las frecuencias genotípicas en la población total, mediante conteo directo de genotipos y se compararon las frecuencias en seropositivos y en seronegativos mediante la prueba de chi cuadrado, no hallándose diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0,83650268$).

Se calcularon además las frecuencias genotípicas esperadas en los seropositivos, según leyes de equilibrio Hardy-Weinberg. No se encontraron diferencias significativas, si bien el resultado de la prueba chi cuadrado dio un valor de probabilidad mucho menor ($p=0,25834893$). Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los homocigotas y heterocigotas en seropositivos y seronegativos ($p=0,88217877$).

La estimación del OR con un intervalo de confianza de 95%, no evidenció diferencias significativas entre grupos de caballos; los valores obtenidos se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de asociación mediante el cálculo de OR en caballos AVE+ y AVE-.

haplotipo (-95, -89, -85)	OR	95% CI
CTC	0,7389	0,2197 a 2,4855
CTT	1,4271	0,6221 a 3,274
TTC	0,977	0,3056 a 3,1245
TTT	0,935	0,4068 a 2,1506

TNF- α es una citoquina muy potente, con múltiples funciones y capacidad para producir daño severo en el organismo si es liberada en exceso, por lo tanto está estrechamente regulada a distintos niveles.

Si bien las variantes en el promotor podrían modificar el nivel transcripcional, esto aún no se ha demostrado en el caballo, aunque sí en otras especies. Sin embargo, no es el único punto de regulación, por lo que otros genes que intervienen en esas vías metabólicas podrían influir en el resultado observado en este trabajo, y por ello no detectarse asociación.

5-3-4. Haplotipos

La combinación de alelos de MHC en un cromosoma se denomina haplotipo del MHC (Janeway y col., 2001). En general ningún haplotipo se encuentra en elevada frecuencia en una población, dado que ninguno confiere ventajas adaptativas al individuo. Un cambio en un alelo del MHC puede aumentar la resistencia a un microorganismo determinado, pero reducir la resistencia a otro (Tizard, 2009).

Los primeros haplotipos del MHC se caracterizaron mediante serología para estudiar la expresión de antígenos de Clase II en linfocitos de sangre periférica de caballos sanos jóvenes y adultos (Bailey y col., 1979, 1983; Barbis y col., 1994). Los únicos reportes de caracterización de haplotipos del MHC equino a nivel molecular se realizaron recientemente (Tseng y col., 2010; Klumplerova y col., 2013) para lo que desarrollaron un sistema de identificación basado en la tipificación de microsatélites localizados en el ELA. Así hallaron 50 haplotipos en las razas *Thoroughbred* y *Standardbred*, y encontraron que alrededor de la mitad tenían una fuerte correlación con los serotipos del ELA y la tipificación con SNPs y

microsatélites (Tseng y col., 2010; Klumplerova y col., 2013).

Las estimaciones realizadas a través del análisis directo y de segregación en las muestras animales con relaciones de parentesco no permitieron definir claramente las combinaciones haplotípicas de los marcadores utilizados en este estudio. Como se mencionó previamente, al iniciar el estudio, en las bases de datos la información disponible correspondía a un listado de marcadores moleculares cuya ubicación cromosómica se había determinado mediante estudios de ligamiento y mapas de radiación híbrida (Lindgren y col., 1998, 2001).

El conocimiento de la ubicación exacta de cada marcador dentro del cromosoma 20 equino Eca20 muestra que las distancias entre los marcadores utilizados varían aproximadamente entre 1Mb y 5Mb. Por tales motivos, el LD característico del MHC no se pone en evidencia.

Los loci más cercanos entre sí son UM011y ELA-DRA. Entre estos marcadores hay una separación de alrededor de 1Mb, representando cada uno los extremos “hipotéticos” de la región de Clase II del MHC. Los resultados obtenidos permiten identificar numerosas combinaciones haplotípicas, la menor cantidad de haplotipos con respecto a lo esperado sin ligamiento pone en evidencia que efectivamente existe LD, pero la distancia entre estos dos marcadores sería suficiente para que ocurran eventos de recombinación entre ellos.

El análisis de asociación entre estos haplotipos y la condición serológica a AVE no pusieron en evidencia asociación estadística con ninguno de los haplotipos detectados.

6 – Conclusiones

1- Población de animales seropositivos y seronegativos a AVE

La población seleccionada para el estudio consistió en animales seropositivos y seronegativos para AVE, y se utilizaron como material de ADN los sueros utilizados originalmente para la determinación por virusneutralización. Dado que el suero contiene muy poco material celular nucleado, no siempre es posible obtener suficiente ADN y de la calidad necesaria para la amplificación por PCR. Sin embargo, en la mayoría de las muestras de suero la extracción de ADN fue exitosa, condición que ampliará el rango de tipos de muestras para estudios que requieran ADN.

2- Desarrollo de métodos de tipificación genética de mediana y alta resolución.

El desarrollo de técnicas moleculares realizado como trabajo experimental de este trabajo de tesis para la detección específica de marcadores genéticos polimórficos (ELA-DRA, TNF- α , microsatélites) posibilitó caracterizar la estructura genética de la población de caballos de Silla Argentino y la realización del estudio de asociación genética. Estas metodologías continúan utilizándose en estudios de caracterización y asociación en otras poblaciones/razas equinas y el ELA.

3- Variabilidad genética en los marcadores del ELA.

En los caballos estudiados se puso en evidencia que la población tiene un elevado grado de polimorfismo en el MHC, tanto en los microsatélites como en los fragmentos de los genes analizados. Se describieron nuevas variantes alélicas/haplotípicas en algunos microsatélites y en el promotor de TNF- α , aportando al conocimiento actual del ELA.

4- Asociación con la resistencia/susceptibilidad genética a la infección por AVE en los animales estudiados.

El análisis de asociación demostró que algunos alelos se encuentran más representados en los animales seropositivos y otros alelos presentan una frecuencia significativamente mayor en los caballos no infectados, lo que podría sugerir una asociación con resistencia/susceptibilidad genética a AVE. Sin embargo, ningún alelo, genotipo o haplotipo parece conferir ventajas adaptativas importantes a un individuo en particular.

Dado que los valores hallados son modestos y su significación estadística se encuentra en el límite, los resultados no pueden considerarse concluyentes; la robustez de estos análisis de asociación genética debería incrementarse mediante la genotipificación de marcadores microsatélites o SNPs adicionales.

Esta falta de asociación estadística fuerte podría deberse, no necesariamente a la ausencia de asociación, sino más bien a un “efecto de suma” de los genes, cada uno con un efecto débil que se sumaría en la respuesta inmune, y por lo tanto no puede ser detectado. Por otra parte, si existe baja heredabilidad del carácter en estudio, disminuye el poder de los

estudios genéticos.

5- *Análisis de haplotipos y evidencia de LD característico del MHC*

Aunque los resultados obtenidos permitieron identificar numerosas combinaciones haplotípicas, la distancia entre los marcadores más cercanos (UM011 y ELA-DRA) es de alrededor de 1Mb, y la longitud total de la región donde se localizan los marcadores estudiados es de 5Mb. La menor cantidad de haplotipos con respecto a lo esperado sin ligamiento pone en evidencia que efectivamente existe LD, pero la distancia entre estos dos marcadores sería suficiente para que ocurran eventos de recombinación entre ellos. Por tales motivos, el LD característico del MHC no se pone en evidencia.

6- *Otros parámetros de asociación y su aplicación.*

No se identificaron motivos aminoacídicos asociados y su interacción con péptidos virales dado que no se identificaron alelos de genes estructurales asociados a la condición serológica de los caballos. Del mismo modo, para obtener un método predictivo de riesgo de infección ante AVE, es necesario identificar marcadores genéticos significativamente asociados así como demostrar y verificar una fuerte asociación entre ellos y la condición de enfermedad.

7 - Bibliografía

- 1) Albright-Fraser DG, Reid R, Gerber V, Bailey E. Polymorphism of DRA among equids. *Immunogenetics*. 1996; 43: 315-317.
- 2) Andersson LS, Swinburne JE, Meadows JR, Broström H, Eriksson S, Fikse WF, Frey R, Sundquist M, Tseng CT, Mikko S, Lindgren G. The same ELA class II risk factors confer equine insect bite hypersensitivity in two distinct populations. *Immunogenetics*. 2012; 64: 201-208.
- 3) Ansari HA, Hediger R, Fries R, Stranzinger G. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex of the horse (ELA) by in situ hybridization. *Immunogenetics*. 1988; 28: 362-364.
- 4) Arbanasic H, Galov A, Salajpal K, Curik I. Diversity of equine major histocompatibility complex class II DRA locus in Posavina and Croatian Coldblood horse: a new polymorphism detected. *Ital J Anim Sci*. 2009; 8: 77-79.
- 5) Bailey E, Stormont C, Suzuki Y, Trommerhausen-Smith A. 1979. Linkage of loci controlling the alloantigens on red blood cells and lymphocytes in the horse. *Science* 204: 1317-1319.
- 6) Bailey E, Skow L, Bernoco D, DeValle A, Scavone MD, Bowling AT, Murray JD. Equine dinucleotide repeat loci LEX071 through LEX078. *Anim Genet*. 2000; 31:286-287.
- 7) Balasuriya UB, MacLachlan NJ. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004; 102: 107-129.
- 8) Barbis DP, Maher JK, Stanek J, Klaunberg BA, Antczak DF. Horse cDNA clones encoding two MHC class I genes. *Immunogenetics*. 1994; 40: 163.

- 9) Barrandeguy M. EVA outbreak in Argentina. *Equine Disease Quarterly*. 2010; 19: 3-4.
- 10) Bartee E, Mansouri M, Hovey Nerenberg BT, Gouveia K, Fruh K. Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins. *J Virol*. 2004; 78: 1109–1120.
- 11) Bland JM, Altman DG. Statistics notes: the odds ratio. *BMJ*. 2000; 320: 1468.
- 12) Blood DC, Radostits OM. Enfermedades causadas por virus y clamidias (II) Enfermedades víricas caracterizadas por síntomas respiratorios. En Blood DC, Radostits OM. *Medicina Veterinaria*. 7ma. Edición México DF, Ed McGraw-Hill Interamericana, 1992, p. 951-953.
- 13) Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 1993; 364: 33-39.
- 14) Brown JJ, Ollier WER, Thomson W, Matthews JB, Carter SD, Binns M, Pinchbeck G, Clegg PD. TNF- α SNP haplotype frequencies in equidae. *Tissue Antigens*. 2006; 67: 377-382.
- 15) Brown JJ, Thomson W, Clegg P, Eyre S, Kennedy LJ, Matthews J, Carter S, Ollier WER. Polymorphisms of the equine major histocompatibility complex class II DRA locus. *Tissue Antigens*. 2004; 64: 173–179.
- 16) Carpenter S, Baker JM, Bacon SJ, Hopman T, Maher J, Ellis SA, Antczak DF. Molecular and functional characterization of genes encoding horse MHC class I antigens. *Immunogenetics*. 2001; 53: 802-809.

- 17) Carter GR, Wise DJ. Arteriviridae. En: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter GR, Wise DJ, Flores EF. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 8-Sep-2006; A3425.0906
- 18) Castillo-Olivares J, Tearle JP, Montesso F, Westcott D, Kydd JH, Davis-Poynter NJ, Hannant D. Detection of equine arteritis virus (EAV)-specific cytotoxic CD8+ T lymphocyte precursors from EAV-infected ponies. *J Gen Virol*. 2003; 84: 2745-2753.
- 19) Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*. 1997; 22: 550-553.
- 20) Clementi M, Di Gianantonio E. Genetic susceptibility to infectious diseases. *Reprod Toxicol*. 2006; 21: 345-349.
- 21) de Groot N, Doxiadis GG, De Groot NG, Otting N, Heijmans C, Rouweler AJ, Bontrop RE. Genetic makeup of the DR region in rhesus macaques: gene content, transcripts, and pseudogenes. *J Immunol*. 2004; 172: 6152-6157.
- 22) de Kossodo S, Grau GE, Danevaj T, Pointaire P, Fossati L, Ody C, Zapf J, Piguet PF, Gaillard RC, Vassalli P. Tumor Necrosis Factor alpha Is Involved in Mouse Growth and Lymphoid Tissue Development. *J Exp Med*. 1992; 176: 1259-1264.
- 23) de Vries RR, Fat RE, Nijenhuis LE, van Rood JJ. HLA-linked genetic control of host response to *Mycobacterium leprae*. *Lancet* 1976; 2: 1328-1330
- 24) Del Piero F. Equine Viral Arteritis. *Vet Pathol*. 2000; 37: 287-296.
- 25) Díaz S, Giovambattista G, Dulout FN, Peral-García P. Genetic variation of the second exon of ELA-DRB genes in Argentine Creole horses. *Anim Genet*. 2001; 32: 257-263.
- 26) Díaz S, Echeverría MG, It V, Posik DM, Rogberg-Muñoz A, Pena NL, Peral García P, Vega-Pla JL, Giovambattista G. Development of an ELA-DRA gene typing method

- based on pyrosequencing technology. *Tissue Antigens*. 2008; 72: 464–468.
- 27) Díaz S, Ripoli MV, Peral-García P, Giovambattista G. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. En Giovambattista G, Peral Garcia P. *Genética de animales domésticos*. Buenos Aires, Argentina. Ed Intemédica, 2005, p 157-177.
- 28) Echeverría MG, Díaz S, Metz GE, Serena MS, Panei CJ, Nosetto EO. Genetic typing of Equine Arteritis Virus isolates from Argentina. *Virus Genes*. 2007; 35: 313-320.
- 29) Echeverría MG, Pecoraro MR, Galosi CM, Etcheverrigaray ME, Nosetto EO. The first isolation of equine arteritis virus in Argentina. *Rev Sci Tech*. 2003; 22: 1029-1033.
- 30) Ellis SA, Martin AJ, Holmes EC, Morrison WI. At least four MHC class I genes are transcribed in the horse: phylogenetic analysis suggests an unusual evolutionary history for the MHC in this species. *Eur J Immunogenet*. 1995; 22: 249-260.
- 31) Ellis SA, Ballingall KT. Cattle MHC: evolution in action? *Immunol Rev*. 1999; 167: 159-168.
- 32) Excoffier L, Slatkin M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 171-180.
- 33) Fraser DG, Bailey E. Demonstration of three DRB loci in a domestic horse family. *Immunogenetics*. 1996; 44: 441-445.
- 34) Fraser DG, Bailey E. Polymorphism and multiple loci for the horse DQA gene. *Immunogenetics*. 1998; 47: 487-490.
- 35) Gustafson Seabury A. Physical mapping and characterization of the equine lymphocyte antigen (ELA) complex. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy. Texas A&M University. 2005.

- 36) Hedrick PW, Parker KM, Miller EL, Miller PS. Major histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. *Genetics*. 1999; 152: 1701-1710.
- 37) Hill AVS. Genetics and genomics of infectious disease susceptibility. *Br Med Bull*. 1999; 55: 401-413.
- 38) Hill AVS. Host Genetics of Infectious Diseases: Old and New Approaches Converge. *Emerging Infectious Diseases*. 1998; 4: 695-697
- 39) Horin P, Matiasovic J. A second locus and new alleles in the major histocompatibility complex class II (ELA-DQB) region in the horse. *Anim Genet*. 2002; 33:196-200.
- 40) Horin P, Smola J, Matiasovic J, Vyskocil M, Lukeszova L, Tomanova K, Kralik P, Glasnak V, Schroffelova D, Knoll A, Sedlinska M, Krenkova L, Jahn P. Polymorphisms in equine immune response genes and their associations with infections. *Mamm Genome*. 2004; 15: 843-850.
- 41) Hraber P, Kuiken C, Yusim K. Evidence for human leukocyte antigen heterozygote advantage against hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2007; 46: 1713-1721.
- 42) Hughes AL, Hughes MK, Howell CY, Nei M. Natural selection at the class II major histocompatibility complex loci of mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994 346: 359-367.
- 43) Hughes AL, Nei M. Evolutionary relationships of the classes of major histocompatibility complex genes. *Immunogenetics*. 1993; 37: 337-346.
- 44) Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th. Ed. New York, USA, 2001.
- 45) Janova E, Matiasovic J, Vahala J, Vodicka R, Van Dyk E, Horin P. Polymorphism and selection in the major histocompatibility complex DRA and DQA genes in the family

- Equidae. *Immunogenetics*. 2009; 61: 513-527.
- 46) Kalemkerian PB, Metz GE, Peral-Garcia P, Echeverría MG, Giovambattista G, Díaz S. ELA-DRA polymorphisms are not associated with Equine Arteritis Virus infection in horses from Argentina. *Res Vet Sci*. 2012; 93: 1271-1273.
- 47) Kalemkerian PB, Metz GE, Peral-García P, Lopez-Gappa J, Echeverría MG, Giovambattista G, Díaz S. Eca20 microsatellite polymorphisms in equine viral arteritis-infected horses from 2011. *Tissue Antigens*. 2011; 78: 281-284.
- 48) Kamath PL, Getz WM. Adaptive molecular evolution of the Major Histocompatibility Complex genes, DRA and DQA, in the genus *Equus*. *BMC Evol Biol*. 2011; 18: 11:128.
- 49) Ksontini R, MacKay SLD, Moldawer LL. Revisiting the role of Tumor Necrosis Factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg*. 1998; 133: 558-567.
- 50) Klumplerova M, Vychodilova L, Bobrova O, Cvanova M, Futas J, Janova E, Vyskocil M, Vrtkova I, Putnova L, Dusek L, Marti E, Horin P. Major histocompatibility complex and other allergy-related candidate genes associated with insect bite hypersensitivity in Icelandic horses. *Mol Biol Rep*. 2013; 40: 3333-3340.
- 51) Lazary S, Antczak DF, Bailey E, Bell TK, Bernoco D, Byrns G, McClure JJ. Joint Report of the Fifth International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horse, Baton Rouge, Louisiana, 31 October-1 November 1987. *Anim Genet*. 1988; 19: 447-456.
- 52) Lindgren G, Breen M, Godard S, Bowling A, Murray J, Scavone M, Skow L, Sandberg K, Guérin G, Binns M, Ellegren H. Mapping of 13 horse genes by fluorescence in-situ hybridization (FISH) and somatic cell hybrid analysis. *Chromosome Res*. 2001; 9: 53-59.

- 53) Lindgren G, Sandberg K, Persson H, et al. A Primary Male Autosomal Linkage Map of the Horse Genome. *Genome Res.* 1998; 8: 951-966.
- 54) Luis C, Cothran EG, Oom MM, Bailey E. Major histocompatibility complex locus DRA polymorphism in the endangered Sorraia horse and related breeds. *J Anim Breed Genet.* 2005; 122: 69–72.
- 55) Makinen A, Chowdhary B, Mahdy E, Andersson L, Gustavsson I. Localization of the equine major histocompatibility complex (ELA) to chromosome 20 by in situ hybridization. *Hereditas* 1989; 110: 93-96.
- 56) Marti E, Szalai G, Antczak DF, Bailey E, Gerber H, Lazary S (1996) The equine major histocompatibility complex. En: Schook LB, Lamont SJ *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1996, pp 245-267
- 57) Matiasovic J, Lukeszova L, Horin P. Two bi-allelic single nucleotide polymorphisms within the promoter region of the horse tumour necrosis factor α gene. Blackwell Science Ltd, *Eur J Immunogenet.* 2002; 29: 285–286.
- 58) McCollum, W.H. Studies of passive immunity in foals to equine viral arteritis. *Vet Microbiol* 1976; 1: 45–54.
- 59) Meagher S, Potts WK. A microsatellite-based MHC genotyping system for house mice (*Musdomesticus*). *Hereditas.* 1997; 127: 75-82.
- 60) Metz GE, Serena MS, Martin Ocampos G, Panei CJ, Fernandez VL, Echeverría MG. Equine Arteritis Virus: A New Isolate From The Presumable First Carrier Stallion in Argentina And its genetic relationships among the four reported unique Argentinean strains. *Arch Virol.* 2008; 153: 2111-2115.

- 61) Moldawer LL. The Tumor Necrosis Factor Superfamily and Its Receptors. En: Paul WE Fundamental Immunology. 5th edition. Lippincott, Williams & Wilkins Publishers, 2003, p.1351-1395
- 62) Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mut Res.* 2005; 573: 54–69.
- 63) Nolan D, Gaudieri S, Mallal S. Host genetics and viral infections: immunology taught by viruses, virology taught by the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18: 413–421.
- 64) Noretto EO, Etcheverrigaray ME, Oliva GA, González ET. Arteritis viral equina: Detección de anticuerpos en equinos de la República Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1984; 31: 526-529.
- 65) Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science.* 1998; 281: 363-365.
- 66) Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 2001, 11: 3-11.
- 67) Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 2008; 8: 103-106.
- 68) Salas A, Carracedo A. Estudios de asociación en enfermedades complejas: problemas estadísticos relacionados con el análisis de polimorfismos genéticos. *Rev Clin Esp* 2007; 207: 563-565.
- 69) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989, pp 1626.
- 70) Sena L, Schneider MP, Brenig B, Honeycutt RL, Womack JE, Skow LC. Polymorphisms

in MHC-DRA and -DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Anim Genet.* 2003; 34: 1-10.

- 71) Singh SP, Mehra NK, Dingley HB, Pande JN, Vaidya MC. Human leukocyte antigen (HLA)-linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLA-DR types. *J Infect Dis.* 1983; 148: 676-681.
- 72) Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003; 73: 1162-1169.
- 73) Su XZ, Morris DD, McGraw RA. Cloning and characterization of gene TNF alpha encoding equine tumor necrosis factor alpha. *Gene.* 1991; 107: 319-321.
- 74) Szalai G, Antczak DF, Gerber H, Lazary S. Molecular cloning and characterization of horse DQA cDNA. *Immunogenetics.* 1994; 40: 458.
- 75) Tallmadge RL, Lear TL, Johnson AK, Guérin G, Millon LV, Carpenter SL, Antczak DF. Characterization of the beta2-microglobulin gene of the horse. *Immunogenetics.* 2003; 54: 725-733.
- 76) Takeshima S, Matsumoto Y, Chen J, Yoshida T, Mukoyama H, Aida Y. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by *Streptococci* and *Escherichia* species. *Tissue Antigens.* 2008; 72: 525-531.
- 77) Thursz M. Genetic susceptibility in infectious diseases. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2000; 17: 253-264.
- 78) Tizard IR. *Introducción a la Inmunología veterinaria*, 8ª edición. Elsevier, España, 2009, pp 17-21.

- 79) Tseng CT, Miller D, Cassano J, Bailey E, Antczak DF. Identification of equine major histocompatibility complex haplotypes using polymorphic microsatellites. *Anim Genet.* 2010, 41: 150-153.
- 80) van Wijk SJL, Timmers HTM. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J.* 2010; 24: 981–993.
- 81) Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet.* 1955; 19: 251-253.